

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06812

研究課題名（和文）遮断薬によるカリウムチャネル促進作用の分子機構と不整脈

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Potassium Channel Facilitation by Blockers and its Impact on Arrhythmias

研究代表者

古谷 和春（Furutani, Kazuharu）

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：40452437

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）：薬物誘発性不整脈の主要な原因は、薬物による心筋細胞の電位依存性カリウムチャネル（hERGチャネル）の遮断である。近年、hERG遮断薬として知られる薬物の多くはチャネルを遮断するだけでなく、電位依存的活性化を促進することが知られてきた。本研究では、遮断薬によるhERGチャネル活性化促進作用の分子機構の理解を進めた。また、薬物の構造からhERGチャネルへの作用を定量的に予測し、さらに心室筋細胞、心組織の機能にどう影響し、不整脈発生のリスクとなるか評価するパイプラインの開発も行なった。本研究の成果は、薬物誘発性不整脈の予測法や回避法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電位依存性カリウムチャネルの一種であるhERGチャネルは、様々な薬物によって遮断され、QT延長症候群の原因となる。この機構は、長年、世界的な研究テーマである。本研究は、活性化を促進する作用を併せ持つ遮断薬に着目し、薬物によるhERGチャネル機能制御の分子機構を明らかにした。この成果は、分子薬理学領域の未解明な問題を解決し、学術的な意義があった。さらに、本研究の成果は、疾患の治療薬の開発段階で必要な心毒性の予測・評価・回避に関して示唆を与え社会的な意義もあった。

研究成果の概要（英文）：A major cause of drug-induced arrhythmias is drug-induced blockade of voltage-gated potassium channels (hERG channels) in cardiomyocytes. In recent years, it has become known that many drugs known as hERG blockers not only block the channels but also facilitate their voltage-dependent activation. In the present study, we have advanced our understanding of the molecular mechanisms blocking agents that facilitate hERG channel activation. We also developed a pipeline to quantitatively predict the effects of drugs on hERG channels based on their structures and to assess how they affect ventricular myocyte and cardiac tissue function and risk of arrhythmogenesis. The results of this study may lead to the development of methods to predict and avoid drug-induced arrhythmias.

研究分野：薬理学

キーワード：イオンチャネル 薬物 不整脈 薬理学 心臓電気生理学 構造生物学 コンピューターシミュレーション 創薬

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) hERG 阻害薬の QT 延長症候群のリスク

Torsades de Points 型心室頻拍など、致死性心室不整脈誘発のリスクのある薬剤が、心室筋細胞の活動電位後再分極を担う電位依存性カリウムチャネルの hERG チャネルに対する遮断作用を示すことが知られていた。その為、医薬品による QT 延長症候群誘発のリスクを前臨床試験で評価するため、製薬会社は全ての新薬候補化合物に対し hERG チャネル遮断活性の検査 (hERG 試験) を行うよう定められている。hERG 試験において化合物が hERG チャネルを遮断すると、催不整脈リスクが疑われ、開発中止の判断理由となる。

2005 年頃より hERG 試験が課せられているが、検査された化合物の 70%にも及ぶ大部分で、hERG チャネル遮断活性が認められた。しかしながら、hERG チャネルを遮断する薬物の全てが致死性不整脈を起こす訳ではない。つまり、hERG 試験が感度は極めて高いが催不整脈性に対して選択性が高いとは言えず、偽陽性が問題と認識されていた。その為、薬物の hERG チャネル遮断活性に起因する不整脈誘発機構をより正確に理解し、真に危険性の高い薬物を検出する方法を確立すること、また、その基盤となる薬物-hERG チャネル相互作用の分子機構を理解し、薬物による不整脈誘発リスクの軽減を可能にすることが課題であった。

