

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390231  
 研究課題名（和文） 性ホルモンによる心筋イオンチャネル制御の検討－不整脈の性差医療の基礎戦略  
 研究課題名（英文）  
 研究代表者  
 古川 哲史（FURUKAWA TETSUSHI）  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
 研究者番号：80251552

## 研究成果の概要：

性ホルモンのテストステロン、エストラジオール、プロゲステロンの心筋イオンチャネルに対する調節メカニズムを明らかにし、これらによる非ゲノム作用による心筋イオンチャネル調節という新たな制御機構を確立することに成功した。得られた基礎データを使って、心筋電気生理の男女差、女性性周期による変動のコンピューターシミュレーションモデルを構築した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,900,000	1,770,000	5,900,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	17,990,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

疾患の罹患率や薬物に対する応答性には男女差があり、これを考慮した医療“性差医療”の必要性が指摘されていた。不整脈にも特徴的な男女差があり、その原因として性ホルモンの関与が示唆されることは古くから知られており、多くの研究がなされていた。性ホルモンには遺伝子の転写を誘導するゲノム作用と、細胞膜局在のシグナル伝達を誘導する非ゲノム作用が存在するが、ほとんどの研究がゲノム作用の検討を行っており、不整脈の性差を説明できる結果が得られていなかった。一方、性ホルモン非ゲノム経路を介する心臓電気生理の調節の有無は全く検討さ

れていなかった。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、性ホルモン非ゲノム作用による心筋イオンチャネル制御の有無を検討すること、その分子メカニズムを解明すること、得られた基礎データをコンピューターシミュレーションモデルに導入し、不整脈リスクの性差や性周期による変動の予測を行うこと、の3点を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

## (1) 電気生理学的検討：

単一細胞レベルでの検討は、モルモット心室

筋細胞を酵素法により単離し、パッチクランプ法により心筋イオンチャンネル電流を記録し、性ホルモンの作用を検討した。

受容体非依存性作用の検討は、性ホルモン受容体が発現しないHEK293T細胞にHERGチャンネルを発現させ、性ホルモンの作用を検討した。

全心臓レベルでの検討は、ランゲンドルフ還流心で、性ホルモンを冠動脈内に還流し、心電図を記録した。

#### (2) 分子生物学的検討：

性ホルモン非ゲノム作用のシグナル分子のAkt, eNOSのリン酸化抗体を用いたWestern blot解析を行った。

シグナル分子の細胞膜における局在の検討は、超遠心機でのスクロース密度勾配による分画後にWestern blot解析法を用いて行った。

#### (3) Biotin-Switch Assay:

一酸化窒素(NO)によるチャンネルタンパク質のニトロシル化の検討は、Biotin-Switch Assay法(Jaffrey et al. *Nat. Cell Biol* 2001)を用いて行った。

#### (4) Computer Simulation Study:

Farber-Rudy細胞モデル(*Biophys. J.* 2000)にパッチクランプ法で得られた性ホルモン作用を因子を導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) 電気生理学的作用

テストステロン(DHT)(Bai et al. *Circulation* 2005)・プロゲステロン(P4)(Nakamura et al. *Circulation* 2007)は濃度依存性に心電図QT間隔および心筋細胞活動電位幅(APD)を短縮し、エストラジオール(E2)は低濃度ではQT・APDを延長し、高濃度では短縮した(Kurokawa et al. *J. Physiol.* 2008)。

DHT・P4・高濃度E2によるAPD短縮のイオン機序の検討を行い、コントロール状態では遅延整流K<sup>+</sup>電流(I<sub>Ks</sub>)を増大すること、交感神経刺激模擬状態ではcAMPにより活性化されたL型Ca<sup>2+</sup>チャンネル(I<sub>Ca,L</sub>)をコントロール状態まで抑制することが原因であった。

