

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591054

研究課題名(和文) KCNH2 (HERG) 電流活性化因子の同定と作用の検討

研究課題名(英文) Identification and Effects of KCNH2 (HERG) current-activating factor

研究代表者

中村 一文 (NAKAMURA, Kazufumi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10335630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心不全患者の予後改善のためには、心室性不整脈の機序を解明し、新たな治療ターゲットを探ることが必要である。KCNH2 (HERG) チャネルは、先天性QT延長症候群・先天性QT短縮症候群などの原因チャネルであり、心筋の再分極相において最も感受性の強い分子の一つである。我々は心室性不整脈を有する心不全患者の循環血液中にKCNH2(HERG)電流活性化因子を発見した。またKCNH2(HERG)に結合する抗体をWestern blottingにてみつけている。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the prognosis in patients with heart failure, to solve the mechanism of ventricular tachyarrhythmia and to find new target of treatment for ventricular tachyarrhythmia are needed. KCNH2 (HERG) channel is related to congenital long or short QT syndrome and is one of the most susceptible channel. We found circulating KCNH2(HERG) current-activating factor in patients with heart failure and ventricular tachyarrhythmia. We also found anti-KCNH2 antibody.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心室性不整脈 HERG電流 心不全 イオンチャネル QT延長症候群 HEK293細胞 自己免疫

## 1. 研究開始当初の背景

治療法の進歩にもかかわらず、心不全患者の予後は不良であり、5年間の死亡率は約50%で、その約40%は心臓突然死が原因である。突然死の原因の8割は心室細動(VF)・心室頻拍(VT)などの致死性心室性不整脈であるといわれている。従って心不全患者の予後改善のためには、心室性不整脈の機序を解明し、新たな治療ターゲットを探ることが必要である。

心室性不整脈発生には、心筋の不応期のばらつきなど電氣的不安定性(electrical instability)が関与する。それには種々のイオンチャネルのリモデリングが影響するが、中でも遅延整流カリウム電流の速い成分( $I_{Kr}$ )を構成するKCNH2(HERG)チャネルは、先天性QT延長症候群・先天性QT短縮症候群ならびに薬剤などによる後天性QT延長症候群の原因チャネルであり最も感受性の強い標的分子の一つである。近年我々は、循環血液中の抗KCNH2(HERG)チャネル抗体がその電流を減弱させる自己免疫性QT延長症候群の存在を発見し報告した(Nakamura and Katayama et al. *J Am Coll Cardiol*. 2007)。続いて心不全患者においても、循環血液中にKCNH2(HERG)チャネル修飾因子がないか検索したところ、興味深いことに、心室性不整脈を有する心不全患者の血清はHEK293細胞に発現させたKCNH2(HERG)電流を逆に増強させた(Sugiyama & Nakamura et al. *PLoS One*. 2011)。すなわち

**KCNH2(HERG)電流活性化因子を循環血液中に認めた。**心室性不整脈のない心不全患者では認めないことから、この因子が電氣的不安定性を誘導し、不整脈発生に関与する可能性が考えられる。そこで本研究においてはこの因子の分離・同定を主目的とし、さらに動物実験においてその因子の作用の確認を副目的として検討を行う。今後本因子が新たな治療ターゲットとしての地位を確立し、将来的に心不全における心室性不整脈発生の抑制・心不全の予後改善につながることを期待したい。

## 2. 研究の目的

心不全患者の予後改善のためには、心室性不整脈の機序を解明し、新たな治療ターゲットを探ることが必要である。KCNH2(HERG)チャネルは、先天性QT延長症候群・先天性QT短縮症候群などの原因チャネルであり、心筋の再分極相において最も感受性の強い分子の一つである。我々は心室性不整脈を有する心不全患者の血清中に**KCNH2(HERG)電流活性化因子を発見した。**本研究の目的は1)KCNH2(HERG)電流活性化因子の分離・同定と2)動物実験においてKCNH2(HERG)電流活性化因子の作用の確認をすることである。本因子が心不全における心室性不整脈の新たな治

療ターゲットとなることを期待する。

まず心室性不整脈を有する心不全患者において血液中のKCNH2(HERG)電流活性化因子を同定するために、血清中KCNH2(HERG)結合タンパクの抽出・同定を行う。

