







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第693号	氏名	Wei, Mengyan
審査委員会委員		主査氏名	高橋尚彦 
		副査氏名	沢井博文 
		副査氏名	加来信久 
<p>論文題目</p> <p>Electrophysiological evaluation of an anticancer drug gemcitabine on cardiotoxicity revealing down-regulation and modification of the activation gating properties in the human rapid delayed rectifier potassium channel (抗腫瘍薬ゲムシタピンがヒト急速活性化遅延整流カリウムチャネルの活性化ゲーティング特性の修飾と同チャネル発現の抑制によって心毒性を示すことを明らかにした電気生理学的研究)</p> <p>論文掲載雑誌名 PLOS ONE</p> <p>論文要旨</p> <p>Gemcitabine is an antineoplastic drug commonly used in the treatment of several types of cancers including pancreatic cancer and non-small cell lung cancer. Although gemcitabine-induced cardiotoxicity is widely recognized, the exact mechanism of cardiac dysfunction causing arrhythmias remains unclear. The objective of this study was to electrophysiologically evaluate the proarrhythmic cardiotoxicity of gemcitabine focusing on the human rapid delayed rectifier potassium channel, hERG channel. In heterologous hERG expressing HEK293 cells (hERG-HEK cells), hERG channel current (I_{hERG}) was reduced by gemcitabine when applied for 24 h but not immediately after the application. Gemcitabine modified the activation gating properties of the hERG channel toward the hyperpolarization direction, while inactivation, deactivation or reactivation gating properties were unaffected by gemcitabine. When gemcitabine was applied to hERG-HEK cells in combined with tunicamycin, an inhibitor of N-acetylglucosamine phosphotransferase, gemcitabine was unable to reduce I_{hERG} or shift the activation properties toward the hyperpolarization direction. While a mannosidase I inhibitor kifunensine alone reduced I_{hERG} and the reduction was even larger in combined with gemcitabine, kifunensine was without effect on I_{hERG} when hERG-HEK cells were pretreated with gemcitabine for 24 h. In addition, gemcitabine down-regulated fluorescence intensity for hERG potassium channel protein in rat neonatal cardiomyocyte, although hERG mRNA was unchanged. Our results suggest the possible mechanism of arrhythmias caused by gemcitabine revealing a down-regulation of I_{hERG} through the post-translational glycosylation disruption possibly at the early phase of hERG channel glycosylation in the endoplasmic reticulum that alters the electrical excitability of cells.</p> <p>本研究は、ゲムシタピンが、急速活性化遅延整流カリウムチャネルの活性化ゲーティング特性を修飾し、同チャネル発現の抑制、および電流抑制をもたらすことを示した。学術的にも意義あるものと考えられ、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第693号	氏名	Wei, Mengyan
審査委員会委員	主査氏名	高橋尚彦	
	副査氏名	穴井博文	
	副査氏名	加来信宏	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 今回の研究では、ゲムシタピンのhERGチャネル電流への影響を検討している。他のイオンチャネル(Naチャネル、Caチャネル、他のKチャネルなど)に対するゲムシタピンの効果について報告はあるか。 急速遅延整流カリウムチャネル電流(IKr)は、新生児ラットやマウスの心筋細胞では電流密度が非常に低いとのことだが、ヒトの心筋細胞ではどのような電流密度なのか。 Figure 1では、ゲムシタピンを24時間投与するとhERGチャネル電流(IhERG)が減少している。なぜ24時間を選んだのか。例えば、6時間、12時間、48時間など他の時間は試さなかったのか。 Figure 10では、ゲムシタピンは、ラット新生児心筋細胞のhERGカリウムチャネルタンパク質の蛍光強度を低下させたが、hERG mRNAは変化しなかったとなっている。この整合性をどう説明するのか。 Figure 9では、ゲムシタピンは、IKr電流密度を減少させた。しかし、活動電位波形および活動電位持続時間は、ゲムシタピンによって変化しなかった。この不一致をどのように説明するのか。 ゲムシタピンによるQT間隔延長が心房細動リスクを高めるメカニズムをもう1度説明せよ。 hERG-HBK cellにはhERGチャネル以外のNaチャネルや、Caチャネルは発現していないのか。 ゲムシタピンはhERGチャネルを直接抑制しているのか、hERGチャネルの発現を抑制しているのか。両方なのか。 ゲムシタピンの使用において、実臨床では間質性肺炎や骨髄抑制が主な副作用であるが、稀な不整脈に着目したのは何故か。 本研究は whole lysate(細胞全体)のwestern blottingが行われている。糖化修飾に対するゲムシタピンの影響を明らかにするためには、細胞膜と細胞質に分けて、western blottingを行うべきではなかったか。 Figure 10のAからEで示されているように、本研究では、分子量の違いで糖化修飾の完全性を評価している。しかし、分子量の違いは、糖化修飾を直接的に評価した結果ではない。細胞の糖化修飾を真に検証するためには、どのような方法があるのか。また、なぜそれを行わなかったのか。 Figure 10のFにおいて、hERGの赤がDAPIの青と重なってみえる。hERGはmRNAの後、細胞質で翻訳と成熟のために修飾を受けるが、本図では、hERGはむしろ核(DAPI)と一致している印象がある。hERGが細胞質や細胞膜表面に位置していないのは何故か。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Wei, Mengyan