いずれの作用も性ホルモン受容体阻害剤で抑制されること、作用時間が数分で発現することから、性ホルモン受容体を介した非ゲノム作用によると考えられた。非ゲノム作用には内皮型NO合成酵素(eNOS)活性化により産生したNOを介する作用と、ERKを介する作用がよく知られているが、上記の作用はNOのトラッパーや非選択的NOS阻害薬でブロックされることからNOを介する作用と考えられる。

NOの作用には、soluble guanylate cyclase (sGC)を介して産生されるcGMPに依存する作用と、タンパク質を直接ニトロシル化する作用の2つが主である。I<sub>Ks</sub>増大はsGC阻害薬ではブロックされずニトロシル化阻害薬

でブロックされることからタンパク質ニトロシル化を介するものと考えられた。一方、I<sub>Ca,L</sub>抑制はsGC阻害薬でブロックされ、ニトロシル阻害薬は無効であったことからsGC/cGMP依存性作用と考えられた。タンパク質ニトロシル化はcAMP非依存的に起こり、sGC/cGMP依存性作用はcAMP作用に拮抗的に表れることから、I<sub>Ks</sub>増大がコントロール状態で起こり、I<sub>Ca,L</sub>抑制が交感神経刺激模擬状態で初めて観察されたことが説明可能である。

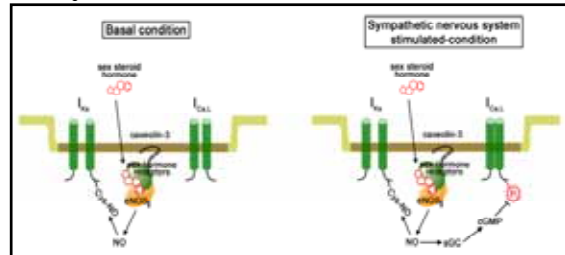


図1. 非ゲノム作用によるI<sub>Ks</sub>・I<sub>Ca,L</sub>制御

低濃度E2は迅速活性型遅延整流性K<sup>+</sup>チャンネル電流(I<sub>Kr</sub>)を抑制し、これがAPD延長の機序と考えられた。E2によるI<sub>Kr</sub>はエストロゲン受容体阻害薬では影響されず、エストロゲン受容体を発現しないHEK293T細胞にI<sub>Kr</sub>チャンネルをコードする遺伝子HERGを発現させることによるI<sub>Kr</sub>電流に対しても抑制作用を示すことから、受容体非依存性作用と考えられた。HERGチャンネルの薬物結合部位のアミノ酸を置換するとE2による抑制作用が見られなくなることから、E2の作用はチャンネル直接作用と考えられた。

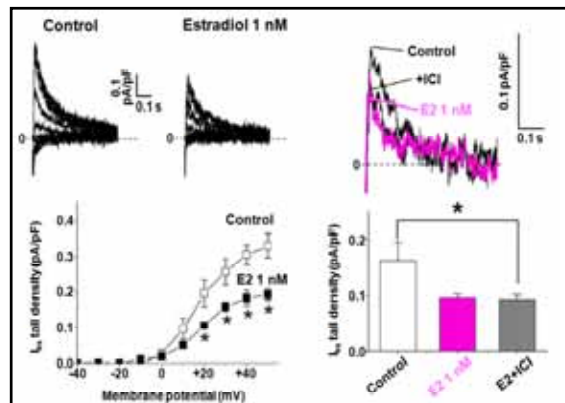


図2. E2の受容体非依存性I<sub>Kr</sub>抑制作用

E2とDHTの違いはaromataseによりステロイドA環がE2では芳香環でありDHTでは芳香環でないことである。そこで藤田保健衛生大学医学部生化学講座原田教授からaromatase KO(Ar-KO)マウスの供与を受け、QT間隔に対するHERGチャンネルブロッカーE-4031の作用を検討したところ、雌マウスでは雄マウスおよびAr-KO雌マウスに比べてQT延長が有意に大きかった。またAr-KO

マウスに E2 を投与すると、E-4031 による QT 延長が野生型雌マウスと同程度になった。以上から、E2 の  $I_{Ks}$  抑制には aromatase による E2 の芳香環形成が関与することが明らかとなった。