具体的にはtag付HERGを作成し、免疫沈降でHERG結合タンパクを回収し、最終的にMALDI-TOF MS解析にて同定を行う。

## 3. 研究の方法

1)KCNH2(HERG)電流活性化因子の分離・同定 血清中HERG結合タンパクの抽出・同定を行う。tag付HERGを作成し、免疫沈降でHERG-tag-beads複合体を形成。この複合体に対して患者血清を混和し、再度beadsを沈降することでHERG結合タンパクを複合体とともに回収する。複合体をSDSで変性させアクリルアミドゲルに電気泳動でタンパクを展開する。銀染色もしくはCBB染色でタンパク質を染色する。病歴上VT/VFの有無で染色されたタンパク量に差があれば、MALDI-TOF MS解析を行いHERG結合タンパクの同定を行う。

2)動物実験におけるKCNH2(HERG)電流活性化因子の作用の確認 血清をラット単離心筋細胞・摘出灌流心に投与し、活動電位持続時間の変化を調べる。ラットに持続皮下注し、不整脈の有無を確認する。

## 4. 研究成果

心室性不整脈発生には、心筋の不応期のばらつきなど電氣的不安定性(electrical instability)が関与する。それには種々のイオンチャネルのリモデリングが影響するが、中でも遅延整流カリウム電流の速い成分( $I_{Kr}$ )を構成するKCNH2(HERG)チャネルは、先天性QT延長症候群・先天性QT短縮症候群ならびに薬剤などによる後天性QT延長症候群の原因チャネルであり最も感受性の強い標的分子の一つである。近年我々は、循環血液中の抗KCNH2(HERG)チャネル抗体がその電流を減弱させる自己免疫性QT延長症候群の存在を発見し報告した(Nakamura and Katayama et al. *J Am Coll Cardiol* 2007)。続いて心不全患者においても、循環血液中にKCNH2(HERG)チャネル修飾因子がないか検索したところ、興味深いことに、心室性不整脈を有する心不全患者の血清はHEK293細胞に発現させたKCNH2(HERG)電流を逆に増強させた。(Sugiyama and Nakamura et al. *PLoS One* 2011)。すなわちKCNH2(HERG)電流活性化因子を循環血液中に認めた。心室性不整脈のない心不全患者では認め

ないことから、この因子が電氣的不安定性を誘導し、不整脈発生に關与する可能性が考えられる(中村一文 呼吸と循環 2012)。心不全に伴う心室頻拍患者の治療にはアミオダロンが用いられるが、アミオダロンはKCNH2(HERG)電流を抑制することからも、この因子の作用が考えられる。

心室性不整脈を有する心不全患者血液中のKCNH2(HERG)電流活性化因子を同定を目的として、血清中KCNH2(HERG)結合タンパクの抽出を試みた。そのためTag付KCNH2(HERG)の作成をおこなった。

pcDNA3.1-V5-His (invitrogen)にpcDNA3-HERG由来のHERGをサブクローニングで組み込み、pcDNA3.1-HERG-V5-Hisを作成した。その後KCNH2(HERG)-V5-beads複合体の形成をこころみているが、うまくいっていない。その原因を究明中である。

現在のところ血清中KCNH2(HERG)に結合するIgGすなわち、抗体をWestern blottingにてみついている。

その後シェーグレン症候群や二次性のQT延長症候群の患者の血清にて、HERG電流に影響を及ぼす因子の有無をパッチクランプにて検討したが、有意なものはえられなかった。

心不全において血液中においても酸化ストレスが亢進しており、酸化ストレス亢進が、心筋細胞において、カルシウム過負荷をひきおこすことを報告した(日本薬理学会雑誌 2012)。

#### 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 4 件)

1. 中村一文、中川晃志、杉山洋樹、森田宏、草野研吾、伊藤 浩. 重症心不全に伴う不整脈の薬物治療. 呼吸と循環 60(4), S2-S4, 2012 査読無
2. 中村一文、伊藤 浩. 慢性心不全治療ガイドライン. 岡山医学会雑誌 124(1)71-73, 2012 査読有
3. 中村一文、三浦大志、松原広己、伊藤 浩. 心不全における酸化ストレスとカルシウム過負荷. 日本薬理学会雑誌 140(6):265-269, 2012 査読無
4. 三好章仁、草野研吾、中川晃志、西井伸洋、永瀬 聡、中村一文、森田 宏、伊藤 浩. 心不全を合併した心房細動症例に対する経口アミロダオンの効果. PROGRESS IN MEDICINE 32(suppl1):54-56, 2012 査読無

