

令和元年6月3日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10078

研究課題名(和文) 不整脈疾患に対する小胞体ストレス制御の検討

研究課題名(英文) Examination of the endoplasmic reticulum stress control for the arrhythmia disease.

研究代表者

古谷 道子 (FURUTANI, MICHIKO)

東京女子医科大学・医学部・研究生

研究者番号：40398805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体内に不良タンパク質が蓄積すると細胞が障害される「小胞体ストレス」が、多くの疾患の原因として注目を集めている。本研究では、QT延長症候群の成因蛋白である心筋チャネルに対する小胞体ストレスを引き起こす因子の検討を行った。心筋のNa⁺チャネル遺伝子であるSCN5A (Nav1.5) 遺伝子の変異型(R1623Q)のチャネル蛋白を発現させた細胞株を作成した。野生型と変異型のそれぞれの細胞株を用い、エストロゲン、プロゲステロン等を添加した前後にパッチクランプを行い、発現電流の変化を検討した。変異型ヒトNav1.5チャネルにプロゲステロンを投与した後のみ、発現電流のピーク値抑制傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不整脈疾患の多くが、心筋のチャネル蛋白の異常により生じている。特に、QT延長症候群の約10%は心停止が初発症状でもあるという点からも、予知と予防が極めて重要である。不整脈疾患における小胞体ストレスに関する研究は、国内外とも少ない。不整脈疾患における小胞体ストレスの制御が可能であれば、新たな予防法、治療法の開発などにつながる。本研究の成果は、無症候性の不整脈疾患発症の予防、治療を行う上での一つの指標となることが期待される。今後、今回得られた結果がいかにか小胞体ストレスにより引き起こされたか等の詳細な検討を行い、不整脈疾患の新しい発症予防法や治療法の創出につなげることが必要である。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been focusing "endoplasmic reticulum stress", accumulation of immature and unfolding protein in the endoplasmic reticulum leads injure of cells and could be cause of many diseases. In this study, we examined factors that cause endoplasmic reticulum stress for the cardiac muscle channel, which is the protein responsible for the long QT syndrome. We established the stable cell line expressing R1623Q of the SCN5A (Nav1.5) mutant protein which was a myocardial Na⁺ channel gene. Using each stable cell line, we performed patch-clamp recordings in before and after adding estrogen, progesterone, fexofenadine and resveratrol, and confirm the change of the expression electric current. We found that only in mutant human Nav1.5 channel following the administration of the progesterone, the peak value tends to suppress the expression electric current.

研究分野：分子生物学

キーワード：Nav1.5チャネル 小胞体ストレス QT延長症候群 ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性不整脈疾患には、QT 延長症候群 (LQTS)、Brugada 症候群、QT 短縮症候群 (SQTS)、家族性心房細動などが含まれる。疾患遺伝子として心筋 K^+ チャンネルである *KCNQ1*、*KCNH2* や心筋 Na^+ チャンネルである *SCN5A* など 27 種類の遺伝子が現在までに報告されている。

日本では、小児で、1,200 人に 1 人に心電図上 QT 延長が認められ、そのうち LQTS を発症するのは、約 20% である。また、まれではあるが、Brugada 症候群も報告があり、発作や突然死を予防するために、抗不整脈薬治療、ペースメーカー治療、埋込み型除細動器などの非薬物療法がおこなわれているが、約 2 割の患者において発作の予防ができていない。また、遺伝子解析の結果、遺伝子異常が認められるが症状がない Genotype-positive/phenotype-negative は、全体の 50~80% 存在し、無症候性 LQTS に対する発症の予防法、治療法は、臨床上重要な問題となっているが、いまだに解決されていない。

我々は、心筋 K^+ チャンネル HERG (*KCNH2*) の trafficking 異常が QT 延長症候群の原因の一因であることを、世界で初めて報告し⁽¹⁾、trafficking 異常が不整脈疾患発症の主な原因であることを証明した。その後、国内外において、trafficking 異常を改善させるなど、変異特異的に有効な薬剤の選別研究は行われているが、未だ有効な薬剤の報告はない。