### (2) シグナル伝達経路の検討

性ホルモン非ゲノム作用の eNOS 活性化のシグナル伝達経路として、血管内皮細胞で受容体 c-Src PI3K Akt eNOS NO の経路が知られている。そこで心筋細胞でも同様の経路が使われているか、性ホルモン受容体、c-Src、PI3K、Akt、eNOS の阻害薬を用いて電気生理学的に検討した。DHT, P4, E2 による  $I_{Ks}$  活性化がいずれにおいても阻害された。

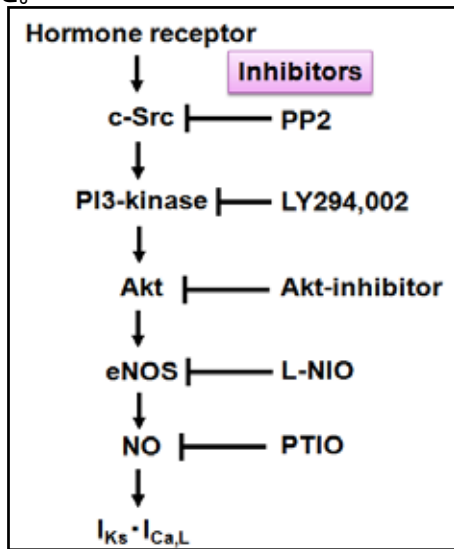


図 3. 非ゲノム作用のシグナル伝達経路

Akt, eNOS 活性化のマーカーとして、それぞれのリン酸化が知られている。そこで、次に DHT により Akt, eNOS のリン酸化が起こるか、リン酸化抗体を用いた Western blot 解析で検討すると、DHT 100 nM により Akt, eNOS のリン酸化が起こり、これらはアンドロゲン受容体(AR)、c-Src、PI3K、Akt 阻害薬で抑制され、電気生理学的にも生化学的にも上記の経路でシグナルが伝達されていることが確認された。

### (3) シグナル伝達の場合

性ホルモン非ゲノム作用のシグナル伝達の場合を、スクロース密度勾配分画法を用いて検討した。超遠心によりスクロース 5%から 40%まで 11 の分画に分け Western blot 解析を行ったところ、脂質ラフト/カベオラのマーカーである Flotillin-1, Cav-3 は主に分画 5 に局在することから同分画が脂質ラフト/カベオラ分画と考えられた。

性ホルモン受容体、 $I_{Ks}$  チャネル  $\alpha$  サブユニット KCNQ1、 $I_{Ca,L}$  チャネル  $\alpha$  サブユニット

$Ca_v1.2$ 、eNOS も分画 5 に局在した。c-Src、PI3K p85、Akt、 $I_{Ks}$  チャネル  $\beta$  サブユニット KCNE1 は比較的広い分画に局在したが、少なくとも一定の割合は分画 5 に局在したことから、脂質ラフト/カベオラ分画が性ホルモン非ゲノム作用シグナル伝達の場合と考えられた。

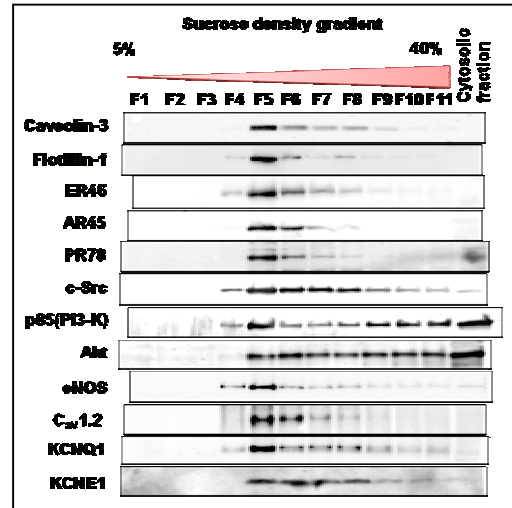


図 4. スクロース密度勾配分画実験

性ホルモン受容体に関して興味深い所見として、AR, エストロゲン受容体(ER), プログステロン受容体(PR)いずれも全長ではなく分子量の小さいバンドが脂質ラフト/カベオラ分画で同定され、これらは C 末端に対する抗体では認識できるが、N 末端に対する抗体では認識できず、N 末端短縮型と考えられた。血管内皮細胞では ER の N 末端短縮型 ER46 が非ゲノム作用を担う受容体であることが示唆されており、心筋細胞でも同様に N 末端短縮型が非ゲノム作用を担当する性ホルモン受容体である可能性が示唆された。

