

## 新しい特異的 $I_{K1}$ 阻害薬の臨床応用に向けた抗不整脈メカニズムの基礎的研究

高成広起

徳島大学病院 糖尿病対策センター  
(前所属 : 大分大学医学部 病態生理学講座)

### 【研究の背景】

心臓不整脈は様々なイオンチャネルの発現・機能の変化によって心筋組織の電気生理学的特性が変化して生じる。近年、イオンチャネルの中でも内向き整流性  $K^+$ 電流 ( $I_{K1}$ ) を形成する Kir2.1 チャネルの不整脈基質に及ぼす影響が注目されている。 $I_{K1}$  は心筋細胞の静止膜電位を安定させて興奮性を制御し、心筋活動電位の再分極にも寄与する。臨床で最も多く見られる不整脈の一つに心房細動が挙げられるが、慢性心房細動では心房組織における Kir2.1 チャネルの過剰発現が報告され、過剰な  $I_{K1}$  が不整脈基質の形成に密接に関連することが示唆された<sup>1)</sup>。Kir2.1 チャネルの機能亢進は心電図上の QT 時間短縮、ひいては心筋細胞の不応期短縮をもたらして不整脈を誘発し (QT 短縮症候群)<sup>2)</sup>、Kir2.1 チャネルの機能低下は QT 時間を延長して不整脈を誘発する (QT 延長症候群、Andersen-Tawil 症候群)<sup>3,4)</sup>。

我々は抗マラリア薬 Pentamidine を改変して作成された  $I_{K1}$  阻害薬 PA-6 を報告した<sup>5)</sup>。Pentamidine 自体も Kir2.1 チャネルに電位依存性に結合し<sup>6)</sup>、 $I_{K1}$  抑制による不整脈の副作用も報告されている<sup>7)</sup>。一方 PA-6 の  $I_{K1}$  遮断作用には電位依存性が見られず<sup>5)</sup>、PA-6 は Pentamidine とは異なる作用機序で  $I_{K1}$  を抑制していることが示唆された。

### 【目 的】

我々は細胞内のスペルミン (SPM) とマグネシウム ( $Mg^{2+}$ ) が、PA-6 が Kir2.1 チャネルに結合する際に相互に干渉するとの仮説を立て、それぞれが単独で存在する場合、あるいは共存する場合に PA-6 の  $I_{K1}$  抑制作用がどのように変化するかを検証し、PA-6 による  $I_{K1}$  阻害作用の詳細な分子機構を明確にすることを目的として以下の実験を行った。

### 【方 法】

HEK293T 細胞に野生型 Kir2.1 チャネルを強制発現させ、inside-out patch clamp 法により  $I_{K1}$  の測定を行った。Inside-out patch clamp 法では細胞質側から薬剤を直接チャネルに作用させることができ、細胞内分子 (SPM、 $Mg^{2+}$ ) の制御も可能である。PA-6 (200 nM) と SPM (0.1、5  $\mu$ M)、 $Mg^{2+}$  (10 mM) の相互作用を確認した。加えて、SPM の Kir2.1 チャネルへの結合部位に変異を施した E244A、D172N 変異型 Kir2.1 チャネルを用いて同様の検証を行った。

### 【結 果】

以前の報告通り<sup>5)</sup> PA-6 (200 nM) は  $I_{K1}$  の内向き成分と外向き成分をほぼ 100% 抑制した。SPM と  $Mg^{2+}$  も以前の報告同様<sup>6,8)</sup>、 $I_{K1}$  の外向き成分を抑制したが、内向き成分には影響しなかった。

0.1  $\mu$ M の SPM 存在下で、PA-6 は  $I_{K1}$  の内向き成分と外向き成分を共に 40% 抑制したが、PA-6 単独のように電流を完全阻害することはできなかった。逆に PA-6 で  $I_{K1}$  を完全遮断した状況で 0.1  $\mu$ M の SPM を加えると、PA-6 による  $I_{K1}$  完全抑制が解除されて 60% 電流が回復した。5  $\mu$ M の SPM 存在下で、PA-6 による  $I_{K1}$  抑制作用は 20% 程度まで減弱し、やはり PA-6 単独のように電流は完全に阻害されなかった。PA-6 による  $I_{K1}$  完全遮断状態に 5  $\mu$ M の SPM を加えると、電流の回復は 0.1  $\mu$ M の SPM を加えた時よりも大きく、SPM は濃度依存性に PA-6 の  $I_{K1}$  抑制作用を減弱させた。

Mg<sup>2+</sup> (10 mM) は PA-6 の前後いずれに加えても、PA-6 の  $I_{K1}$  完全抑制作用に影響を及ぼさなかった。

E224A 変異型 Kir2.1 チャンネルでは PA-6 あるいは SPM は  $I_{K1}$  に対する抑制作用を失い、SPM 存在下に PA-6 を投与しても電流は変化しなかった。

