

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590810
 研究課題名（和文） 病態下心筋KチャンネルIK_sベータサブユニットが不整脈発生、薬物治療に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Modulation of IK_s β subunit on arrhythmogenesis or drug treatment in diseased hearts
 研究代表者
 丹羽 良子 (NIWA RYOKO)
 名古屋大学・環境医学研究所・研究員
 研究者番号：00216467

研究成果の概要：

病態心では、βサブユニットKCNE1遺伝子を介してIK_s電流が修飾され不整脈の発生様式や抗不整脈薬の効果に影響すると推察されるが、この点の報告はない。我々は、KCNE1の発現増大が、IK_s電流量、活動電位持続時間、心電図波形、不整脈の発生様式に及ぼす影響を解析した。その結果、①IK_sは減少、②IK_rの寄与率が相対的に高まる、③IK_rブロッカーの効果が高まる、④APD延長の逆頻度依存性が増す、ことを明かにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心筋Kチャンネルの一種であるIK_sのβサブユニットKCNE1遺伝子は、心不全や心筋梗塞など心臓の病態で発現レベルが修飾されることが相次いで報告されている。一般的に、イオンチャンネルのβサブユニットは、イオンを透過するαサブユニットの開閉機構を修飾してイオンチャンネルの活動性を調節する。中でも、心筋IK_s電流のβ

サブユニットであるKCNE1は膜電位や時間依存性に多大な影響を与えることが知られており、同αサブユニットKCNQ1チャンネルの活性化を著しく遅延させると同時にコンダクタンスを数倍以上増加させる。したがって、心臓の病態下では、KCNE1遺伝子の発現レベルに応じてIK_s電流が変化し、不整脈治療薬に対する感受性、心電図QT時間などを変化させ、不整脈の発生

や予防に関して影響を及ぼすことが容易に推察される。しかしながら、未だそのような報告はない。その原因は、これらの点を解明するには、チャンネル構造・機能関連、薬物作用の3次元的分子機序、心電図学への造詣、シミュレーション、不整脈モデルなど、異なる階層の知識や実験システムが必要であり、我々のように実行できる研究グループが極めて少ないからである。

2. 研究の目的

病態下を想定し、IKs 電流を構成する α サブユニット(KCNQ1)に対する β サブユニット(KCNE1)の発現比の変化が、(1)抗不整脈薬の力価に及ぼす影響、(2)心電図に対する影響、(3)不整脈発生に対する関与を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) β サブユニット(KCNE1)が IKs、APD、心電図に及ぼす影響のシミュレーション

①遺伝子発現実験
KCNQ1 及び KCNE1 遺伝子を一定量で発現させた場合の IKs チャンネルの特性を計測するため、遺伝子発現実験を行う。遺伝子を注入した卵母細胞を遺伝子注入後 1~2 日間おき、膜電位固定法による IKs 電流の過渡応答特性を計測する実験を行う。膜電位は -90 mV に固定して安定させた後、あらかじめ設定した電位 (-60 mV から 40 mV まで 10 mV 間隔) まで瞬時に上昇させ、上昇後 7.5 sec の間膜電位を固定する。その後膜電位を -80 mV まで低下させ、再分極時の IKs 電流の過渡応答を計測する。試料温度は 35°C に固定する。

②遺伝子発現実験結果の解析

実験より求められた IKs チャンネルのコンダクタンス G_{Ks} の過渡応答より、IKs チャンネルの特性を同定した。Luo-Rudy model では、哺乳類の心筋細胞に対して膜電位固定法による実験を行った場合、 G_{Ks} の過渡応答は式(a)のように表される。

$$G_{Ks}(E_m, t) = \bar{G}_{Ks} \times Xs_{\infty}^2(E_m) \times \{1 - \exp(-t/\tau_{x_{s1}}(E_m))\} \times \{1 - \exp(-t/\tau_{x_{s2}}(E_m))\}$$

.....(a)

E_m : 膜電位 [mV],

t : 時間 [msec],

\bar{G}_{Ks} : 最大コンダクタンス [mS],

Xs_{∞} : 最大活性化係数,

$\tau_{x_{s1}}, \tau_{x_{s2}}$: 時定数 [msec]

(シミュレーションに用いる変数の詳細は省略する)