小胞体ストレスとは、異常なタンパク質が、その合成の場である細胞内小器官 (小胞体) の内部に蓄積してしまう状態のことで、単細胞生物から高等ほ乳動物まで存在する現象である。最近、小胞体ストレスは、心血管疾患でも、心不全、虚血性心疾患、糖尿病性心筋症、アテローム性動脈硬化症などのさまざまな疾患に関与すると考えられている。しかし、その発症のメカニズムはほとんど明らかになっていない。

チャンネルタンパクは、小胞体 (ER) で合成され、末端がゴルジ体においてグリコシル化される。このグリコシル化はタンパク質の成熟と trafficking のために重要であり、この再構築が trafficking 異常に関与している可能性が報告されている⁽²⁾。

プロゲステロンは、女性の月経周期、妊娠、および胚形成に関与する重要なステロイドホルモンであるが、最近、プロゲステロンが妊娠後期にレベルが非常に高いことにより、小胞体ストレスが起り、QT 延長などの不整脈を引き起こしている可能性が示された⁽³⁾。女性の月経周期、妊娠期に不整脈が認められる症例が多くあるが、この現象は、この小胞体ストレスがその起因となっている可能性がある。

また、レスベラトロールはポリフェノールの一種で、心血管関連疾患の予防効果が期待されている。マウスなどのモデル生物・実験動物を用いた研究では、寿命延長、抗炎症、抗癌、血糖降下などの効果が報告されている。最近、このレスベラトロールは小胞体ストレスの改善に有効である可能性が示された⁽⁴⁾。

以上のことより、少なくとも HERG、Nav1.5 チャンネルにおいて、小胞体ストレスがチャンネル機能異常を引き起こしていることが考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、LQTSの主たる成因蛋白である心筋のNa⁺チャンネルに対する、小胞体ストレスを引き起こす因子の検討および、それを回復させる可能性について検討し、不整脈疾患の新しい発症予防法や治療法の創出につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

不整脈疾患遺伝子である *SCN5A* (Na⁺チャンネル(Nav1.5)) の心筋チャンネルに着目し、不整脈患者で認められた *SCN5A* 異常と同じ変異型チャンネルにおける小胞体ストレスの検討をバッチクラウン法を用いて解析した。

(1) 哺乳類細胞発現コンストラクトの作製: pET19b プラスミドに挿入されているヒト *SCN5A* 遺伝子のコード領域 cDNA に対して c. 4868g>a (p.Arg1623Gln) 変異を、QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit を用い PCR により導入した。野生型とこの変異を持つ *SCN5A* cDNA (5' に FLAG タグ入り) を、哺乳類細胞発現用プラスミド (pSF-CMV-Ub-hygromycin) にサブクローニングし、挿入 *SCN5A* cDNA の塩基配列をシークエンス法により確認した。

(2) 293T 細胞にコンストラクトを導入: 遺伝子導入の前日に、12 well プレートに 293T 細胞を当日 90% 密度程度になるように蒔いた。プラスミド DNA 1.6 μg を Opti-MEM 100 μL に、またリポフェクタミン 2000, 4 μL を Opti-MEM 100 μL に懸濁し、混和して DNA-リポフェクタミン複合体を調製し、細胞培地へ添加して遺伝子導入した。遺伝子導入後 2 日間、抗生剤を加えずに 37 °C, 5%CO₂ 環境で培養した後、10 cm 培養用プレートに導入 293T 細胞を継代した。100 μg/mL ハイグロマイシンを含む 10% FBS DMEM 培地 (1x 非必須アミノ酸ミックス, 1x ペニシリン-ストレプトマイシン) でコロニー選択を実施した。生育したコロニーを個別に 96 well プレートに播種し培養した。コピーの 96 well プレートを作製し、1 プレートは細胞保存用、1 プレートを免疫染色用として培養した。