2) hERG 遮断薬による hERG チャネルの電位依存性活性化の促進

臨床で病気の治療に長年使用されている薬剤の中にも、hERG チャネルに対し遮断作用を示す薬物が数多く知られている。以前より本研究課題の研究代表者は、臨床で比較的催不整脈作用の低い薬物に着目し、hERG チャネルに対する作用を解析してきた。そのような研究から理解されてきたこととして、比較的催不整脈作用の低い hERG 遮断薬は、通常は hERG チャネルが担うカリウムイオン電流を減らす、特定の条件では、奇妙なことに電流を可逆的に増やすこともある。この遮断薬による hERG チャネル電流の増加作用は、電位依存的な活性化機構の促進によって起きており、ファシリテーション作用とも呼ばれているが、分子機構が理解されていなかった。

また、hERG 遮断薬は心筋細胞 I_{Kr} 電流を抑制することにより致死性不整脈誘発のリスクがあることが知られているが、遮断薬のファシリテーション作用と致死性不整脈誘発リスクとの関連もよく分かっていなかった。研究代表者は以前の理論研究によって、心筋細胞が異常な興奮を始める重要なタイミングで、薬物のファシリテーション作用は I_{Kr} 電流を増やし、薬物の不整脈リスク軽減に貢献できる可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究課題では、詳細な電気生理学的実験を含む実験的アプローチと、計算化学や生体機能シミュレーション手法を含む理論的アプローチを有機的に組み合わせ、臨床使用される hERG 遮断薬で広く観察される、hERG 電流促進作用 (ファシリテーション作用) の分子機構を機能的に、構造的に理解し、その予測、制御を目指した。そして、ヒト心機能への hERG 遮断薬の影響に対する理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 研究手法および実験材料：イオンチャネル機能の解析は電気生理学的手法を用いた。培養哺乳類細胞やアフリカツメガエル卵母細胞に異所的に発現させた hERG チャネルを流れる電流をパッチクランプ法もしくは二極電極膜電位固定法により測定した。hERG チャネル電流を評価することで、薬物の効果を評価した。本研究に必要な hERG チャネルの遺伝子は既に研究室に所持しており、実際に異所性に発現させ電流を測定し、研究に用いた実績があった。

また、分子構造モデリングは、Rosetta ソフトウェア (<https://www.rosettacommons.org/>) を使用した。さらに、心筋活動電位シミュレーションなど、機能的なモデリングおよびシミュレーションは独自にプログラミングしたものをを用いており、ソースコードなどのリソースは論文のオンラインマテリアルや GitHub を通じて公開している (<https://github.com/ClancyLab>)。

2) 研究実施体制：研究代表者は研究統括と実験遂行を担う。研究者協力者の Vladimir Yarov-Yarovoy 博士、Colleen E. Clancy 博士、および Heike Wulff 博士は (いずれも、米国 University of California, Davis、教授)、K チャネルの分子機能制御とその生理的役割の研究で多数の業績をあげており世界的に著名である。実験結果を研究者協力者と議論し、助言を得て進めることで、最重要な課題に軸足を置き、最適な方法論で研究を進めた。

4. 研究成果

1) ファシリテーション作用の基礎となる hERG 遮断薬のチャネル機能制御

詳細な実験を行い、ファシリテーション作用の発現には hERG チャネルの細胞内ゲートの開口により薬物相互作用部位である中心腔への侵入経路が開くことが必要であると分かった (図1)。

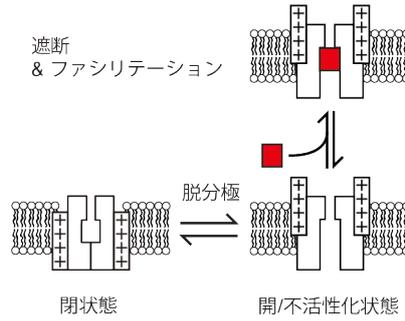


図1 脱分極刺激が促す薬物の hERG チャネル遮断作用とファシリテーション作用の模式図

また、hERG チャネルの野生型にファシリテーション作用を示す薬物は、過分極によっても活性化する D540K 変異体に対してもファシリテーション作用を発揮できることが分かった (図2)

