

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15554

研究課題名(和文) ラット肺静脈心筋細胞における新規Cl<sup>-</sup>チャンネルの多層階生理機能研究研究課題名(英文) The multi-layer analysis on physiological functions of the unique Cl<sup>-</sup> channel in rat pulmonary veins

研究代表者

岡本 洋介 (Okamoto, Yosuke)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50758224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はラットの肺静脈心筋における過分極活性化型Cl<sup>-</sup>電流の心房細動への関与を多角的に検討することである。以前、申請者はラットの肺静脈で不整脈を促進するようなCl<sup>-</sup>電流を記録しており、今回、このCl<sup>-</sup>電流の分子実態を同定することに成功した(Okamoto, 2019)。学外共同研究により、ラット肺静脈において持続性不整脈が発生する現象を、コンピューター上で再現することに成功した(Umehara, 2019)。ラット以外のモルモットやウサギの肺静脈においても過分極活性化電流を計測したところ、それぞれが異なる電気生理学的性質を示した(Takagi, 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺静脈は心房細動という極めて患者数の多い不整脈の発生源であり、ここで発生する不整脈の分子機構の一部を解明したことは、基礎研究を臨床へ橋渡ししてくための突破口としての学術的意義がある。ただし、不整脈が発生する根本的な仕組みは哺乳類であれば種に依らず一貫しているようだが、過分極活性化電流の関わり方には種差が存在する。今後、研究成果を社会に還元するためにはヒト心房細動患者サンプルを用いたより精緻な研究が必要だと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previously, a unique hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current was identified in rat pulmonary vein cardiomyocyte (Okamoto, 2014). In this research project, the Cl<sup>-</sup> current was investigated in vitro, in vivo and in silico. We succeeded to identify the ion channel responsible for the current of our interest (Okamoto, 2019). Collaborators outside our institute built a computer simulation program that demonstrates the arrhythmogenic feature of rat pulmonary vein by incorporating our experimental data (Umehara, 2019). Surprisingly, electrophysiological properties of hyperpolarization-activated current in pulmonary vein cardiomyocyte were quite different in rat, guinea-pig and rabbit (Takagi, 2020).

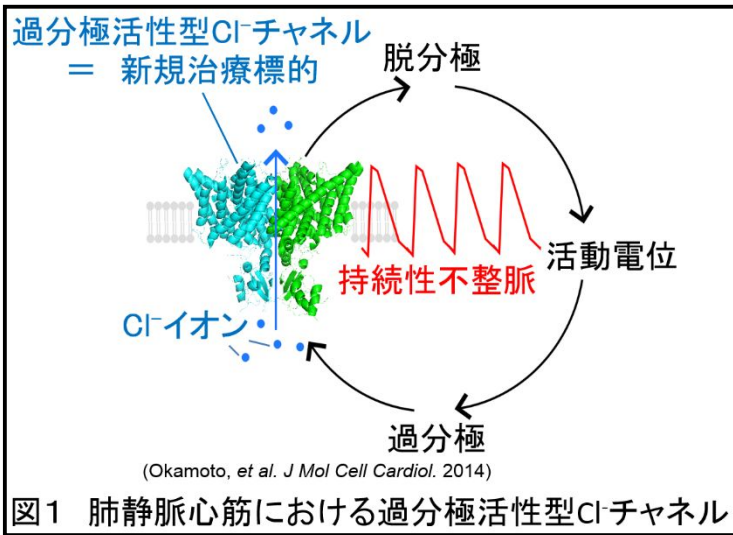
研究分野：不整脈

キーワード：肺静脈 Clチャンネル 細胞生理学的数理モデル 種差 自動能 心房細動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

< 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 117 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の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, *N Engl J Med* 1998)、肺静脈心筋を左房から電気的に隔離する 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は、国内・国外において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たもの (Namekata, *J Pharmacol Sci* 2009; Doisne, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 など)、小型実験動物からの肺静脈心筋の単離が難しく、分子生物学的なアプローチに課題があった。そんな中、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、(1) 肺静脈心筋におけるノルエピネフリン誘発自動能とそのメカニズム (Okamoto, *et al. J Mol Cell Cardiol* 2012)、(2) 肺静脈心筋細胞における新規 Cl<sup>-</sup>電流の不整脈促進機序 (Okamoto, *et al. J Mol Cell Cardiol* 2014、**図 1**) を発見・発表した。さらにその後の研究で、当該 Cl<sup>-</sup>チャンネルのうち、Cl<sup>-</sup>イオンが通過するサブユニットは Clcn2 遺伝子がコードする蛋白であることが分かった (投稿準備中)。しかし、Clcn2 を単独で発現させた場合に観察される電流 (一般に「CIC-2 電流」と、肺静脈で観察された Cl<sup>-</sup>電流は物理化学的な性質が明らかに異なっていた。Clcn2 のスプライスバリエーションは肺静脈では検出されなかったため、Clcn2 蛋白が補助蛋白 (以下「サブユニット」) によって調節を受けている事が示唆された。