### (4) KCNQ1 ニトロシル化の検討

近年 NO の作用として sGC/cGMP 依存性経路だけでなく、タンパク質ニトロシル化が多く作用を担っていることが明らかとなってきた。 $I_{Ks}$  の活性化が sGC 阻害薬ではブロックされず、ニトロシル化を阻害する di-thiothreitol (DTT) および N-ethylmaleimide (NEM) によりブロックされたことからニトロシル化を介することが示唆された。そこで、 $I_{Ks}$  チャネルがニトロシル化されるか否か、biotin-switch assay 法を用いて検討した。 $I_{Ks}$  チャネルは  $\alpha$  サブユニット KCNQ1 と  $\beta$  サブユニット KCNE1 のヘテロ多量体から構成されるが、NO ドナーの SNAP は KCNQ1 をニトロシル化したが、KCNE1 をニトロシル化しなかった。KCNQ1 には 9 個の Cys 残基が存在するので、次にどの Cys 残基がニトロシル化の標的となるか GST 融合タンパク質を用いて検討を行った。KCNQ1 C 末端の



Cys445を含むGST融合たんぱくのみがニトロシル化され、標的 Cys として同定された。

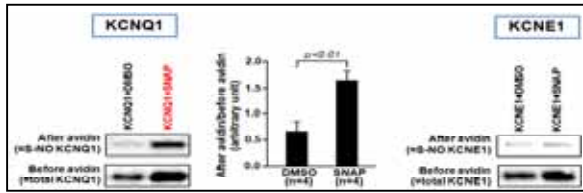


図 5. KCNQ1 のニトロシル化

次に複数の Cys 残基の中から Cys445 を特異的にニトロシル化する分子メカニズムの検討を行った。ニトロシル化には電子の受け渡しが必要となること、Cys445 だけが隣に酸性アミノ酸 Asp446 を持つことから、周囲のレドックス配列が重要ではないかとの仮説を立てた。Asp を中性の Asn に置換すると Cys445 のニトロシル化は起こらず、酸性アミノ酸の Glu に置換するとニトロシル化が認められた。次に、一番近くの塩基性アミノ酸 His442 を中性アミノ酸 Ala に置換してもニトロシル化が確認された。以上から、Cys445 の周囲のレドックス配列が部位特異的なニトロシル化に重要であること、電子アクセプターとなる塩基性アミノ酸は必要ないのか、一次配列では離れているが、3次元配列では近傍に存在する別の塩基性アミノ酸が関与するのは今後の課題として残された。

(5) コンピューターシミュレーションモデル得られた基礎データを使って、心電図および不整脈リスクの男女差や性周期による変動を再現できるコンピューターモデルの構築を米国コーネル大学 Clancy 博士との共同研究で行った。Farber-Rudy モデル(*Biophys. J.* 2000)をベースとした。詳細な電気生理学的検討から、 $I_{Ks}$  に対しては動態を変化させずにコンダクタンスを増大すること、 $I_{CaL}$  に対しては、cAMP によりシフトした電位依存性をもとに戻し、コンダクタンスには影響しないことから、それぞれコンダクタンスおよび電位依存性のパラメーターのみを性ホルモン依存性に变化させた。また、単一細胞モデルに加えて、100 個の心筋細胞をギャップジャンクションにより結合させた心筋シートモデルも新たに作成した。