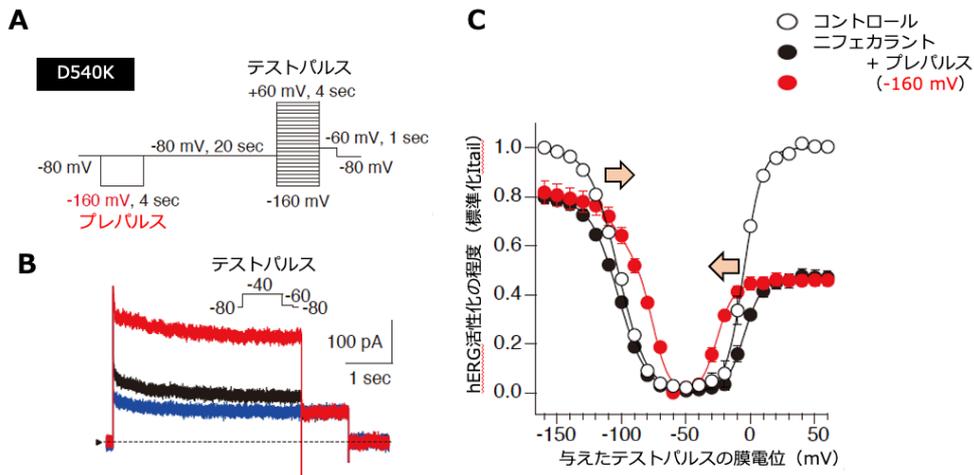


図2 過分極刺激による D540K hERG 変異体に対するニフェカランの促進作用誘導

A 実験で用いた電位固定プロトコル、B 過分極刺激による D540K hERG 変異体に対するニフェカランの促進作用誘導の典型例、C 過分極刺激によって誘導されたニフェカランの促進作用による D540K hERG 変異体の GV 関係の変化

さらに、脱分極による hERG チャネルの不活性化は、薬物に対する親和性を高めた。さらにファシリテーション作用は、作用を誘導する刺激がなければ、活動依存的に作用が解除された。その為、中心腔で相互作用した薬物は、細胞内ゲートが閉口するとチャネル内部に閉じ込められ、再開口を促し、細胞内ゲートが再開口するとチャネルから遊離すると考えられた (図3)。薬物-チャネル相互作用の形成と解除の速度も電気生理学的に評価し、数理モデルを構築した。そのモデルをシミュレートすると実験で観察したファシリテーション作用が再現された (図4)。

