

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461633

研究課題名(和文) QT延長症候群に対する ω -3多価不飽和脂肪酸の抗不整脈作用の検討

研究課題名(英文) Study of the anti-arrhythmic effects of omega-3 PUFA to long QT syndrome

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心筋のNa⁺チャネル(Nav1.5)においては、 ω -3系-多価不飽和脂肪酸PUFA(EPA)と ω -6系-PUFA(AA)の両方においてNa⁺チャネル電流の抑制が認められた。QT延長症候群(LQTS)患者における、EPAとAAの濃度比(EPA/AA比)の平均値は、一般日本人の値と比べると低値を認めた。さらに、20歳以上の失神発作を認めた群のEPA/AA比は、失神発作を認めなかった群の値と比べ低値を認めた。PUFAは、Nav1.5チャネルを調節することが認められ、LQTS患者では、低EPA/AA比が失神発作のリスクを上げる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the myocardial Na⁺ channel (Nav1.5), INa suppression was observed in both of the cell with the ω -3 PUFA (EPA) or ω -6 -PUFA (AA). In the long QT syndrome (LQTS) patients, the mean value of the concentration ratio of EPA and AA (EPA / AA ratio), showed a low value compared with the value of the general Japanese. In the group of 20 years of age or older with a syncope episode, EPA / AA ratio had a significant low value compared to the value of the group with no syncope episode. PUFA was found to modulate the Nav1.5 channel. The low-EPA / AA ratio raises the risk of syncope episode was considered.

研究分野：分子生物学

キーワード：QT延長症候群 多価不飽和脂肪酸 EPA/AA

1. 研究開始当初の背景

QT 延長症候群 (LQTS) は、QT 間隔の延長と Torsade de pointes (TdP) という特徴的な心室性不整脈による失神や突然死をきたす遺伝性不整脈疾患である。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 13 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、1200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。発作や突然死を予防するために、投薬治療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。

一方、エイコサペンタエン酸 (EPA) などの -3系-多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は、心臓の再分極に影響を及ぼすことが示唆され、抗不整脈効果を発揮する可能性が報告されはじめている。これまでに、-3系PUFAが心臓の電位依存性 $Na(+)$ 電流に対し、抗不整脈作用を示した、(Kang JX, et al. Proc Natl Acad Sci U S A., 1996)、逆に、アラキドン酸 (AA) などの -6系PUFAが、心臓のKVチャンネルの活動電位を減少させる (Moreno C, et al. Front Pharmacol., 2012) などの報告がある。また、電位依存性Kチャンネルが原因によって生じるてんかんの患者において、PUFA誘発性開口によっててんかん発作を防ぐことができるとの報告もある。しかし、これらの作用メカニズムは不明のままである。また、-3系PUFAであるEPAと-6系PUFAであるアラキドン酸(AA)の比(EPA/AA比)が0.75以上の群においてEPA/AA比が0.75未満の群より主要冠動脈イベントリスクが有意に低く ($P=0.031$)、1.00以上の群も1.00未満の群より有意に低い ($P=0.021$) との報告がある (Itakura H, et al. J Atheroscler Thromb., 2011)。以上のことより、少なくともEPA/AA比が0.75以上であれば有意なイベント抑制を期待できると考えられている。

しかし、LQTS患者において、EPA/AA比の評価検討は、世界的にも行われていない。LQTS関連心事故のリスクファクタとして、性別、年齢、QTc間隔値、失神歴、遺伝子型があげられているが、個別の評価指標とはなりえていない。遺伝子解析は、費用、時間的にも臨床上負担が大きくなかなか全員には行えないため、臨床上、症状発症の予防に役立つ指

標を探索する必要がある。

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 K^+ チャンネル、 Na^+ チャンネルに対する、-3系PUFAの抗不整脈作用への関与を明らかにし、LQTS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。

