

薬剤誘発 QT 延長症候群の成因解明と創薬開発のための基礎的研究

所属機関 独協医科大学越谷病院循環器内科
研究者名 高柳 寛

《研究の概要》

本研究の主目的は、この薬物性 QT 延長症候群の成因をチャネル分子に対する薬物作用の分子動態から明らかにし、その細胞電気活動・組織レベルでの不整脈成立機序との関連を計算科学技術により定量的に検討し、実際の臨床例での遺伝子多形と薬物作用機構を分子レベルまで解明し、QT 延長の機序を定量的に明らかにすることである。これらにより、QT 延長症候群を起こす薬物の特性とその心筋での表現系の関連を個腹に明確にし、有効な抗不整脈治療法を開発するとともに薬剤の副作用としての心電図 QT 延長を取り除くことができる。

研究事業の必要性であるが、薬剤性 QT 延長はキニジン、ジソピラミドなどの I 群やドフェチリドなどの III 群の抗不整脈薬のみならず、テルフェナジン、三環系抗鬱剤その他多くの非循環器作用薬にも見られる。これらは重大な心臓副作用であり、新薬開発に際し最近特に注意が喚起されている。その機序に関してはカリウムイオンの関与が以前から指摘されているが、詳細はほとんど解明されていない。QT 延長症候群を起こす薬物の特性とその心筋での表現系の関連を明確にし、有効な抗不整脈治療法を開発するとともに薬剤の副作用としての心電図 QT 延長を取り除くことへの臨床における必要性は高くかつ緊急の課題である。

我々の研究は、2004 年のフォーラムでも提示したようにこの目的に沿って着実に成果をあげ始めている。具体的な成果は、以下の通りである。チャネル分子解析の主体である大阪大学および秋田大学薬理学教室では心筋細胞のカリウムチャネルの基礎的研究が進む一方、シミュレーションによる定量的解析も大阪大学および国立病院大阪医療センターで検討されている。国立循環器病センターと獨協医科大学では、実際の臨床例での解析が進められ、特に循環器病センターでは遺伝子レベルでの分析が可能になっている。

大阪大学の倉智らは電流阻害特性の解析結果を基に、薬物作用動態モデルを作成するためのパラメータスキャンの技術を開発した。さらに、Luo-Rudy モデルと統合することで、心筋細胞に対する薬物効果を細胞レベルでシミュレートし、薬物誘発性 QT 延長症候群のメカニズムを詳細に調べることが可能になった。秋田大学薬理学教室では、薬物特に吸入麻酔薬による QT 延長を実験で解析し、その結果のシミュレーションモデルを開発した。さらに β サブユニット欠損マウスでの解析も進めている。

国立循環器病センターの清水らは、遺伝子レベルでの QT 延長症候群を、臨床例で解析するとともに、灌流実験で QT 延長症候群のメカニズムを詳細に検討した。大阪大学工学部および国立病院大阪医療センターではモデルからの解析が、催不整脈作用の解析に大きく貢献している。

獨協医科大学の高柳は、抗不整脈薬の催不整脈作用に注目し、臨床例で抗不整脈薬投与後に paradoxical facilitation という現象が起きることを見出し、その機序を推定した。従来の QT 延長に加えて、致死性不整脈の誘因になる可能性が極めて大きい危険かつ奇異

な現象である。

これらの実績を踏まえて、薬物性 QT 延長症候群の機序解明は、確実に進んだ。これらの基礎的研究は、創薬への情報を確実に増大し、副作用の少ない新薬開発推進への基盤となると考える。

研究者名 高柳 寛
所属機関 独協医科大学越谷病院循環器内科

研究報告

I 研究目的

CAST study で抗不整脈薬の心室性期外収縮 (PVC) に対する作用が問われたが、PVC の機序自体は不明の点が多い。我々は、PVC が自動能によると考え、2003 年に PVC 前後 8 心拍の移動平均から平均洞周期長 (mSCL) を求め、対応する PVC-PVC 間隔を二段脈、三段脈等に色分けしてプロットする解析法を公表した。今回横軸に誤差のない新しいプロットを考案し両方法を対比検討した。

II 研究計画および材料と方法

1) 対象は心室副収縮 10 例を含む PVC が頻発する ($>3,000$ /日) 無投薬下の 92 例である。解析には 24 時間心電図記録から、総ての PVC-PVC 間隔 ($X1-X2$) を二段脈 $X1-N-X2$ 、三段脈 $X1-N-N-X2$ 、以下 n 段脈 ($n=1-10$) にまで分類した (図 A)。次いで、各 n 段脈毎に色分けして、 $X1-X2$ を縦軸にとり、横軸を a) 移動平均から求めた mSCL と、b) Nau(1982) らに準じた $X1-N$ 間隔に対してプロットした。2) この解析結果から位相反応曲線 (PRC) の推定が可能かを調べるため、自動能に対する解析には 6 個のパラメーター $a, b, c, \omega, \gamma, \delta$ をとり入れた Ikeda (1982) モデルで検討した。

III 研究成果

1) 無投薬の記録 92 例中 55 例で間入性 (In-) PVC を認めた。a) mSCL 法では、間入性二段脈 (In-B) は勾配が水平に近く ($n=48$)、代償性二段脈 (Com-B) は勾配が 2 に近いが両者には重なりがあった。b) $X1-N$ 法では In-B と Com-B は、横軸の位置が異なるので重なりはなく、勾配が 1 に近い同一直線上に回帰した。間入性三段脈 (In-T) と代償性三段脈 (Com-T) は異なる直線に回帰し、四段脈も同様であった。2) モデルで δ を 0.4 以下に減少すると In-B が出現した。本法による表示により、抗不整脈薬投与後の間入性 PVC 増加現象を見出した。機序として薬による房室伝導の遅延が基にした paradoxical facilitation を考えた。

IV 考察

移動平均で求めた mSCL は大幅に短縮する。新しい PVC 表示方法は、両者を識別して各症例に固有のパターンを呈し、かつ従来困難と考えられてきた PRC の直接推定が可能となった。薬投与後の間入性 PVC 増加現象は、いまだ報告がなく、催不整脈性との関連が示唆された。

V 研究成果の発表

1. 第 21 回日本心電学会 心室性期外収縮の sequence 解析 2004 年 9 月 14 日 京都
2. 中原志朗 心室性期外収縮の起源による出現様式の差異 不整脈 21:48-54, 2005.

