

令和元年5月31日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0194

研究課題名(和文) 遺伝性致死性不整脈におけるトリガー発生機序の解明とin silico予測

研究課題名(英文) The elucidation of mechanisms underlying triggered activity in inheritable lethal arrhythmias: in silico predictions

研究代表者

津元 国親 (TSUMOTO, Kunichika)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70353331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：QT延長症候群や心不全、Brugada症候群などで不整脈が発生する際、発症の引き金となるトリガー応答が発生する。心筋細胞の活動電位2相から3相にかけて生じる一過性の脱分極(早期後脱分極)や、活動電位の短縮に引き続き短い連結期で再び興奮を引き起こすPhase-2リエントリー(P2R)は、不整脈トリガーの典型例である。P2Rは、心筋細胞のNaチャンネル発現の細胞体側面膜からの選択的な減少と心臓組織内でのNaチャンネルの空間的な発現差の組み合わせによって発生することを明らかにした。さらに、活動電位の過剰な延長に伴うL型Caチャンネル電流の再活性化が、早期後脱分極の発生に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心室頻拍や心室細動といった心室性不整脈は、突然死をもたらす。これらの致死性不整脈の発生に先行して、発症のきっかけとなる応答(トリガー)が発生する。このトリガーの発生を予測し、抑止できれば、心臓突然死の危険性を低減できる。本研究では、不整脈トリガーの発生機序を解明し、新たな不整脈発生予測法の開発に資する重要な成果を得た。本成果は、致死性不整脈の誘発制御理論の確立に向けた礎となる。

研究成果の概要(英文)：It is believed that arrhythmias in patients with long QT syndrome, heart failure, and Brugada syndrome are caused by a triggered activity that preceded the arrhythmia onset. For instance, cardiac action potential with transient depolarizations that occurs during action potential (AP) phase 2 to 3 (early afterdepolarization) is a typical example of the triggered activity. Furthermore, an AP shortening followed by re-excitation, which is referred to as phase-2 reentry, is the triggering mechanism of ventricular fibrillation in the Brugada syndrome. We showed that a combination of selective reduction of cardiac sodium channel expression from the lateral membrane in each cardiomyocyte and spatial dispersion of sodium channel expression in the ventricle is responsible for phase-2 reentry mechanism. Furthermore, we elucidated that reactivation of L-type calcium channel current accompanying excessive prolongation of AP leads to the development of early afterdepolarization.

研究分野：生理学一般

キーワード：生理学 循環器・高血圧 細胞・組織 生物物理 興奮伝播 心筋細胞 活動電位

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩は、QT 延長症候群 (LQTS) や Brugada 症候群 (BrS) に代表される遺伝性不整脈疾患の原因が、心筋イオンチャネル構成タンパク質をコードする遺伝子の異常であることを明らかにしてきた。近年、遺伝子の機能解析やその変異解析から得たデータを数理モデルに反映させ、コンピュータシミュレーションによって心臓不整脈のメカニズムを明らかにとする融合研究が、多数展開されている。遺伝子変異による心筋イオンチャネルの機能変化が、心筋活動電位や組織内興奮伝播、そして不整脈に対する受功性や持続性にどのように影響するかが調べられてきた。つまり、不整脈の起き易さ、そして発生した不整脈の維持され易さに遺伝子異常がどのように関与するかといった、不整脈基質に関する研究が中心を占めている。

動物実験や理論研究において、研究対象となる不整脈は、トリガー (期外刺激) を人為的に与えることで誘発する。それゆえ、心臓における不整脈は、きっかけとなるトリガー応答によって惹起されると考えられている。しかしながら、トリガーがどのように発生するのか、不整脈トリガーに関する研究は殆ど手付かずのままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、致死性不整脈発生のきっかけとなる「期外刺激」(不整脈トリガー)の発生メカニズムを解明し、その発生予測を可能とする方法論を確立することにある。とりわけ、いまだ不整脈の発生機序が解明されていない遺伝性不整脈疾患である BrS を対象とする。BrS では、活動電位持続時間長 (APD) が急激に短縮し、早期に再分極した心筋細胞が短い連結期で再び脱分極 (興奮) する、Phase-2 Reentry (P2R) の機序により誘発すると考えられている。また、LQTS や薬物誘発性不整脈においては、早期後脱分極 (Early AfterDepolarization: EAD) と呼ばれる活動電位 2 相から 3 相にかけて生じる一過性の脱分極が、Torsades de Pointes (多形成心室頻拍) や心室細動の発生をトリガーすると考えられている。そこで、P2R や EAD といったトリガー応答の発生機序を明らかにする。