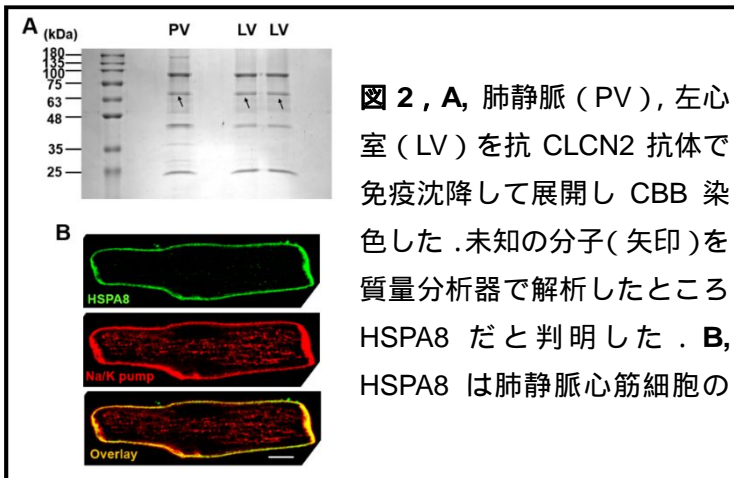


**図 1** 肺静脈心筋における過分極活性型 Cl<sup>-</sup>チャンネル

図 1 肺静脈心筋における過分極活性型 Cl<sup>-</sup>チャンネル (Okamoto, *et al. J Mol Cell Cardiol* 2014)

< 2 . 研究の目的 >

本研究の目的はラットの肺静脈心筋における過分極活性型 Cl<sup>-</sup>電流の心房細動への関与を多角的に検討することである。心房細動という不整脈は肺静脈から発生することが知られているが、肺静脈から不整脈が発生する分子機構は不明な点が多い。以前、申請者はラットの肺静脈で不整脈を促進するような Cl<sup>-</sup>電流を記録していた (Okamoto, *et al. J Mol Cell Cardiol*. 2014)。



**図 2, A**, 肺静脈 (PV), 左心室 (LV) を抗 CLCN2 抗体で免疫沈降して展開し CBB 染色した。未知の分子 (矢印) を質量分析器で解析したところ HSPA8 だと判明した。**B**, HSPA8 は肺静脈心筋細胞の

(Okamoto, *et al. J Mol Cell Cardiol*. 2014)。

< 3 . 研究の方法 >

本研究ではまず、この Cl<sup>-</sup>電流の分子実態を同定するため、既存の Cl<sup>-</sup>チャンネルを鋳型とした分子クローニングを試みた。Cl<sup>-</sup>チャンネルのメインサブユニットが CIC-2 であるとわかった。さらに、CIC-2 に結合するタンパクを IP-MS 法で探索した結果、構造的ヒートショック蛋白である HSPA8 (HSC70) を CIC-2 の調節タンパクとして新規に同定した (Okamoto, *et al. J Biol Chem*. 2019, **図 2**)。学外

共同研究では、ラット肺静脈において生じる持続性不整脈（自動能）が、コンピューター上で再現したされた（Umehara, *et al. Int J Mol Sci.* 2019）。肺静脈不整脈が発生する本質的な仕組みは、筋小胞体に蓄積された  $Ca^{2+}$  がリアノジン受容体や  $IP_3$  受容体から放出される際に生じる一過性の内向き電流であるが、ラットの肺静脈では今回同定した  $Cl^-$  チャネルが不整脈が持続化する際に補助的な役割をしている可能性が示された（図 2）。一方で、モルモットやウサギなど、ラット以外の肺静脈で過分極活性化電流を測定したところ、それぞれが異なる電気生理学的性質を示した（Takagi, *et al. J Physiol Sci.* 2020）。肺静脈不整脈は哺乳類であればいずれの種でも観察できる現象であるが、種によって分子機構はことなる可能性がある。

#### < 4 . 研究成果 >

肺静脈は心房細動という極めて患者数の多い不整脈の発生源であり、ここで発生する不整脈の分子機構を一部解明したことは、基礎研究を臨床へ橋渡ししてくための突破口としての学術的意義がある。ただし、不整脈が発生する根本的な仕組みは哺乳類であれば種に依らず一貫しているようだが、過分極活性化電流の関わり方には種差が存在する。このことを考えると、今後、研究成果を社会に還元してくためにはヒト心房細動患者サンプルを用いたより精緻な研究が必要だと考えられた。現在は、ラット不整脈モデルを作製して、種々の薬剤の効果を検証しながら、学外共同研究でヒトサンプルを用いた研究を計画中である。研究成果を新規の心房細動治療薬開拓の橋渡し研究へと展開していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件(うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件)