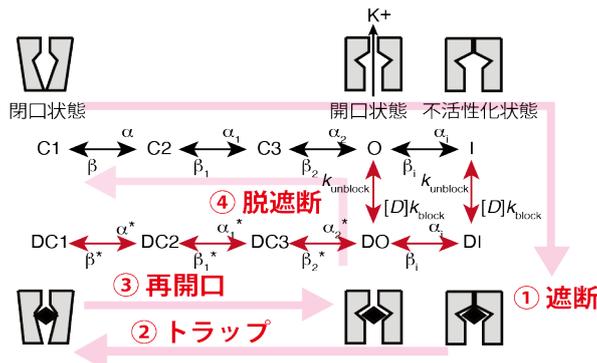


図3 hERG チャネル遮断薬がファシリテーション作用を発揮する機構 (仮説) の模式図

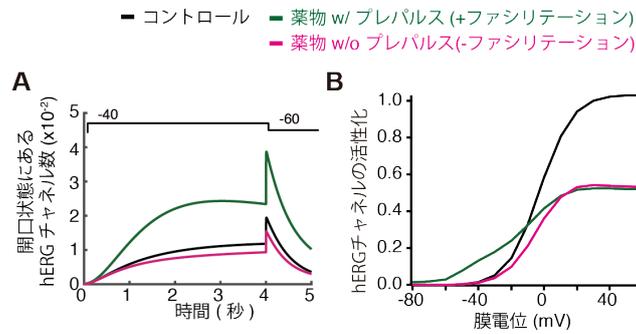


図4 hERG遮断薬によるファシリテーション作用の現象を再現する数理モデルシミュレーション結果

A プレパルスによる-40 mVで活性化されるhERG電流の増大、B プレパルスの有無によるコンダクタンス-電圧関係の変化

2) 遮断薬によるhERGファシリテーション作用の構造基盤

まず、閉状態、開状態、不活性化状態のhERGチャンネルの構造モデルを構築した。S620T hERG変異体は不活性化を起こさず、一方S641A hERG変異体は不活性化を野生型よりも起こしやすかった。野生型hERG、S620T hERG変異体、S641A hERG変異体の開状態の構造モデルの構造的安定性を調べ、hERGチャンネルが不活性化を受ける際に起こる構造変化を考察した(図5)。活性化状態では選択性フィルターのF627とポアヘリックスのS620間の水素結合が選択性フィルターの構造をイオン透過型に保ち、一方、不活性化状態ではその相互作用がなくなり選択性フィルターの構造の崩れがおけると示唆された。

また、開状態、不活性化状態のhERGチャンネルとhERG遮断薬の相互作用を予測し、薬物結合の状態依存性を考察した。特に注目すべきこととして、第Ⅲ群抗不整脈薬のニフェカランとドフェチリドはhERGチャンネルを阻害するが、両薬物とも活性化状態よりも不活性化状態に高い親和性を持つこと、そしてその理由として、S6ヘリックスの回転性の構造変化により薬物相互作用部位の位置が変化することが重要だと考えられた(図5)。

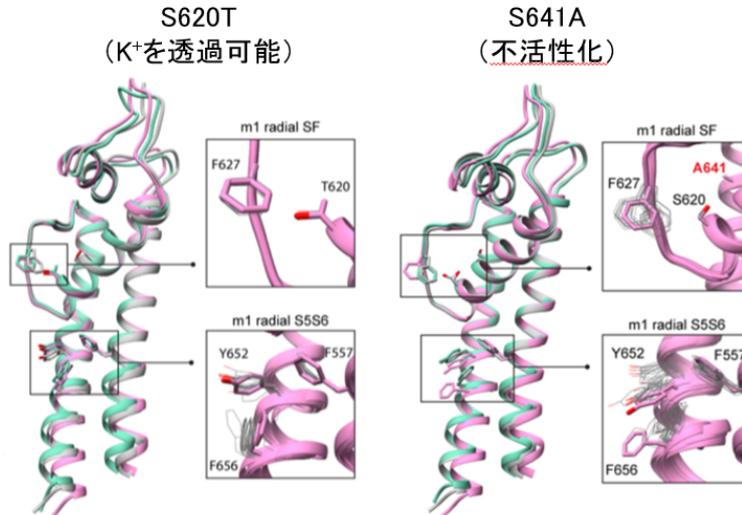


図5 S620T変異体とS641A変異体の構造モデル

さらに、ファシリテーション作用を示すhERG遮断薬とファシリテーション作用を示さないhERG遮断薬で、hERGチャンネルとの結合に違いはないか解析した。催不整脈リスクが比較的低くhERGチャンネルに対しファシリテーション作用を発揮するアミオダロン、ニフェカラン、フレカイニド、モキシフロキサシンは、開状態において、hERGチャンネルの疎水性ポケット内に位置していた(図6)。一方、催不整脈リスクが比較的高くhERGチャンネルを遮断するだけでファシリテーション作用を示さないd/Iソタロールとドフェチリドは疎水性ポケット内にほとんど位置していなかった。さらに、モデリングが予測する薬物作用を電気生理学的実験によって実証した。

