

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K16132
研究課題名(和文) 徐脈性不整脈を来たすイオンチャンネル病の遺伝子変異に対する特異的化合物の薬理解析

研究課題名(英文) Pharmacological analysis of selective KACH channel blocker for gene mutations responsible for hereditary bradyarrhythmia

研究代表者
山田 憲明(YAMADA, Noriaki)

大阪大学・国際共創大学院学位プログラム推進機構・特任助教(常勤)

研究者番号：40850144
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：心臓アセチルコリン感受性カリウムチャンネル(KACHチャンネル)は、副交感神経刺激時にKイオンが細胞外へ流出することで心拍数を減少させる生理作用を有する。KACHチャンネルおよびその活性化に関連する遺伝子の先天的な変異によって徐脈性不整脈を来すことが知られている。本研究は、これらの遺伝子群の種々の変異について、選択的KACHチャンネル阻害薬の薬理解析を細胞実験で行い、変異によりチャンネル電流が異常増加することで徐脈性不整脈を発症するKACHチャンネル病に対する新規治療法の可能性について検討した。本化合物は野生型のみならず、変異型チャンネルに対しても阻害効果を認め、有効な新規治療薬になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
選択的KACHチャンネル阻害薬が、変異によりチャンネル電流が異常増加することで徐脈性不整脈を発症するというその病因が明確であるイオンチャンネル病に対して、病態機序に基づいた新規の分子特異的治療薬となり得ることを示した。
これまで遺伝性徐脈の原因分子を標的とした治療薬はなく、一般の徐脈性不整脈に対する治療と同様、心臓ペースメーカー治療に頼らざるを得ないのが現状である。既存の不整脈病名と診断されたものの遺伝子解析が行われていないKACHチャンネル病の患者が国内外で潜在的に存在すると予想され、ペースメーカー植え込み手術の代替となる新たな治療法になり得る可能性があり、今後の研究開発につなげていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The acetylcholine-activated potassium channel (KACH channel) expressed in the heart is a heterotetramer of two potassium channel subunits, encoded by the KCNJ3 and KCNJ5 genes. The KACH channel contributes to parasympathetic control of heart rate. Mutations in these channel genes or genes involved in the channel activation are reported to be causative for hereditary bradyarrhythmias. The activity of these mutants seemed to be associated with the pathophysiology of the disease.
The aims of this study were to characterize channel properties of various mutations and to evaluate their sensitivity to a selective KACH channel blocker. Pharmacological analysis of this compound for various mutations was performed in cellular electrophysiological studies. This compound was found to have an inhibitory effect not only on wild type but on mutant channels, suggesting that it may be an effective novel therapeutic agent for bradyarrhythmia patients harboring a mutation in the KACH related genes.

研究分野：薬理学

キーワード：イオンチャンネル 遺伝性不整脈 遺伝子変異 カリウムチャンネル阻害薬 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

徐脈性不整脈は環境要因（加齢等）や遺伝的要因が原因となり、心拍数の低下を伴う疾患の総称である。一過性の脳血流低下により眼前暗黒感や失神を来し、労作時息切れ、全身倦怠感、四肢末梢冷感など、低心拍出性心不全の症状を呈する。治療法としては、外科的なペースメーカー植え込み術が標準治療であり、徐脈性不整脈の病態分子機序に基づいた長期的に服用可能な治療薬は存在しない。心臓の洞結節細胞は自発興奮機能（自動能）を有するが、この自動能の発生にはいくつかのイオンチャンネルが重要な役割を果たしており、自律神経による心拍数制御に関与している。遺伝性不整脈家系での遺伝子解析結果をもとに、疾患をイオンチャンネル病（チャンネルopathy）として分子レベルで発症メカニズムを理解することができれば、特定のイオンチャンネルを分子標的とした薬物治療法の開発につながる。

心拍数調節に関連する心臓アセチルコリン感受性カリウムチャンネル（KACHチャンネル）は、KCNJ3の遺伝子産物であるKir3.1とKCNJ5の遺伝子産物であるKir3.4の2種類のサブユニットがヘテロ四量体として、心臓において洞房結節、房室結節、心房筋に発現している。副交感神経が活性化すると、迷走神経終端より放出されたアセチルコリンによりムスカリン作動性アセチルコリン受容体（M2受容体）が刺激され、三量体Gタンパク質から遊離したGβγサブユニットがKACHチャンネルに結合する。KACHチャンネルはこのようにシグナル伝達を介して活性化されることで開口し、カリウムイオンが細胞外へ流出することにより心拍数を減少させる生理作用を有する（図1A）。