心筋チャンネル蛋白の遺伝子のうち、LQTSを含む多様な不整脈疾患の疾患遺伝子である*KCNH2*、*SCN5A*がコードするHERGチャンネル、Nav1.5チャンネルに着目し、以下を行う。

(1) -3系PUFAのHERGチャンネル、Nav1.5チャンネルに対する抗不整脈作用を解析する。

(2) LQTS患者で認められた遺伝子異常と同じ変異型チャンネルに対する-3系PUFAの影響を解析する。

(3) LQTS患者において血中の-3系PUFA (EPA) と -6系PUFA (AA) の比 (EPA/AA比) を測定し、心イベント予防のための指標の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) -3系PUFAのHERG、Nav1.5チャンネルに対する抗不整脈作用

電気生理学的解析:

KCNH2 (K^+ チャンネル、HERG)、*SCN5A* (Na^+ チャンネル、Nav1.5) の2種類の心筋チャンネルを発現させた細胞を用いて、-3系PUFA (EPA: エイコサペンエン酸)、-6系PUFA (AA: アラキドン酸) のHERG、Nav1.5チャンネルに対する影響をパッチクランプ法を用いて解析した。

(2) LQTS患者で認められた遺伝子異常と同じ変異型チャンネルに対する-3系PUFAの影響の解析

免疫染色法:

変異型のチャンネルを発現させた細胞を用い、Nav1.5抗体により免疫染色を行い、変異型Nav1.5チャンネルの細胞内局在を、共焦点顕微鏡を用いて調べた。

(3) LQTS患者において血中の-3系PUFA (EPA) と -6系PUFA (AA) の比 (EPA/AA比) を測定し、心イベント予防のための指標の検討

LQTS患者およびLQTS疑いの患者134名について血液中の脂肪酸4分画検査を行い、-3系PUFA (EPA) と -6系PUFA (AA) の濃度比 (EPA/AA比) を算出した。同時に患者の失神発作の有無等の臨床所見についても調査し、EPA/AA比と表現型との検討を行った。

4. 研究成果

(1) -3系 PUFA の HERG、Nav1.5 チャンネルに対する抗不整脈作用

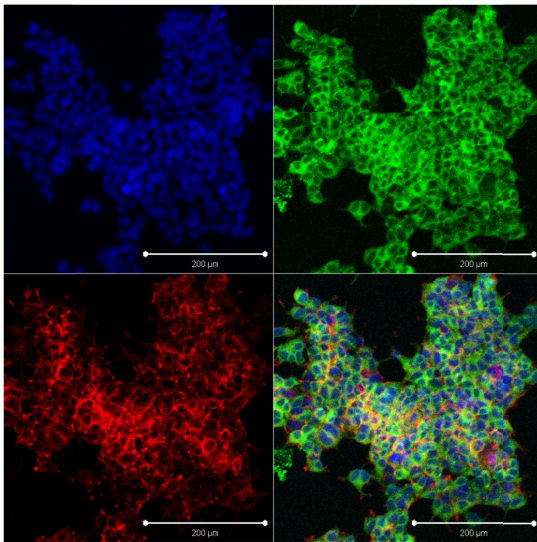
-3系-PUFA(EPA)と -6系-PUFA(AA)をそれぞれ 100nM, 5μM, 20μM の濃度で、心筋の K⁺チャンネル(HERG)、Na⁺チャンネル(Nav1.5)の安定株細胞に添加し、パッチクランプ法を用いて解析した結果、Nav1.5 チャンネルにおいては、EPA(n=11) および AA(n=5)両方において Na⁺チャンネル電流のピーク値抑制傾向が認められた。一方、今回の検討では、HERG チャンネルに対する、EPA(n=9) および AA(n=10)のはっきりとしたK⁺チャンネル電流のピーク抑制傾向や開放促進傾向は認められなかった。