論 文 題 目

Electrophysiological evaluation of an anticancer drug gemcitabine on cardiotoxicity revealing down-regulation and modification of the activation gating properties in the human rapid delayed rectifier potassium channel

(抗腫瘍薬ゲムシタビンがヒト急速活性化遅延整流カリウムチャネルの活性化ゲーティング特性の修飾と同チャネル発現の抑制によって心毒性を示すことを明らかにした電気生理学的研究)

要 旨

【Introduction and purpose】 Gemcitabine is an antineoplastic drug commonly used in the treatment of several types of cancers. Although gemcitabine-induced cardiotoxicity is widely recognized, the exact mechanism of causing arrhythmias remains unclear. The objective of this study was to evaluate the proarrhythmic cardiotoxicity of gemcitabine focusing on the human rapid delayed rectifier potassium (hERG) channel.

【Methods】 The human embryonic kidney 293 (HEK293) cells stably expressing the hERG channel (hERG-HEK cells) were examined for the purpose of hERG channel current (I_{hERG}) recordings by use of the voltage-clamp technique. Neonatal rat ventricular myocytes were prepared from 1- to 2-day-old Wistar rats for the molecular biological studies. I_{hERG} was recorded by whole-cell patch clamp using an EPC-9 amplifier. For analysis of the conductance-voltage relationship or I_{hERG} -membrane potential relationship, activation, inactivation, deactivation and reactivation

gating properties, distinct pulse protocols were applied as shown in the each experimental methods. Real-time PCR, western blotting and immunocytochemistry were applied for the evaluation of hERG channel expression and distribution in cardiomyocytes.

【Results】 In heterologous hERG expressing HEK293 cells, gemcitabine reduced I_{hERG} and modified the activation gating properties of the hERG channel toward the hyperpolarization direction, while inactivation, deactivation or reactivation gating properties were unaffected when applied for 24 h. Gemcitabine was unable to reduce I_{hERG} or shift the activation properties when gemcitabine was applied with tunicamycin, an inhibitor of the transfer of N-acetylglucosamine 1-phosphate to dolichol monophosphate. Kifunensine, a specific class I mannosidase inhibitor, was without effect on I_{hERG} when hERG-HEK cells were pretreated with gemcitabine for 24 h. In addition, gemcitabine down-regulated fluorescence intensity for hERG potassium channel protein in rat neonatal cardiomyocyte, although hERG mRNA was unchanged.

【Conclusions and Implications】 Our study revealed that the long-term application of gemcitabine reduces I_{hERG} possibly through the inhibition of asparagine-linked glycosylation of the channel, which may explain the hitherto unknown pharmacological mechanism of gemcitabine to cause QT prolongation in ECG. Furthermore, excessive reduction of I_{hERG} by gemcitabine in cardiomyocytes may account for supraventricular arrhythmogenicity of this drug as documented in clinical reports.