

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19689006
 研究課題名（和文） 不整脈トリガー間クロストークの機能的・計算科学的アプローチによる統合的解析
 研究課題名（英文） Systematic analysis of crosstalk between arrhythmic triggers using functional and mathematical approaches.
 研究代表者
 黒川 洵子（KUROKAWA JYUNKO）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
 研究者番号：40396982

研究成果の概要（和文）：

性ホルモン、交感神経刺激、薬物という3つの不整脈トリガー因子について調べ、不整脈発生の男女差のメカニズムを解析した。性ホルモン受容体を介した非ゲノム経路によるNO産生が心電図QT間隔の性差に関与し、交感神経刺激により調節機構が変化するというクロストークを見出した。また、NOによるカリウムチャネル調節の新しい機構と、催不整脈作用があるQT延長薬物の感受性を増大するエストロゲン特有の作用も見出した。これらの結果を基に、QT延長薬物による不整脈発生が男女で異なることを*in silico*モデルでシミュレートし、発表した。不整脈の予防・薬物安全性における性差医療の土台作りに貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：

To understand the underlying mechanisms of sex-difference in susceptibility of arrhythmias induced by long QT intervals, these systemic factors for triggers of arrhythmias (sex hormones, sympathetic nervous system stimulation, and drugs) were analyzed. We then found an involvement of non-genomic action of sex-hormones in the sex difference, a novel mechanism for regulation of a K⁺ channel by nitric oxide, and effects of estrogen on sensitivity of QT-prolonging drugs. These data were introduced into a computer simulation model of cardiac action potentials. The model could assess the sex difference of susceptibility of arrhythmias induced by QT-prolonging drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：(1) 不整脈 (2) 性ホルモン (3) イオンチャネル
 (4) シミュレーション (5) 交感神経 (6) 非ゲノム作用
 (7) 薬物性QT延長 (8) 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

不整脈は初回発作が突然死・重篤な合併症（脳梗塞など）をもたらすため、予防的医療の確立が極めて重要となる。従来の不整脈研究は、家族性不整脈疾患における心筋イオンチャネル遺伝子異常等の不整脈基質が解析されてきた。次のステップとして、トリガー因子の解析が国内外でさかんに行われている。これまで、申請者は、性ホルモン、交感神経系刺激、薬物作用など、トリガー因子を個別に解析し、それぞれ新規の発見を含む業績を残してきた。

ところが、不整脈発現には複数のトリガー因子が協調的に作用しており、複数のトリガー因子の統合的解析が不可欠となる。

このような多因子のクロストークが関与する複雑系の解析には、計算科学的アプローチが大きな威力を発揮する。事実、複数の心筋イオンチャネルの統合的活動により規定される心臓電気現象の解析では、早くから**生体シミュレーションモデル**が開発されている。ところが、従来のモデルでは、トリガー因子の協調的関与がほとんど考慮されておらず、不整脈誘発のように多因子が関与する事象を高い正確性をもって予測できていなかった。

薬物副作用として心電図 QT 時間延長を伴う不整脈（QT 延長毒性）は、創薬・薬物治療の緊急解決課題となっている。そこで、開発初期段階でのコンピューターによる *in silico* 薬物安全性試験の土台作りも念頭において計画を立案した。

2. 研究の目的

不整脈は初回発作が突然死・重篤な合併症（脳梗塞など）をもたらすため、予防的医療の確立が極めて重要となる。本研究は不整脈の予防・薬物安全性におけるオーダーメイド医療の土台作りを長期的目標としており、応募期間内での目標として、複数の不整脈トリガー因子による統合的心筋イオンチャネル制御の分子機構を解明すること、得られたデータを基にして高精度かつ高予測性の統合的心臓電気活動シミュレーションモデルを構築すること、の2点の達成を目指す。

具体的には、予試験の結果を元に、交感神経刺激と性ホルモン、性ホルモンと薬物というトリガー因子同士のクロストークの分子

機構を電気生理学的・光学的・生化学的手法（wet 実験）を用いて明らかにすること、交感神経刺激と性ホルモンと薬物の3つの因子によるクロストークを導入した心臓シミュレーションモデルを用いて催不整脈作用を予測し、wet 実験により評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 電気生理

