

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860561

研究課題名(和文) 抗SSA抗体陽性妊娠における循環血液中KCNH2電流抑制因子の検索

研究課題名(英文) The identification of circulating KCNH2 current-inhibitory factor in anti-SSA antibody-positive patients with pregnancies

研究代表者

杉山 洋樹 (SUGIYAMA, Hiroki)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20726137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：国立循環器病研究センター周産期科・婦人科において入院となった抗SSA抗体陽性妊娠症例に対し、患者説明・同意が得られた患者より母体血清・胎児臍帯血を岡山大学循環器内科へ郵送、HERG発現HEK293細胞を血清入りの細胞培養液で共培養後に、パッチクランプ法(Voltage clamp)を用い、KCNH2(HERG)チャネル機能を解析、チャネル機能の評価を行った。解析対象症例数は6例。現時点では母体血清、胎児臍帯血ともに、有意なチャネル機能の修飾因子の存在を示唆するデータは得られていない。今後、HERG結合蛋白を抽出・解析し、再度パッチクランプにてチャネル機能変化について再評価を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The subjects in this study were anti-SSA antibody-positive patients (n=6) with pregnancies referred to department of gynecology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japan. Serum samples were obtained from these patients and their fetus after obtaining informed consent, and sent to our laboratory in Okayama university. HEK293 cells stably expressing KCNH2 were cultured for 1 day in a medium to which serum obtained from the study subjects had been added. The KCNH2 current activation in these cells was studied by analysis of deactivating tail currents recorded by using the whole-cell patch-clamp technique. There were no significant differences in KCNH2 tail currents in these patients and normal controls. HERG-binding protein was needed to be identified and abstracted by immunoprecipitation experiments using HERG-tagged fusion protein from sera obtained from subjects.

研究分野：循環器内科学

キーワード：抗SSA抗体 KCNH2電流 パッチクランプ法 免疫沈降 HERG結合蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

心室性不整脈は心原性突然死の主要な原因であるが、機序が不明な症例も多くその予防、治療法を完全に確立できてはいない。よって可能な限りその機序を解明することで新たな治療ターゲットを探索し、心臓性突然死の予防に役立てることが重要である。

KCNH2 (HERG) チャネルは、心筋の再分極相における主要な電流である「遅延整流カリウム電流の早い成分 ( $I_{Kr}$ )」を形成し、その電流の異常は心筋の不応期のばらつきなどの電氣的不安定性を生じ、Torsade de pointes の重要な原因となる。臨床的には KCNH2 (HERG) チャネルの機能低下により QT 延長症候群を生じ、逆に機能亢進によっては QT 短縮症候群を生じ、いずれも Torsade de pointes を誘発して心原性突然死の重要な原因である。また KCNH2 チャネルは種々の薬剤に対する感受性が非常に高く、後天性 QT 延長症候群の主要な標的分子として知られている。

近年我々は、循環血液中の **抗 KCNH2 (HERG) チャネル抗体** が  $I_{Kr}$  を減弱させる自己免疫性 QT 延長症候群の存在を発見し報告した (Nakamura et al. J Am Coll Cardiol. 2007) が、その症例では **抗 SSA 抗体が陽性** であった。シェーグレン症候群合併妊娠においては新生児に先天性房室ブロックを生じるが、Boutjdir らはその機序として循環血液中の **抗 SSA 抗体** による L 型カルシウムチャネルの機能抑制によることをパッチクランプ法により証明した。また、Lazzerini らは **抗 SSA 抗体陽性患者において QTc 間隔が有意に延長** し且つ心室性不整脈の発生が多いことを報告している。

これらの事実より予想される事項として、

(1) 抗 SSA 抗体陽性患者の循環血液中には KCNH2 (HERG) チャネルの抑制因子が存在し、 $I_{Kr}$  電流の抑制を介して心筋の再分極を障害し、QTc 間隔の延長や心室性不整脈の原因となっている。

(2) そのイオンチャネル抑制因子は新生児に対しても強力に作用し得る。

という2点が挙げられる。そこで本研究においては「抗 SSA 抗体陽性妊娠症例における母体循環血液および臍帯血中の KCNH2(HERG)チャネル調節因子の検索」を主目的とし、さらにその因子を分離・同定することを副目的として検討を行う。

抗 SSA 抗体は general population にお

いても 0.5-2.7% で陽性であると報告されており、その催不整脈性をが証明されることにより心室性不整脈のハイリスク症例の選別に役立てられる可能性がある。

## 2. 研究の目的

シェーグレン合併妊娠における胎児の先天性房室ブロックの原因として抗 SSA 抗体の関与が知られているが、以前我々の報告した「抗 KCNH2 (HERG) チャネル抗体による自己免疫性 QT 延長症候群」においても抗 SSA 抗体が陽性であった。抗 SSA 抗体陽性症例において QT 間隔が延長することは報告されているが、KCNH2(HERG) チャネルとの関係を含め、その機序は今もって不明である。本研究の目的は 抗 SSA 抗体陽性シェーグレン症候群合併妊婦及びその新生児血清における抗 KCNH2 (HERG) 電流抑制因子の検索である。

