

論文内容の要旨

論文題目

心筋細胞活動電位数値計算モデルを用いた心疾患のメカニズム とその治療法に関する検討

氏名 山口 喬弘

1. 研究背景

近年わが国においては、食生活の欧米化や感染症対策の進歩に伴い、心室細動や心室頻拍等の不整脈を機序とする心臓突然死が増加している。しかし、不整脈の発生・停止メカニズムについては不明な点が多く、これを解明するための基礎的研究が必要とされている。

不整脈の発生・停止メカニズムや心臓の電気生理に関する研究は、イオンチャネルレベル、心筋細胞レベル、心筋組織・心臓レベル、生体レベルなど様々なスケールで行われている。不整脈に関する理解を深めるためには、各スケールの研究によって得られる知見を統合して研究を進める必要がある。しかし、心臓は複数の要素が複雑に結合したシステムであるため、任意の要素の変化がシステム全体に与える影響を定量的に推定することは困難であり、各スケールで得られた知見を統合的に評価する研究はほとんど行われていない。

2. 目的

イオンチャネルレベルから心筋細胞レベル、2次元心筋組織レベルまでの電気生理現象を再現可能なシミュレーション環境を構築し、構築したシミュレーション環境を用いて、各スケールの実験的知見及び臨床的知見を結合し、新たな知見を創出することを目的とする。

3. シミュレーション環境の構築

本研究では、心筋細胞活動電位数値計算モデルとして、Luo-Rudy dynamic model を使用した。また、2次元心筋組織興奮伝播モデルとしては、Luo-Rudy dynamic model を1セルとして、隣接する4つのセルと細胞内及び細胞外を連結抵抗によって接続し、細胞外連結抵抗を0、すなわち

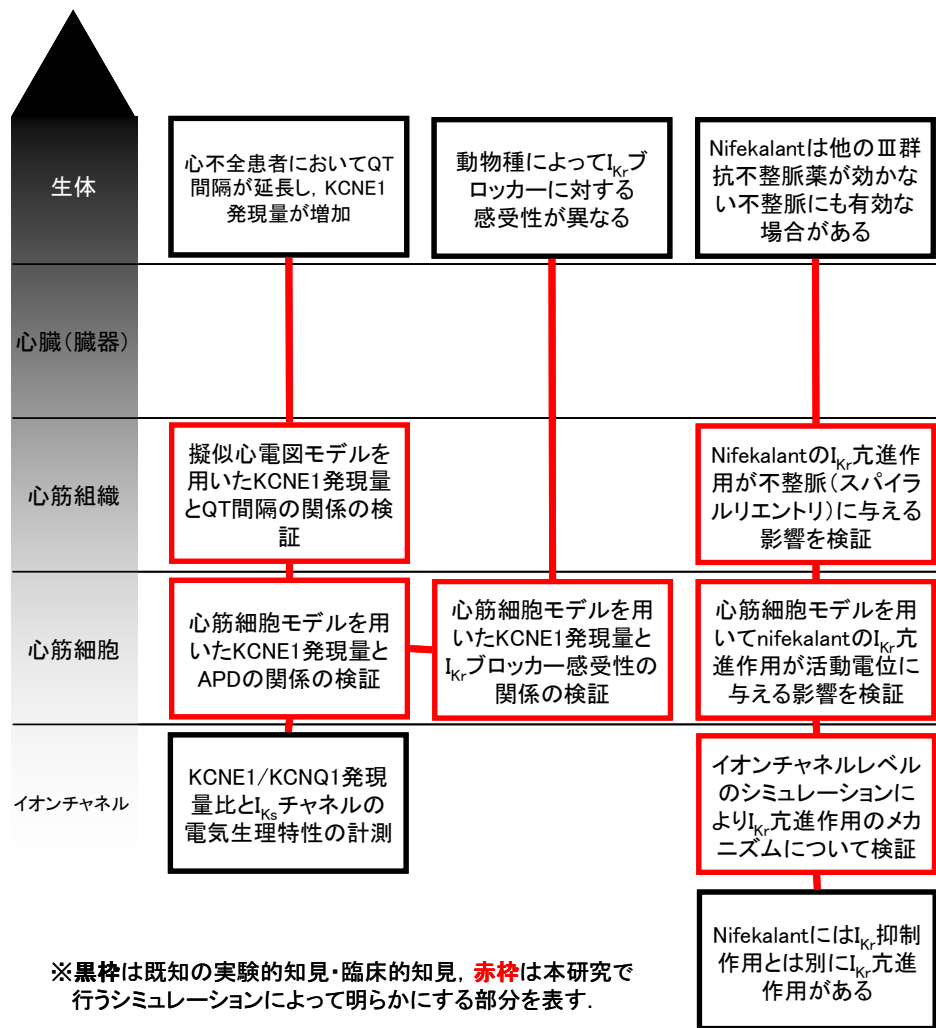


図 本研究によって得られる実験的知見及び臨床的知見の結合

細胞外電位を等電位とした2次元心筋組織モノドメインモデルを構築した。さらに構築した2次元心筋組織興奮伝播モデルに、心室壁における貫壁性の電気生理特性の不均一性を導入した貫壁性2次元心筋組織興奮伝播モデルを構築し、擬似的な心電図波形を導出できる環境を構築した。