1. 著者名 Yurina Kashino, Yutaro Obara, Yosuke Okamoto, Takeo Saneyoshi, Yasunori Hayashi, Kuniaki Ishii.	4. 巻 19(7)
2. 論文標題 ERK5 Phosphorylates Kv4.2 and Inhibits Inactivation of the A-Type Current in PC12 Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 pii: E2008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19072008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arash Yavari, Mohamed Bellahcene, Annalisa Bucchi, Syevda Sirenko, Katalin Pinter, Neil Herring, Julia J. Jung, Kirill V. Tarasov, Emily J. Sharpe, Markus Wolfien, Gabor Czibik, Violetta Steeples, Sahar Ghaffari, Chinh Nguyen, Alexander Stockenhuber, Joshua R. St. Clair, Christian Rimmbach, Yosuke Okamoto 他46名	4. 巻 8
2. 論文標題 Mammalian 2 AMPK regulates intrinsic heart rate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01342-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Daichi Takagi, Yosuke Okamoto, Takayoshi Ohba, Hiroshi Yamamoto, Kyoichi Ono.	4. 巻 70(1)
2. 論文標題 Comparative study of hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from rat, guinea pig, and rabbit.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Science	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00736-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shohei Umehara, Xiaoqi Tan, Yosuke Okamoto, Kyoichi Ono, Akinori Noma, Akira Amano, Yukiko Himeno.	4. 巻 20(12)
2. 論文標題 Mechanisms Underlying Spontaneous Action Potential Generation Induced by Catecholamine in Pulmonary Vein Cardiomyocytes: A Simulation Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 pii: E2913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20122913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yosuke Okamoto, Yoshinobu Nagasawa, Yutaro Obara, Kuniaki Ishii, Daichi Takagi, Kyoichi Ono.	4. 巻 294(44)
2. 論文標題 Molecular identification of HSPA8 as an accessory protein of a hyperpolarization-activated chloride channel from rat pulmonary vein cardiomyocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16049-16061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yosuke Okamoto, Naing Ye Aung, Masahiro Tanaka, Yutaro Obara, Kuniaki Ishii, Mitsunori Yamakawa, Daichi Takagi, Kyoichi Ono.
2. 発表標題 Molecular Sources of Arrhythmogenicity in Pulmonary Vein Cardiomyocytes
3. 学会等名 第 65 回 日本不整脈心電学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木 大地, 岡本 洋介, 大場 貴喜, 尾野 恭一
2. 発表標題 肺静脈心筋細胞の潜在的自動能に関する過分極活性化電流の種差
3. 学会等名 第50回東北生理談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本 洋介, ナイン イエイ アウン, 永澤 善伸, 高木 大地, 尾野 恭一
2. 発表標題 ラット肺静脈心筋細胞におけるカテコラミン誘発性自動能の分子基盤
3. 学会等名 第28回日本循環薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本 洋介, 高木 大地, 尾野 恭一
2. 発表標題 肺静脈心筋の細胞生理と心房細動治療の新規標的分子
3. 学会等名 第1回トランスポーター研究会 北部会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本 洋介, 安藤 賀子, 加藤 和子, 高橋 優維, 高木 大地, 尾野 恭一
2. 発表標題 ラット心房細動モデルにおけるリーク電流活性化剤の抗不整脈効果
3. 学会等名 生理学研究所 研究会「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本 洋介, 梅原 象平, Xiaiqui Tan, 姫野 友紀子, 尾野 恭一, 野間 昭典, 天野 晃
2. 発表標題 「肺静脈心筋細胞(PVC)モデル」ー肺静脈心筋細胞(PVC)モデルによる異所性自動能発生機序の理論的考察ー
3. 学会等名 第7回e-Heart シンポジウム 「立命館大学バイオシミュレーション研究センターにおけるシミュレーション教育・研究10年の成果」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daichi Takagi, Yosuke Okamoto, Takayoshi Ohba, Hiroshi Yamamoto, Kyoichi Ono
2. 発表標題 Species difference of the hyperpolarized-activated current in pulmonary vein cardiomyocytes
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Okamoto, Naing Ye Aung, Yoshinobu Nagasawa, Daichi Takagi, Kyoichi Ono
2. 発表標題 Molecular architecture of catecholamine-induced arrhythmogenicity in rat pulmonary vein
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kako Andoh, Yoriko Katoh, Yosuke Okamoto, Yui Takahashi, Daichi Takagi, Kyoichi Ono
2. 発表標題 An anti-arrhythmic force of leak current enhancement on manufactured atrial fibrillation in rat
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 洋介
2. 発表標題 異所性自動能の新しい分子基盤
3. 学会等名 生理学会研究会「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinichi Sato, Yosuke Okamoto, Kyoichi Ono.
2. 発表標題 Pilocarpine but not Ach permeate the mouse footpads and induce perspiration, sedation and arrhythmia.
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Okamoto
2. 発表標題 The Antiarrhythmic Force of Leak Current Enhancement in Atrial Arrhythmia Model of Rat
3. 学会等名 第66回日本不整脈心電学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹市光希, 岡本洋介, 小山崇, 高木大地, 尾野恭一
2. 発表標題 ラット心房細動モデルにおけるミトコンドリア-筋小胞体連関のリモデリング
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本 洋介, 永澤 悦伸, ナイン イエイ アウン, 姫野 友紀子, 野間 昭典, 天野 晃, 高木 大地, 石井 邦明, 尾野 恭一
2. 発表標題 肺静脈心筋細胞における不整脈トリガーの分子機構
3. 学会等名 第97回生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----