これにより、APD および QT 間隔が女性で性周期依存性に変動し、これが臨床で見られる変動を高精度に再現することが明らかとなった。そこでこの高精度のモデルを用いて不整脈リスクの予測ができないか実験を行った。不整脈は先天性 QT 延長症候群モデル(LQT)として KCNE1 に変異を有する LQT5 モデルを用いた。LQT5 は交感神経刺激時に不整脈発作が頻発することから、交感神経刺激を模倣し、心拍数を増加させると、性周期依存性に不整脈が発生することが予測され

た(図 4A)。

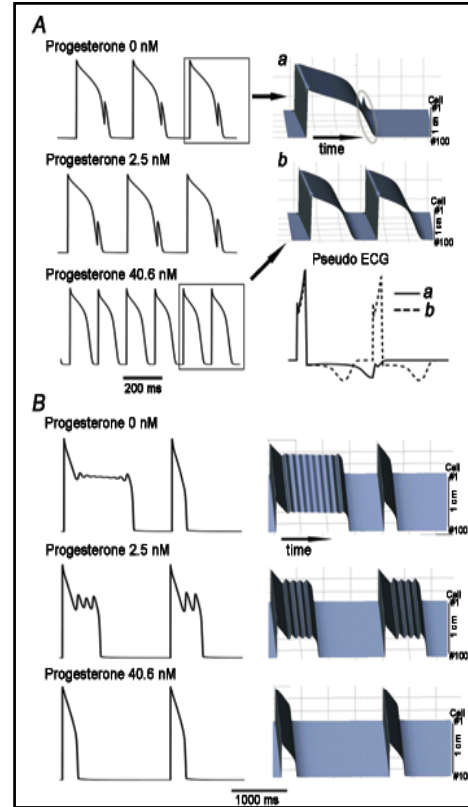


図 6. コンピューターシミュレーション

後天性 LQT としては、薬物誘発性不整脈を対象とした。薬物誘発性不整脈を起こす多くの薬物が  $I_{Kr}$  をブロックすることから、 $I_{Kr}$  電流値を 50% に低下させると、性周期依存性に不整脈が発生することが予測された。これらは、臨床で報告されている不整脈リスクの変動を極めて良く再現していた(図 4B)。

#### (6) 結果のまとめ

- ・ 性ホルモン非ゲノム作用が心筋  $I_{Ks}$  チャネル・ $I_{CaL}$  チャネルが新規調節機構であった。
- ・ エストロゲンは性ホルモン受容体非依存性・チャネル直接作用として、 $I_{Kr}$  を抑制した。
- ・ 性ホルモン非ゲノム作用は細胞膜特殊構造の脂質ラフト/カベオラをシグナル伝達の間とする。
- ・ 非ゲノム作用を担当する性ホルモン受容体は、N 末端短縮型受容体であることが示唆された。
- ・ NO による  $I_{Ks}$  チャネルの活性化は、Cys445 の特異的なニトロシル化によりもたらされ、これには周囲のレドックス配列が重要であった。
- ・ コンピューターシミュレーションモデルにより、性ホルモン非ゲノム作用が QT 間隔および不整脈リスクの男女差・性周期による変動の一因であることが示唆された。