我々は、未成年時より洞不全症候群（洞性徐脈）を呈し、その後、若年で心房細動や一過性房室ブロックの合併に至る遺伝性徐脈性不整脈の家系について遺伝子解析を行い、上述のKCNJ3遺伝子に新規変異（c.247A>C, p.N83H）を同定した。機能解析実験の結果、本変異により、KACHチャンネルの開口確率が高まり、チャンネル電流の異常増加が引き起こされることを明らかにした。さらに、同定したKCNJ3 c.247A>C変異について、疾患動物モデルとして、変異型KACHチャンネルを心房特異的に強制発現させたトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作製したところ、ヒト症例同様の徐脈性不整脈を示したことから、変異に伴うチャンネル電流の異常活性化が、徐脈性不整脈の原因であることを確認した（図1B）。また、本家系の徐脈性不整脈に対する治療法として、新規の心房細動治療薬として臨床応用が期待されている選択的KACHチャンネル阻害薬NIP-151（J Cardiovasc Pharmacol. 2008 Feb;51(2):162.）に着目した。選択的KACHチャンネル阻害薬は、心房特異的に発現しているKACHチャンネルを低濃度で選択的に阻害するという二重の利点を有するため、多臓器に対する副作用や心室性不整脈のリスクが低く、安全性が高い抗不整脈薬として臨床開発の意義は大きい。NIP-151の本家系の徐脈性不整脈に対する有効性をin vitroおよびin vivoで評価するため、アフリカツメガエル卵母細胞での二電極膜電位固定法およびトランスジェニック・ゼブラフィッシュモデルを用いて、KCNJ3 c.247A>C変異型KACHチャンネルに対する薬理解析実験を施行した。その結果、NIP-151は野生型のみならず、変異型KACHチャンネルに対しても阻害効果を認め、また変異型ゼブラフィッシュにおいても心拍数増加と徐脈性不整脈の改善効果を確認した。この結果から、選択的KACHチャンネル阻害薬は、KACHチャンネルの異常活性化というその病因が明確である本家系の徐脈性不整脈に対して有効な治療薬となり得ることが示された（図1C）（Circulation. 2019;139(18):2157-2169.）。

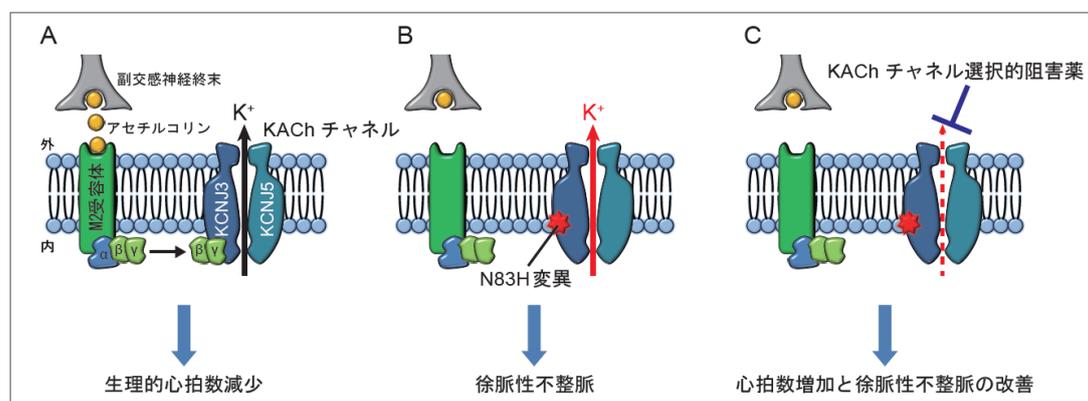


図1. KACHチャンネルの分子生理機序とKCNJ3 c.247A>C, p.N83H変異の病態メカニズム

遺伝性徐脈性不整脈の家系解析から同定されたKACHチャンネルやその活性化に関連する遺伝子の原因変異として、我々が同定したKCNJ3 c.247A>C変異以外に、海外から報告されたKCNJ5 遺伝子変異 (KCNJ5 c.303G>C, p.W101C) (Circ Genom Precis Med. 2019 Jan;12(1):e002238.)、およびKACHチャンネルの活性化に関連する3量体Gタンパク質のG8サブユニットをコードするGNB2遺伝子の変異 (GNB2 c.155G>T, p.R52L) (Circ Res. 2017 May 12;120(10):e33-e44.) の2つが報告されている。これらの変異についても、KACHチャンネル電流が異常増加することが機能解析によって証明されている。

