

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06006

研究課題名(和文) ラットにおける肺静脈心筋固有Cl⁻チャネルのクローニング研究課題名(英文) Cloning of the Cl⁻ channel unique to pulmonary vein cardiomyocytes in rat

研究代表者

岡本 洋介 (Yosuke, Okamoto)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50758224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラットの肺静脈からRT-PCR法により、Cl⁻チャネルのホモロジークローニングし、HEK293細胞にクローニングしたcDNAを遺伝子導入して、機能を確認した。クローニングの結果Cl⁻チャネルのポアドメインはClcn2であった。機能もClcn2由来の電流としてすでに知られているもので肺静脈のCl⁻電流とは異なっていた。免疫染色により肺静脈心筋におけるClcn2タンパクの膜発現を確認しており、肺静脈Cl⁻電流は、未知の調節タンパクにより制御されていることが示唆された。今後、プロテオミクスにより、この調節タンパクを網羅的に探索していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary vein (PV) are known to be the origin of atrial fibrillation (AF), the most frequent arrhythmia. We have observed the novel Cl⁻ current in rat PV cardiomyocytes, and revealed that the current facilitates the arrhythmogenicity of PV. The purpose of the current study is to isolate cDNA of ion channel responsible for the Cl⁻ current before we identify the actual whole molecule. Because the Cl⁻ current of PV is hyperpolarization-activated, we tried to find splice variants of well-known hyperpolarization-activated Cl⁻ channel, Clcn2, by RT-PCR. We could not find any variants from rat PV but Clcn2 itself. Immunostaining revealed Clcn2 expression on the plasma membrane of rat PV. Properties of the channel cloned from rat PV are exactly same as those of Clcn2 reported previously, different from the PV current. These results suggest that Clcn2 functionally expressed in rat PV, and regulated by unknown axillary proteins. We will unveil the axillary subunits by proteomics in the future.

研究分野：心筋細胞の細胞生理

キーワード：イオンチャネル 心筋細胞 心房細動

1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も頻度の高い不整脈であり、我が国では心房細動患者は約 80 万人いるとされている。とりわけ高齢者において罹患率が高い。心房細動に伴うリズム異常は、心不全や心筋梗塞等の心疾患患者において予後を大きく左右するのみでなく、脳梗塞や認知症といった心外疾患を引き起こす原因ともなっており、高齢化が進む日本においては解決すべき喫緊の課題である。

1998 年、心房細動の起源は実は心房ではなく肺静脈に存在する心筋細胞であるという画期的な発見が報告されて以来 (Haïssaguerre et al. *N Engl J Med* 1998)、肺静脈心筋を左房から電氣的に隔離する PV isolation 法など、心房細動治療は大きく変化した。一方、肺静脈における異常興奮発生の分子基盤についても、分子生物学的及び電気生理学的なアプローチによりいくつかの新たな知見が提出されてくる中、申請者は、齧歯類の肺静脈から心筋細胞を単離する技術を独自に開発し、以下の 2 つの知見を発表した。

(1) 肺静脈心筋におけるノルエピネフリン誘発自動能 (Okamoto et al. *J Mol Cell Cardiol* 2012)。肺静脈心筋細胞は心房筋細胞に比べて静止膜電位が浅く、わずかな刺激でも興奮しやすい性質を有している。また、心房筋細胞とは対照的に横行小管が比較的良好に発達している。こうした潜在性自動能の分子基盤を明らかにした。

(2) 肺静脈心筋細胞における新規 Cl⁻電流 (Okamoto, et al. *J Mol Cell Cardiol* 2014、[図 1](#))。この電流は膜の過分極によって活性化される Cl⁻電流で、ノルアドレナリン誘発自動能を促進する機能を有している。心房筋など他の心筋細胞には見られないことから、肺静脈心筋に固有のイオン電流と考えられる。

Cl⁻チャンネルの分子実態解明は、肺静脈心筋の発生的な成り立ち、生理機能の解明へつながるのみならず、薬物治療の標的蛋白として心房細動の原因究明や治療戦略の立案につながることを期待されて、急務の課題であ