3. 第 20 回日本心臓ペースング学会シンポジウム 自動能によるに心室性期外収縮に対する抗不整脈薬の薬理作用 2005 年 5 月 30 日 宝塚
4. Tanaka K, Hayashi T, Iwasaki Y, Morooka S, Nagase K, Nakata T, Takayanagi K: Premature atrial contraction and paroxysmal atrial fibrillation about ectopic automaticity, examination from atrial parasystole. 12th World Congress on Cardiac Pacing and Electrophysiology, February 19-22, Hong Kong, China 2003
5. Nakata T, Inoue T, Sakai Y, Fujito T, Hoshi K, Hayashi T, Takayanagi K, Morooka S: Mechanism of parasystole interectopic intervals in patients with fixed coupling interval of premature ventricular contractions-relation to the modulated parasystole theory. 74th American Heart Association, November 9-12, 2003, Orland, USA.
6. 瀧澤 圭、高柳 寛、岩崎洋一、中田俊之、田中数彦、林 輝美、諸岡成徳、森本文雄、佐藤陽二、池上敬一、瀧沢義教、佐々木伸二：Holter 心電計を装着中に突然死した 2 症例．心臓 34 (suppl. 3)：72-76, 2002
7. 田中数彦、高柳 寛、中田俊之、岩崎洋一、酒井良彦、井上晃男、林 輝美、諸岡成徳、池田憲昭：副収縮による分単位で群発する心室性期外収縮二段脈例ーコンピューターとの対比ー．日本心電学会誌 22 (suppl)：99, 2002
8. 池田憲昭、竹内昭博、高柳 寛、宮原英夫、幸田 誠：双方変調副調律モデルの特性とその臨床心電図への適用．日本心電学会誌 22 (suppl)：86-91, 2002

倉智嘉久 大阪大学薬理学教室 教授

薬物作用動態の解析

薬物のカリウムチャネルに対する作用動態の解析と不整脈成立機序の計算科学を用いたモデル構築

研究報告

I 研究目的

クラス I、III 群に属する抗不整脈薬や抗生物質、抗ヒスタミン薬、精神安定剤、三環系抗鬱薬等の非循環器作用薬等、様々な薬物がカリウムチャネルの活性抑制を介して、QT 間隔を延長する。この薬物作用動態を正確に定量し、シミュレートできれば、薬物の活動電位に与える影響、不整脈発生の予測を *in silico* で可能とし、創薬の過程の効率化、臨床への応用が期待される。

II 研究計画および材料と方法

1) ホスホジエステラーゼの阻害薬ベスナリノン、クラス Ia 群抗不整脈薬キニジン、そしてクラス III 群抗不整脈薬ドフェチリドは、HERG と MiRP1 の複合体からなる遅延性外向き整流性カリウムチャネル (I_{Kr}) を阻害する。しかし、ドフェチリド、キニジンが不整脈を

発生するのに対して、ベスナリノン是不整脈を誘発しにくい。我々は、アフリカツメガエル卵細胞、ヒト培養細胞に異所性に発現、再構成した I_{Kr} 電流に対する 3 つの薬物の阻害作用を解析した。2) この薬物阻害モデルを、心筋細胞活動電位モデル (Luo-Rudy モデル) に組み込み、各阻害剤がもたらす活動電位変化のシミュレーションを行った。

III 研究成果

1) ドフェチリドは電位・時間非依存性、キニジンとベスナリノンは電位・時間依存性に HERG を阻害すること、2) 脱分極時に、キニジンはベスナリノンよりも早く HERG を阻害することが判った。(Katayama et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 294, 339-346, 2000; Tsujimae et al., Eur. J. Pharmacol., 493, 29-40, 2004)。

2) 心室壁中心部の細胞 (M-cell) の活動電位を再現するため、 I_{Ks} の電流量を Luo-Rudy モデルに対して 40% に落とし、各薬物の脱分極側での定常ブロックの値を 20% として、活動電位変化をシミュレートした。すると、活動電位が立ち上がると、キニジンによる時間依存性ブロックは速やかに高いレベルに達するが、ベスナリノンのそれは脱分極側での時定数が遅いため、低いレベルであることが判った。このため、特に徐脈においては、キニジンとドフェチリドの存在下で、早期後脱分極 (EAD) が発生するが、ベスナリノン存在下では活動電位は正常に再分極した。また、徐脈の方が頻脈よりも EAD が発生しやすくなる現象 (逆頻度依存性) が見られた。これは I_{Ks} 電流の寄与が徐脈で小さいことが原因であると考えられた。一方、ベスナリノンはブロックのリカバリはキニジンと同程度だが、ブロックの時定数が長い。そのため、ブロックのおこる速度がおそく、逆頻度依存性が弱いことが判った。このように、in silico で再現した活動電位モデルから、 I_{Kr} 電流に対する作用動態が全く異なるにも関わらず、ドフェチリドとキニジンは、どちらも逆頻度依存性に早期後脱分極が発生し、不整脈誘発を引き起こしやすいこと、ベスナリノンは阻害作用がゆっくりとしているため、早期後脱分極を引き起こさないことが明らかとなった。この知見は、臨床的な薬物作用の報告とも一致する。