4. KCNE1/KCNQ1 発現量比と心電図 QT 間隔の関連性に関する検証

心不全患者においては、心電図 QT 間隔が延長し、KCNE1 遺伝子の mRNA 量が増加することが報告されている。しかし、細胞電気生理学的な実験に基づく知見として、KCNE1 発現量が増加すると I_{Ks} 電流量が増加することが報告されており、KCNE1 発現量の増加は心電図 QT 間隔を短縮する方向に作用すると推測されるため、KCNE1 発現量の増加と心電図 QT 間隔の延長を関連付けて説明することは困難である。本研究では、KCNE1/KCNQ1 発現量比を制御した遺伝子発現実験を行い、その結果より KCNE1/KCNQ1 発現量比の異なる I_{Ks} チャンネルのモデル化を行い、構築した I_{Ks} チャンネルのモデルを心筋細胞活動電位数値計算モデル及び擬似心電図モデルに導入してシミュレーションを行い、KCNE1 発現量の増加と心電図 QT 間隔の関連性について検証した。

遺伝子発現実験においては、アフリカツメガエル卵母細胞に KCNQ1 遺伝子 mRNA 5ng に対して KCNE1 遺伝子 mRNA 0.2ng, 1ng, 5ng を注入し、 I_{Ks} チャンネルを発現させた。遺伝子注入から2~4日後に、二電極膜電位固定法によって発現した I_{Ks} チャンネルの過渡応答特性を計測した。

KCNE1/KCNQ1 発現量比の異なる I_{Ks} チャンネルのモデル化においては、遺伝子発現実験より導出された I_{Ks} チャンネルの過渡応答特性に対して、Luo-Rudy model における I_{Ks} チャンネル動特性を記

述する数式をフィッティングすることによって、KCNE1/KCNQ1 発現量比の異なる I_{Ks} チャンネルの動特性を導出した。この結果、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど、最大 I_{Ks} コンダクタンスが増加し、 I_{Ks} チャンネルの開閉速度を規定する時定数が増加し、 I_{Ks} チャンネルが活性化し始める膜電位(活性化閾値)が脱分極側にシフトすることがわかった。

シミュレーションにおいては、構築した KCNE1/KCNQ1 発現量比の異なる I_{Ks} チャンネルのモデルを心筋細胞活動電位数値計算モデル及び2次元擬似心電図モデルを導入し、シミュレーションを行った。まず、心筋細胞活動電位シミュレーションの結果、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど APD が延長した(1Hz ペーシング時)。また、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど I_{Ks} 電流の立ち上がりが顕著に抑制され、ピーク電流量も顕著に減少した。次に、2次元擬似心電図モデルを用いたシミュレーションについては、刺激頻度を 0.1~4Hz の間で変化させてシミュレーションを行った。その結果、KCNE1 発現量が増加するほど心電図 QT 間隔が延長し、その刺激頻度依存性が強まることが明らかになった。

以上の結果より、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど、 I_{Ks} チャンネルの最大コンダクタンスの増加(I_{Ks} 増加)、開閉速度を規定する時定数の増加(I_{Ks} 減少)、活性化閾値の脱分極側へのシフト(I_{Ks} 減少)が生じ、結果として I_{Ks} が減少し、APD 及び心電図 QT 間隔が延長するものと考えられる。また、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど心電図 QT 間隔の刺激頻度依存性が強まる理由としては、KCNE1/KCNQ1 発現量比の増加によって I_{Ks} チャンネルの活性化・不活性化が遅くなり、高頻度刺激時に I_{Ks} チャンネルが完全に不活性化しない現象が生じるため、 I_{Ks} 電流が増加し、APD が短縮するためと考えられる。

5. 動物種による I_{Kr} ブロッカー感受性の違いに関する検証

急速活性化遅延整流外向き K^+ 電流(I_{Kr})を選択的に阻害する薬剤(I_{Kr} ブロッカー)は、通常逆頻度依存性の APD 延長作用を示す。 I_{Kr} ブロッカーによる APD 延長の程度は動物種によって異なる。KCNE1 遺伝子の少ない動物、例えばヒト、ウサギ、ネコの APD は I_{Kr} ブロッカーによってほとんど延長されない。一方、KCNE1 遺伝子の多い動物、例えばモルモットの APD は I_{Kr} ブロッカーによって顕著に延長され、この APD 延長作用は強い刺激頻度依存性を示す。しかし、APD 延長作用の違いのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、前章で構築した KCNE1/KCNQ1 発現量比の異なる心筋細胞活動電位数値計算モデルを用い、KCNE1/KCNQ1 発現量比と I_{Kr} ブロッカーによる APD 延長作用及びその刺激頻度依存性を検証した。