[学会発表](計 15 件)

1. Nakamura K. Circulating KCNH2 Current-Activating Factor in Patients with Heart Failure -Novel Mechanism of Ventricular Tachyarrhythmia- 第4回センシングバイオロジー・シンポジウム (2014/1/30 東京医科歯科大学難治疾患研究所 東京都)
2. 中村一文. 心不全と体液管理. 高知 Cardiology フォーラム 特別講演 (2014/6/27 土佐御苑 高知市)
3. 中村一文. 心不全治療によるリバーシブル・リモデリング -不全心は回復するのか?- 第104回日本循環器学会中国・四国合同地方会 共催セミナー (2014/7/18 岡山コンベンションセンター 岡山市)
4. 中村一文. 心不全治療によるリバーシブル・リモデリング -不全心は回復するのか?- 2nd Hiroshima Cardiovascular Seminar (2014/9/16 広島大学広仁会館 広島市)
5. 中村一文. 心血管疾患のリバーシブル・リモデリング -治療による回復- 第15回福岡心不全研究会 (2014/9/19 ホテルオークラ福岡福岡市)
6. 中村一文. 「リバーシブル・リモデリングへの挑戦I」の覚え書き. 第62回日本心臓病学会学術集会 (2014/9/26 仙台市民会館 仙台市)
7. 中村一文. 心不全治療 Up to Date 特別講演 第37回岩国循環器疾患懇話会 (2014/12/2 岩国国際観光ホテル 岩国市)
8. 中村一文. 心不全治療 Up to Date 明石ベイエリア循環器カンファレンス (2013/6/6 シーサイドホテル舞子ピラ 神戸市)
9. 中村一文. 心不全患者の不整脈とモニター観察の注意点. 平成25年度日本心不全学会チーム医療推進委員会企画 教育セミナー 札幌会場 (2013/7/6 北海道大学医学部学友会館フラテホール大研修室 札幌市)

10. 中村一文. 基調講演 重症心不全に伴う不整脈の薬物治療. 岡山心臓血管研究会 (2013/7/24 岡山大学 岡山市)
11. 中村一文. 心不全治療 Up to Date. 横浜心臓研究会横浜市大医学部附属市民総合医療センター 特別講演 (2013/11/5 青葉台フォーラム 横浜市)
12. 中村一文. 重症心不全に伴う不整脈の薬物治療. 循環器合同エキスパートミーティング (2012/4/14 アークホテル 岡山 岡山市)
13. 中村一文. 重症心不全に伴う不整脈の発生機序と薬物療法. 久留米心疾患セミナー (2012/7/12 ホテルニューブラザ 久留米市)
14. 中村一文. 心不全治療 Up to Date -ガイドラインから iPS まで- 第二回姫路心血管病ネットワークセミナー (2012/11/1 ホテル日航姫路 姫路市)
15. 中村一文. 「心不全と体液管理」(特別講演) 姫路水利尿カンファレンス (2012/12/11 姫路キャッスルグランビリホテル 姫路市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 中村一文. 「慢性心不全の薬物治療 抗不整脈薬」 心不全ケア教本 編集: 真茅みゆき・池亀俊美・加藤尚子、p161-165 (2012 年) メディカル・サイエンス・インターナショナル

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

〔その他〕  
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 一文 (NAKAMURA Kazufumi)  
 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号 : 1 0 3 3 5 6 3 0

(2)研究分担者

森田 宏 (MORITA Hiroshi)  
 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号 : 5 0 3 2 2 2 2 7

(3)研究分担者

吉田 賢司 (YOSHIDA Masashi)  
 岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号 : 7 0 5 3 2 7 6 1

(4)研究分担者

伊藤 浩 (ITO Hiroshi)  
 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号 : 9 0 4 4 6 0 4 7