2. 研究の目的

KCNJ3 遺伝子や KCNJ5 遺伝子、さらには M2 受容体や三量体 G タンパク質などの KACH チャンネルおよびその活性化に関連する遺伝子の変異によって、KACH チャンネル電流が恒常的に異常増加することで徐脈性不整脈を発症する疾患群を、我々は新たな疾患概念として KACH チャンネロパチーと定義した。KCNJ3 c.247A>C 変異による KACH チャンネロパチーに対する選択的 KACH チャンネル阻害薬の有効性は検証済みであるが、KCNJ5 や GNB2 など原因となる遺伝子やその変異の部位によらずあらゆる KACH チャンネロパチーの病態に対して、選択的 KACH チャンネル阻害薬が阻害効果を有するかについては不明である。本研究は KACH チャンネロパチーを来たす各種の遺伝子変異について、選択的 KACH チャンネル阻害薬が普遍的な新規の治療法となり得るかを検討することを目的とした。

また、臨床現場において徐脈性不整脈と診断された症例の中に、KACH チャンネロパチー患者が未診断のままに含まれることが予見される。本研究ではさらに、徐脈性不整脈患者から収集したゲノム検体において、KACH チャンネロパチーの病原性遺伝子変異の追加探索を行い、同定し得た変異について機能解析および選択的 KACH チャンネル阻害薬の薬理的解析も実施することとした。

3. 研究の方法

(1) 既報の KCNJ5 遺伝子および GNB2 遺伝子の変異による KACH チャンネロパチーに対する選択的 KACH チャンネル阻害薬の有効性の検証

KACH チャンネロパチーに共通する病態生理機序は、心拍数を減少させる生理作用を有する KACH チャンネルの異常活性化により恒常的にチャンネル電流が増加することである。選択的 KACH チャンネル阻害薬は KACH チャンネルを直接的に阻害するが、チャンネルのどの部位に結合するかは明らかになっておらず、また、KACH チャンネルの活性化に関連する 3 量体 G タンパク質等の変異による KACH チャンネル電流の増加にも、選択的 KACH チャンネル阻害薬が有効かは明らかではない。

本研究では、上述の KCNJ5 遺伝子変異 (KCNJ5 c.303G>C, p.W101C)、および 3 量体 G タンパク質の G8 サブユニットをコードする GNB2 遺伝子の変異 (GNB2 c.155G>T, p.R52L) についても、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現系において電気生理学的実験を行い、NIP-151 の誘導体である高親和性・高選択性 KACH チャンネル阻害薬である NTC-801 が異常増加した KACH チャンネル電流を阻害し得るかを評価した。

(2) KACH チャンネロパチーを来たす病原性遺伝子変異の追加探索と同定されてきたものに対する選択的 KACH チャンネル阻害薬の有効性の検証

KACH チャンネロパチーに共通する臨床表現型は、KACH チャンネルが洞結節、房室結節、心房のいずれの細胞にも発現する分子であり、その生殖細胞系列のゲノム変異により、それらの細胞全てが障害されるため、洞不全症候群、房室ブロック、心房細動の各種不整脈を若年時より発症することである。若年発症や遺伝性が疑われる徐脈性不整脈患者から得たゲノム検体を用いて、次世代シーケンサーを活用した KACH チャンネル関連遺伝子の標的遺伝子解析により検出されてくる種々の変異について、機能ドメインと変異の位置関係による各種シミュレーションなどを用いることで変異の生化学的側面からの蛋白機能変化の推定などから病原性を予測する。病原性が疑われる変異に対して機能解析を実施し、KACH チャンネロパチーと診断し得る変異に対しても(1)と同様の方法で NTC-801 の有効性を検証することとした。

4. 研究成果

(1) まず、KCNJ5 遺伝子変異 (KCNJ5 c.303G>C, p.W101C) について、KCNJ5 WT/W101C KACH チャンネル (W101C ヘテロ接合変異型 KACH チャンネル) に対する NTC-801 の阻害作用について解析した。

アフリカツメガエルの卵母細胞に、常染色体優性遺伝形式によるヘテロ接合を模するため、等モル量の野生型 **KCNJ5** (**KCNJ5 WT**) と **KCNJ5 W101C** の cRNA を、野生型 **KCNJ3** (**KCNJ3 WT**) の cRNA とともに注入することにより、**W101C** ヘテロ接合変異型 **KACH** チャンネルを発現させ、全細胞電流量を二電極膜電位固定法により測定した。**NTC-801** は **DMSO** に溶解し、最終濃度 **0.01, 0.1, 1 μM** となるように灌流液を調製した。電流量がほぼ定常になった状態で **NTC-801** を含む灌流液を低濃度より添加し、その後同様に順に高濃度灌流液へ置換しながら電流量を記録した。記録終了時に **Ba²⁺** を加えて内因性リーク電流を測定した。**NTC-801** は、**KCNJ5 WT/W101C KACH** チャンネル (**W101C** ヘテロ接合変異型 **KACH** チャンネル) に対しても濃度依存性の阻害効果を示した (図 2)。

