

第3回 基礎・臨床融合の学内共同研究発表会

イオンチャネル研究の最前線-From Gene to Computer Simulation-

- ◆ 日 時 平成 23 年 2 月 2 日 (水) 16 時～18 時
- ◆ 場 所 大会議室 (管理棟 3 階)
- ◆ 研究責任者 堀江 稔 (内科学講座・循環器内科)
松浦 博 (生理学講座・細胞機能生理学)
- ◆ 司 会 堀江 稔 (内科学講座・循環器内科)

講演者

1. Wu Jie (内科学講座・循環器内科・特任助教)
2. 松浦 博 (生理学講座・細胞機能生理学部門・教授)
3. 芦原 貴司 (内科学講座・循環器内科・助教)
4. 野間 昭典 (立命館大学・生命科学部・教授)

はじめに

松浦 博 (生理学講座・細胞機能生理学部門)

基礎医学講座と臨床医学講座が融合した学内共同研究プロジェクト (服部隆則 研究活動推進室会議室長) 推進のための第 3 回学内講演会を開催したので報告する。

平成 23 年 2 月 2 日 (木) 16 時より大会議室 (管理棟 3 階) で、内学講座教授・堀江 稔先生の司会のもとで、『イオンチャネル研究の最前線-From Gene to Computer Simulation-』というテーマで、

Wu Jie 先生 (内科学講座・循環器内科・特任助教)、松浦 博 (生理学講座・細胞機能生理学・教授)、芦原 貴司先生 (内科学講座・循環器内科・助教)、野間 昭典先生 (立命館大学・生命科学部・教授) に講演いただいた。講演の内容は、各論文を参照されたい。

馬場忠雄学長はじめ基礎・臨床あわせて 39 名の出席があり、岡村富夫先生 (薬理学講座教授)、小笠原一誠先生 (病理学講座教授) などから活発な質疑がなされ、今後の新たな研究の展開や方向性についての手掛かりが得られた。

A weak dominant negative mutation of KCNQ1-G269S affects protein kinase A-mediated up-regulation of I_{Ks} channels and causes adrenergic triggered long QT syndrome

Wu Jie^{1,2}, Wei-Guang Ding², Nobu Naiki¹, Hiroshi Matsuura², Minoru Horie¹

Departments of Cardiovascular Medicine¹ and Physiology², Shiga University of Medical Science

Congenital Long QT syndrome (LQTS) is characterized by QT interval prolongation in the electrocardiogram (ECG) and syncope due to torsade de pointes and ventricular fibrillation. The syndrome is caused by at least 13 types of gene mutations, among which the KCNQ1 gene mutations are responsible for the LQT1 (often triggered by adrenergic stimulations such as physical or emotional stress) that can cause the loss-of-function of I_{Ks} channel encoded by KCNQ1 and thereby the prolongation of the QT interval. We identified a *KCNQ1*-G269S mutation in 11 patients from 4 families. Clinical data showed that most of patients were asymptomatic. However, when receiving exercise stress, QTc intervals of some patient's prolonged obviously. The aim of present study is to explore the possible mechanisms underlying the adrenergic-triggered LQTS associated with G269S mutation. Thus, the G269S mutation was made by using PCR based mutagenesis and transfected into CHO or HEK293 cells together with KCNE1 by using lipofectamine method. The whole cell I_{Ks} mutant currents were checked up using the patch-clamp technique. The results showed that the G269S mutation decreased I_{Ks} currents in a mutant concentration-

dependent manner, shifted the $I-V$ relationship of I_{Ks} currents to more depolarizing direction, and accelerated the deactivation time of the currents. In addition, we found that G269S was a trafficking-refractory mutation and that the I_{Ks} reconstituted by the G269S mutant or the co-expression of wild type (WT) + G269S mutant lost their response to β -adrenergic stimulation. The study results suggest that G269S mutation: (1) exerted weak dominant-negative suppression effects on KCNQ1 channel; (2) trapped KCNQ1 WT subunits to form tetramers and thereby altered their gating kinetics; (3) might be associated with exercise-dependent unmasking of QTc prolongation.