これらのトリガー応答の発生機序の解明を通して、期外刺激の発生機序に基づいた不整脈制御理論の構築と致死性不整脈の発生予測・予防法を確立する。

3. 研究の方法

本研究では、コンピュータ (silicon) 上でのモデル構築とシミュレーション (*in silico*) 解析により、上記目的を達成した。以下詳細を述べる。

(1) BrS モデルの構築と P2R 発生機序解析

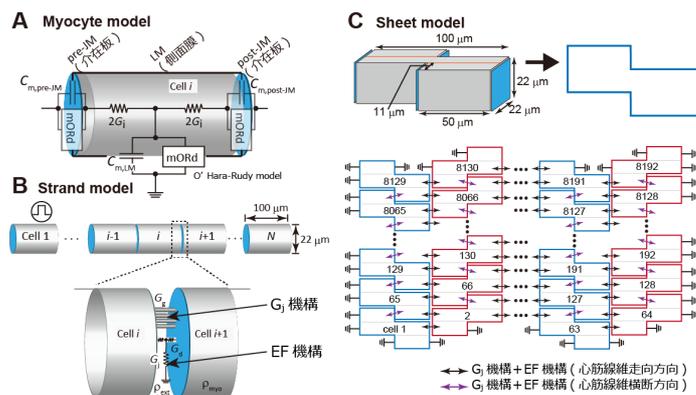


図 1 : 心筋ストランドモデルとシートモデル模式図。A : 3つの細胞膜セグメントからなるヒト心室筋モデル。B : Gap junction (G_j 機構) と、細胞間隙における細胞外電位変化を介した興奮伝播機構 (EF 機構) により電氣的に結合する。C : 心筋細胞体 (側面) に存在する介在板を考慮した心筋細胞モデル (上) と心筋シートモデル (下)。

本研究では、 Na^+ チャネルの細胞内分布変化に着目した。心室筋細胞膜を3つの膜コンパートメント (介在板 $\times 2$; 細胞側面体膜) から構成し (図 1A)、その各々の細胞膜コンパートメントに、ヒト心筋細胞の実験データを最も良く再現すると言われるヒト心室筋活動電位モデル (O'Hara et al, *Plos Comp Biol*, 2011; 以下 ORd モデル) を割り当てた。心筋細胞 (介在板) 間の Gap junction 機構 (G_j 機構) と膜電位相互干渉機構 (EF 機構) による電氣的結合を導入した心筋ストランドモデル (図 1B) を構築した。実際の心室筋細胞は、その細胞体 (細胞側面) に不規則に介在板が存在し、この介在板が電氣的な結合の足場となる。細胞側面に介在板を設けた細胞形態に改良し、細胞側面部で向かい合う介在板間にも G_j

機構と EF 機構を導入することによって、心筋シートモデルを構築した (図 1C 上)。

(2) ヒト心筋モデル細胞の分岐解析による EAD 解析

心室筋細胞の活動電位が過剰に延長すると、EAD 発生の危険性が高まることが知られている。我々は、非線形力学系にみられる動的挙動の数学的解析手法である分岐解析を導入し、ヒト心室筋細胞モデル (Kurata 等, *Biophys J*, 2005) における活動電位の動的安定性変化 (EAD 発生)

への各イオンチャネル電流の役割を調べた。特に本研究では、急速活性化型遅延整流性 K^+ チャネル電流 (I_{Kr} 電流) 変化の活動電位持続時間への影響を調べた。EAD が発生する (活動電位の安定性変化が生じる) パラメータ値を同定し、EAD 発生 of 動的メカニズムを明らかにした。

