

P-4-1



抗不整脈薬によるヒト心筋Naチャンネル抑制作用のチャンネルポア分子構造基盤

中川博揮¹、宗像達夫²、角南明彦¹

¹国際医療福祉大・薬・分子薬理学、²国際医療福祉大・薬・医薬資源情報科学

【目的】哺乳類の電位依存性Naチャンネルはその大きさがゆえに結晶化が困難であり、詳細な構造解析は十分に行われていない。そこで、ヒトの心筋Naチャンネルのチャンネルポアの構造を明らかにする目的で、結合部位がポアに存在すると考えられている抗不整脈薬を用い、局所麻酔薬の作用に影響を及ぼすことが知られている3つのドメイン (D)、膜貫通領域S6のアミノ酸に着目し、これら変異体の抗不整脈薬の作用に及ぼす影響を検討した。

【方法】ヒトの心筋Naチャンネル α サブユニット (Nav1.5) とNav1.5から作成した変異体 (局所麻酔薬結合部位の可能性が示唆されている膜貫通領域S6の変異体:N406A (DI)、L1462A/E/F (DIII)、F1760A (DIV)) をHEK293細胞に一過性に発現させた。発現させたNaチャンネル電流の記録は全細胞パッチクランプ法により行い、抗不整脈薬 (フレカイニド、メキシレチン、リドカイン) の影響を検討した。チャンネルポアの三次元分子構造モデリングと抗不整脈薬の結合配座はDiscovery Studio (Accelrys) で行った。

【結果】F1760Aではフレカイニド、メキシレチン、リドカインによるチャンネルブロックは著しく減少した。また、フレカイニド、メキシレチンによるチャンネルブロックはL1462Eで減少し、L1462Fで増加した。一方、N406Aでフレカイニドによる使用依存性ブロックは減少し、メキシレチンによるトニックブロックは増大した。N406A、L1462E、L1462Fのフレカイニドによるブロックに及ぼす影響は選択的な活性化状態に対する親和性の変化をともなった。

【考察】F1760は3つの抗不整脈薬の結合部位で共通の最も重要なアミノ酸の一つであることが判明した。また、N406とL1462はこれら抗不整脈薬の結合に影響を及ぼすが、それらの寄与はチャンネルの状態依存性であった。一方、これら抗不整脈薬とチャンネルポアとの相互作用に関する分子モデリングから、抗不整脈薬によるチャンネルの抑制作用は抗不整脈薬の結合によるポアの閉塞と不活性化状態の促進/安定化であることが示唆された。

トランスジェニックマウスを利用した心筋遅延整流性カリウムチャネル分子複合体の探索と解析

○福田俊¹、児玉昌美¹、永森収志²、五十棲規嘉²、藤塚美紀¹、喜多紗斗美³、岩本隆宏³、金井好克²、古川哲史¹、黒川洵子¹

¹東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野 ²大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学 ³福岡大学医学部 薬理学教室

固有心筋細胞の再分極過程は、KCNQ1およびKCNE1から成る Ca^{2+} 感受性の遅延整流性カリウム (I_{Ks}) チャネルによって制御される。 I_{Ks} チャネルは分子複合体によって調節される事例が示されているが、調節機構の全容は解明されていない。そこで我々は、分子複合体を介した新規の I_{Ks} チャネル調節機構を探索するために、KCNQ1-KCNE1融合タンパク質を過剰発現させたトランスジェニック (I_{Ks} -TG) マウスを使用し、プロテーム解析および電気生理学的解析を実施した。まず、相互作用するタンパク質を探索するために、 I_{Ks} -TGマウスの心室筋を標本として、KCNQ1抗体による免疫沈降物のLC-MS/MS分析を実施した。その結果、 I_{Ks} -TGマウスと野生マウスのスコア比が2以上である163種のタンパク質を同定し、 I_{Ks} チャネル分子複合体を形成するタンパク質の候補とした。この163種のタンパク質に対し、IPAソフトウェア (Qiagen) を使用してパスウェイ解析を行ったところ、カルシウムシグナリングが最上位となった。そこで、 I_{Ks} -TGマウスの心室筋単離細胞を標本として、パッチクランプ法により I_{Ks} 電流を測定したところ、カルシウムシグナリング制御分子を薬理的に阻害する事で濃度依存的に I_{Ks} チャネルが活性化し、このカルシウムシグナリング制御分子が I_{Ks} チャネルを抑制的に調節することが示唆された。次に、この分子間相互作用について、イヌの心室筋細胞抽出液を使用し、KCNQ1細胞内部位のGST融合タンパク質を用いたGSTプルダウンアッセイで調べたところ、KCNQ1N末端およびC末端の近位部が相互作用に強く影響している事が示された。今後は、この相互作用が、 I_{Ks} チャネルの Ca^{2+} 感受性に及ぼす影響について、生化学的および電気生理学的解析により明らかにしていきたい。