(3) 免疫染色と蛍光顕微鏡撮影: 免疫染色用の 96 well プレートの細胞層から培地を除き、PBS 100 μL/well で 1 回洗浄し、100%メタノールで固定した。TBST 150 μL で well を 1 回洗浄し、3% BSA/TBST 100 μL/well でブロッキングした。一次抗体 (抗 FLAG mouse mAb, 0.05 μL/1% BSA/TBST 50 μL/well) 室温 1 時間、TBST 150 μL で well を 2 回洗浄し、二次抗体 (抗 mouse-IgG-Cy3, 0.05 μL/1% BSA/TBST 50 μL/well) 室温 1 時間、TBST 150 μL で well を 2 回洗浄し、TBST 100 μL/well を添加した。蛍光顕微鏡 (BZX 710, キイエンズ) を用いて免疫蛍光染色された細胞を観察し、Nav1.5 発現のよいクローンをスクリーニングした。残しておいた対応する 96 well プレートから高発現細胞を 6 well プレートへ継代した。選別した細胞をセルバンカー細胞凍結保存液 (Takara) により凍結保存した。

(4) ウェスタンブロット (WB) 法による全長 Nav1.5 発現クローンの探索: 免疫染色により選別し、増やした細胞を PBS 1 mL で洗浄し、可溶化液 (10 mM Tris, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 1x プロテアーゼ阻害剤カクテル, Sigma-Aldrich) を 1 well あたり 0.1 mL 加えて細胞を可溶化して 1.5 mL チューブに回収した。氷上 30 分間放置後膜蛋白質を抽出し、

15,000 rpm x 10 分間 4 で遠心分離し上清を得た。上清のタンパク質濃度を、BSA を標準として測定し、2-5 µg タンパク質/µL になるように 1-thioglycerol を含む 6x サンプル 液を添加し 37 °C 1 時間加温処理して電気泳動用試料とした。4-12% NuPAGE ゲル と 1x MOPS 電気泳動用緩衝液を用いて泳動し、PVDF メンブレン(0.45 µm)にブロッティングした。プロットを 5% スキンミルク/TBST によりブロッキング後、一次抗体(抗 FLAG, マウスモノクローナル抗体)室温 1 時間、TBST 洗浄 3 回、二次抗体(抗 mouse IgG-HRP)室温 1 時間、TBST 洗浄 3 回、化学発光(イムノスターLD, Wako)により検出した。細胞の免疫染色と WB の結果を考慮して、電気生理実験用の細胞を選択した。選別した細胞をセルバンカー細胞凍結保存液により凍結保存した。

(5) Na チャネル発現 293T 細胞を用いたオートパッチクランプ実験

凍結保存 293T 細胞をパッチクランプ実験用に準備：パッチクランプ実験予定日の 7 日前に、-80 °C フリーザー保存の Nav1.5 発現 293T 細胞のチューブを 30 秒程度 37 °C で加温、温めた 1 mL 10% FBS D-MEM 培地を保存チューブに添加し、細胞を懸濁した。これを 10 mL 10% FBS D-MEM 培地の入った 15 mL コニカルチューブに添加し、遠心分離(1,200 rpm, 3 分間)により上清を除き細胞塊とした。この細胞を懸濁して細胞培養用 10 cm プレートに播種し(1 プレートあたり 15 mL 10% FBS D-MEM 培地, 100 µg/mL hygromycin), 37 °C, 5%CO₂ 環境で培養した。パッチクランプ実験当日に 70-90% コンフルエンス細胞生育状態が望ましいので、実験日の 2 日前にほぼ 100%コンフルエンス細胞生育状態の 10 cm プレートの 10%分を、コラーゲンコート培養プレート(MS-0390K, セルタイト C-1 シャーレ)に播種し培養した。