References

1. Roden DM. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2008;358:169-176.
2. Fowler SJ, Cerrone M, Napolitano C, Priori SG. Genetic testing for inherited cardiac arrhythmias. *Hellenic J Cardiol.* 2010; 51: 92-103
3. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks)

- potassium channel. *Nature*. 1996; 384: 80-83.
4. Moss AJ, Shimizu W, Wilde AA, Towbin JA, Zareba W, Robinson JL, Qi M, Vincent GM, Ackerman MJ, Kaufman ES, Hofman N, Seth R, Kamakura S, Miyamoto Y, Goldenberg I, Andrews ML, McNitt S. Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. *Circulation*. 2007; 115: 2481-2489.
 5. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*. 2002; 295: 496-499.
 6. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001; 103: 89-95.

アンギオテンシン受容体による心筋カリウムチャネルの

調節機構

松浦 博¹, Dimitar P Zankov^{1,2}, 堀江 稔²

滋賀医科大学 生理学講座 細胞機能生理学部門¹, 呼吸循環器内科²

心房筋の高頻度 (400–600 回/分) で不規則な収縮を特徴とする心房細動は, 明らかな原因を欠く場合に加えて (孤立性心房細動), 心不全や高血圧性心疾患さらには甲状腺機能亢進症などにもしばしば合併し, 最も頻度の高い心臓不整脈の一つである. 加えて, 心房細動をいったん発症すると心房筋自体に心房細動の持続もしくは再発が起こりやすくなるような機能的, 組織学的変化が惹起されるため (電氣的, 構造的リモデリング) [1], 心房細動は発作型から持続型へ移行しやすく治療に難渋することが多い.

心房細動の発生には心房筋の電気生理学的性質の変化が密接に関わっており, 特にその活動電位持続時間 (action potential duration, APD) およびそれに依存する有効不応期 (atrial effective refractory period, AERP) の短縮は心房内に多発性のリエントリー回路の形成を可能にして心房細動の発生に第一義的に寄与すると考えられている [2]. ヒト心房筋細胞の活動電位に寄与するイオンチャネルとして, 内向き電流を発生するナトリウムチャネル (I_{Na}) および L 型カルシウムチャネル (I_{CaL}), 外向き電流を発生する一過性外向きカリウムチャネル (I_{to}), 超急速活性

型, 急速活性型および緩徐活性型遅延整流性カリウムチャネル (それぞれ I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}) 等があげられる.

近年の家族性心房細動家系の遺伝子検索により, I_{Ks} チャネルの pore-forming α -subunit (KvLQT1) の発現をコードする *KCNQ1* 遺伝子の機能獲得型 (gain of function) のミスセンス変異 (S140G) が見つかり [3], I_{Ks} チャネルの機能亢進 (upregulation) が心房筋有効不応期 (AERP) の短縮を介して心房細動の発症に結びつく可能性が考えられている [図 1].

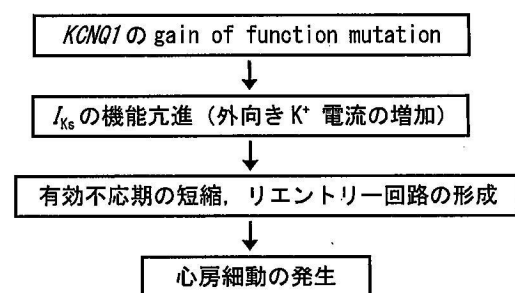


図 1 心筋 I_{Ks} チャネルの変異による心房細動の発生

一方, 我々は最近, モルモット単離心房筋細胞にパッチクランプ法を適用した電気生理学的検討において, 1) アンギオテンシン II (Ang II) およびそのアナログである

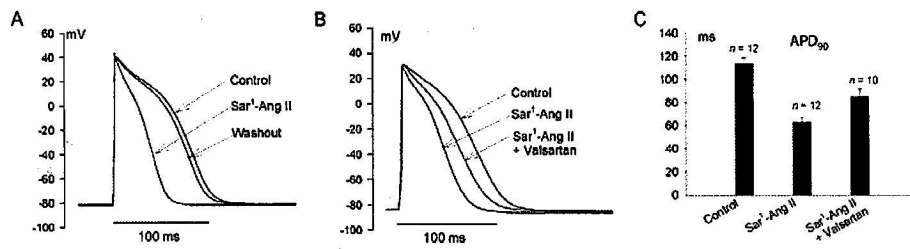


図2 AT₁受容体による心筋活動電位の調節

Sar¹-Ang IIが1型 Ang II (AT₁) 受容体-Gqタンパク質-ホスホリパーゼ C (PLC) -プロテインキナーゼ C (PKC) 系を活性化して I_{Ks} を著明に増大すること, またそれに伴い 2) Ang II (および Sar¹-Ang II) は活動電位持続時間 (90%再分極時間として計測した APD₉₀) を短縮し (図 2A, C), AT₁受容体阻害剤 (valsartan) はそれを部分的であるが正常化すること (図 2B, C), を明らかにした [4].