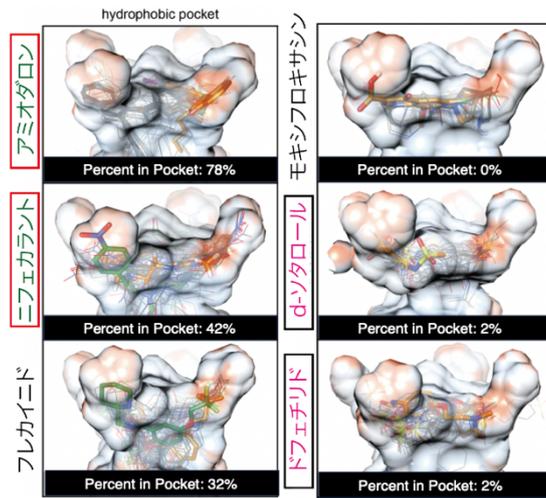


図6 ファシリテーション作用を発揮する薬物と発揮しない薬物の結合部位の違い

3) hERG チャンネル遮断薬の催不整脈性の理論的予測

薬物-hERG チャンネル相互作用の構造モデルから hERG チャンネル電流抑制の濃度依存性を定量的に予測し、心筋細胞活動電位への影響、心組織における不整脈発生への影響を多階層で解析する方法論 (in silico パイプライン) を開発した (図7)。

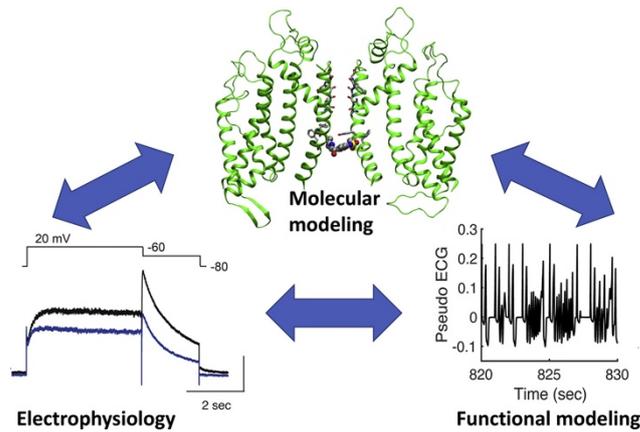


図7 薬物-チャンネル相互作用の構造モデルから薬物の催不整脈リスクの多階層的シミュレーション

4) 遮断薬の hERG チャンネルファシリテーション作用の分子機構および不整脈との関連に関する理解の整理

研究期間全体として、遮断薬による hERG チャンネル活性化促進作用の分子機構の理解が大きく進んだ。本研究の集大成として、薬物の hERG チャンネル機能制御と不整脈発生の関係に関するこれまでの知見を纏めた総説を執筆した。

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 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Emigh Cortez Aiyana M., DeMarco Kevin R., Furutani Kazuharu, Bekker Slava, Sack Jon T., Wulff Heike, Clancy Colleen E., Vorobyov Igor, Yarov-Yarovoy Vladimir	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural modeling of hERG channel-drug interactions using Rosetta	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1244166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1244166	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 Furutani Kazuharu	4. 巻 24
2. 論文標題 Facilitation of hERG Activation by Its Blocker: A Mechanism to Reduce Drug-Induced Proarrhythmic Risk	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16261 ~ 16261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms242216261	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 Furutani Kazuharu, Kawano Ryotaro, Ichiwara Minami, Adachi Ryo, Clancy Colleen E., Sack Jon T., Kita Satomi	4. 巻 102
2. 論文標題 Pore Opening, Not Voltage Sensor Movement, Underpins the Voltage-Dependence of Facilitation by a hERG Blocker	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.122.000569	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 Maly Jan, Emigh Aiyana M., DeMarco Kevin R., Furutani Kazuharu, Sack Jon T., Clancy Colleen E., Vorobyov Igor, Yarov-Yarovoy Vladimir	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural modeling of the hERG potassium channel and associated drug interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 966463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2022.966463	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 DeMarco Kevin R., Yang Pei-Chi, Singh Vikrant, Furutani Kazuharu, Dawson John R.D., Jeng Mao-Tsuen, Fettinger James C., Bekker Slava, Ngo Van A., Noskov Sergei Y., Yarov-Yarovoy Vladimir, Sack Jon T., Wulff Heike, Clancy Colleen E., Vorobyov Igor	4. 巻 158
2. 論文標題 Molecular determinants of pro-arrhythmia proclivity of d- and l-sotalol via a multi-scale modeling pipeline	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 163 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2021.05.015	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