③シミュレーション

前節から求められた連続関数を Luo-Rudy model に組み込み、シミュレーションを行う。ただし、アフリカツメガエルを試料とした実験系から求められたダイナミクスを哺乳類の心筋細胞モデルである Luo-Rudy model に導入する際には、種の違いやチャンネル数の違いなどを考慮したパラメータ調整を行う必要がある。

(2) IKs 特性の動物やヒトとの差を KCNE1 遺伝子発現量の違いにより説明する。

哺乳類の心筋細胞における IKs チャンネルの特性 (開閉過程の速度、電位依存性、コンダクタンス等) には種差が激しい。この違いを KCNE1 遺伝子の発現量から説明できないか検討する。 α サブユニットと β サブユニット数の数比は、モルモットでは 1:10 前後、兔、猫では 1:0.5 ぐらい、ヒトでは 1:1 程度であり、種族である。ここで、 α サブユニットはポアを含む6回膜貫通型であり、 β サブユニットは1回膜貫通型である。また、イオンチャンネルを構成する各分子の質量はほぼ等しいと仮定する事ができ、イオンが通過するポアの部分の質量は微小であり無視できると仮定できる。したがってヒトの心筋細胞の α サブユニットに対する β サブユニット質量比及び KCNQ1 遺伝子に対する KCNE1 遺伝子の発現重量比は 5:1 付近であると仮定され、本研究では、KCNQ1 5 ng に対し KCNE1 1 ng を注入した場合がヒトの心筋細胞 IKs にほぼ近いと考えられる。KCNE1 遺伝子の発現量を種々に変化させ、各種動物心筋 IKs の特性と比較検討する

(3) KCNE1 発現と薬剤の相互作用の観察

既に我々は、抗不整脈薬ベプリジルについて、KCNE1 (MinK) の量が増えるに従い KCNQ1 電流抑制作用が減弱することを見出している。更に、他の薬剤 (クロマノール293B、ドロネダロン) についても同様の検討を加える。

(4) KCNE1 発現が薬剤感受性を変化させる分子機構 (結合部位の移動など)

①変異 KCNQ1 遺伝子の作成 (担当: Seebohm)
 現在 KCNQ1 チャンネル (IKs チャンネルの α subunit) のポア領域の 6 個 (V307-T312) と S6 領域の 13 個 (L646-Y667) のアミノ酸をそれぞれ Cysteine もしくは Alanine に置換した変異 KCNQ1 遺伝子を作成した (Cysteine-scanning)。今後さらに上流もしくは下流のアミノ酸改変遺伝子を作成する。

②KCNQ1 チャンネル内の薬物結合部位の同定 (担当: 丹羽)

(a) 遺伝子導入: アフリカツメガエルの卵母細胞に、cRNA を注入する。

(b) 電気生理実験: cRNA 注入 48 時間から 72 時間後に、二本微小電極法を用い、発現した膜電流を観察する。

(c) 薬物の作用: 第 III 群抗不整脈薬 (K チャンネル阻害薬) を始めとする各種薬物を作用させ、発現した電流に対する抑制様式 (電位依存性、チャンネル内結合部位への結合解離の動態) を解析する。アジミリド、ソタロール、クロマノール 293B などを検討する。

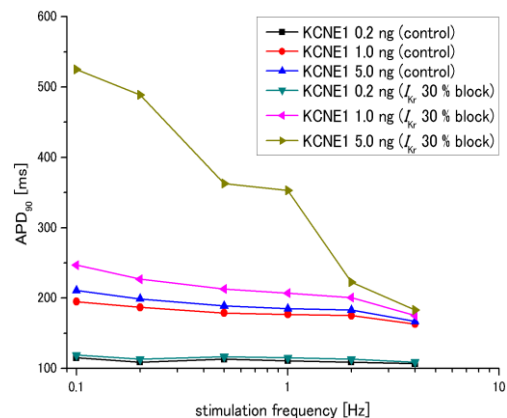
(d) β サブユニットの影響: 我々は既に、アジミリドの KCNQ1 への唯一の結合 (A341) が KCNE1 の共発現で消失する現象を見出している。この点についてさらに詳細に検討する。