これらの実験結果は, AT₁受容体阻害剤が心房細動の治療 (電氣的除細動後の再発予防) において有効であると報告されているが[5], その作用機構として, AT₁受容体阻害剤が Ang IIによる I_{Ks}の upregulationを介した APD (および AERP) 短縮作用に拮抗することにより抗心房細動作用を発揮する可能性を示唆したものである [図3].

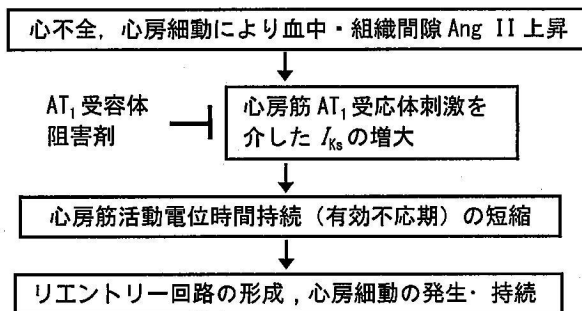


図3 AT₁受容体阻害剤による心房細動の抑制

また, 心房細動や心不全等の心房や心室壁の拡張を伴う病態においては, 心筋細胞膜に機械的ストレスが加わることが知られている. この機械的ストレスに伴う細胞膜の伸展 (stretch) は種々のイオンチャネル活性に影響を与え, 前述の I_{Ks}チャネルも細胞膜の伸展に伴い upregulation されることが知られている [6]. 一方, 近年, 細胞膜の伸展が Ang II 非存在下でも AT₁受容体を活性化するという興味深い報告もなされている [7, 8].

そこで, 我々は心房筋細胞において, 細胞膜の伸展に伴う I_{Ks} チャネル電流の増大に AT₁ 受容体の活性化が関わっているか否か, について検討を行った. モルモット心房筋細胞にパッチクランプ法を施行し, 正常浸透圧溶液 (~290 mOsm) から低浸透圧溶液 (~200 mOsm) で灌流することにより, 細胞の膨張 (hyposmotic cell swelling) ならびにそれに伴う細胞膜の伸展を誘発した. モルモット心房筋細胞を低浸透圧溶液 (~200 mOsm) で灌流することにより, I_{Ks}チャネル電流の大きさは 84% (n = 12) 増大したが, AT₁受容体阻害剤 (candesartan, 1 μM) 存在下ではその増大率が 47% (n = 9) となり有意に (P < 0.05) 減少した. さらに, 心房筋細胞を低浸透圧溶液で灌流すると APD が 114 ms から 95 ms に約 17%

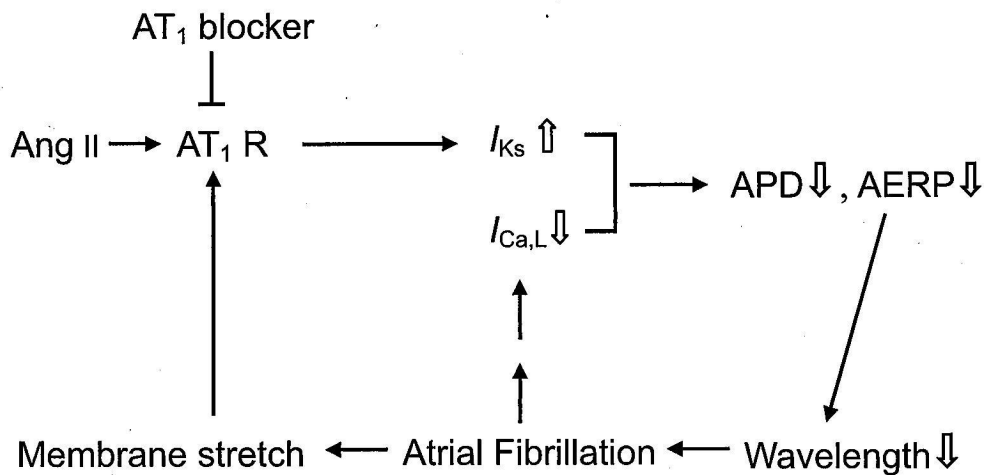


図4 心房細動と電氣的リモデリング

短縮したが, candesartan存在下では, その短縮の程度が約9%に減弱した. これらの実験結果は, 細胞膜の伸展に伴う I_{Ks} チャンネル電流の増大とAPDの短縮に, 部分的にはあるがAT₁受容体の関与を示唆するものである.