シミュレーションにおいては、 I_{Kr} ブロッカーの一種である E-4031 の作用を想定し、 I_{Kr} チャンネルの最大コンダクタンスを 30%低減することによって再現した。刺激周期は 0.1~4Hz の間で変化させた。シミュレーションの結果、KCNE1/KCNQ1 発現量比が大きいほど I_{Kr} ブロッカーによる APD 延長作用が顕著となり、その逆頻度依存性も強まることが確認された。また、KCNE1/KCNQ1 発現量比が大きいほど外向き電流に占める I_{Ks} の割合が低下し、 I_{Kr} の割合が増加する傾向が見られた。さらに、KCNE1/KCNQ1 発現量比が大きいほど刺激頻度の上昇に伴う I_{Ks} の割合が増加し、 I_{Kr} の割合が相対的に低下する現象が見られた。

以上の結果より、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど I_{Kr} ブロッカーによる APD 延長作用が強まる理由としては、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど I_{Ks} が減少するため I_{Kr} の割合が相対的に上昇し、 I_{Kr} ブロッカーの作用も強まったものと考えられる。また、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど、高頻度刺激時に I_{Ks} が増加しやすくなり、相対的に I_{Kr} の割合が低下するため I_{Kr} ブロッカーの作用も弱まると考えられる。これが、KCNE1/KCNQ1 発現量比が増加するほど、 I_{Kr} ブロッカーによる APD 延長作用の逆頻度依存性が強まるメカニズムであると考えられる。

また、KCNE1/KCNQ1 発現量比の大きいモデルにおいて、低頻度刺激時に I_{Kr} ブロッカーを投与した場合、早期後脱分極(early after depolarization: EAD)の発生が見られた。 I_{Kr} ブロッカーの副作用としては、torsades de pointes (TdP)型心室頻拍が発生しやすくなることが知られており、EAD は TdP を誘発する撃発活動であることが知られている。本研究の結果より、KCNE1/KCNQ1 発現量の増大するようなりモデリングの生じている患者に対して、 I_{Kr} ブロッカーを投与すると、TdP 型心室頻拍を誘発しやすくなる可能性が示唆されたと言える。

6. Nifekalant の薬理作用メカニズムに関する検証

I_{Kr} ブロッカーの一種である Nifekalant は、致死性重症心室頻拍に対して amiodarone や sotalol 等のⅢ群抗不整脈薬が無効でも著効する症例が多く報告されており、nifekalant の薬効について I_{Kr} 抑制作用以外の機序の可能性が予想されている。Nifekalant の薬理作用については、その開発当初より -50 mV 付近の電位では I_{Kr} 抑制作用が見られず、逆に I_{Kr} を増加させる可能性が指摘されていた。本研究では、-50 mV 付近の膜電位において出現する I_{Kr} agonist effect が、 I_{Kr} 電流量、活動電位波形、不整脈(spiral reentry)に及ぼす影響を、動物実験及びコンピュータシミュレーションの組み合わせによって検証を行い、nifekalant の薬理作用メカニズムを解明することを目的とした。

まず、nifekalant 投与時の I_{Ks} チャネル動特性の変化について検証するため、 I_{Kr} チャネルと極めて類似した電気生理学的及び薬理学的特性を持ち、 I_{Kr} チャネルを構成していると考えられる HERG チャネルをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、二電極膜電位固定法を用いて nifekalant 投与時の HERG チャネルの動特性の計測を行った。この結果、nifekalant 投与時に 0mV 程度の強い脱分極パルス印加後、その後-50mV 程度の弱い脱分極パルスを与えると、nifekalant 投与時の HERG 電流量が control を上回る、HERG 電流 agonist effect が確認された。この現象は 1 回目の強い脱分極パルスと 2 回目の弱い脱分極パルス間のインターバルが長くなるほど減弱し、2 回目の脱分極パルスが-50mV 近傍でない場合には発生しないことが確認された。また、1 回目の強い脱分極パルス印加後に電流-電圧曲線を計測すると、nifekalant 投与時の HERG チャネルの活性化曲線(activation curve)は、control と比較して-27mV 過分極側にシフトする現象が確認され、より低い膜電位で活性化しやすくなっていることがわかった。これより、nifekalant 投与時の HERG チャネル activation curve のシフトが HERG 電流 agonist effect の発生要因となっていると仮定し、nifekalant 投与時の HERG チャネルの動特性を表現するモデルを構築した。本モデルを用いて実験プロトコルと同様のシミュレーションを行い、実験結果と同様の現象を再現した。これにより、nifekalant による HERG 電流 agonist effect の発生メカニズムは本モデルによって説明された。

7. 結論

イオンチャネル、心筋細胞、心筋組織の各レベルにおけるシミュレーション環境を構築し、動物実験研究や臨床的な研究によって得られた知見と結びつけることによって、新たな知見を創出することの可能な研究システムを実現した。このような実験とシミュレーションを有機的に融合させた研究を進めることにより、種々の心疾患及び抗不整脈薬がイオンチャネル及び心筋細胞、心筋組織の電気生理特性に与える影響を理解する上で極めて有用であり、不整脈治療における根拠に基づく治療(evidence based medicine: EBM)の推進に資するものと考えられる。