(2) LQTS 患者で認められた遺伝子異常と同じ変異型チャンネルに対する -3系 PUFA の影響の解析

LQTS 患者で認められた遺伝子異常 [SCN5A:L1988R] を発現させた安定株細胞についてその変異型ナトリウムチャンネル (Nav1.5 L1988R) の細胞内における局在を免疫染色法により観察した結果、Nav1.5 L1988R の細胞内局在は、小胞体および Golgi 体に多く存在し、細胞膜上の発現は少なかった。このため、電気生理学的解析が難しく、今回作成した Nav1.5 L1988R チャンネルの -3系 PUFA の影響の解析は、今後の検討が必要である。

DAPI (核)

Nav1-5 L1988R



Phalloidin
(アクチン骨格)

Merge
(全てを重ねたもの)

(3) LQTS 患者において血中の -3系 PUFA (EPA)と -6系 PUFA (AA)の比(EPA/AA 比)を測定し、心イベント予防のための指標の検討

年齢(歳)	21以上				20以下			
	+	-	+	-	+	-	+	-
失神発作	+	+	-	-	+	+	-	-
遺伝子変異	+	-	+	-	+	-	+	-
人数	31	13	11	5	28	7	24	15
EPA/AA比	0.255	0.228	0.335	0.248	0.173	0.256	0.159	0.101
アラキドン酸 (μg/ml)	91.23	90.23	120.27	76.4	79.32	77.86	80	84.8
シホモ リノレン酸 (μg/ml)	26.26	21.92	30.18	17.2	24.64	24.43	24.38	22.1
DHA (μg/ml)	56.74	46.62	89	38.4	41.82	47.43	41.21	34.53
EPA (μg/ml)	23.95	19.98	41.13	19.66	13.82	19.61	14.3	8.65

LQTS 患者および LQTS 疑いの患者について血液中の脂肪酸 4 分画検査を行い、 -3系-PUFA(EPA)と -6系-PUFA(AA)の濃度比(EPA/AA 比)等を算出した。対象者における EPA/AA 比の平均は、 0.24 ± 0.16 であった。一般日本人の EPA/AA 比 0.6 と比べると低値を認めた。さらに、20 歳以上の失神発作を認めた群の EPA/AA 比は、 0.24 ± 0.14 であり、失神発作を認めなかった群の 0.33 ± 0.21 と比べ低値を認めた。

一方、20 歳以下の対象者においては、失神発作を認めた群と認めない群での EPA/AA 比の差は認められなかった。20 歳以下の対象者の EPA/AA 比は 0.17 と一般日本人の値から比べるとかなり低値であり、今後、年齢に基づいた指標評価の検討が必要である。

LQTS を含む不整脈疾患の多くが、心筋のチャンネル蛋白の異常により生じている。特に、LQTS 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。今回の結果より、多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、心筋 Na⁺チャンネル(Nav1.5)を調節することが認められ、EPA/AA 比が低値な対象者(20 歳以上)においては、失神発作のリスクが上がる可能性が考えられた。

今後、 -3系 PUFA (EPA) が LQTS に対しても、有効な抗不整脈作用があることを明らかにできれば、LQTS における予防法、治療法の開発や創薬の促進につながり、Genotype-positive/phenotype-negative など無症候性の LQTS 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。

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)

Izumi G, Hayama E, Yamazawa H, Inai K, Shimada M, Furutani M, Nishizawa T, Furutani Y, Matsuoka R, Nakanishi T. Compound Mutations Cause Increased Cardiac Events in Children with Long QT Syndrome: Can the Sequence Homology-Based Tools be Applied for Prediction of Phenotypic Severity? *Pediatr Cardiol.* 2016 Apr 4. [Epub ahead of print] 査読あり

〔学会発表〕(計0件)

なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

羽山恵美子 (HAYAMA EMIKO)
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00349698

中西 敏雄 (NAKANISHI TOSHIO)
東京女子医科大学・医学部・研究生
研究者番号：90120013