心房細動に伴う電氣的リモデリングは心房筋有効不応期(AERP)の短縮を特徴とし, 発症後早期(数分から数時間後以内)から出現する. その主なメカニズムとして $I_{Ca,L}$ チャンネルのdownregulationがあげられている. 本実験で示された心房筋細胞膜の伸展によるAT₁受容体を介した I_{Ks} の増大ならびにAPDの短縮もまた, 心房筋電氣的リモデリング(AERPの短縮)の1つのメカニズムとしてはたらいっていると考えられる(図4).

[文献]

1. Allessie M, Ausma J, Schotten U. (2002). Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:230-246.
2. Nattel S. (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415:219-226.
3. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. (2003). KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 299:251-254.
4. Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Toyoda F, Ding WG, Matsuura H, Horie M. (2006). Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K⁺ current via the AT1 receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation* 113:1278-1286.
5. Madrid AH, Bueno MG, Rebollo JM, Marin I,

- Pena G, Bernal E, Rodriguez A, Cano L, Cano JM, Cabeza P, Moro C. (2002) . Use of irbesartan to maintain sinus rhythm in patients with long-lasting persistent atrial fibrillation: a prospective and randomized study. *Circulation* 106:331-336.
6. Sasaki N, Mitsuiye T, Wang Z, Noma A. (1994) . Increase of the delayed rectifier K⁺ and Na⁺-K⁺ pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ Res*;75:887-895.
 7. Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. (2004) . Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol.* 6:499-506.
 8. Yasuda N, Miura S, Akazawa H, Tanaka T, Qin Y, Kiya Y, Imaizumi S, Fujino M, Ito K, Zou Y, Fukuhara S, Kunimoto S, Fukuzaki K, Sato T, Ge J, Mochizuki N, Nakaya H, Saku K, Komuro I. (2008) . Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep.* 9:179-186.

コンピュータシミュレーションの不整脈研究への応用

芦原 貴司

滋賀医科大学 循環器内科・不整脈センター

Application of Computer Simulations to the Studies of Cardiac Arrhythmias

Takashi ASHIHARA

Department of Cardiovascular Medicine, Heart Rhythm Center, Shiga University of Medical Science

1. はじめに

近年、心電学ならびに分子生物学の発展により、不整脈の電気生理的な解明が進み、分子・細胞レベルで膨大な研究成果が蓄積されたが、臨床に広く活用されてきたとは言えない。このような現状において、遺伝子から臓器まですべてのレベルをシステムとして見わたすことのできるコンピュータシミュレーション (in silico) が有用と考えられるようになってきた。

不整脈を治療するには、不整脈を知る必要がある。そのために、患者や動物で不整脈を調べるのが臨床医や実験医学者であるのに対し、理論でつくり出した仮想的な不整脈を調べるのが理論医学者と言える。

2. 不整脈シミュレーションの基礎

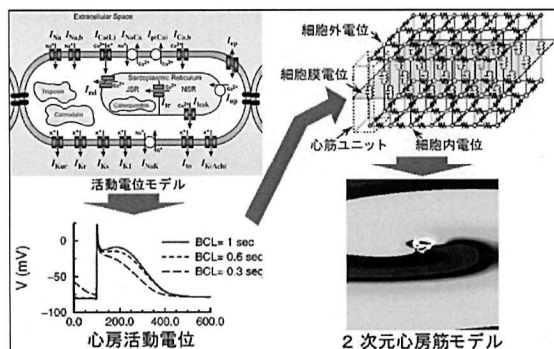


図1. 心筋組織モデルの構築

シミュレーションを行うには、まず、心筋細胞をモデル化する (図1)。コンピュータ上に構成された心筋細胞の細胞膜には、Na, Ca, K のイオンチャネルが多数存在し、各チャネルの開閉が複雑な微分方程式で記述されている。細胞内には筋小胞体を介する細胞内Ca動態も再現されている。次に、細胞の内側はギャップ結合で、外側は細胞外液を介して、周囲の心筋細胞と電氣的に結合させることで、大規模な心筋組織モデ