(3) 薬物誘発性 EAD 解析

hERG (human Ether-a-go-go Related Gene) チャネルは、心筋細胞における I_{Kr} 電流を構成すると考えられている。第 III 群抗不整脈薬である Nifekalant は、この I_{Kr} 電流を抑制する作用を示すが、膜電位条件によっては電流増強作用 (facilitation とよぶ) を誘導できる。この facilitation 作用の有無が、活動電位に与える影響を検討するため、hERG を HEK293 細胞に発現させ、イオンチャネルの電気生理学的性質、ならびにの hERG チャネルへの薬理作用の実験データを基に、新しい hERG チャネルモデルを構築した。ORd モデルにこの hERG チャネルモデルを組み込むことで、Nifekalant のヒト心室筋細胞の活動電位への影響を予測する *in silico* モデルを構築し、EAD の発生について *in silico* 解析を行った。この *in silico* モデルから得られた予測を検証するため、facilitation 作用を示す Nifekalant と、facilitation 作用を示さない Dofetilide をそれぞれウサギ心室筋細胞に暴露し、心筋細胞からの活動電位記録を比較検討することで、*in silico* モデルによる予測の妥当性を検証した。

4. 研究成果

(1) BrS におけるトリガー発生機序の解明

BrS における不整脈トリガーである P2R の発生機序の解明と、発生条件の定量化を目的とし、心筋細胞における Na^+ チャネル発現の局所的変化と P2R 発生との関係を明らかにした (図 2A)。本研究で提案した心筋ストランドモデルの興奮伝導シミュレーションから、心筋細胞体側面膜から Na^+ チャネル発現の大幅な低下が、活動電位を急激に短縮した。心筋ストランドモデル内に、 Na^+ チャネルの発現レベルの異なる部位 (長い APD を保持する部分と短い APD を示す部分) が存在する時に、APD の長い領域 (脱分極レベルを維持した部分) から、APD の短縮した領域に gap junction を介して逆行性に電気緊張性電流が流れることで、APD の短い心筋細胞が再び興奮する P2R (図 2B および 2C) が発生することがわかった。APD の短縮には、L 型 Ca^{2+} チャネル電流 ($I_{CaL,LM}$ 電流) も関与した。細胞側面膜から Na^+ チャネルの発現が低下した時、この活動電位 0 相での電位変化 (振幅) が小さくなる。この電位変化が、L 型 Ca^{2+} チャネルを活性化する閾値に達しない場合、活動電位は速やかに再分極することがわかった。

P2R の発生機序に基づいて、L 型 Ca^{2+} チャネル電流の増強が P2R の発生を抑制するかを検討した。 β 受容体刺激を想定し、L 型 Ca^{2+} チャネル電流がコントロール値の 3 倍に増強したと仮定した条件で、P2R の発生が抑制された。この結果は、P2R の発生機序に基づく新たな不整脈発生予測法の開発に資する重要な成果であり、現在、論文投稿準備中である。

次に、P2R の発生から心室頻拍・心室細動へと至る機序を明らかにするため、2 次元的な広がりをもつ心筋シートモデルを構築した (図 3C)。細胞体側面の介在板を考慮した細胞形態へと変更した心筋細胞モデルを 2 次元正方形格子状に配列したシートモデルを考えた (図 3A)。心筋ストランド走行方向に刺激した時 (図 3A-i) の興奮波面の伝播速度 (CV_L) は、生理的条件である ~ 70 cm/s に達した (図 3A-iii) が、心筋走行方向に直交する方向へ