オートパッチクランプ実験：培養プレートから培地を除き、ハンス緩衝液(HBSS, カルシウム・マグネシウム含まず)を用いて細胞層を穏やかに洗い、冷 1x TrypLE Express により細胞を剥離し、OptiMEM と HBSS を用いて懸濁した。この細胞懸濁液を用いて、Syncropatch 384 PE システム(Nanon Technologies)により Whole cell パッチクランプ実験を行った。外液組成は、in mM: TEA 3.5, NaCl 135, KCl 4, CaCl₂ 3.5, HEPES 10, and glucose 10 (pH 7.4)、内液組成は、in mM: CsF 110, CsCl 10, NaCl 10, HEPES 10, and EGTA 10 (pH 7.2)であった。

不整脈疾患患者に認められる発作誘発のリスク因子と考えられる、薬剤、ホルモンによる Nav1.5 チャネルにおける小胞体ストレスの検討をパッチクランプ法を用いて解析した。

野生型および変異型 Nav1.5 チャネルの安定細胞株(Stable cell line)に、小胞体ストレスを引き起こす可能性がある薬剤(エストロゲン 100 µM、プロゲステロン 100 µM、フェキソフェナジン 200 µM、レスベラトロール 100 µM)をそれぞれ添加し、発現電流の変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 変異型 SCN5A (Na⁺チャネル、Nav1.5) の小胞体ストレスの検討

心筋の Na⁺チャネル遺伝子である、SCN5A (Nav1.5)遺伝子に、R1623Q (g4868 a, CGA CAA) を導入した変異型発現ベクターを、293T 細胞に導入した細胞を用いて、R1623Q 変異型ヒト Nav1.5 チャネルの、安定細胞株(Stable cell line)を作成した。この安定した細胞株(Stable cell line)を用いて、野生型(WT)と変異型(R1623Q)の細胞でパッチクランプを行った。そ

の結果、変異型 (R1623Q) Nav1.5 チャンネルにおいて、発現電流の減少が認められた。

(2) Nav1.5 チャンネルにおける小胞体ストレスを増悪、改善する薬剤、因子の検討

この安定した細胞株 (Stable cell line) を用いて、野生型 (WT) と変異型 (R1623Q) の細胞のパッチクランプを行い、それぞれに小胞体ストレスを増悪、改善する可能性が考えられる薬剤 (フェキソフェナジン、レスベラトロール、エストロゲン、プロゲステロン) 添加した。薬剤添加の前後でパッチクランプを行い、発現電流の変化を確認する実験を行った。

その結果、変異型 (R1623Q) Nav1.5 チャンネルにプロゲステロンを添加した後に、発現電流の減少が有意に認められたが、野生型 (WT) Nav1.5 チャンネルにプロゲステロンを添加したものでは、変化は認められなかった。フェキソフェナジン、レスベラトロール、エストロゲンを添加した野生型 (WT) と変異型 (R1623Q) Nav1.5 チャンネルでは、その前後で電流のピーク抑制傾向や開放促進傾向は認められなかった (表 , 図)。

添加物 (濃度)	電流密度 (pA/pF) < 平均値 ± 標準誤差 >					
	Nav1.5-WT			Nav1.5 R1623Q		
	添加前	添加後	p値	添加前	添加後	p値
エストロゲン (100 μ M)	-141.0 ± 23.1	-128.2 ± 17.0	0.1082	-66.1 ± 28.2	-75.6 ± 25.8	0.5625
プロゲステロン (100 μ M)	-152.8 ± 21.0	-153.3 ± 20.8	0.2598	-126.9 ± 25.3	-103.9 ± 19.3	0.0156*
フェキソフェナジン (200 μ M)	-136.2 ± 19.4	-155.3 ± 22.2	0.7726	-53.5 ± 33.9	-54.4 ± 34.2	0.3438
レスベラトロール (100 μ M)	-109.7 ± 19.5	-141.4 ± 33.7	0.7871	-71.8 ± 23.8	-73.1 ± 18.3	0.3672