## 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15件)

- 1) Furukawa T, Bai CX, Kaihara A, Ozaki E, Kawano T, Nakaya Y, Awais M, Sato M, Umezawa Y, Kurokawa J. Ginsenoside Re, a main phytosterol of panax ginseng, activates cardiac potassium channels via a non-genomic pathway of sex hormones. *Mol. Pharmacol.* 2006;70:1916-1924.
- 2) Furukawa T, Kurokawa J. Potassium channel remodeling in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006;41:753-761.
- 3) Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Xu J, Oren RV, Zhu ZI, Clancy CE, Isobe M, Furukawa T. Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway. An in vitro patch-clamp and computational modeling study. *Circulation* 2007;116:2913-2922.
- 4) Nakamura K, Katayama Y, Kusano K, Haraoka K, Tani Y, Nagase S, Morita H, Miura S, Fujimoto Y, Furukawa T, Ueda K, Aizawa Y, Kimura A, Kurachi Y, Ohe T. Anti-KCNH2 antibody-induced long QT syndrome. Novel acquired form of LQT syndrome? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;50:1808-1809.
- 5) Tani Y, Miura D, Kurokawa J, Furukawa T. T75M-KCNJ2 mutation causing Andersen-Tawil syndrome enhances inward rectification by changing Mg<sup>2+</sup> sensitivity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007;43:187-196.
- 6) Furukawa T, Kurokawa J. Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: Implication for gender-difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol. Therapeut.* 2007;115:106-115.
- 7) Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, Furukawa T. Acute effects of estrogen on the guinea pig and human I<sub>Kr</sub> channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J. Physiol.* 2008;586:2961-2973.
- 8) Furukawa T, Kurokawa J. non-genomic regulation of cardiac ion channels by sex hormones. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 2008;8:245-251.
- 9) Kaihara A, Umezawa Y, Furukawa T. Bioluminescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based split *Renilla* luciferase complementation in living cells. *Analyt. Sci.* 2008;24:1405-1408.
- 10) Kakusaka S, Asayama M, Kaihara A, Sasano T, Suzuki T, Kurokawa J, Furukawa T. A receptor-independent effect of estrone sulfate on the HERG channel. *J. Pharmacol. Sci.* 2009;109:152-156.
- 11) Asada K, Kurokawa J, Furukawa T. redox- and calmodulin-dependent s-nitrosylation of the KCNQ1 channel. *J. Biol. Chem.* 2009;284:6014-6020.
- 12) Furukawa T, Kurokawa J, Clancy CE. A combined approach using patch-clamp study and computer simulation study for understanding long QT syndrome and TdP in women. *Curr. Cardiovasc. Rev.* 2009 (in press).
- 13) Kurokawa J, Suzuki T, Furukawa T. Acute effect of female hormones on cardiac ion channels and cardiac repolarization. *J. Pharmacol. Sci.* 2009;109:334-340.
- 14) Kurokawa J, Bankston JR, Kaihara A, Chen L, Furukawa T, Kass RS. KCNE variants reveal a critical role of the beta subunit carboxy terminus in PKA-dependent regulation of the I<sub>Ks</sub> potassium channel. *Channels* 2009;3:16-24.
- 15) Kaihara A, Kurokawa J, Furukawa T. A genetically encoded bioluminescent indicator for the sodium channel activity in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2009;131:4188-4189.

[学会発表](計31件)

- 1) Furukawa T, Kurokawa J, Bai CX. Testosterone regulates cardiac potassium channels via a non-genomic pathway. Keystone symposium "Cardiac arrhythmias: linking structural biology to gene defects" Tahoe City, CA, USA, Jan 29-Feb 3, 2006.
- 2) Kurokawa J, Bai CX, Furukawa T. Testosterone shortens ventricular action potential duration via a non-genomic pathway. 50th Annual Meeting of Biophysical Society, Salt Lake City, Utah, USA, Feb 18-22, 2006.
- 3) Kurokawa J, Bai CX, Furukawa T. Impact of a non-genomic pathway on QT intervals shortening by testosterone: Mechanism of sex-related difference in fatal arrhythmias. The 7th International Conference on Systems Biology,