IV 考察

以上のように、電流阻害特性の解析結果を元に、薬物作用動態モデルを作成するためのパラメータスキャンの技術を開発した。さらに、Luo-Rudy モデルと統合することで、心筋細胞に対する薬物効果を細胞レベルでシミュレートし、薬物誘発性 QT 延長症候群のメカニズムを詳細に調べることができるようになった。今後の課題としては、組織の部位ごとの特性の違いを考慮して、細胞間の興奮伝導を取り込んだモデルの構築である。そのためには、まず各特性を持った細胞モデルの確立を行い、次に伝導メカニズムの解明、最後に心筋組織の解剖学的なデータの解析を行い、細胞レベルの心筋細胞活動電位モデル、細胞間伝導モデルといった、多階層のモデルを結合し、薬物の組織レベルにおける作用を定量的にシミュレートするシステムを完成させてゆきたい。

V 研究成果の発表

1. Yamada, M., and Kurachi, Y. A functional role of the C-terminal 42 amino acids of SUR2A and SUR2B in the physiology and pharmacology of cardiovascular ATP-

- sensitive K⁺ channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 39, 1-6, 2005.
2. Ishii, M., Fujita, S., Yamada, M., Hosaka, Y., and Kurachi, Y. Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate and Ca²⁺/calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action. *Biochem. J.*, 385, 65-73, 2005.
 3. Ishii, M., and Kurachi, Y. Assays of RGS protein modulation by phosphatidylinositides and calmodulin. *Methods Enzymol.*, 389, 105-118, 2004.
 4. Hibino, H., Fujita, A., Iwai, K., Yamada, M., and Kurachi, Y. Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 279, 44065-44073, 2004.
 5. Yamada, M., Ishii, M., Hibino, H., and Kurachi, Y. Mutation in nucleotide-binding domains of sulfonylurea receptor 2 evokes Na-ATP-dependent activation of ATP-sensitive K⁺ channels: implication for dimerization of nucleotide-binding domains to induce channel opening. *Mol. Pharmacol.*, 66, 807-816, 2004.
 6. Tsujimae, K., Suzuki, S., Yamada, M., and Kurachi, Y. Comparison of kinetic properties of quinidine and dofetilide block of HERG channels. *Eur. J. Pharmacol.*, 493, 29-40, 2004.
 7. Yamada, M., and Kurachi, Y. The nucleotide-binding domains of sulfonylurea receptor 2A and 2B play different functional roles in nicorandil-induced activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Mol. Pharmacol.*, 65, 1198-1207, 2004.
 8. Makino, Y., Matsushita, K., Yamada, M., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., and Kurachi, Y. Effect of Tertiapin on Different Types of Recombinant Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Med. J. Osaka Univ.*, 47, 1-11, 2004.
 9. Hibino, H., Higashi-Shingai, K., Fujita, A., Iwai, K., Ishii, M., and Kurachi, Y. Expression of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir5.1, in specific types of fibrocytes in the cochlear lateral wall suggests its functional importance in the establishment of endocochlear potential. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 76-84, 2004.
 10. Kurachi, Y., and Ishii, M. Cell signal control of the G protein-gated potassium channel and its subcellular localization. *J. Physiol.*, 554, 285-294, 2004.
 11. Kurachi, Y., and North, R. A. Ion channels: their structure, function and control-an overview. *J. Physiol.* 554, 245-247, 2004.
 12. Chachin, M., Yamada, M., Fujita, A., Matsuoka, T., Matsushita, K., and Kurachi, Y. Nateglinide, a D-Phenylalanine Derivative Lacking Either a Sulfonylurea or Benzamido Moiety, Specifically Inhibits Pancreatic β -Cell-Type K_{ATP} Channel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304, 1025-1032, 2003
 13. Ishii, M., Fujita, A., Iwai, K., Kusaka, S., Higashi, K., Inanobe, A., Hibino, H., and Kurachi, Y. Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 Inwardly rectifying K⁺ channels in retina. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285, C260-C267, 2003