心電図QT間隔に対するエストロゲン類の影響

田村文弥^{1,2}、家田真樹¹、鈴木岳之²、中谷晴昭³、原田信広⁴、古川哲史⁵、黒川洵子⁵

¹慶應義塾大学循環器内科、²慶應義塾大学薬学部薬学教育研究センター、³千葉大学医学部、⁴藤田保健衛生大学医学部、⁵東京医科歯科大学難治疾患研究所

種々の薬剤が誘発する致死性のQT延長不整脈は創薬開発上の大きな課題である。このQT延長毒性は、女性での発症が有意に多いものの具体的な策はとられていない。その理由の一つとして、メカニズムが未解明である点が指摘されている。そこで、我々のグループは、分子メカニズムの理解を目指して、性ホルモンが心電図波形に与える影響について、分子レベルの研究を行っている。これまで、エストロゲン類であるエストラジオールとエストロンサルフェートが、生理的濃度範囲内でhERGチャネルの細胞内薬物結合部位に結合することを見出した。これらのエストロゲン類の結合により、わずかにhERGチャネルの活性が抑制され、hERG阻害剤に対する感受性も上昇した。これらの作用には、エストロゲン化合物の芳香族環および側鎖の構造が関与しているということが、hERGチャネル変異体を用いた実験から示唆された。

そこで、本研究ではエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ欠損マウスを用いて、hERG阻害剤E-4031の心電図QT間隔に対する作用にエストロゲン類が及ぼす影響をin vivoモデルで調べた。アロマターゼ欠損により、E-4031によるQT延長作用が消失したことから、エストロゲン類がhERG阻害剤の感受性を増強することがin vivoで示された。次に、これまで調べられていないエチニルエストラジオールというエストロゲン化合物にも注目し、hERGチャネルに対する相互作用の有無を調べた。エチニルエストラジオールは、前立腺がんや男性ホルモン療法抵抗性の乳がんの治療だけでなく、経口避妊薬に含まれるエストロゲンとして広く利用されていることから、hERG阻害剤などQT延長薬剤との併用により不整脈リスクが高まるかどうか調べることは、予防的観点からも意義がある。以上の研究は、QT延長毒性の発症に対してエストロゲン類が影響する可能性を示唆するものである。