また、**GNB2** 遺伝子の変異 (**GNB2 c.155G>T, p.R52L**) についても、アフリカツメガエルの卵母細胞に **KCNJ3 WT** および **KCNJ5 WT** の cRNA を、変異型 **GNB2 R52L** および野生型 **Gy** の cRNA とともに注入することにより発現させ、全細胞電流量を二電極膜電位固定法により測定した。この変異型 **GNB2 R52L** を発現させた活性化状態の **KACH** チャンネルに対しても、**NTC-801** は野生型に対してと同様の濃度依存的な阻害効果を示した。

以上から、**KCNJ5** 遺伝子変異 (**KCNJ5 c.303G>C, p.W101C**)、および **KACH** チャンネルの活性化に関わる 3 量体 **G** タンパク質の **GNB2** 遺伝子の変異 (**GNB2 c.155G>T, p.R52L**) についても、アフリカツメガエル卵母細胞発現系で **NTC-801** の薬理学的効果を解析した結果、**NTC-801** はいずれの変異型 **KACH** チャンネルに対しても阻害効果を認め、選択的 **KACH** チャンネル阻害薬が、種々の遺伝子変異により **KACH** チャンネル電流が異常増加することで徐脈性不整脈を発症するというその病因が明確である **KACH** チャンネルパチーに対して、病態機序に基づいた新規の分子特異的治療薬となり得ることが示唆された。

(2) **KACH** チャンネルパチーに共通する臨床表現型は、**KACH** チャンネルが洞結節、房室結節、心房のいずれの細胞にも発現する分子であり、その生殖細胞系列のゲノム変異により、それらの細胞全てが障害されるため、洞不全症候群、房室ブロック、心房細動の各種不整脈を若年時より発症することである。若年発症や遺伝性が疑われる徐脈性不整脈患者からゲノム検体を収集し、次世代シーケンサーを活用して **KACH** チャンネル関連 45 遺伝子を対象として標的遺伝子解析により検出した種々の変異から、機能ドメインと変異の位置関係による病原性予測に基づいて候補として絞り込んだ 5 遺伝子 8 種類の変異について電気生理学的解析を行った。結果、一定の変化を認める変異を認めたものの、疾患寄与度の大きな変異として単独で病原性を証明できるまでの機能的変化を示すデータは得られず、病原性があると明確に考えられる新たな変異を同定することはできなかった。

以上、本研究により、**KACH** チャンネルパチーは希少遺伝性不整脈疾患であると見込まれるが、選択的 **KACH** チャンネル阻害薬 **NTC-801** がその病態機序に基づいた新規の分子特異的治療薬となり得ることが示された。これまで遺伝性徐脈の原因分子を標的とした治療薬はなく、一般の徐脈性不整脈に対する治療と同様、心臓ペースメーカー治療に頼らざるを得ないのが現状であるが、**KACH** チャンネルパチーに対して本薬はペースメーカー植え込み手術の代替となる新たな治療法になり得る可能性があると考えられる。

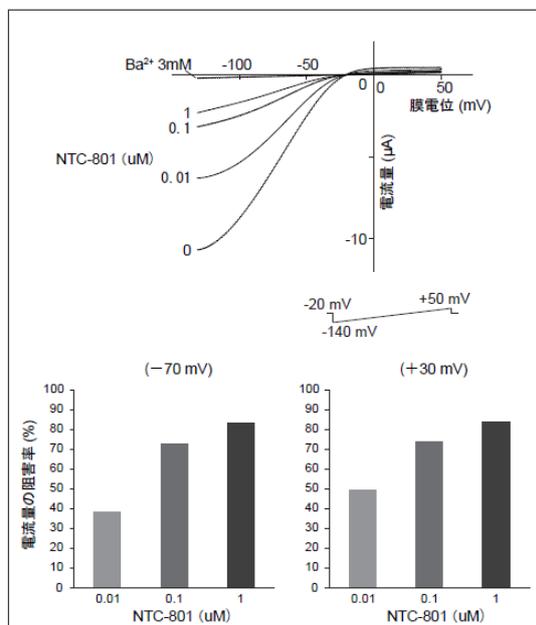


図2. WT/W101C変異ヘテロ接合変異型**KACH**チャンネルに対する**NTC-801**の作用

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

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------