14. Yamashita, T., Ogawa, S., Aizawa, Y., Atarashi, H., Inoue, H., Ohe, T., Okumura, K., Kato, T., Kamakura, S., Kumagai, K., Kurachi, Y., Kodama, I., Koretsune, Y., Saikawa, T., Sakurai, M., Sugi, K., Nakaya, H., Nakayama, T., Hirai, M., Fukatani, M., Mitamura, H., Yamazaki, T. J-RHYTHM Investigators. Investigation of the optimal treatment strategy for atrial fibrillation in Japan. *Circ. J.*, 67, 738-741, 2003.
15. Ishii, M., and Kurachi, Y. Physiological actions of regulators of G-protein signaling (RGS) proteins. *Life Sci.* 74, 163-171, 2003.
16. Jay, P. Y., Berul, C., Tanaka, M., Ishii, M., Kurachi, Y., and Izumo, S. Cardiac conduction and arrhythmia: insights from Nkx2.5 mutations in mouse and humans. *Novartis Foundation Symposium*, 250, 227-238, 2003
17. Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarriubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M. L., Grissmer, S., Jan, L. Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H. A., McKinnon, D., Nichols, C. G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M. M., Vandenberg, C. A., Wei, A., Wulff, H., and Wymore, R. S. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.*, 55, 583-586, 2003.
18. Kondo, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kuriyama, H., Makino, Y., Nishizawa, H., Matsuda, M., Maeda, N., Nagaretani, H., Kihara, S., Kurachi, Y., Nakamura, T., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. Human aquaporin adipose (AQPap) gene: genomic structure, promoter analysis and functional mutation. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1814-1826, 2002.
19. Saito, H., Kimura, M., Inanobe, A., Ohe, T., and Kurachi, Y. An N-terminal sequence specific for a novel Homer1 isoform controls trafficking of group I metabotropic glutamate receptor in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 523-529, 2002.
20. Inanobe, A., Ito, M., Fujita, A., Tomoike, H., and Kurachi, Y. Inward rectifier K⁺ channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, C1396-1403, 2002.
21. Tanemoto, M., Fujita, A., Higashi, K., and Kurachi, Y. PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron* 34: 387-397, 2002.
22. Matsushita, K., Kinoshita, K., Matsuoka, T., Fujita, A., Fujikado, T., Tano, Y., Nakamura, H., and Kurachi, Y. Intramolecular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP-induced differential control of K_{ATP} channels. *Circ. Res.* 90, 554-561, 2002.
23. Ishii, M., Inanobe, A., and Kurachi, Y. PIP₃-inhibition of RGS protein and

its reversal by Ca^{2+} /calmodulin mediate voltage-dependent control of the G protein cycle in a cardiac K^+ channel. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 99, 4325-4330, 2002.

24. Fujita, A., Horio, Y., Higashi, K., Mouri, T., Hata, F., Takeguchi, N., and Kurachi, Y.. Specific localization of an inwardly rectifying K^+ channel, Kir4.1, at the apical membrane of gastric parietal cells; its possible involvement in K^+ recycling for activation of H^+/K^+ pump. J. Physiol. 540, 85-92, 2002.
25. Lourdel, S., Paulais, M., Cluzeaud, F., Bens, M., Tanemoto, M., Kurachi, Y., Vandewalle, A., and Tuelon, J. A K^+ inward rectifier at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. J. Physiol. 538, 391-404, 2002.

清水 渉 国立循環器病センター 医長

動脈灌流心室筋切片標本を用いた QT 延長症候群の細胞学的成因の解明と臨床的検討

研究報告

I. 研究目的

QT 延長症候群 (LQTS) は、QT 延長に伴って Torsade de Pointes (TdP) と称される多形性心室頻拍が出現し、失神や突然死の原因となる疾患である。先天性 LQTS では、現在までにイオンチャネル機能や膜蛋白に関係する遺伝子異常による 8 つの遺伝子型が報告されている。また、薬剤などを原因とする後天性 LQTS の一部の家系でも、先天性 LQTS の原因遺伝子の異常が報告されている。本研究では、独自に開発した動脈灌流心室筋切片標本を用いて先天性または後天性 QT 延長モデルを作成し、QT 延長や TdP の細胞学的成因を解明するとともに、先天性 LQTS の各遺伝子型における交感神経刺激や抗不整脈薬の反応性の違いや、薬剤誘発性 LQTS における有効な薬剤を検討する。また、これらの実験的成果を踏まえて、遺伝子型の判明した先天性 LQTS 患者の交感神経刺激 (Epinephrine) に対する反応を観察し、その臨床的有用性を検討した。

II. 研究計画および材料と方法

1) 動脈灌流心室筋切片標本を用いた LQTS モデル

貫壁性、すなわち心外膜 (Epi) 細胞、心室筋中層の M 細胞、心内膜 (Endo) 細胞の活動電位 (AP)、貫壁性双極心電図 (ECG) の同時記録が可能な動脈灌流イヌ左室心筋切片を用いて先天性 LQTS (LQT1, isoproterenol+chromanol 293B, I_{Ks} 遮断; LQT2, d-sotalol, I_{Kr} 遮断; LQT3, ATX-II, late I_{Na} 増強) を作成し、各遺伝子型の異常 T 波、TdP の発生機序、および交感神経刺激や各種抗不整脈薬の有効性を検討した。また、動脈灌流ネコ左室心筋切片において、 I_{Ks} 遮断薬により潜在的な K^+ チャネル異常を模擬し、これに I_{Kr} 遮断

薬を追加することにより、薬剤誘発性 LQTS モデルを作成し、TdP の発生機序を解明するとともに、L-type Ca^{2+} チャネル遮断薬のベラパミルの有効性を検討した。

2) 先天性 LQTS の遺伝子型別の Epinephrine 負荷に対する反応性の違いとその臨床的有用性

LQT1 型の 31 例 (12 家系)、LQT2 型の 23 例 (12 家系)、LQT3 型の 6 例 (3 家系)、対照群 30 例を対象とし、交感神経刺激薬である Epinephrine 負荷試験 ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ボーラス静注 + $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ 持続点滴) を施行し、潜在性 LQTS の検出、および先天性 LQTS の遺伝子型の推定における Epinephrine 負荷試験の有用性を検討した。(倫理面への配慮) 研究成果の発表においては、患者のプライバシーを考慮し、人権擁護を保持した。