4. 研究成果

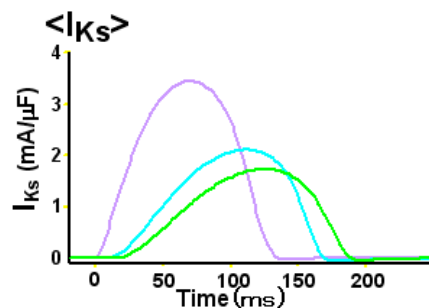
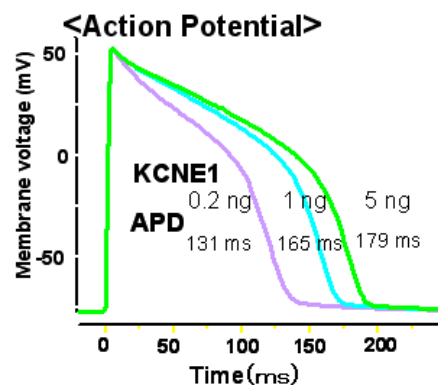
(1) β サブユニット (KCNE1) が IKs、活動電位持続時間 (APD)、心電図に及ぼす影響を検討した。アフリカツメガエル卵母細胞に IKs の α サブユニットである KCNQ1 遺伝子と β サブユニット KCNE1 遺伝子を共発現させ IKs 電流を観察すると、KCNE1 発現量を増大させるに伴い、①電流最大値が増大する、②活性化が遅延する、③より浅い電位より活性化する、④活性化の開始に潜伏期がある、ことが判明した。これらの結果は、IKs に対して増大もしくは減少させる方向に働き、総和としての作用が明確でない、そこで、シミュレーションにより IKs、APD、心電図 QT 時間に対する影響を推定した。その結果、 β サブユニット KCNE1 の共発現量の増大とともに、①IKs は減少する、②IKr の寄与率が相対的に高まる、③IKr ブロッカーの効果が高まる、④APD 延

長の逆頻度依存性が増す、ことが明らかとなった。また、心内、中層、心外膜の心筋 3 層構造を想定し、KCNE1 遺伝子量増加に伴う IKs 電流の変化を組み入れた擬似心電図シミュレーションを行うと、KCNE1 遺伝子発現量が増加すると IKs 電流の減少を介して心電図 QT 時間の延長をもたらすことが判明した。また、特に低頻度 (0.2 Hz 以下) の刺激時に容易に EAD を生じることも判明した。

APDの逆頻度依存性のシミュレーション



Simulation (L-R model)



(2) β サブユニット(KCNE1)の増減に伴うIKs抑制剤のIKs電流に対する作用の差を検討した。検討した薬剤としては、クロマノール293Bに加えてベプリジル、ドロネダロンなどである。いずれも一定の傾向は見られず、アジミリドでみられたKCNE1遺伝子発現増大にともなう薬剤感受性の変化は明らかでなかった。この点については、さらに検討を続けている。今後は、スパイラルリエンリーの発生・停止に対するKCNE1遺伝子発現の影響も観察する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① KAMIYA Kaichiro, NIWA Ryoko, MORISHIMA Mikio, HONJO Haruo, SANGUINETTI Michael C.: Molecular determinants of hERG channel block by terfenadine and cisapride. Journal of Pharmacological Sciences 108(3): 301-307, 2008. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 丹羽良子 他、HERG および KCNQ1/KCNE1 チャンネルに対するドロネダロンの作用、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜
- ② 丹羽良子 他、アミオダロンとドロネダロンの薬理作用の比較、日本循環器学会第132回東海・第117回北陸合同地方会、2008年11月16日、名古屋
- ③ 森島幹雄 他、ニフェカラントによるIKr電流増大作用の発現様式とその機序、第25回日本心電学会学術集会、2008年11月2日、新潟
- ④ 森島幹雄 他、ニフェカラントによるIKrアゴニスト作用の特徴と分子機序、第23回日本不整脈学会学術大会、2008年5月6日、横浜
- ⑤ 高成広起 他、低カリウム下の心室スパイラル・リエントリーに対するベプリジルの作用、第23回日本不整脈学会学術大会、2008年5月6日、横浜
- ⑥ 高成広起 他、心室スパイラル・リエントリーに対するベプリジルの作用、第

129回日本循環器学会東海地方会、2007年6月23日、名古屋

- ⑦ 森島幹雄 他、ニフェカラントのhERGチャンネルアゴニスト作用について、第22回日本不整脈学会学術大会、2007年5月31日、広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 良子 (NIWA RYOKO)

名古屋大学・環境医学研究所・研究員

研究者番号：00216467