ルを組み上げる (図1)。このような仮想心筋で不整脈を誘発し、興奮伝播解析や疑似心電図などから、そのメカニズムを解明することができる。

3. 不整脈シミュレーションの応用例

現在の不整脈治療は、臨床や動物実験における経験に依るところが大きい。シミュレーション研究は、不整脈の発生・治療メカニズムを解明する上で、理論的側面を補い、新たなヒントを与えてくれる。ここでは、我々の研究成果を中心に、コンピュータシミュレーションの不整脈研究への応用例について紹介する。

3-1. 遺伝性不整脈の遺伝子型から表現型へ

家族性心房細動の一因として、SCN5A 遺伝子の missense 変異 M1875T による Na チャネル電流 (I_{Na}) の gain-of-function が報告された[1]。しかし、この遺伝子異常 (遺伝子型) がどのように心房細動 (表現型) を発症するのかわを示した直接的証拠はない。そこで、M1875T により I_{Na} の steady-state inactivation の $V_{1/2}$ が脱分極側に 16.4 mV シフトするという実験的事実をコンピュータモデルに導入したところ、M1875T モデルでは野生型に比べ、興奮伝播速度の 11.3% 上昇と有効不応期の 18.8% 短縮があり、組織興奮性の亢進を認めた。2次元心房筋シートで、心房細動の基本メカニズムであるスパイラルリエントリーを誘発すると、M1875T モデルでは野生型よりもスパイラルリエントリーが持続しやすかった。本シミュレーション結果は、家族性心房細動の遺伝子型と表現型を繋ぐものであり、proband 患者で心房筋の興奮性が亢進し、心房細動が持続しやすかった事実と矛盾しない。

3-2. 抗不整脈薬の薬効評価

抗不整脈薬がどのイオンチャネルをどのくらい遮断するのかわを示す詳細なデータがあれば、それをモデルに組み込むことで、コンピュータ上で薬効評価を行える。実際、シングルチャネル遮断薬[2]のみならず、

医学生理学におけるシミュレーション研究の展望と戦略；基礎

臨床の連携

野間昭典

立命館大学・生命科学部・生命情報学科

細胞機能の動作原理を明らかにする研究領域には Mathematical Physiology や Computational Cell Biology があり、いろいろな細胞の機能を数式によって明快に説明することに成功している。しかしながら、これら数学的な解法は分子実態をとりあえずほとんど無視し、きわめて簡略化したモデルに限って適用されていて、細胞を構成する各々の分子の役割に視点を置く医学生物学的考え方との間に深い溝があり、医学生物学における主な研究手段になり得なかった。近年、ポストゲノムの時代にあつて極めて広範囲の分子機能が明らかになったため、分子あるいは分子複合体で構成される機能単位の数学モデル開発が急速に進み、これら機能単位モデルを統合して細胞機能全体を包括的にシミュレーションできるようになってきた。しかし一方、細胞モデルはそれを構成する数百の変数が連立微分方程式の中で相互に依存関係を有する複雑系である。このため、実験室レベルで観察される細胞応答が正確に再現できるモデルが開発されても、その細胞数学モデル自身の複雑さ、すなわち計算式の多さ、変数やパラメータの多さ、複雑な変数の相互依存関係、計算アルゴリズムの複雑さなどのため、肝心な動作原理を明快に把握することが困難になりつつある。

そこで、我々は Computational Cell Biology の数学的手法と伝統的な生理学的思考法を、独

自に開発した心筋細胞や膵臓β細胞モデルに適用し、細胞機能動作原理と各機能分子の役割を明らかにしていくための努力を行っている。これまで、膵臓β細胞モデルに平衡点解析法（分岐解析法）と我々が開発したリードポテンシャル解析法を適用して、特に膵臓β細胞の電氣的活動の動作原理を解析することができた [1, 2]。これによって、連続的に変化していく細胞の電気活動を異なる活動様式間の遷移としてとらえることに成功した。さらに、様式間遷移に寄与するそれぞれの要素の寄与度を求めることができた。

以上の細胞機能について数学的に活動様式を決定し、様式変化に関係する要素の寄与度を決定する手法は幅広い応用が期待できる。

文献

- [1] Cha CY, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A. (2011). Ionic mechanisms and Ca^{2+} dynamics underlying the glucose response of pancreatic β cells: a simulation study. *J Gen Physiol* 138:21-37.
- [2] Cha CY, Santos E, Amano A, Shimayoshi T, Noma A (2011). Time-dependent changes in membrane excitability during glucose-induced bursting activity in pancreatic cells. *J. Gen Physiol* 138:39-47.