III. 研究成果

1) 動脈灌流心室筋切片標本を用いた先天性 LQTS モデル

LQT1、2、3 のいずれでも、M 細胞活動電位持続時間 (APD) が選択的に延長し、貫壁性再分極時間のバラツキ (transmural dispersion of repolarization: TDR) が増大し、TdP が誘発された。各遺伝子型に特徴的な異常 T 波には貫壁性の電位勾配が関係し、TdP 第 1 拍目の期外収縮は、M 細胞または心内膜側 Purkinje 細胞を起源とする早期後脱分極 (EAD) からの撃発活動、2 拍目以降は、TDR 増大によるリエントリーが機序と考えられた。LQT1 と LQT2 では、isoproterenol (β 受容体刺激) により QT 時間および TDR が持続的または一次的に増大して、TdP 頻度が増加し、propranolol (β 遮断薬) はこれを抑制した。一方、LQT3 では QT 時間および TDR は持続的に短縮した。mexiletine (late I_{Na} 遮断) は、LQT3 で QT および TDR を著明に短縮し最も有効であったが、TDR は LQT1、LQT2、LQT3 のモデルで同等に縮小させ TdP を抑制し、LQT1 と LQT2 でも補助的有効性が示唆された。nicorandil (I_{KATP} 開口) は、LQT1 と LQT2 で TDR を縮小させ TdP を抑制したが、有効血中濃度との関係で、LQT1 と LQT2 においてのみ静注薬の有効性が示唆された。

2) 先天性 LQTS の遺伝子型別の Epinephrine 負荷に対する反応性の違いと臨床的有用性

LQT1 患者では、Epinephrine 負荷開始直後に QTc 時間が著明に延長し、持続点滴中の定常状態でも QTc 時間延長が持続するのに対して、LQT2 患者では、Epinephrine 開始直後には一過性に著明な QTc 延長を認めるが、定常状態では QTc はコントロールレベル近くまで短縮した。これに対して LQT3 患者では、Epinephrine 開始直後の QTc 延長は軽度で、定常状態での QTc はコントロールレベル以下に短縮した。Epinephrine 点滴中の定常状態の QTc を用いると、Keating の診断基準を用いた場合、LQT1 型の診断率は 68% から 87% へ、LQT2 型の診断率は 83% から 91% へと向上した。特異度はいずれも 100% であり、正常者で疑陽性になることはなかった。LQT3 型では診断率は 83% のままであった。

IV. 考察

動脈灌流心室筋切片を用いた先天性 LQTS モデルにより、先天性 LQTS (LQT1、LQT2、LQT3) の QT 延長および TdP には、M 細胞を含めた貫壁性再分極過程の不均一性が関与した。また、各遺伝子型により、交感神経刺激や各種抗不整脈薬に対する反応性の違いが明らかとなり、遺伝子型特異的な患者管理、治療の可能性が示唆された。

先天性 LQTS では、LQT1、LQT2、LQT3 型で 90% 以上を占め、実験的検討や初期の臨床的

研究により遺伝子型特異的な患者管理、治療の可能性が示唆されている。今回の検討から、LQTS患者におけるEpinephrine負荷試験は、遺伝子診断前に遺伝子型を推定する上で有用であると考えられた。また、遺伝子診断されない40-50%のLQTS患者では、Epinephrine負荷に対する反応から遺伝子型を推定し、これに基づいて治療方針を立てる可能性が示唆された。

V. 研究成果の発表

1. Antzelevitch C, Shimizu W: Cellular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol* 17: 43-51, 2002
2. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR: Brugada syndrome. A decade of progress. *Circ Res* 91: 1114-1118, 2002
3. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Kurita T, Nagaya N, Satomi K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Echigo S, Nakamura K, Sunagawa K, Ohe T, Towbin J A, Napolitano C, Priori S G: Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 41: 633-642, 2003
4. Shimizu W: Genotype-specific clinical manifestation in long QT syndrome. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 1: 401-409, 2003
5. Takenaka K, Ai T, Shimizu W, Kobori A, Ninomiya T, Otani H, Kubota T, Takaki H, Kamakura S, Horie M: Exercise stress test amplifies genotype-phenotype correlation in the LQT1 and LQT2 forms of the long QT syndrome. *Circulation* 107: 838-844, 2003
6. Shimizu W: Editorial comment, Gender difference and drug challenge in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15: 70-71, 2004
7. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Nagaya N, Satomi K, Kurita T, Suyama K, Aihara N, Sunagawa K, Echigo S, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Nakamura K, Ohe T, Towbin J A, Priori S G, Kamakura S: Diagnostic value of epinephrine test for genotyping LQT1, LQT2 and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 1: 276-283, 2004
8. Shimizu W, Horie M, Ohno S, Takenaka K, Yamaguchi M, Shimizu M, Washizuka T, Aizawa Y, Nakamura K, Ohe T, Aiba T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Towbin J A, Priori S G, Kamakura S: Mutation site-specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in LQT1 form of congenital long QT syndrome - Multi-center study in Japan -. *J Am Coll Cardiol* 44: 117-125, 2004
9. Shimizu W: Acquired Forms of Brugada Syndrome. in Antzelevitch C (ed): *The Brugada Syndrome: From bench to bedside*, Chapter 14, Blackwell Futura, UK, 166-177, 2004
10. Kobori A, Sarai N, Shimizu W, Nakamura Y, Murakami Y, Makiyama T, Ohno S, Takenaka K, Ninomiya T, Fujiwara Y, Matsuoka S, Takano M, Noma A, Kita T, Horie M: Additional gene variants reduce effectiveness of β -blockers in the