モルモット（雌）から心臓を摘出し、コラゲネース処理により心室筋細胞を単離した³⁾。Amphotericin B (0.3 mg/mL)を細胞内液に添加することにより、細胞内環境を維持しながら行う手法である perforated whole-cell patch-clamp 法により、心室筋活動電位、心筋 I_{Ks} 電流を測定した。動物実験は、Institutional Animal Care and Use Committee of Tokyo Medical and Dental University の基準に遵守して行った。

HEK293 細胞に hERG を安定的に過剰発現させて、ホールセルパッチクランプ法により、hERG 電流に対するエストラジオール(E2)の作用と hERG blocker E4031 への影響を検討した。CHO 細胞に hERG 野生型と変異体を一過性に過剰発現させて、作用部位を探索した。

(2) コンピューターシミュレーション

Dr. Colleen E Clancy (UC Davis) との共同研究により行った。モルモット心室筋細胞シミュレーションモデルである Luo-Rudy 改変型 Faber-Rudy モデルに、アドレナリン受容体シグナルの過去のデータを導入することにより本研究で用いたシミュレーションモデルを構築した。 I_{Ks} 電流と L 型 Ca^{2+} 電流に対する女性の卵胞期(A)と黄体期(B)のプロゲステロン血中濃度（報告されている値）におけるプロゲステロンの急性（非ゲノム）作用を調べた実験データを Faber-Rudy モデルに導入することによりシミュレーションを行った。心筋 I_{Kr} 電流を 50%ブロックすることにより、薬物依存性 QT 延長症候群のモデルとした。

4. 研究成果

(1) プロゲステロンの急性作用

プロゲステロンが、モルモット心室筋細胞の活動電位幅(APD)を有意に短縮することを見出した。

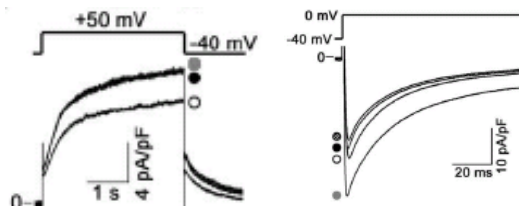


図 1 I_{Ks} 電流 (左) と L 型 Ca^{2+} 電流 (右) に対するプロゲステロンの作用。
 I_{Ks} - Basal 状態 (電流増大)
 $I_{Ca,L}$ - cAMP 刺激 (電流抑制)

心臓の活動電位幅に影響を与える I_{Ks} チャネル電流が濃度依存的に増大することを見出した (図 1)。これらの作用はすべて 5 分以内に最大効果を示し、プロゲステロン受容体の阻害剤で消失したことから、'非ゲノム作用' であることが示された。 I_{Ks} チャネル電流に対するプロゲステロンの作用の EC_{50} は 2.7 nM とヒトの生理的血中濃度の範囲であった。

細胞内 cAMP を刺激した条件では、L 型 Ca^{2+} 電流が抑制されることを見出した (図 1 の右)。 EC_{50} は 29.9 nM であり、ヒトの生理的血中濃度の範囲 (2.5 - 40.6 nM) の最高濃度で抑制が見られることが示唆された。

プロゲステロンの実験データを心室筋細胞の活動電位シミュレーションモデル (Faber-Rudy モデル) に導入したところ、性周期に応じて活動電位幅が変動するという結果を得た。この活動電位幅の変化率は、女性の性周期による QT 間隔について報告されている変化率と定量的に一致する値であった。さらに、不整脈の誘発に対しても、プロゲステロンは生理濃度の範囲内で、濃度依存的に保護的作用があることが示された (図 2)。