D172N 変異型 Kir2.1 チャンネルでは PA-6 は  $I_{K1}$  を約 75%抑制した。0.1  $\mu$ M の SPM は D172N-Kir2.1 の内向き成分に影響を及ぼさず、外向き成分の抑制作用は野生型 Kir2.1 に対する作用より約 20%減弱していた。SPM 存在下で 200 nM の PA-6 を投与すると、SPM による内向き整流性の電流抑制作用は解除されて、PA-6 単独と同等の電流抑制作用を示した。

## 【考 察】

我々は以前の研究で、PA-6 の Kir2.1 チャンネルへの結合には E224 位のマイナス電荷が関係するが、Pentamidine のチャンネルへの結合に比べて脂肪親和性が高いことを報告した<sup>5)</sup>。E224 位は、PA-6 の元となった Pentamidine や細胞内スペルミン (SPM) のチャンネルへの結合にも関与することが以前の研究で知られている<sup>6,8)</sup>。Pentamidine と SPM はプラス電荷が強く、チャンネルを介した外向き K<sup>+</sup>電流が発生する際にチャンネル孔に入り込んでチャンネル孔を閉鎖して電流を抑制する。一方、内向き電流が生じると水素結合は容易に外れて電流抑制が解除されるため、 $I_{K1}$  内向き成分はオームの法則に従う。PA-6 はチャンネル孔内で SPM と同じく E224 位に結合するが、SPM によって PA-6 の電流抑制作用が減弱した結果から、E224 への結合親和性は SPM の方が PA-6 より高いと推察された。

D172 位もマイナス電荷を持ち、SPM や Mg<sup>2+</sup>による  $I_{K1}$  外向き成分の抑制に関連する<sup>9)</sup>。E224 に結合した SPM がさらに深い部分 (D172) まで侵入して Kir2.1 チャンネルの長いチャンネル孔が縦列に連なった SPM によって閉鎖されるという long-pore theory が提唱されている。PA-6 は D172 位の遺伝子変異を加えたチャンネル電流も強く抑制していることから、PA-6 は D172 位には結合していない可能性がある。チャンネル孔の深い部分で  $I_{K1}$  外向き成分を抑制する Mg<sup>2+</sup>が、PA-6 の電流抑制作用に干渉しないことがこれを裏付ける。さらに、D172N 変異型チャンネルで PA-6 の  $I_{K1}$  抑制作用に対する SPM の干渉が見られなかったことから、SPM がチャンネル孔の深い部分 (D172) に入り込むことで、チャンネルの浅い部分で脂肪親和性に結合している PA-6 を弾き出す形で PA-6 による  $I_{K1}$  抑制を解除する可能性がある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により PA-6 による  $I_{K1}$  抑制作用の分子機序が詳細に判明した。現在、本研究の結果も踏まえ、オランダにおいて PA-6 を動物に投与する実験が進行しており、将来的には人を対象とした臨床試験も視野に入れている。PA-6 が  $I_{K1}$  に起因する不整脈の治療に応用されることになれば、従来の薬物治療に抵抗性の不整脈に対する新しい治療の選択肢が増えると期待される。

## 【参考・引用文献】

- 1) Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, et al. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Herat Rhythm* 2009;6:1802-9.
- 2) Deo M, Ruan Y, Pandit SV, et al. KCNJ2 mutation in short QT syndrome 3 results in atrial fibrillation and ventricular proarrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:4291-6.
- 3) Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, et al. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002;110:381-8.
- 4) Barajas-Martinez H, Hu D, Ontiveros G, et al. Biophysical and molecular characterization of a novel de novo KCNJ2 mutation associated with Andersen-Tawil syndrome and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mimicry. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4:51-7.
- 5) Takanari H, Nalos L, Stary-Weinzinger A, et al. Efficient and specific cardiac IK1 inhibition by a new pentamidine analogue. *Cardiovasc Res* 2013;99:203-14.

- 6) de Boer TP, Nalos L, Stary A, et al. The anti-protozoal drug pentamidine blocks KIR2.x-mediated inward rectifier current by entering the cytoplasmic pore region of the channel. *Br J Pharmacol* 2010;159:1532-41.
- 7) Sands M, Kron MA, Brown RB: Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis* 1985;7:625-33.
- 8) Ishihara K, Yan DH: Low-affinity spermine block mediating outward currents through Kir2.1 and Kir2.2 inward rectifier potassium channels. *J Physiol* 2007;583:891-908.
- 9) Fujiwara Y, Kubo Y. Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 2002;120:677-92.