- LQT1 form of the long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15: 190-199, 2004
11. Kandori A, Shimizu W, Yokokawa M, Noda T, Kamakura S, Miyatake K, Murakami M, Miyashita T, Ogata K, Tsukada K: Identifying patterns of spatial current dispersion that characterize and separate the Brugada syndrome and complete right-bundle branch blocks. *Med Biol Eng Comput* 42: 236-244, 2004
 12. Kandori A, Shimizu W, Yokokawa M, Kamakura S, Miyatake K, Murakami M, Miyashita T, Ogata K, Tsukada K: Reconstruction of action potential of repolarization in patients with congenital long-QT syndrome. *Phys Med Biol* 49: 2103-2115, 2004
 13. Aiba T, Shimizu W, Inagaki M, Satomi K, Taguchi A, Kurita T, Suyama K, Aihara N, Sunagawa K, Kamakura S: Excessive prolongation of QT interval and increased dispersions of repolarization after chronic oral amiodarone predict the recurrence of ventricular tachyarrhythmia. *PACE* 27: 901-909, 2004
 14. Noda T, Shimizu W, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S: Classification and mechanism of initiation of torsade de pointes in patients with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J* 25: 2149-2154, 2004
 15. Shimizu W, Antzelevitch C: Long QT syndrome. in Lang F (ed): *Molecular mechanisms of disease: an Encyclopedic reference*, Springer, UK, -, 2005 (in press)
 16. Shimizu W, Aiba T, Antzelevitch C: Specific therapy based on the genotype and cellular mechanism in inherited cardiac arrhythmias. - Long QT syndrome and Brugada syndrome -. *Curr Pharm Design* 11: 1561-1572, 2005
 17. Shimizu W: The long QT syndrome: Therapeutic implications of a genetic diagnosis. *Cardiovasc Res*, 2005 (in press)
 18. Shimizu W, Aiba T, Kamakura S: Current understanding and future challenges in Brugada syndrome. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2005 (in press)
 19. Shimizu W: Acquired Forms of the Brugada Syndrome. *J Electrocardiol*, 2005 (in press)
 20. Shimizu W: The Brugada Syndrome. - An update -. *Internal Med*, 2005 (in press)
 21. Shimizu W: Chapter 5, Basic mechanisms of Brugada syndrome as a cause of sudden cardiac death. in Abe H, Nakashima Y (eds): *Clinical and occupational medicine. A handbook for occupational physicians*, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands: 47-59, 2004
 22. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, Lemarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A: Brugada Syndrome. Report of the Second Consensus Conference. Endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 111: 659-670, 2005

23. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, Lemarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A: Brugada Syndrome. Report of the Second Consensus Conference. Endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. Heart Rhythm 2: 429-440, 2005
24. Aiba T, Shimizu W, Inagaki M, Noda T, Miyoshi S, Ding WG, Zankov DP, Toyoda F, Matsuura H, Horie M, Sunagawa K: Cellular and ionic mechanism for drug-induced long-QT syndrome and effectiveness of verapamil. J Am Coll Cardiol 45: 300-307, 2005
25. Maekawa K, Saito Y, Ozawa S, Adachi-Akahane S, Kawamoto M, Komamura K, Shimizu W, Ueno K, Kamakura S, Kamatani N, Kitakaze M, Sawad J: Genetic polymorphisms and haplotypes of the human cardiac sodium channel α subunit gene (SCN5A) in Japanese and their association with arrhythmia. Ann Hum Genet 2005 (in press)
26. Satomi K, Shimizu W, Takaki H, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S: Response of beat-by-beat QT variability to sympathetic stimulation in LQT1 form of congenital long QT syndrome. Heart Rhythm 2: 149-154, 2005
27. Noda T, Shimizu W, Taguchi A, Aiba T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S: Malignant entity of idiopathic ventricular fibrillation and polymorphic ventricular tachycardia initiated by premature extrasystoles originating from right ventricular outflow tract. J Am Coll Cardiol 2005 (in press)

飯島俊彦 秋田大学 医学部

単離心筋細胞での薬物動態 —単離心筋細胞での薬物作用

研究報告

I 研究目的

心電図上 QT 時間を延長させる薬物の多くは HERG 遺伝子由来の急速活性型遅延整流 K 電流 (IKr) を抑制するとされている。しかしながら、QT 時間すなわち心室筋細胞の活動電位持続時間の決定には IKr 以外に、緩徐活性型遅延整流 K 電流 (IKs)、カルシウム電流、ナトリウム電流、等がある。従って、薬物作用を決定するには実際の心室筋細胞を用いての解析が必須である。本研究では、1) 臨床的に心電図異常とりわけ QT 延長を示す薬物を臨床報告から検索し、単離心筋細胞での作用を検討し、2) 薬物作用をシミュレーションモデル上で再現することを試みた。さらに、3) 心筋カルシウムチャネルの β サブユニットのノックアウトマウスにおいて、活動電位とりわけプラトー相の形成機転を解析した。

II 研究計画および材料と方法

- 1) 単離心筋細胞での薬物作用の検討：モルモット、ラット、ウサギ、マウス、ブタから単離した心室筋および洞房結節細胞を用いた。パッチクランプ法により各イオン電流を記録し、薬物の作用を解析した。本研究では抗精神病薬 Risperidon、吸入麻酔薬 sevoflurane、環境物質 PFOS について検討した。また、過酸化水素によってもたらされる早期後脱分極に対する乳酸脱水酵素（LDH）の阻害作用について検討した。
- 2) シミュレーションモデルの開発と薬物作用の再現：シミュレーションには、野間らが作成した Kyoto Model を使用した。既存のモデル（モルモット心室筋用）での薬物作用を確認するのみならず、ヒト心臓を想定したモデル作成に着手した。本研究では主として洞房結節細胞の自発活動電位のシミュレーションを行った。
- 3) カルシウムチャンネルβサブユニット欠損マウスでの解析：電位依存性カルシウムチャンネルのβ2サブユニット欠損マウスを作成し、機能解析を行った。本プロジェクトは現在継続中である。