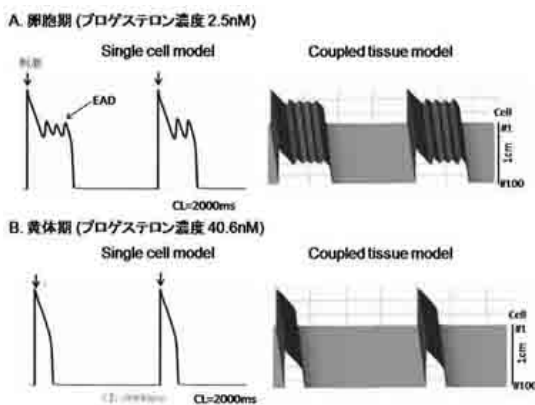


図 2 性周期に応じた催不整脈性の変動。
 HERG50% ブロックにより、卵胞期では不整脈が発生するが、黄体期には消失。

催不整脈性が女性の性周期に従って変動することをシミュレートできた。女性の卵胞期(A)と黄体期(B)のプロゲステロン血中濃度 (報告値) に従い、実測値を得た。薬剤誘発

性致死性不整脈のモデルとして、ヒト I_{Kr} (hERG) チャネル電流を 50% 抑制して心拍を下げたところ、プロゲステロンは保護効果を示した (図 2)。

(2) エストロゲンの急性作用

モルモット活動電位に対するエストラジオール (E_2) の急性作用を調べたところ、生理的濃度範囲において有意に活動電位幅 (APD) が延長し、心臓の活動電位幅に影響を与える I_{Kr} チャネル電流が部分的に抑制された。これらの作用はエストロゲン受容体 (ER) 阻害薬で阻害されなかったことから受容体を介さない作用であることが示唆された。

ER を発現していない HEK293 細胞と CHO 細胞においても E_2 は native の I_{Kr} 電流に対する作用と同様に生理的濃度範囲内で部分的な抑制を示した。HERG 変異体を用いることにより S6 に位置する Phe656 が E_2 の作用部位であることが示された。

Phe656 は hERG ブロッカーの主要な結合部位でもあることから、hERG ブロッカーによる hERG 電流抑制作用と QT 延長 (ラングンドルフ還流標本) に対する生理的濃度の E_2 の影響を調べた。 E_2 は濃度依存的に hERG ブロッカーの抑制作用と QT 延長作用を増強した。

(3) 考察

本研究では、女性ホルモンであるプロゲステロンとエストロゲンがそれぞれ異なる心筋イオンチャネルを急性的に制御することを見出した。この分子メカニズムは、臨床データから示唆される 2 種類の女性ホルモンが QT 間隔に対して相反して影響しているという可能性を支持する。

プロゲステロンに関しては、非ゲノム経路を活性化させ eNOS から産生された NO が心筋 I_{Ks} 電流を活性化し L 型 Ca^{2+} 電流を抑制することにより活動電位幅については QT 間隔を短縮した。プロゲステロンの実験データを心室筋細胞の活動電位シミュレーションモデルに導入した結果から、性周期に応じた活動電位幅の変動は約 10ms であり、性周期における QT 間隔の変動 (15 ms 前後) にはプロゲステロンの急性作用の寄与が大きい可能性が示唆された。QT 間隔の調節は心筋細胞の予備力を変化させるので、不整脈リスクの調節に結びつく。

エストロゲンに関しては、プロゲステロンとは逆に生理的濃度範囲内で QT 間隔を延長する傾向があった。心筋イオン電流を解析したところ、ホルモン受容体を介さずに I_{Kr} 電流

が部分的に抑制されることを見出した。この部分的抑制が実際に性周期における QT 間隔の変動を説明するかどうかは疑わしいと考えている。次の実験としてシミュレーションモデルを導入することを考えているが、プロゲステロンほど大きな変化が得られるとは考えにくい。実は臨床データにおいて、エストロゲンの QT 延長作用はプロゲステロンの QT 短縮作用ほど明らかに示されたわけではない。しかしながら、経口避妊剤による不整脈発症率増加やエストロゲン単独補充療法が QT 間隔を延長し(2 ms)不整脈を誘発するという結果が報告されていることから、エストロゲンが QT の調節のみでなく積極的に後天性不整脈を誘発するメカニズムがあるであろうと予測される。今回のエストロゲンによる hERG ブロッカーの作用の増強は、積極的な不整脈増悪のメカニズムの一つであると考えられる。