## 3. 研究の方法

### (1) KCNH2 (HERG) 電流調節因子の検索

抗 SSA 抗体陽性患者循環血液中 KCNH2 (HERG) 電流調節因子を検索するため、国立循環器病研究センター 周産期・婦人科における抗 SSA 抗体陽性妊娠症例を対象とし、出産時に採取した母体血および臍帯血を用いる。採血については国立循環器病研究センター 周産期・婦人科の三好剛一先生による患者説明および同意の承諾を得る (国立循環器病研究センターにおける倫理委員会の承認は得ている)。まず、HEK293 細胞に対して pcDNA3-HERG を transfection で導入する。発現を確認した後、抗 SSA 抗体陽性妊婦および臍帯血を用いて 10% 血清入りの細胞培養液とともに HEK293 細胞を overnight で培養する。Single cell に対し、conventional whole cell によるパッチクランプ法 (Voltage clamp) を用いて KCNH2(HERG)チャネル機能を解析し、患者血清中の因子が KCNH2(HERG)チャネル機能を変化させ得るか評価する。パッチクランプに対する技術支援およびデータ解析については東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学の古川哲史教授および黒川洵子准教授の協力を頂いている。

### (2) KCNH2 (HERG) 電流調節因子の分離・同定

Tag 付き KCNH2(HERG)の作成。  
pcDNA3.1-V5-His (invitrogen) に pcDNA3-HERG 由来の HERG をサブクローニングで組み込み、  
pcDNA3.1-HERG-V5-His を作成する。

KCNH2-HERG-V5-beads 複合体の形成。pcDNA3.1-HERG-V5-His を HEK293 に transfection で導入し、HERG-V5 を産生する CHAPS を使用し HERG-V5 を可溶化する。V5 tagged protein purification kit (MBL) を使用し、HERG-V5-beads 複合体を形成させる。この時点で、beads を PBS で洗浄し HERG-V5 以外のタンパクを除去する。

KCNH2(HERG) 結合タンパクの免疫沈降。

前述の HERG-V5-beads 複合体に抗 SSA 抗体陽性妊娠症例の血液(母体血、臍帯血)を加え十分混和する。その後 beads を洗浄することで HERG-V5 に結合したタンパク以外を除去する。この時点で V5 tagged protein purification kit (MBL) 内の V5 タンパクを使用し HERG 結合タンパクおよび HERG-V5 タンパクを回収する。

KCNH2(HERG) 結合タンパクの検出。回収した HERG 結合タンパクを SDS-PAGE で電気泳動し、銀染色もしくは CBB 染色で泳動したタンパクを可視化する。コントロール(抗 SSA 抗体陰性例)と比較し差が認められるバンドに目的とする HERG 結合タンパクが存在することとなる。

### (3) KCNH2 (HERG) 電流調節因子の分離・同定

KCNH2(HERG) 結合タンパクの同定。HERG 結合タンパクを含むバンドを切り出し、トリプシンで消化ののち MALDI-TOF MS 解析を行い(共同実験室の機器使用)、HERG 結合タンパクを同定する。

KCNH2(HERG) 結合タンパクによる HERG 電流修飾の確認。

同定された因子が HEK293 細胞に発現させた KCNH2(HERG)チャネル機能を変化させるかパッチクランプにて再確認する (Nakamura et al. J Am Coll Cardiol 2007, Sugiyama et al. PLoS One 2011)。

### 4. 研究成果

国立循環器病研究センター 周産期・婦人科より抗 SSA 抗体陽性妊娠患者の血清の送付を受け、母体血清および胎児臍帯血で共培養を行った KCNH2(HERG)チャネル発現 HEK293 細胞において KCNH2 チャネル機能解析を行った結果、tail current についてはコントロール血清における最大の電流密度との比較において、一定の傾向をもった修飾効果は得られなかった。

Boltzmann equation を用いて解析した Activation curve から導かれる電位依存性についても、half-maximally activation を表す  $V_{1/2}$ 、slope factor  $k$  についても同様に、一定の傾向を認めなかった。臨床情報から得られる要素についての検討において、チャネル機能の修飾と関連する因子を導き出すことが困難と考えられた。また、母体血清から得られたチャネル電流密度のデータおよび、その胎児臍帯血から得られた前述の各種パラメータを比較したところ、同じ親子関係にあったとしてもやはりチャネル機能の修飾についての一定の傾向を認めなかった。さらに対象とするチャネルを拡大し KvLQT1 における電流密度の検討を試みるも、概ね同様の傾向と考えられた。

パッチクランプ法における問題点として、測定対象となる個々の細胞におけるチャネル機能のばらつきが大きく、対象症例数が比較的少数である場合には実験上の誤差が大きいことから、統計学的な有意差に対する件出力が低いことが障壁と考えられる。また、チャネル機能に影響を与える因子としては電解質を含め多岐にわたることから、個々の症例における抗 SSA 抗体以外の因子を均一化したコントロールを用いることが困難であることが解析上の問題として挙げられる。

これらの問題は対象症例の積み増しにて緩和することが可能と考えられ、今後も対象症例の蓄積を継続していくことでチャネル機能の修飾因子を持つ症例の同定が可能となり、KCNH2(HERG)結合タンパクの同定についての進展が予想される。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 洋樹 (SUGIYAMA, Hiroki)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20726137