III 研究成果

1) 単離心筋細胞での薬物作用の検討

抗精神病薬である Risperidone は、モルモット心室筋細胞の IKr を抑制することを明らかにした。一方、吸入麻酔薬である Sevoflurane は IKs を選択的に抑制した。Perfluorooctane sulfonate (PFOS) は潤滑油、化粧品、ペンキなど多くの製品に含まれる化学物質で生物への影響が懸念されている。モルモット心筋細胞において L 型カルシウム電流の活性化・不活性化のキネティクスを過分極側へシフトさせる一方、電流密度を増大させることを明らかにした。ラット心室筋細胞に過酸化水素を投与すると、早期脱分極を伴う活動電位プラトー相の延長が観察される。乳酸脱水酵素の前投与により早期脱分極（EAD）の発現頻度が優位に減少した。

2) シミュレーションモデルの開発と薬物作用の再現

IKr 阻害薬としての Risperidone の作用、IKs 阻害薬としての sevoflurane の作用は Kyoto Model により、それぞれの電流密度を減少させることにより容易にシミュレーションできた。

さらに、我々はヒト心臓の興奮モデル開発に着手すべく、ブタ洞房結節細胞の電気生理学的解析を行った。ブタはヒトと心拍数が同等であり、ヒト洞房結節モデルへの代替標本と考えたからである。単離洞房結節細胞は、正常 Tyrode 液中で 80-120 回の規則正しい拍動を示した。L 型 Ca²⁺電流は、-40mV より脱分極側で活性化し、心室筋細胞に比較して緩やかな不活性化を示し、300ms の脱分極パルスによっても完全に不活性化されない成分を多く含んでいた。Westernblot 法により L 型 Ca チャンネルのαサブユニットを同定したところ、心室筋細胞においてはα1C、洞房結節細胞においてはα1D の発現が強く認められた。ジヒドロピリジンに対する結合親和性には心室筋・洞房結節間で有意な差は認められなかった。ブタ洞房結節細胞で記録された L 型 Ca 電流および遅延整流 K 電流の電気生理学的パラメータを、心筋活動電位シミュレーションプログラム（Kyoto Model）に組込むことにより、1分当たり 60-70 回の発火頻度を有する自発活動電位をシミュレーションすることができた。

3) β サブユニット欠損マウスでの解析

電位依存性カルシウムチャネルは、 α 、 β 、 γ 、 $\alpha 2\delta$ のサブユニットからなる。我々は心筋に多く発現する $\beta 2$ サブユニットを作成し、その機能解析をおこなった。 $\beta 2$ 欠損マウスにおいてはカルシウム電流の不活性化が遅延し、その結果活動電位のプラトー相が延長していた。

IV 考察

- 1) 薬物による QT 延長：現在、臨床的に心電図異常とりわけ QT 延長を起こすとされている薬物の多くは IKr を抑制する。しかしながら、sevoflurane に代表される吸入麻酔薬は IKs の抑制作用が強いことが明らかとなった。臨床的にも、吸入麻酔薬により QT 延長を来したという報告もあり、今後さらなる検討が必要と思われる。とりわけ、IKr を抑制する他薬物との併用には注意を払う必要がある。
- 2) シミュレーションモデルの開発：活動電位に対する薬物の効果を評価する際、現状の心筋興奮モデルでも実験値を再現する結果が得られている。このことは、既存のモデルの精度を支持するが、ヒト心筋モデル、さらには薬物作用のキネティクスを含んだ精密なシミュレーションには至っていない。本研究では、ブタ洞房結節細胞と心室筋細胞での L 型 Ca^{2+} 電流のキネティクスの違いは異なる α サブユニットが関与していることを明らかにし、自発活動モデルを作成した。異なる動物種では異なるイオンチャネルが発現・機能していることは周知の事実であり、ヒト心臓を目指したモデル作成が急務と考えられる。
- 3) β サブユニット欠損マウスでの解析： β サブユニットは、カルシウムチャネルの発現量、キネティクスに重要な役割を果たしており、今回見いだされた「 $\beta 2$ サブユニット欠損マウスにおけるカルシウム電流の不活性化遅延」は従来の報告と合致する。また、これがひいては活動電位プラトー相の延長を引き起こすことは容易に想像できる。今後、不整脈発現への影響、早期後脱分極の発生機転についての実験を重ねて行く必要がある。

V 研究成果の発表

1. Ono K, Shibata S and Iijima T. Pacemaker mechanism of porcine sino-atrial node cells. J Smooth Muscle Res 39, 195-204, 2003
2. Shibata S, Ono K and Iijima T. Inhibition by sevoflurane of the slowly activating delayed rectifier K^+ current in guinea-pig ventricular cells. J Pharmacol Sci. 95, 363-373, 2004
3. Ono K, Shibata S and Iijima T Pacemaker mechanism of porcine sino-atrial node cells. J. Smooth Muscle Res., 39, 195-204, 2003.
4. Murakami M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Iijima T. Structures of the Murine Genes for the beta1-and beta4-Subunits of the Voltage-Dependent Calcium Channel. J Mol Neurosci. 21, 13-22, 2003.
5. Murakami M, Yamamura H, Suzuki T, Kang MG, Ohya S, Murakami A, Miyoshi I, Sasano H, Muraki K, Hano T, Kasai N, Nakayama S, Campbell KP, Flockerzi V, Imaizumi Y, Yanagisawa T, Iijima T. Modified cardiovascular L-type channels

