

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域循環病態内科学教育研究分野 氏名 工藤 奈津美
(論文題目) Mutational analysis of β-arrestin in Japanese patients with coronary spastic angina (日本人冠攣縮性狭心症患者における β アレスチン遺伝子変異の解析)	
(内容の要旨) 【背景】 冠攣縮性狭心症 (CSA) は、冠動脈の器質的狭窄を伴わない狭心症発作を引き起こすだけでなく、心筋梗塞や心室性不整脈といった致死的心疾患の原因となり得る。臨床の場において CSA は重要な疾患であるが、そのメカニズムは未だ完全には解明されていない。CSA の発症には遺伝的要因が関与し、我々は冠攣縮に関連した遺伝子変異として phospholipase C- δ 1 (PLC- δ 1) 遺伝子のミスセンス変異 (Arg257His) を報告している。 今回研究対象とした β アレスチンは、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の脱感作を担う分子として発見されたが、近年、G タンパクとは別の独自の細胞内シグナル伝達経路においても重要な役割を担っていることが明らかになった。 β アレスチンは、アンジオテンシン II 受容体、エンドセリン受容体、 μ オピオイド受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体といったほとんど全ての GPCR に動員され、続いて下流のシグナル伝達が誘導される。また、 β アレスチンには、 β アレスチン 1 および 2 の 2 種類のサブタイプがあり、各々が独立して細胞内シグナル伝達を調整している。 β アレスチン 1 あるいは β アレスチン 2 をノックダウンさせたラット血管平滑筋細胞において、ミオシン軽鎖のリン酸化および平滑筋細胞の収縮性の低下が示唆されたと報告されている。さらに、気道平滑筋細胞において、 β アレスチン 1 のノックダウンは、メタコリン刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制し平滑筋細胞の収縮性が低下したと報告されている。これらの結果は、平滑筋細胞の筋収縮の調整に β アレスチンが関与することを示しているが、CSA の成因に関する β アレスチンの役割についてはほとんど報告されていない。本研究の目的は、日本人 CSA 患者における β アレスチン遺伝子変異の有無を検討し、 β アレスチンが CSA の成因として関与し得るかを明らかにすることである。	
【方法】 20 例の CSA 患者と狭心症既往のない 5 例の対照群を対象とした。CSA の診断は心臓カテーテル検査におけるアセチルコリン負荷試験や自然発作時の心電図変化によって行った。その後、 β アレスチン 1 において、50 例の CSA 患者と 50 例の対照群を対象として関連解析を行った。対象者の血液よりそれぞれ DNA を抽出し、 β アレスチン 1 と β アレスチン 2 のアミノ酸コード領域を直接シーケンス法により解析した。統計的有意性は、カイ二乗検定を用いて決定した。P 値<0.05 を統計学的に有意とし、統計ソフトウェアは JMP (version 13.0)を用いて解析した。	
【結果】 β アレスチン 1 遺伝子解析では、エクソン 5 領域 176 番目でヘテロ接合型の一塩基置	

換 (C→T) を認めた。この置換は CSA 患者 20 例のうち 2 例で検出され、5 例の対照群からは検出されなかった。続いて 50 例の CSA 患者と 50 例の対照群を対象とした関連解析では、CSA 患者 50 例のうち 11 例 (22%)、対照群 50 例のうち 8 例 (16%) で同様の一塩基置換が検出された。二群間において変異の出現率に差は認められなかった ($p=0.44$)。この一塩基置換は SNP (rs877711) として既に知られており、アミノ酸置換を伴わなかった (His111His、サイレント変異)。

β アレスチン 2 遺伝子解析では、エクソン 11 領域 61 番目の一塩基置換 (C→T) を認めた。この置換は CSA 患者 20 例中 13 例でホモ接合型、7 例でヘテロ接合型であった。対照群 5 例はすべてホモ接合型であった。この一塩基置換もまた SNP (rs1045280) として既に知られており、アミノ酸置換を伴わなかった (Ser280Ser、サイレント変異)。

【考察】

CSA の有病率やその特徴は日本人と欧米人で異なり、遺伝的要因が CSA の発症に関与することが示唆されている。冠攣縮は血管内皮細胞障害あるいは血管平滑筋細胞機能の亢進によって引き起こされる。一酸化窒素 (NO) は血管内皮細胞の endothelial NO synthase (eNOS) によって合成され、血管のトーン調整に重要な役割を果たしている。従って、eNOS の遺伝子変異は CSA の重要な成因とされている。eNOS 遺伝子の Glu298Asp 変異体や 5' 側非翻訳領域の -786T/C 多型は CSA 患者との有意な関連が示されている。血管平滑筋細胞に関して、我々は以前 PLC- $\delta 1$ 遺伝子の Arg257His 変異を同定し、PLC- $\delta 1$ 変異型蛋白過剰発現マウスにおいて冠攣縮が誘発されることを証明している。

β アレスチンは血管平滑筋細胞の筋収縮を調整すると報告されている。さらに、 β アレスチン 1 あるいは β アレスチン 2 の発現抑制は、ヒト大伏在静脈の内皮細胞における eNOS のリン酸化を阻害すると報告されている。

これらの報告から本研究では、 β アレスチンが CSA の成因に関与している可能性があるという仮説を立て、日本人 CSA 患者における β アレスチン遺伝子変異の有無を検討した。CSA 患者と対照群において、 β アレスチン 1、 β アレスチン 2 ともに一塩基置換を認めたが、両者ともアミノ酸置換は伴わず、またその発現率にも差は認められなかった。本研究において、 β アレスチンの一次構造は CSA の成因に必ずしも関与しないことが示された。しかしながら、 β アレスチンは血管平滑筋細胞や血管内皮細胞において様々な細胞内シグナル伝達の足場蛋白として作用するため、 β アレスチンの発現や機能評価といったさらなる研究が今後必要である。

【結論】

本研究では、日本人 CSA 患者で β アレスチン 1 および β アレスチン 2 の有意な遺伝子変異は検出されなかった。 β アレスチンの一次構造は日本人における CSA の成因に必ずしも関与しないことが示された。