モルモット肺静脈心筋自発活動におけるアドレナリン受容体の役割

○望月颯¹、入江雅彦¹、恒岡弥生^{1,2}、長谷川直生¹、下林真梨子¹、田中悠介¹、
濱口正悟¹、行方衣由紀¹、田中光¹

¹東邦大・薬・薬物、²東理大・薬・薬理

肺から左心房に血液を送る血管である肺静脈の管壁には心房から続く心筋組織の層が存在しており、この肺静脈心筋で生じる電氣的興奮が心房に伝播することで心房細動が発症することが知られている。また、自律神経活動が心房細動の発症および維持に関与することも知られている。私達はモルモット摘出肺静脈組織標本を用いて、交感神経伝達物質 noradrenaline が肺静脈心筋の自発活動を誘発することを明らかにした。本研究では、この標本に収縮力測定法及びガラス微小電極法を適用し、noradrenaline 誘発肺静脈自発活動に関与するアドレナリン受容体の種類と役割を明らかにすることを目的とした。Noradrenaline は肺静脈心筋の自発活動を濃度依存的に誘発した。アドレナリン α 受容体刺激薬 methoxamine も自発活動を誘発し、その興奮頻度は低値であったが、 β 受容体刺激薬 isoproterenol の追加により頻度が著明に上昇した。Isoproterenol 単独では自発活動は誘発されなかった。noradrenaline 誘発肺静脈心筋自発活動に対し各種アドレナリン受容体選択的遮断薬を処置したところ、 α_1 受容体選択的遮断薬 prazosin および β_1 受容体選択的遮断薬 atenolol が自発活動を停止、あるいは頻度を減弱させた。 α_2 受容体選択的遮断薬 yohimbine、 β_2 受容体選択的遮断薬 ICI118551 および β_3 受容体選択的遮断薬 SR59230 は抑制効果を示さなかった。アドレナリン受容体刺激が肺静脈心筋活動電位に及ぼす影響を検討したところ、アドレナリン α_1 受容体刺激により静止膜電位の脱分極方向への移動に続いてオシレーションが見られ、続いて自発的かつ連続的な活動電位の発生が誘発された。一方、 β_1 受容体刺激によつては、静止膜電位の過分極方向への移動がみられた。1Hz の電気刺激により誘発した活動電位の持続時間は α 受容体刺激により延長し、 β 受容体刺激により短縮した。以上の結果から、noradrenaline はアドレナリン α_1 受容体および β_1 受容体の両方を介して、それぞれ異なる膜電流成分を活性化させることで肺静脈心筋自発活動を誘発することが示唆された。

胎盤栄養膜細胞の分化・融合におけるカルシウムイオンとcAMPの関係

毛野恵理子¹、吉江 幹浩¹、田村 和広¹、岡田美紗希¹、玉腰 琳奈¹、石川源²、
井坂 恵一³、桑原 直子¹、立川 英一¹

¹東京薬大・内分泌・神経薬理学、²日本医大・産婦人科学、

³東京医大・産科婦人科学

【目的】胎盤の絨毛を構成する合胞体栄養膜細胞は、細胞性栄養膜細胞が分化・融合（シンシチウム化）した細胞であり、妊娠維持に重要な絨毛性ゴナドトロピン（HCG）やプロゲステロン（P4）を産生・分泌する。この栄養膜細胞の分化・融合過程には、cAMPシグナル伝達経路の活性化が不可欠である。しかしながら、セカンドメッセンジャーであるCa²⁺と分化・融合との関係に関する知見は限られている。本研究では、ヒト栄養膜細胞におけるHCG、P4産生と細胞融合におけるCa²⁺とcAMPシグナル伝達との関連について検討した。

【方法】ヒト栄養膜細胞株（BeWo細胞）に電位依存性Ca²⁺チャネル阻害薬ニフェジピン、小胞体からのCa²⁺放出を阻害するダントロレン、細胞内にCa²⁺を流入させるアラメチシンを1時間処置した後、分化・融合刺激としてジブチリルcAMPを48時間処置した。その後、機能的分化の指標としてHCG α 、 β サブユニット、コレステロール側鎖切断酵素（P450scc）と3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素1（3 β -HSD1）のmRNA発現を定量的RT-PCR法で解析した。また、培養メディウム中のHCGとP4量をそれぞれイムノブロットティング、EIAにて評価し、細胞融合は、顕鏡下にて多核化細胞をカウントすることにより評価した。【結果・結論】BeWo細胞にニフェジピンを前処置すると、ジブチリルcAMPにより誘導されるHCG α 、 β サブユニット、P450scc、3 β -HSD1のmRNA発現と培養メディウムへのHCG、P4分泌量がさらに増加した。また、ダントロレンも同様の効果を示した。その一方、細胞内Ca²⁺流入促進薬であるアラメチシンは、ジブチリルcAMPによるHCG β と3 β -HSDの発現及びHCGとP4の分泌を抑制した。また、ニフェジピンとダントロレンは、細胞融合を促進した。以上、ヒト栄養膜細胞における細胞質内Ca²⁺レベルの増加は、cAMPシグナル経路を介したホルモン産生及び細胞融合に対して抑制的に機能することが示唆された。