- in mice lacking the voltage-dependent Ca^{2+} channel beta3 subunit. *J Biol Chem.* 278, 43261-43267, 2003.
6. Murakami M, Xu F, Miyoshi I, Sato E, Ono K, Iijima T. Identification and characterization of the murine TRPM4 channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 307, 522-528, 2003.
 7. Xu F, Satoh E and Iijima T. Protein kinase C-mediated Ca^{2+} entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. *Br J Pharmacol.* 140, 413-421, 2003.
 8. Murakami M, Mori T, Nakagawasai O, Hagiwara K, Sakurada Y, Mobarakeh II, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Tan-No K, Yanai K, Tadano T and Iijima T. Inhibitory effect of pranidipine on N-type voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Neuroscience letters,* 367, 118-122, 2004.
 9. Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Yanai K, Tan-No K, Sasano H, Tadano T and Iijima T. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel α_1 subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res.,* 1024, 122-129, 2004.
 10. Harada K, Xu F, Ono K, Iijima T and Koizumi A. Effect of PFOS and PFOA on L-type Ca^{2+} current in guinea pig ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 487-494, 2005.
 11. Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Yamada T, Kuriyama S, Karibe H, Okada Y, Takahata O, Taniguchi T, Iijima T, Iwasaki H, Narumiya S and Ushikubi F. Thromboxane A2 and prostaglandin F₂□ mediate inflammatory tachycardia. *Nature Medicine* 11, 562-566, 2005.
 12. Murakami M, Ohba T, Xu F, Shida S, Satoh E, Ono K, Miyoshi I, Watanabe H, Ito H, Iijima T. Genomic Organization and Functional Analysis of Murine PKD2L1. *J Biol Chem.* 280: 5626-5635, 2005.
 13. Ono K and Iijima T. Ionic and molecular basis of cardiac automaticity in mammalian heart. In *Molecular mechanism of heart diseases* (in press) 2005.

佐藤俊輔 大阪大学工学部
楠岡 英雄 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 副院長
モデルによる解析

研究報告

I 研究目的

心筋細胞のカリウムチャネルの動態と、薬剤がチャネルに及ぼす効果を定性的に評価することを目的とし、チャネルの状態遷移モデルの構築と、シミュレーションを行った。

II 研究計画および材料と方法

チャンネルの状態遷移モデルとしてはコンパートメント・システムを採用した。コンパートメント・システムは、いくつかの区画（コンパートメント）が移行係数により結合されている複合システムで、医学・生物学において、物質の動態に着目して生体機能を解析するためのモデルとして広く使用されている。古典的には、コンパートメントは物質が存在する仮想的空間であり、コンパートメント間の物質の移行量は移行係数と上流側の物質質量に比例するものと見なされる。本研究では、コンパートメントはチャンネルの状態を現すと考え、状態間の遷移は移行係数と状態にあるチャンネル数で定まるとモデル化した。さらに、チャンネルの遷移は CCOI（C はチャンネルの閉状態、O は開状態、I は不活化状態）の 4 状態で起こり、かつ、薬剤の影響は別途並行して存在する CCOI 状態とモデル化した。コンパートメント・モデルは線形微分方程式として現されるため、シミュレーションは、Mathcad 2001 (MathSoft Inc., U. S. A.) を用いて行った。

III 研究成果

シミュレーションの例では、C1 (X_5)、C2 (X_6)、O (X_7)、I (X_8) の各状態にあるチャンネル数の変化を示していた。励起と共に C1 状態のチャンネル数が時間と共に一過性の増加を示し、C2 状態、O 状態、I 状態にあるチャンネルの数は遅れて増加していくこと、その数はほぼ同数であり、平衡状態にあることが示されている。本シミュレーションでは、状態間遷移に逆行を認めて移行係数を設定したため、このような結果になったと考えられる。

IV 考察

これまで、チャンネルの状態遷移のモデルとしてはマルコフモデルが標準的に使用されてきた。マルコフモデルでは、1 個のチャンネルに着目し、初期状態から出発して時刻 t 後における各状態のとり確率を解析し、電流が開状態でのみ流れるとして電流の確率分布を求めるものである。本モデルでは、チャンネルの集団がマルコフモデルにしたがって状態遷移を行う時の、初期状態から出発して時刻 t 後における各状態にあるチャンネル数を表現しえた。これまでもマルコフ過程に従う事象をコンパートメント・システムにより解析した例はあるが、イオンチャンネルについての検討はない。本モデルを更に精緻化するには、実データから移行係数を決定する必要がある。今後、パラメータ推定についての検討が必要である。

V 研究成果の発表

1. 佐藤俊輔：心筋細胞のイオンチャンネルのノイズ解析 マルコフモデルによる考察，生理生体工学シンポジウム論文集，4 pages，2003
2. S., Sato, H., Fukai, T., Nomura: Bifurcation Analysis of the Hodgkin-Huxley Equations, chap 16, in Modeling in the Neurosciences, From Proteomics to Robotics (2nd Edition) Edited by K. A. Lindsay, R. R. Poznanski, J. R. Rosenberg, Taylor & Francis, London, 2004
3. T. Nakamura, H. Horio, S. Miyashita, Y. Chiba, S. Sato: Identification of

- autonomic nerve activity from heart rate variability. The 5th International Workshop on Neural Coding 2003, p. 43, Aulla, Italy, Sept. 20-25, 2003
4. T. Nomura, S. Sato: A model of spinal network with a huge degree of freedom. The 5th International Workshop on Neural Coding 2003, p. 111, Aulla, Italy, Sept. 20-25, 2003
 5. Y. Asai, T. Nomura, S. Sato, A. Tamaki, Y. Matsuo, I. Mizukura, K. Abe: A coupled oscillator model of disordered interlimb coordination in patients with Parkinson's disease. *Biological Cybernetics*, 88, 152-162 (2003)