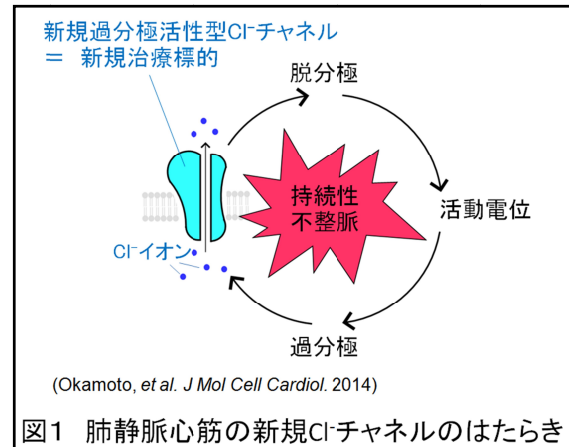


図1 肺静脈心筋の新規Cl⁻チャンネルのはたらきと考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は**肺静脈心筋固有のCl⁻チャンネルをクローニングし、そのイオンチャンネルの三次元構造を明らかにする**事である。肺静脈は極めて頻度の高い心疾患である心房細動の発生源であることが知られている。心房細動は持続性の不整脈で、脳塞栓、心筋梗塞、認知症などを合併し、大きな社会問題となっている。それにもかかわらず、心房細動の発症メカニズムや根本的治療法は不明のままである。申請者は近年、肺静脈でのみ観察される新規クロライド (Cl⁻) 電流を発見し、この電流が不整脈の発生を促していることを明らかにした。この Cl⁻電流の責任担体となるイオンチャンネルを同定する事で、より実践的な治療標的としたい。

3. 研究の方法

(1) 目的とする Cl⁻チャンネルは Clcn2 チャンネルと特徴が類似しているため、

まず Clcn2 のバリエントを RT-PCR 法で検索した。

- (2) Clcn2 の発現を免疫染色で確認した。
- (3) ラット肺静脈から Clcn2 をサブクローニングした。
- (4) HEK293 細胞にクローニングした Clcn2 を発現させ、パッチクランプ法で機能を確認した。

Clcn2 をホモロジーモデリングし、代表的な抗不整脈薬とドッキングステーションした。クロライド電流を抑制する薬を検討した。

4 . 研究成果

- (1) 目的とする Cl-チャンネルは Clcn2 チャンネルと特徴が類似しているため、まず Clcn2 のバリエントを RT-PCR 法で検索した。その結果、バリエントは検出されなかった。図2に示すように2811bpのClcn2の発現が確認された。Clcn2 の下にある約 2000bp バンドは非特異的な塩基配列の増幅であることが DNA シークエンスによって確認された。

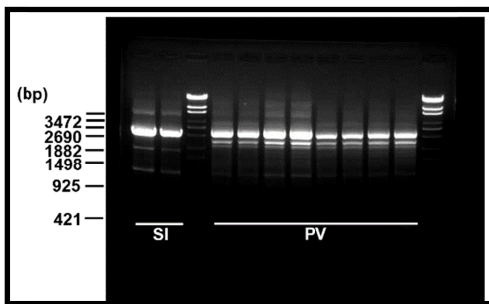


図 2

- (2) 免疫染色法で Clcn2 の細胞膜への発現を確認した (図 3) 。

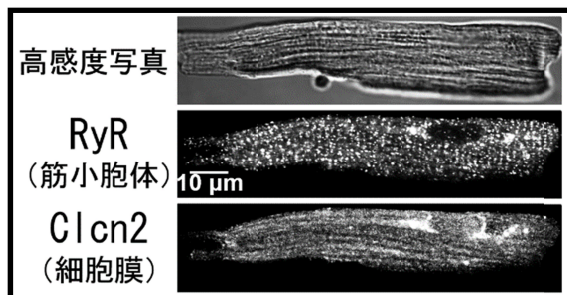


図 3

- (3) (1) で得られた PCR 産物をプラスミドベクターに挿入し、ベクターを載せた大腸菌を増幅することで Clcn2 をラットの肺静脈からサブクローニングした。
- (4) クローニングした Clcn2 を HEK293 細胞に発現させて記録したところ、既に報告されている ClC-2 電流と同じ電流が観察され、肺静脈の電流とは違う性質を示した (図 4) 。
- (5) Clcn2 をホモロジーモデリングし、代表的な抗不整脈薬とドッキングステーションした結果、クロライドチャンネルは一般的に薬剤がチャンネル機能に本質的なゲート機構に作用しずらく、Cl-チャンネルを標的とした効果的な創薬は難しいことが分かった (図 5) 。