- Yokohama, Oct, 2006.
- 4) Kurokawa J, Nakamura H, Bai CX, Isobe M, Furukawa T. Mechanisms of gender-related differences in susceptibility to torsades de pointes: Reverse effects of estrogen and progesterone on cardiac repolarization. AHA Scientific Sessions, Chicago, IL, USA, Nov. 12-15, 2006.
  - 5) Kurokawa J, Nakamura H, Bai CX, Furukawa T. Effects of ovarian steroids on cardiac repolarization. 51st Annual Meeting of the Biophysical Society, USA, Mar. 3-7, 2007.
  - 6) Kurokawa J, Furukawa T. Receptor-independent effects of estrogen on the HERG channel predispose women to drug-induced arrhythmias. AHA Scientific Sessions, Orlando, FL, USA, Nov. 3-7, 2007.
  - 7) Kurokawa J, Nakamura H, Furukawa T. Acute effects of female sex hormones on cardiac ion channels. Gordon Research Conference (Cardiac regulatory mechanism). NH, USA. 2008 July.
  - 8) Furukawa T, Kurokawa J. Site-specific S-nitrosylation acts as a novel regulatory mechanism of the cardiac  $I_{Ks}$  channel. Gordon Research Conference (Cardiac regulatory mechanism). NH, USA. 2008 July.
  - 9) Furukawa T. Hormonal control of  $I_{Ks}$  and  $I_{Kr}$ . Heart Rhythm 2008, 29th Annual Scientific Session. Symposium "Arrhythmias in women" San Francisco, USA, 2008, May.
  - 10) 黒川洵子, 白長喜, 角坂祥子, 玉川正次, 中谷晴昭, 古川哲史. エストロゲンによる QT 延長のメカニズム. 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
  - 11) 白長喜, 黒川洵子, 古川哲史. 性ホルモン受容体の作用特異的リガンドとしての薬用人参の主成分ステロールサポニン (ジンセノシド). 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
  - 12) 浅田健, 黒川洵子, 古川哲史. NO による遅延整流性カリウムチャンネルへのニトロ化. 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
  - 13) 中村浩章, 白長喜, 黒川洵子, 古川哲史, 磯部光章. Effect of progesterone on slow activating delayed rectifier  $K^+$  currents. 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
  - 14) 黒川洵子, 白長喜, 古川哲史. 非ゲノム経路による NO 産生を介したテストステロンによる心電図 QT 間隔短縮: 致死性不整脈における性差のメカニズム. 第 6 回日本 NO 学会学術集会, 東京, 2006 年 5 月.
  - 15) 古川哲史, 浅田健, 黒川洵子. 植物エストロゲン, ジンセノシド, の心血管作用は一酸化窒素を介する. 第 6 回日本 NO 学会学術集会, 東京, 2006 年 5 月.
  - 16) 黒川洵子, 中村浩章, 大石咲子, 白長喜, 古川哲史. 心筋イオンチャンネルに対するプロゲステロンの急性作用. 第 16 回日本循環薬理学会, 東京, 2006 年 12 月.
  - 17) 古川哲史, 黒川洵子, 中村浩章, 白長喜, 浅田健, 玉川正次, 中谷晴昭, Ronit V, Xu J, Clancy CE, 磯部光章. 性ホルモン非ゲノム作用による心筋イオンチャンネル制御機構. 第 24 回日本心電学会学術集会学術諮問委員指定シンポジウム「不整脈受攻性因子としての性差と加齢」, 名古屋, 2007 年 10 月.
  - 18) 浅田健, 黒川洵子, 古川哲史. レドック スモチーフに基づく遅延整流性カリウムチャンネルのニトロ化. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2007 年 3 月.
  - 19) 古川哲史, 黒川洵子, 白長喜, 中村浩章, 浅田健. カベオラを基盤とするホルモン受容体・NO シグナル・イオンチャンネルの機能協同制御. 第 81 回日本薬理学会年会シンポジウム「創薬標的としてのイオン制御蛋白分子間機能協同と細胞膜ミクロドメイン集積機構」, 横浜, 2008 年 3 月.
  - 20) 黒川洵子, 浅田健, 中村浩章, 古川哲史. 性ホルモンによる  $I_{Ks}$  チャンネル調節における S-ニトロシル化の関与. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
  - 21) 角坂祥子, 黒川洵子, 鈴木岳志, 古川哲史. Receptor-independent regulation of the HERG channel by estrogen. 第 81 回日本薬理学会年会, 横浜, 2008 年 3 月. (他 10 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川哲史 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授)

### (2) 研究分担者

黒川洵子 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授)

### (3) 連携研究者

中谷晴昭 (千葉大学・大学院医学系研究院・教授)

大江透 (岡山大学・医薬総合研究科・教授)

柳圭子 (佐賀大学・医学部・准教授)