表 野生型 (WT) および変異型 (R1623Q) Nav1.5 チャンネルにおける薬剤の影響

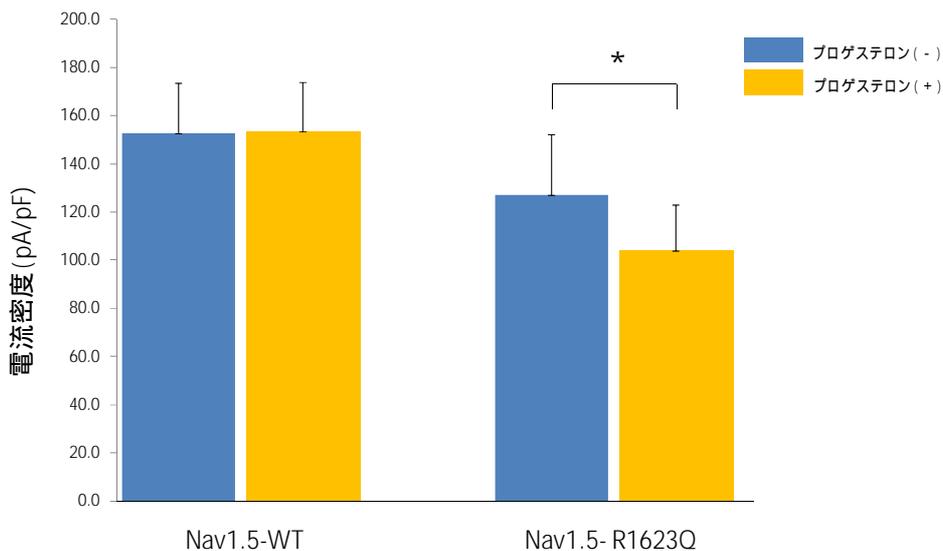


図 プロゲステロンによる変異型 (R1623Q) Nav1.5 の電流密度の抑制

今回の研究により、変異型 (R1623Q) Nav1.5 チャンネルに小胞体ストレスを引き起こすリスク因子としてプロゲステロンが考えられた。女性の月経周期、妊娠、および胚形成に關与する重要なステロイドホルモンであるプロゲステロンが小胞体ストレスを起こし、QT延長などの不整脈を引き起こしている可能性の報告がある。今回、野生型 Nav1.5 チャンネルでプロゲステロンによる電流密度の変化は認められないことから、遺伝子異常が認められるが症状がない無症候性 LQTS にのみ生じる現象とも考えられる。女性の月経周期、妊娠期に不整脈が認められる症例

が多くあるが、この小胞体ストレスがその起因となっている可能性がある。今後、この小胞体ストレス状態を緩和する因子の有無、および抗不整脈作用の可能性を検討することで、発症予防、治療に貢献すると考えられる。

参考文献

(1) Furutani M, et al. Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation*. 1999 May 4;99(17):2290-4.

(2) Varadarajan S1, et al. A novel cellular stress response characterised by a rapid reorganisation of membranes of the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*. 2012 Dec;19(12):1896-907. doi: 10.1038/cdd.2012.108. Epub 2012 Sep 7.

(3) Wu ZY1, et al. Progesterone impairs human ether-a-go-go-related gene (HERG) trafficking by disruption of intracellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem*. 2011 Jun 24;286(25):22186-94. doi: 10.1074/jbc.M110.198853. Epub 2011 Apr 27.

(4) Zhao X1, et al. The rescuable function and mechanism of resveratrol on As₂O₃-induced hERG K⁺ channel deficiency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014 Nov;387(11):1079-89. doi: 10.1007/s00210-014-1019-8. Epub 2014 Aug 10.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中西 敏雄

ローマ字氏名：NAKANISHI TOSHIO

所属研究機関名：公益財団法人日本心臓血圧研究振興会（臨床研究施設・研究部門）

部局名：国際分子細胞免疫研究センター

職名：施設長

研究者番号（8桁）：90120013

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。