

氏名	飯塚和彦 いいつかかずひこ
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第533号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Na ⁺ チャンネル遮断薬ピルジカイニドのイオンチャンネル増加作用の分子機構：リドカインとの比較
学位論文審査委員	(主査) 重政千秋 (副査) 大野耕策 久留一郎

学位論文の内容の要旨

Kv1.5 チャンネルは7回膜貫通型のK⁺チャンネルであり、心臓や内分泌の生理機能に重要な役割を持つ。心房細動により心房筋がリモデリングを起こすと Kv1.5 蛋白が減少し、心房細動の悪化を招くため、Kv1.5 蛋白を増加する作用を有する薬剤の探索が望まれる。これまでの研究から、Kv1.5 チャンネル蛋白はユビキチン・プロテアソーム系で分解されるため、プロテアソームを阻害して Kv1.5 蛋白を増加する薬剤が心房細動によるリモデリングの治療薬となり得る。Na⁺チャンネル遮断薬は芳香環とアミド結合を持ちプロテアソーム阻害薬に類似した構造を有するが、著者らはこれまでNa⁺チャンネル遮断薬 pilsicainide が Kv1.5 チャンネル蛋白を含む短い半減期を持つ蛋白の増加作用を有することを報告してきた。本研究はその詳細な機序を明らかにすることを目的として行った。

方法

FLAG で標識された p53、IKK2 および Kv1.5 をCOS7 細胞に遺伝子導入発現させ、抗 FLAG 抗体、抗ユビキチン化抗体を用いて immunoblot, 免疫沈降法、免疫染色法を行った。さらに FLAG-Kv1.5 ならびに GFP 発現ベクターを COS7 細胞に共発現させ、patch-clamp 法を用いて IKur を測定した。また一部の研究には培養ラット心房筋細胞を使用した。これらの実験系を用いて Na⁺ チャンネル遮断薬である lidocaine と pilsicainide を比較検討した。さらに simulation によるドッキング試験を用いて両薬剤のプロテアソーム抑制機序を構造学的に検討した。

結果

pilsicainide と lidocaine はユビキチン・プロテアソームで分解される p53 や IKK2 蛋白を増加させた。pilsicainide と lidocaine の蛋白安定化作用は、p53 の E3 リガーゼである Mdm2 の dominant negative でそのユビキチン・プロテアソーム系が遮断されると、発揮できなかった。pilsicainide と lidocaine は用量依

存性に20S プロテアソーム活性を抑制したが、Ca²⁺チャネル遮断薬である I-verapamil やK⁺チャネル遮断薬であるE-4031にはこの作用は認められなかった。pilsicainideとlidocaineは共に用量依存性にp53蛋白を安定化したが、pilsicainideはlidocaineに比較してより低い濃度でp53-FLAG蛋白を安定化した。一方、pilsicainideとlidocaineはプロテアソームで分解されるKv1.5チャネル蛋白を安定化して小胞体・ゴルジ体での発現を増加し、細胞膜での本チャネルがコードするIKur電流を増加した。この作用は培養細胞に発現されたKv1.5のみならずラット心房筋の内因性Kv1.5でも認められた。さらにKv1.5-FLAG蛋白の安定化の用量依存性の検討よりpilsicainideはlidocaineより低濃度で本作用を発揮することが判明した。pilsicainideとlidocaineはユビキチン・プロテアソーム系を抑制することで半減期の短い蛋白であるp53、IKK2やKv1.5蛋白を安定化することが明らかとなった。両薬剤のプロテアソーム阻害作用の分子機序はin silicoドッキング試験から、20Sプロテアソームを構成する $\beta 5$ subunitのペプチド結合部位に水素結合を介して結合し、その活性を抑制することが推測された。さらにpilsicainideがlidocaineに比較して結合性が高いことが再現できた。

考 察

プロテアソーム阻害薬に類似した構造を持つNa⁺チャネル遮断薬が、そのイオンチャネル阻害作用とは独立してプロテアソームを阻害することで、半減期の短い蛋白をクラス効果として増加させることから、これらの薬剤の作用は細胞増殖や細胞の生理学的機能に大きく影響することが示唆された。構造学的アプローチから、特にpilsicainideが臨床使用濃度で直接20Sプロテアソームの $\beta 5$ subunitに可逆的に結合しイオンチャネルを増加させるという知見は、慢性心房細動によるイオンチャネルの減少を回復させる可能性を示しており、新しい心房細動治療薬の開発につながる可能性がある。

結 論

Na⁺チャネル遮断薬は、その構造的特徴から、チャネル阻害と独立してプロテアソームを阻害することが判明した。この作用は、半減期の短い機能性蛋白の増加につながり、様々な細胞機能を修飾することが明らかとなった。特にそのイオンチャネル増加作用は、心房細動のリモデリング治療薬として期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はプロテアソーム阻害剤に類似した構造を有するNa⁺チャネル遮断薬のKv1.5チャネル蛋白の増加作用機序を明らかにし、臨床でよく用いられるpilsicainideとlidocaineの効果を比較検討したものである。その結果、両薬剤はプロテアソーム活性を抑制することでKv1.5蛋白を増加・安定化させ、特にpilsicainideはより低い濃度でKv1.5蛋白を安定化させることが判明した。ドッキング試験からpilsicainideがlidocaineに比較してプロテアソーム阻害部位への結合性が高いことが再現でき、pilsicainideのKv1.5蛋白増加作用の優位性が示された。本論文の内容は、pilsicainideが臨床使用濃度でプロテアソーム活性を抑制し、Kv1.5を含む半減期の短い蛋白を増加させる作用を発揮することを明らかにしたものである。

これらの結果から、pilsicainide が臨床使用濃度で心房細動時の電氣的リモデリングを改善し、心房細動の悪化防止に貢献する可能性を示したものであり、循環器内科学の分野で、明らかに学術水準を高めたものと認める。