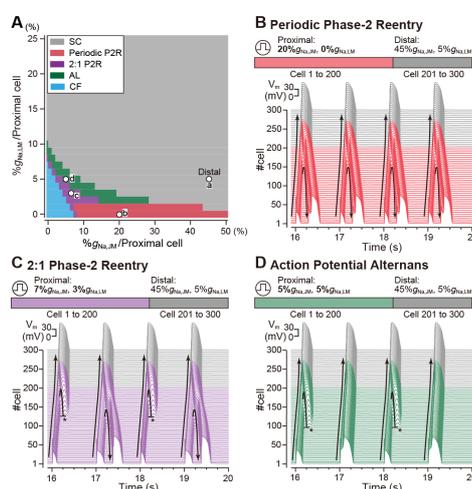


図 2: 細胞内 Na^+ チャネル分布変化による Phase-2 Reentry の発生。A: 介在板と細胞側面膜の Na^+ チャネル発現量に対する電気現象の相図。B-D: 周期的 P2R (B), 2:1 P2R (C), 交代伝導 (D) の例。

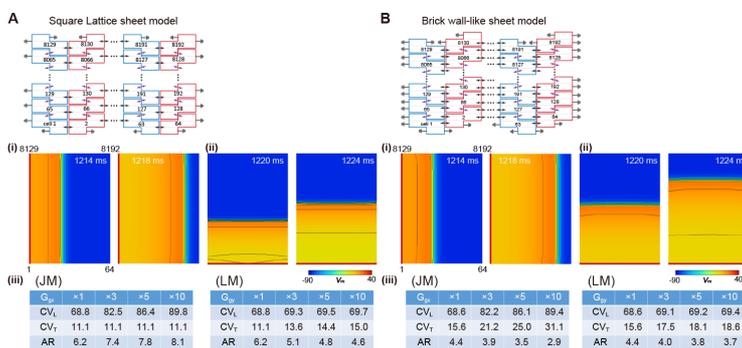


図 3: 心筋シートモデルと興奮伝播シミュレーション解析。心筋ストランド走向方向とその横断方向の gap junction コンダクタンス変化に対する興奮伝播速度と異方性比。

の興奮伝播速度 (CV_T) は、 CV_L の約 1/6 であった。一般に、ヒト心臓における興奮伝播には、 CV_L と CV_T が異なる異方性があること、その CV_L/CV_T 比 (Anisotropic Ratio: AR) はおよそ 3 であることが知られている。この正方格子状に心筋細胞を配置したシートモデルでは、心室組織で見られる異方性を達成できない ($AR \sim 6$) ことがわかった。そこで、心筋ストランドの分枝構造を模擬し、煉瓦状に心筋細胞を配置した心筋シートモデルを構築した (図 3B)。その AR はおよそ 4.4 であった。さらに、心筋ストランド走行方向の gap junction を独立に増加することで、 $AR \sim 3$ となる生理学的な心筋シートモデルが構築できた。この成果によって、 Na^+ チャンネルの組織上での局在と致死性不整脈発生との関係を検討することが可能となった。ここで得られた成果は、現在論文投稿準備中である。

(2) 心室性不整脈トリガーの解析

心室筋細胞の活動電位長を規定する再分極電流、すなわち遅延整流性 K^+ チャンネル電流が减弱した時の活動電位の動的安定性の変化を解析した (研究方法を参照)。その再分極電流である I_{Kr} 電流が減少する時、活動電位は saddle-node (SN) 分岐によって消失した (図 4A)。その消失の後、EAD を伴う活動電位 (状態) へのジャンプが起きる。また、SN 分岐の発生による活動電位応答の間のジャンプ

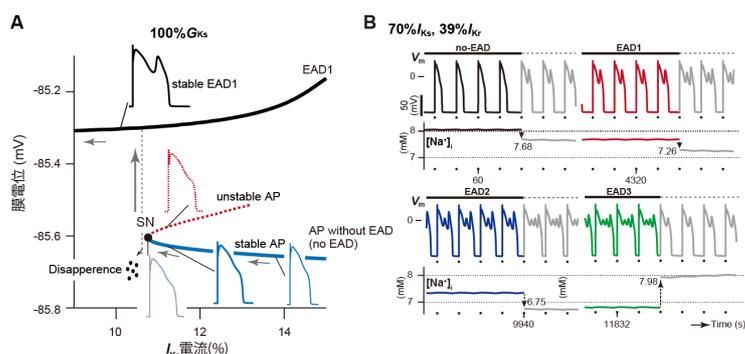


図 4: Kurata モデル心室筋細胞にみられる活動電位の 1 パラメータ分岐図 (A) と活動電位応答の共存現象の例 (B)