システム生物学を利用したシミュレーションモデルにおいて、今回はスロゲズ手論の実験データを基に臨床報告されている結果のデモンストレーションに成功した。次はエストロゲンの結果も導入して再度モデルを評価していく。将来的には女性ホルモンレベルの簡易測定と抱き合わせて、性周期による QT 延長毒性リスクの予測と予防に応用が可能となることが期待される。

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 17 件)

1. Yang PC, Kurokawa J, Furukawa T, Clancy CE. (2010) Acute effects of sex steroid hormones on susceptibility to cardiac arrhythmias: A Simulation Study. *PLoS Comput Biol* **6**, 29, e1000658.
2. Kaihara A, Sunami A, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) A genetically encoded bioluminescent indicator for the sodium channel activity in living cells. *J Am Chem Soc*, **131**, 41388-4189.
3. Kakusaka S, Asayama M, Kaihara A, Sasano T, Suzuki T, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) A receptor-independent effect of estrone sulfate on the hERG channel. *J Pharmacol Sci*, **109**, 152-156.
4. Asada K, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) Redox- and calmodulin-dependent S-nitrosylation of the KCNQ1 channel. *J Biol Chem*, **284**, 6014-6020.
5. Kurokawa J, Bankston JR, Kaihara A, Chen L, Furukawa T & Kass RS. (2009) KCNE variants reveal a critical role of the beta subunit carboxyl terminus in PKA-dependent regulation of the I_{Ks} potassium channel. *Channels*, **3**, 16-24.
6. Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, Furukawa T. (2008) Acute effects of estrogen on the guinea pig and human I_{Kr} channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J Physiol (Lond.)*, **586**, 2961-2973.
7. Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Xu J, Oren RV, Zhu ZI, Clancy CE, Isobe M & Furukawa T. (2007) Progesterone regulates cardiac repolarization through a non-genomic pathway: an *in vitro* patch-clamp and computational modeling study. *Circulation*, **116**, 2913-2922.
8. Tani Y, Miura D, Kurokawa J, Nakamura K, Ouchida M, Shimizu K, Ohe T & Furukawa T. (2007) T75M-KCNJ2 mutation causing Andersen-Tawil syndrome enhances inward rectification by changing Mg^{2+} sensitivity. *J Mol Cell Cardiol*, **43**, 187-196.
9. Asaoka H, Kurokawa J, Furukawa T & Shimokado K. (2007) High glucose concentrations impair the activation of K^+ channels and proteases in undifferentiated THP-1 monocytes. *J Med Dent Sci*, **54**, 97-102.
10. Kurokawa J, Abriel H. (2009) Neurohormonal Regulation of Cardiac Ion Channels in Chronic Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, **54**, 98-105.
11. 黒川 洵子 (2009). 性ホルモンの非ゲノム作用. *日薬理誌* vol.134, 103-104.
12. Kurokawa J, Suzuki T, Furukawa T. (2009) Acute effects of female hormones on cardiac ion channels and cardiac repolarization. *J Pharmacol Sci*, **109**, 334-340.
13. Furukawa T, Kurokawa J, CE Clancy. (2008) A combined approach using patch-clamp study and computer study for understanding long QT syndrome and TdP in women. *Curr Cardiol Rev*, **4**, 157-169.
14. Furukawa T, Kurokawa J. (2008) Non-genomic regulation of cardiac ion channels by sex hormones. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, **8**, 245-251.
15. 黒川 洵子 (2007). 6. K^+ チャネルと創薬. *医学のあゆみ* vol.223.No.6. 484-487. 医歯薬出版株式会社.

16. Kurokawa J. (2007) Compartmentalized Regulations of Ion Channels in the Heart. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **30**, 2231-2237.
17. Furukawa T, Kurokawa J. (2007) Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: Implication of gender-difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol Ther*, **115**, 106-115.