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古谷和春, 河野諒太郎, 一藁南, 足立亮, Colleen E. Clancy, Jon T. Sack, 喜多紗斗美
2. 発表標題 hERGチャネル遮断薬は開状態にあるhERGチャネルと相互作用し促進作用を發揮する
3. 学会等名 第143回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田友睦, 古谷和春, Aiyana M. Emigh Cortez, Igor Vorobyov, Vladimir Yarov-Yarovoy, 喜多紗斗美
2. 発表標題 薬物によるhERGチャネル遮断と活性化促進の構造基盤,
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会九州部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古谷和春, 和田友睦, Aiyana M. Emigh Cortez, Igor Vorobyov, Vladimir Yarov-Yarovoy, 喜多紗斗美
2. 発表標題 薬物によるhERGチャネル遮断と活性化促進の構造基盤
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田友睦, 古谷和春, Aiyana M. Emigh Cortez, Igor Vorobyov, Vladimir Yarov-Yarovoy, 喜多紗斗美
2. 発表標題 hERGチャネル遮断薬が活性化促進作用を発揮する構造的機構
3. 学会等名 第62回日本薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古谷和春
2. 発表標題 薬理学実験から示唆される電位依存性カリウムチャネルのゲーティングに伴う構造変化
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会シンポジウム「イオンチャネル研究の最前線：新規イオン電流の評価から活性制御の動的構造基盤の解析まで」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古谷 和春, Cortez Aiyana, Vorobyov Igor, Yarov-Yarovoy Vladimir, 喜多 紗斗美
2. 発表標題 hERGの阻害剤による促進作用の機能的・構造的基盤
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古谷和春
2. 発表標題 薬物誘発性不整脈リスクの予測への応用を目指した心筋細胞イオンチャネルの薬理学研究
3. 学会等名 第16回徳島文理大学薬学部学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古谷和春、喜多紗斗美
2. 発表標題 コロナ禍で実施した薬理学実習から教員が学んだこと
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古谷和春
2. 発表標題 hERG Kv チャネル制御の機能構造的理解
3. 学会等名 生理研研究会2022 「構造情報を基盤とした膜機能分子の生理機能理解に向けて」 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuharu Furutani, Ryotaro Kawano, Satomi Kita
2. 発表標題 Functional and structural basis of hERG facilitation by its blockers
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryotaro Kawano, Kazuharu Furutani, Minami Ichiwara, Ryo Adachi, Colleen E. Clancy, Jon T. Sack, Satomi Kita
2. 発表標題 Pore opening, not voltage sensor movement, underpins the voltage-dependence of facilitation by a hERG blocker
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuharu Furutani, Ryotaro Kawano, Minami Ichiwara, Ryo Adachi, Colleen E. Clancy, Jon T. Sack, Satomi Kita
2. 発表標題 Pore opening, not voltage sensor movement, underpins the voltage-dependence of facilitation by a hERG blocker
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古谷和春
2. 発表標題 hERGチャネルの不活性化機構と薬物相互作用
3. 学会等名 2021年度 生理研究会「比較統合生理学的観点からの循環生理の解析」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuharu Furutani, Jan Maly, Vladimir Yarov-Yarovoy
2. 発表標題 hERG channel inactivation and drug binding
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古谷和春、マリー ヤン、ヴラディミール ヨロフヨロボイ
2. 発表標題 薬物相互作用に影響するhERGチャネルの不活性化機構
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田 泰伸、佐久間 康夫、岡村 康司（古谷 和春 分担翻訳）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 910
3. 書名 ギャノン生理学 原書26版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島文理大学薬学部薬理学講座ホームページ http://p.bunri-u.ac.jp/lab12/ 徳島文理大学薬学部薬理学講座ホームページ http://p.bunri-u.ac.jp/lab12/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California, Davis		