は、解の共存現象の存在を示唆する。共存現象とは、ある固定パラメータ値において、システムが複数の安定状態を有しており、その初期条件に依存して、異なる応答が観察される現象である。本研究で検討した Kurata モデルには、 I_{Kr} 電流の減少に加え、再分極電流である緩徐活性型遅延整流性 K^+ チャンネル電流 (I_{Ks} 電流) の减弱により、複数の EAD 応答が共存することが明らかとなった (図 4B)。このような複数の EAD 応答の共存は、局所的な APD 差をもたらし、不整脈をトリガーする可能性がある。EAD の発生から不整脈の状態に移行するメカニズムの一つである可能性を新たに提案できた。

(3) hERG チャンネルモデリングと Facilitation 作用による EAD の誘発抑制効果

HEK293 細胞に発現させた hERG チャンネルの膜電位固定による電流測定並びに、Nifekalant の用量依存性電流の測定記録を基に、 I_{Kr} 電流の *in silico* モデルを構築した。本研究において新たに構成した I_{Kr} 電流モデルは、HEK293 細胞を用いた hERG チャンネルの実験の結果を非常によく再現した (図 5A)。また、Nifekalant の用量依存的な電流抑制、ならびに活動電位様波形固定による hERG 電流変化を極めてよく再現した。活動電位シミュレーションにおいては、hERG チャンネル阻害作用と facilitation 作用を併せ持つ Nifekalant が、用量依存的に活動電位を延長 (すなわち不応期を延長) した。この結果は、Nifekalant が第 III 群抗不整脈薬の主たる作用である抗不整脈効果を発揮することを示唆した。更に、facilitation 作用が、第 III 群抗不整脈薬の過剰投与による EAD の発生を抑制できる可能性が示唆された。さらにウサギ心室筋細胞を用いた電気生理学・薬理学的実験研究によって、この *in silico* 解析からの予測を検証した。純粋な hERG チャンネル阻害薬である Dofetilide への暴露によってウサギ心室筋は EAD を誘発したが、facilitation 作用を併せ持つ Nifekalant への暴露では、EAD を誘発しなかった。本結果は、hERG チャンネルの阻害作用のみならず facilitation 作用を示す hERG チャンネル阻害薬が、純粋な hERG チャンネル阻害薬よりも不整脈の薬物治療に適している可能性を示唆した。

以上で得られた成果は、期外刺激 (トリガー) の発生機序に基づく新たな不整脈発生予測法の開発に資する重要な結果であり、致死性不整脈の誘発制御理論の確立に向けた礎を築くことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Shinichi Uchida, Yoshiyuki Asai, Yoshiaki Kariya, Kunichika Tsumoto, Hiroshi Hibino, Masashi Honma, Takeshi Abe, Fumiaki Nin, Yasutaka Kurata, Kazuharu Furutani, Hiroshi Suzuki, Hiroaki