[学会発表](計 28件)

1. Kurokawa J., Furukawa T (2008). Regulation of cardiac ion channels by sex hormones. 81回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, **106**, 32P.
2. Kurokawa J., Tamagawa M, Harada N, Honda S, Nakaya H, Furukawa T (2007). Receptor-independent Effects of Estrogen on the HERG Channel Predispose Women to Drug-induced Arrhythmias. **AHA Scientific Session**, Orland, *Circulation* **116**, Suppl. 38.
3. Kurokawa J., Asada K, Furukawa T (2010). Regulation of the I_{Ks} channel by S-nitrosylation at carboxyl-terminus of KCNQ1. 54th Biophysical Society Annual Meeting, San Francisco, *Biophys J*, **98**, 357B.(Feb 20-24, 2010)
4. Kurokawa J., Asada K, Furukawa T (2009). Targeted S-nitrosylation of the KCNQ1 channel in the heart. 36回 IUPS2009, 京都, *J Physiol Sci*, **59**, 127P. (July28, 2009)
5. Kurokawa J., Kaihara A, Furukawa T (2009). The C-terminus region of KCNE1 is essential for PKA-dependent functional regulation of the I_{Ks} channel. 82回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, **109**, 139P.
6. Kurokawa J., Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, Furukawa T (2009). Effects of estrogen on the I_{Kr} channel and cardiac repolarization. 53rd Biophysical Society Annual Meeting, Boston, *Biophys J*, **Abst**, 172a.
7. Kurobane E, Kurokawa J., Suzuki T & Furukawa T, (2009). A role of PDE2 in a localized regulation of cardiac L-type Ca^{2+} currents by progesterone. 83回日本薬理学会年会, 大阪, *J Pharmacol Sci*, **112**, 75P.
8. Kurobane E, Kurokawa J., Suzuki T & Furukawa T (2009). PDE2 involves in a non-genomic regulation of cardiac L-type calcium currents. 36回 IUPS2009, 京都, *J Physiol Sci*, **59**, 126P. (July28, 2009)
9. Kurobane E, Kurokawa J., Suzuki T & Furukawa T, (2009). Involvement of PDE2 in the inhibitory effect of progesterone on cAMP-stimulated cardiac L-type Ca^{2+} currents. 82回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, **109**, 138P.
10. Asayama M, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T & Kurokawa J. (2008). Influence of estrogen on gender-difference in drug-induced QT prolongation. 35回日本トキシコロジー学会, 東京, *The Journal of Toxicological Sciences*, **33**, S134.
11. Kakusaka S, Kurokawa J., Suzuki T & Furukawa T (2008). Receptor-independent regulation of the HERG channel by estrogens. 81回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, **106**, 218P.
12. Asada K, Kurokawa J. & Furukawa T (2008). Site-specific S-nitrosylation of KCNQ1 channel enhances IKs currents. 81回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, **106**, 73P.
13. Furukawa T, Kurokawa J., Bai CX, Nakamura H & Asada K (2008). Functional interactions between hormone receptor/NO signal/ion channel in the caveolae microdomain. 81回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, **106**, 46P.
14. 黒川洵子 (2010.3.30) 心筋 I_{Ks} チャネル分子複合体を介した心臓再分極のアドレナリン性制御. 口頭発表, 第130回日本薬学会, 岡山.
15. 黒川洵子 (2010.3.20) 心筋イオンチャネルの制御機構とその破綻による病態の解析. 口頭発表, 平成22年度特定領域研究班若手の会, 大阪.
16. 黒川洵子, 黒羽笑加, 松原清二, 中村浩章, 笹野哲郎, 古川哲史 (2009.11.25-26) NOによる心筋カルシウムチャネル調節. 口頭発表, 平成21年度生理学研究所研究会, 岡崎.
17. 黒川洵子, 浅田健, 中村浩章, 古川哲史 (2008.12.09-12) 性ホルモンによる心筋 I_{Ks} チャネル調節におけるS-ニトロシル化の関与. 口頭発表, BMB2008, 神戸.
18. 黒川洵子, 浅山真秀子, 玉川正次, 中谷晴昭, 古川哲史 (2008.11.21) 薬物誘発性QT延長症候群の性差におけるエストロゲンの影響のメカニズム. 口頭発表, 第18回日本循環薬理学会, 千葉.
19. Kurokawa J. (2008.10.30). Acute effects of female sex hormones on cardiac