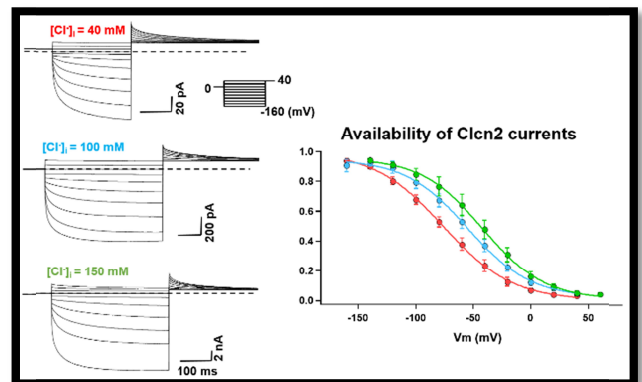


図 4

- 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

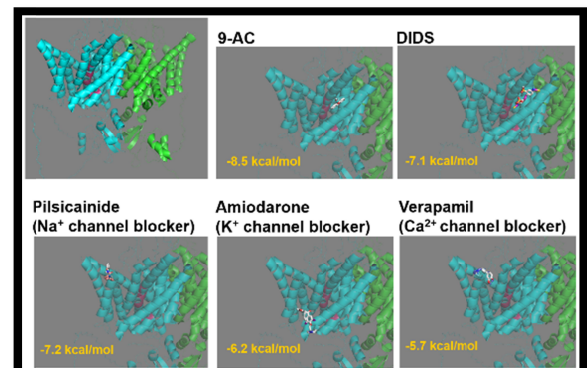


図 5

は下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Yaniv, Y., Ahmet, I., Tsutsui, K., Behar, J., Moen, J. M., Okamoto, Y., ... & Lakatta, E. G. Deterioration of autonomic neuronal receptor signaling and mechanisms intrinsic to heart pacemaker cells contribute to age associated alterations in heart rate variability in vivo. 2016 *Aging cell*, 15(4), 716-724. (査読あり)

〔学会発表〕(計 9件)

1. 神部 良太, 岡本 洋介, 永澤 悦伸, 小原 祐太郎, 石井 邦明. ヒト心臓 K⁺チャネル、Kv1.5toKir2.1 に対する高グルコース濃度の異なる影響. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松, アクトシティ浜松, 2017 年 3 月 28 日~3 月 30 日 (口頭発表)
2. 岡本 洋介, 石井 邦明. ラット肺静脈心筋細胞における過分極活性型 Cl⁻チャネルの分子生物学的研究. 第 26 回循環薬理学会, 松本, 信州大学, 2016 年 12 月 2 日 (口頭発表)
3. 岡本 洋介, 尾野 恭一, 石井 邦明. 肺静脈心筋細胞における新規 Cl⁻電流の分子生物学的研究. 生理学研究所研究会 2016 心臓・血管系の包括的な機能統合研究, 福岡, 九州大学, 2016 年 10 月 25 日 (口頭発表)
4. 岡本 洋介, 石井 邦明. ラット肺静脈心筋細胞における過分極活性型 Cl⁻チャネルの薬理学的研究. 第 67 回薬理学会北部会, 札幌, 北海道大学, 2016 年 9 月 30 日 (口頭発表)
5. Okamoto Y., Takano M, Ishii K, Ono K. "Arrhythmogenic properties of rat pulmonary vein cardiomyocytes the

13th Asia Pacific Federation of Pharmacist meeting, Bangkok, Berkeley Hotel Pratunam, Thailand. 2016 年 2 月 1 日~3 日 2016. (ポスター発表)

6. 岡本 洋介, 鷹野 誠, 尾野 恭一. ラット肺静脈心筋細胞の不整脈性. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌, 札幌コンベンションセンター, 2016 年 3 月 22 日~24 日 (ポスター発表)
7. Yosuke Okamoto, Kyoichi Ono, Makoto Takano, Kuniaki Ishii. Impact of hyperpolarization-activated Cl⁻ current on arrhythmogenicity of rat pulmonary vein cardiomyocytes. 第 89 回薬理学会年会, 横浜, パシフィコ横浜, 2016 年 3 月 9 日~11 日 (口頭発表)
8. 岡本洋介. 「ラット肺静脈心筋細胞の潜在性自動能」第 32 回山形電気生理研究会, 山形, 山形大学医学部第五講義室, 2015 年 11 月 27 日. (口頭発表)
9. 岡本洋介, Tarasov V. Kirill, Yelena D. Tarasova, Bruce D. Ziman, Edward G. Lakatta, 石井邦明. 「生物学的ペースメーカーの構築を目的とした洞房結節のマイクロアレイ解析」第 47 回東北生理談話会, 弘前, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター, 2015 年 10 月 31 日. (口頭発表)

6. 研究組織
(1)研究代表者

岡本洋介 (Yosuke Okamoto)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 50758224