- Kitano, Ryuji Inoue, Yoshihisa Kurachi, Integrative and theoretical research on the architecture of biological system and its disorder, *Journal of Physiological Sciences*, 査読有, 69(3):433–451, May 2019.
doi:10.1007/s12576-019-00667-8
2. Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, I-Shan Chen, Kenichiro Handa, Yuko Yamakawa, Jon Sack, Yoshihisa Kurachi, Facilitation of IKr current by some hERG channel blockers suppresses early afterdepolarizations, *Journal of General Physiology*, 査読有, 151(2): 214–230 Feb 2019.
doi:10.1085/jgp.201812192
 3. Kunichika Tsumoto, Yasutaka Kurata, Kazuharu Furutani, Yoshihisa Kurachi, Hysteretic dynamics of multi-stable early afterdepolarisations with repolarisation reserve attenuation: a potential dynamical mechanism for cardiac arrhythmias, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 10771, Sep 2017.
doi:10.1038/s41598-017-11355-1
 4. Tomohiro Numata, Kunichika Tsumoto, Kazunori Yamada, Tatsuki Kurokawa, Shinichi Hirose, Hideki Nomura, Mitsuhiro Kawano, Yoshihisa Kurachi, Ryuji Inoue, Yasuo Mori, Integrative approach with electrophysiological and theoretical methods reveals a new role of S4 positively charged residues in PKD2L1 channel voltage-sensing, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 9760, Aug 2017.
doi:10.1038/s41598-017-10357-3
 5. Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, Yoshihisa Kurachi: for HD physiology project investigators, HD Physiology Project - Japanese Efforts to Promote Multilevel Integrative Systems Biology and Physiome Research-, *npj Systems Biology and Applications*, 査読有, 3(1), Jan 2017.
doi: 10.1038/s41540-016-0001-0
 6. Yasutaka Kurata, Kunichika Tsumoto, Kenshi Hayashi, Ichiro Hisatome, Mamoru Tanida, Yuhichi Kuda, Toshishige Shibamoto, Dynamical Mechanisms of Phase-2 Early Afterdepolarizations in Human Ventricular Myocytes: Insights from bifurcation analyses of two mathematical models, *American Journal Physiology - Heart and Circulatory physiology*, 査読有, 312(1):H106–H127 Jan 2017
doi:10.1152/ajpheart.00115.2016

[学会発表](計 32件)

1. Kunichika Tsumoto, Takashi Ashihara, Yasutaka Kurata, Yoshihisa Kurachi, Reflected conduction caused by subcellular sodium channel redistributions, 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) congress in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019.
2. Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, Jon T. Sack, Yoshihisa Kurachi, hERG Facilitation is a Proposed Drug Mechanism to Improve the Safety of the Patients Taking hERG Blockers, *American Heart Association, Scientific Sessions 2018*, 2018.
3. Kunichika Tsumoto, Narumi Naito, Takashi Ashihara, Akira Amano, Yoshihisa Kurachi, Cellular mechanisms underlying anisotropic conduction in ventricle: insights from computational models, the 65th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society (JHRS2018), 2018.
4. Kunichika Tsumoto, Yasutaka Kurata, Kazuharu Furutani, Yoshihisa Kurachi, Dynamical mechanism of multi-stable early afterdepolarizations in a ventricular myocyte elicited by administration of class III antiarrhythmic agents: in silico study, the 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 2018.
5. Kunichika Tsumoto, Yasutaka Kurata, Kazuharu Furutani, Yoshihisa Kurachi, Bifurcation analysis of early afterdepolarizations observed in a human ventricular myocyte model, 第 57 回日本生体医工学会大会, 2018.
6. 津元国親, 倉智嘉久, A role of subcellular sodium channel localizations in phase-2 reentry developments in Brugada syndrome: in silico study, 第 82 回日本循環器学会学術集会, 2018.
7. Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, Jon T. Sack, Yoshihisa Kurachi, Facilitation by hERG channel blockers suppresses early afterdepolarization of simulated cardiac action potentials. the Biophysical Society 62nd Annual Meeting (BPS2018), 2018.
8. Kunichika Tsumoto, Yoshihisa Kurachi, Reflected conduction attributed to sodium channel distribution within cardiomyocytes: a possible mechanism of ventricular fibrillation induction in Brugada syndrome, the Biophysical Society 62nd Annual Meeting (BPS2018), 2018.
9. Kunichika Tsumoto, Yasutaka Kurata, Yoshihisa Kurachi, Multi-stability in early afterdepolarizations as a potential mechanism that triggers life-threatening arrhythmias in human ventricle, The Joint Meeting of the 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR 2017) and the 64th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society(JHRS2017), 2017.
10. Kunichika Tsumoto, Takashi Ashihara, Kazuo Nakazawa, Yoshihisa Kurachi, A generating mechanism of phase-2 reentry in Brugada syndrome: insight from changes in the Na channel expression, The 63rd Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society 2016, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：芦原 貴史

ローマ字氏名：ASHIHARA, takashi

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：80396259

(1)研究分担者

研究分担者氏名：倉智 嘉久

ローマ字氏名：KURACHI, yoshihisa

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30142011

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。