- repolarization. 口頭発表, International Symposium: Recent progress in cardiovascular research and drug-target discovery, Daejeon, South Korea.
20. Kurokawa J, Nakamura H & Furukawa T (2008.07). Acute effects of female sex hormones on cardiac ion channels. Gordon Research Conference (Cardiac regulatory mechanism). ポスター発表, NH, USA.
 21. 浅田健, 黒川洵子, 古川哲史 (2008.1.26-1.28): 部位特異的ニトロソ化による I_{Ks} 制御. 特定領域研究「G 蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ 2008, 箱根.
 22. 浅山真秀子, 黒川洵子, 古川哲史 (2008.1.26-1.28): 薬剤起因性不整脈における性差. 特定領域研究「G 蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ 2008, 箱根.
 23. 古川哲史, 黒川洵子, 中村浩章, 白長喜, 浅田健, 玉川正次, 中谷晴昭, Ronit Vatkin, Jun Xu, Colleen E. Clancy, 磯部光章 (2007.10.5-10.6): 第 24 回日本心電学会学術集会学術諮問委員会指定シンポジウム, 名古屋.
 24. 黒川洵子, 中村浩章, Clancy CE, 玉川正次, 中谷晴昭, 古川哲史 (2007.11): 性周期による QT 延長症候群不整脈リスク変動のメカニズム. 口頭発表, 第 17 回日本循環薬理学会, 大阪.
 25. 黒川洵子, 中村浩章, Clancy CE, 古川哲史 (2007.11): 性周期による QT 延長症候群不整脈リスク変動のシミュレーション
プロゲステロンによる心筋イオンチャネル制御のデータを基に 口頭発表, 平成 19 年度生理学研究所研究会, 岡崎.
 26. 黒川洵子, 中村浩章, 大石咲子, Clancy CE, 古川哲史 (2007.10): プロゲステロン非ゲノム作用による心筋イオンチャネル制御: 性周期による QT 延長症候群不整脈リスク変動のメカニズム. 口頭発表, 第 117 回日本薬理学会関東部会, 東京.
 27. 黒川洵子, 浅田健, 中村浩章, 古川哲史 (2007.9): 性ホルモン非ゲノム経路を介した NO 産生による心筋カリウムチャネル制御機構. 口頭発表, 平成 19 年度生理学研究所研究会, 岡崎.
 28. Kurokawa J (2007.06). Hormonal regulation of cardiac ion channels via a non-genomic pathway. 口頭発表, International Symposium on Principles of Calcium Signaling, Salisbury Cove, ME, USA.
- 〔図書〕(計 3 件)
1. Chen L, Carroll SJ, Kurokawa J, Kass RS (2009). Chapter 18: KCNQ1/KCNE1 macromolecular signaling complex: channel microdomains and human disease. In: *Cardiac Electrophysiology from Cell to Bedside*. Zipes DP, Jalife J (Eds): Saunders, Philadelphia, pp187-194.
 2. 古川哲史, 黒川洵子 (2007) II-5 章 イオンチャネルの構造と不整脈の分子医学. In: 先天性心疾患を理解するための臨床心臓発生学. 山岸敬幸, 白石公 (編) メジカルビュー社, 東京, pp188-194.
 3. 古川哲史, 黒川洵子 (2007) 5 章 性ホルモンとイオン電流. In: QT 間隔の診かた・考えかた. 有田 眞 (監), 犀川哲典, 小野克重 (編) 医学書院, 東京, pp59-74.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
黒川 洵子 (KUROKAWA JYUNKO)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号: 40396982
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし