

# 心筋細胞活動電位数値計算モデルを用いた動物種による $I_{Kr}$ ブロッカーに対する感受性の違いに関する検証

山口 喬弘\*・荒船 龍彦\*・佐久間一郎\*・寺澤 敏昭\*\*  
柴田仁太郎\*\*\*・本荘 晴朗†・児玉 逸雄†・神谷香一郎†

## Analysis of Differences in Sensitivity of Animals to an $I_{Kr}$ Specific Blocker Using Simulation

Takahiro YAMAGUCHI,\* Tatsuhiko ARAFUNE,\* Ichiro SAKUMA,\* Toshiaki TERAZAWA,\*\*  
Nitaro SHIBATA,\*\*\* Haruo HONJO,† Itsuo KODAMA,† Kaichiro KAMIYA†

**Abstract**  $I_{Kr}$  specific blockers commonly exhibit reverse frequency-dependent prolongation of the action potential duration (APD). APD prolongation induced by  $I_{Kr}$  specific blockers varies according to the species of animal. The APD of animals with few KCNE1 genes (e.g., humans, rabbits and cats) is only slightly prolonged by  $I_{Kr}$  specific blockers. On the other hand, the APD of animals with more KCNE1 genes (e.g., guinea pigs) is markedly prolonged by  $I_{Kr}$  specific blockers, and the APD prolongation exhibits strong reverse frequency-dependency. However, the mechanism of the difference in APD prolongation is not clearly understood. In this study, we analyzed the relation of APD prolongation induced by an  $I_{Kr}$  specific blocker and the KCNE1 expression level with simulations using cardiac membrane action potential models that differ in the KCNE1 expression level based on electrophysiological experiments. In the experiments, KCNE1 of 0.2 ng, 1 ng and 5 ng was coinjected with KCNQ1 of 5 ng in *Xenopus* Oocytes. Expressed currents were recorded 1-2 days after injection by the double-microelectrode voltage clamp method at 35°C. Maximum  $I_{Ks}$  conductance and relations between time constants, maximum activation parameter and membrane action potential were obtained from fitting functions describing  $I_{Ks}$  channel properties in the Luo-Rudy model to experimental results with the Nelder-Mead simplex method. In simulations, we stimulated three models differing in KCNE1 expression level at six frequencies. From the simulation results, it was confirmed that an increase in KCNE1 expression level strengthened APD prolongation and the reverse frequency-dependency induced by the  $I_{Kr}$  specific blocker. In time histories of  $I_{Ks}$ ,  $I_{Ks}$  increased as the result of high-frequency stimulation in the case of more KCNE1 genes. An increase in  $I_{Ks}$  induced by time constant prolongation with an increase in the KCNE1 expression level led to a relative decrease in  $I_{Kr}$  contribution ratio to outward ion currents. This is the mechanism of the difference in APD prolongation and reverse frequency-dependency induced by an  $I_{Kr}$  specific blocker according to animal species.

**Keywords:** potassium,  $I_{Kr}$  blocker, E-4031, KCNE1, Luo-Rudy model.

生体医工学シンポジウム 2005 発表 (2005 年 9 月, 大阪)

2005 年 8 月 1 日受付, 2005 年 11 月 1 日改訂

Received August 1, 2005; revised November 1, 2005.

\* 東京大学大学院新領域創成科学研究科

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

\*\* スズケン事業部

Suzuken Co., Ltd.

\*\*\* 東京都保健医療公社大久保病院

Div. of Cardiology, Dept. of Medicine, Tokyo Metropolitan Ohkubo Hospital

† 名古屋大学環境医学研究所

Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

## 1. 序 論

これまで心臓不整脈の治療を目的として、心筋細胞イオンチャンネルに対して作用する種々の抗不整脈薬が開発されてきた。しかし、これらの抗不整脈薬は、イオンチャンネルに作用するという性質上、副作用として不整脈を起りやすくする性質（催不整脈性）を有するものが多く、抗不整脈薬による不整脈の誘発を防ぐためには、抗不整脈薬の薬理作用のメカニズムを詳細に理解する必要がある。

抗不整脈薬はその作用対象によって複数に分類されている。かつては I 群抗不整脈薬 ( $Na^+$ チャンネル抑制) を中心に強力な抗不整脈薬が開発されてきたが、CAST 試験[1]

によって I 群抗不整脈の投与が必ずしも生命予後の改善にはつながらないことが示され、抗不整脈薬の主流は III 群抗不整脈薬 ( $K^+$ チャネル抑制) にシフトした。その後、SWORD 試験[2]等、III 群抗不整脈薬の限界を示す知見も報告されているが、現在でも抗不整脈薬の開発は III 群抗不整脈薬が主流となっている。III 群抗不整脈薬の作用対象である  $K^+$ チャネルは、心筋細胞膜活動電位の再分極相において活性化するチャネルであり、III 群抗不整脈薬はそれを抑制することによって活動電位を延長し、不応期を延長して心臓不整脈を治療するものである。III 群抗不整脈薬としては、複数の種類の薬剤が開発されているが、その作用機序は複雑なものが多く、その薬理作用のメカニズムは完全には明らかになっていない。

III 群抗不整脈薬の一種である E-4031 は再分極相において活性化する  $K^+$ 電流の一種である急速活性化遅延整流外向き  $K^+$ 電流 ( $I_{Kr}$ ) のみを選択的に抑制し、活動電位持続時間 (action potential duration: APD) を延長する抗不整脈薬 ( $I_{Kr}$  ブロッカー) である。 $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用には、刺激頻度が高くなるほど減弱する性質 (逆頻度依存性, reverse use-dependency) があるため[3]、頻脈時には APD 延長作用が得られず、徐脈時には APD が極端に延長し、torsades de pointes が発生しやすくなるという問題がある[4]。 $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用の逆頻度依存性のメカニズムは、 $I_{Kr}$  と同様に活動電位の再分極相に作用する  $K^+$ 電流である緩徐活性化遅延整流外向き  $K^+$ 電流 ( $I_{Ks}$ ) と  $I_{Kr}$  の活動電位に対する寄与の割合が、刺激頻度によって変化するためであると考えられている。 $I_{Kr}$  チャネルは活性化及び不活性化が早いため、高頻度刺激時にも次の脱分極が生じる前に不活性化が完了する。一方、 $I_{Ks}$  チャネルは活性化及び不活性化が遅いため、高頻度刺激時に次の脱分極が始まる前に不活性化が完了せず、高頻度刺激が継続すると  $I_{Ks}$  チャネルが活性化したままの状態となり、 $I_{Ks}$  は増加する。以上より、高頻度刺激時には活動電位に対する  $I_{Kr}$  の寄与率が  $I_{Ks}$  に対して相対的に低下し、 $I_{Kr}$  ブロッカーの APD 延長作用が減弱していると考えられている。

また、動物種によって  $I_{Kr}$  ブロッカーに対する応答性が異なることが報告されている。KCNQ1 遺伝子に対する KCNE1 遺伝子発現量比の大きいモルモットでは、 $I_{Kr}$  ブロッカーによって APD は顕著に延長されるが、KCNE1 遺伝子発現量比の小さいウサギでは APD 延長作用は弱いことが報告されている[5]。しかし、動物種によって  $I_{Kr}$  ブロッカーに対する反応性が異なるメカニズムは、明らかにされていない。

我々は、 $I_{Ks}$  チャネルの  $\alpha$  サブユニットを発現する KCNQ1 遺伝子及び  $\beta$  サブユニットを発現する KCNE1 遺伝子を一定量で発現させた時の  $I_{Ks}$  チャネルの特性を計測する細胞電気生理学的実験を行い、その結果に基づいて

KCNQ1 遺伝子に対する KCNE1 遺伝子発現量比 (以下、KCNE1 発現量比と呼ぶ) の異なる心筋細胞膜活動電位数値計算モデルを構築して、KCNE1 発現量比と APD の関係について検証してきた。その結果として、KCNE1 発現量比の増大に伴って、最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスは増加するが、 $I_{Ks}$  チャネルの活性化及び不活性化の速さを規定する時定数が増加するため、結果として  $I_{Ks}$  は減少し、APD が延長することを報告している[6]。

本研究では、まず、前述の細胞電気生理学的な実験に新たな KCNE1 発現量比での実験結果を追加し、KCNE1 発現量比の異なる心筋細胞膜活動電位数値計算モデルを追加した。次に、構築したモデルにおける E-4031 による  $I_{Kr}$  チャネル抑制作用を再現したシミュレーションを行い、KCNE1 発現量比と  $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用及び APD 延長作用の刺激頻度依存性の関係について検証した。そして動物種により KCNE1 発現量比が異なるという知見と、本シミュレーション結果から、実験的に報告されている動物種による  $I_{Kr}$  ブロッカーに対する感受性の違いの機序を考察した。

## 2. 方 法

### 2.1 遺伝子発現実験

我々はこれまで、KCNQ1 及び KCNE1 遺伝子を一定量で発現させた場合の  $I_{Ks}$  チャネルの特性を計測するため、アフリカツメガエル卵母細胞に KCNQ1 遺伝子 5 ng と KCNE1 遺伝子 1 ng を注入した試料 (KCNE1 発現量比 1 ng/5 ng) と、KCNQ1 遺伝子 5 ng と KCNE1 遺伝子 5 ng を注入した試料 (同 5 ng/5 ng) を用い、遺伝子発現実験を行ってきた[6]。本研究では、KCNQ1 遺伝子 5 ng と KCNE1 遺伝子 0.2 ng を注入した試料 (同 0.2 ng/5 ng) を新たに用意し、遺伝子注入から 2 ~ 4 日後に二電極膜電位固定法 (double-microelectrode voltage clamp method) によって  $I_{Ks}$  の過渡応答特性を計測した。膜電位は -90 mV に固定して安定させた後、あらかじめ設定した電位 (-60 mV から 40 mV まで 10 mV 間隔) までステップ状に上昇させ、上昇後 7.5 s の間膜電位を固定した。さらにその後 -80 mV まで低下させ、再分極時の過渡応答特性を計測した。サンプリング周期は 1.2 ms とし、試料温度は 35°C に固定した。実験は 3 例行った。図 1 に実験結果の例を示す。

### 2.2 遺伝子発現実験に基づくモデル構築[6]

心筋細胞膜活動電位数値計算モデルである Luo-Rudy model[7-12] では、前節の実験プロトコルにおける  $I_{Ks}$  チャネルの過渡応答は以下のように表現される。

$$\begin{aligned} I_{Ks}(E_m, t) &= G_{Ks\infty}(E_m) \cdot \{1 - \exp(-t/\tau_{ss1}(E_m))\} \\ &\quad \cdot \{1 - \exp(-t/\tau_{ss2}(E_m))\} \cdot (E_m - E_{Ks}) \\ &= \bar{G}_{Ks} X_{ss}^2(E_m) \cdot \{1 - \exp(-t/\tau_{ss1}(E_m))\} \\ &\quad \cdot \{1 - \exp(-t/\tau_{ss2}(E_m))\} \cdot (E_m - E_{Ks}) \end{aligned} \quad (1)$$

ただし、 $E_m$ : 膜電位 [mV],  $t$ : 時刻 [ms],  $G_{Ks\infty}(E_m)$ : 膜

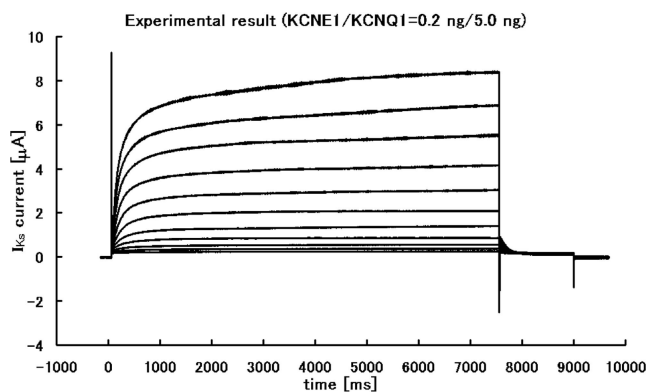


図1 アフリカツメガエル卵母細胞に KCNQ1 遺伝子 mRNA 5 ng 及び KCNE1 遺伝子 mRNA 0.2 ng を注入した場合の遺伝子発現実験における、 $I_{Ks}$  電流の過渡応答計測結果

Fig. 1 Transitional  $I_{Ks}$  current in an experiment of oocyte expression when 5 ng KCNQ1 mRNA and 0.2 ng KCNE1 mRNA were co-injected into an *Xenopus* oocyte.

電位別最大コンダクタンス [mS],  $\tau_{rs1}(E_m)$ ,  $\tau_{rs2}(E_m)$ : 時定数 [ms],  $E_{Ks}$ : 平衡電位 [mV],  $\bar{G}_{Ks}$ : 最大コンダクタンス [mS],  $X_{S\infty}(E_m)$ : 最大活性化係数.

そこで、これらのパラメータのうち時定数  $\tau_{rs1}(E_m)$  及び  $\tau_{rs2}(E_m)$ , 最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $\bar{G}_{Ks}$ , 最大活性化係数  $X_{S\infty}(E_m)$  を前節の実験結果より導出することによって、KCNQ1 遺伝子 5 ng と KCNE1 遺伝子 0.2 ng を注入した場合の  $I_{Ks}$  チャネルのモデルを構築した。本研究では、前節の遺伝子発現実験によって得られた  $I_{Ks}$  の過渡応答は立ち上がりから 1,000 ms 以降、一時的に  $Cl^-$  イオン等の影響により実際より低く計測されるため、定常状態を対象に最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスを導出した後に、過渡応答を対象に時定数を導出することとした。

まず、膜電位別の最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$  を導出するため、遺伝子発現実験で得られた  $I_{Ks}$  コンダクタンスの定常状態 (時刻  $t=6,900 \sim 7,500$  ms) に対して式(2)をフィッティングし、最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$  を膜電位ごとに導出した。フィッティング手法は直接探索手法である Nelder-Mead simplex method [13] を用い、最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$  及び時定数  $\tau_{rs}$  を調節することによって式(2)の実験データとの誤差を最小化した。

$$I_{Ks}(E_m, t) = G_{Ks\infty}(E_m) \cdot \{1 - \exp(-t / \tau_{rs}(E_m))\} \cdot (E_m - E_{Ks}) \quad (2)$$

次に、膜電位別の時定数を導出するため、遺伝子発現実験で得られた  $I_{Ks}$  コンダクタンスの過渡状態 (時刻  $t=36 \sim 1,800$  ms) に対して式(3)をフィッティングし、時定数  $\tau_{rs1}(E_m)$  及び  $\tau_{rs2}(E_m)$  を膜電位ごとに導出した。フィッティング手法には Nelder-Mead simplex method を用い、膜電位別最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$  は前述の手法で同定したものをを用いて固定し、時定数  $\tau_{rs1}(E_m)$  及び  $\tau_{rs2}(E_m)$  を調節することによって式(3)の実験データとの誤差を最

小化した。

$$I_{Ks}(E_m, t) = G_{Ks\infty}(E_m) \cdot \{1 - \exp(-t / \tau_{rs1}(E_m))\} \cdot \{1 - \exp(-t / \tau_{rs2}(E_m))\} \cdot (E_m - E_{Ks}) \quad (3)$$

以上より、遺伝子発現実験において発現した KCNE1 発現量比 0.2 ng/5 ng の  $I_{Ks}$  チャネルの膜電位別最大コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$ , 膜電位別時定数  $\tau_{rs1}(E_m)$  及び  $\tau_{rs2}(E_m)$  がそれぞれ 3 例ずつ求められた。ここで、これらを平均することにより、KCNE1 発現量比 0.2 ng/5 ng の  $I_{Ks}$  チャネルの膜電位別最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$ , 膜電位別時定数  $\tau_{rs1}(E_m)$  及び  $\tau_{rs2}(E_m)$  を求めた。しかし、これらは実験で固定した膜電位ごとの離散的なデータであるため、膜電位依存性を連続関数で表現する必要がある。

まず、式(1)より膜電位別最大  $I_{Ks}$  コンダクタンス  $G_{Ks\infty}(E_m)$  は式(4)のように表されるため、最大活性化係数は式(5)のように表される。

$$G_{Ks\infty}(E_m) = \bar{G}_{Ks} \cdot X_{S\infty}^2(E_m) \quad (4)$$

$$X_{S\infty}(E_m) = \sqrt{G_{Ks\infty}(E_m) / \bar{G}_{Ks}} \quad (5)$$

ここで、最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスを式(6)のように設定し、Luo-Rudy model を参考に最大活性化係数の膜電位依存性を式(7)のように設定した。これにより、式(8)を実験より求められた膜電位別最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスの平方根に対してフィッティングすることによって、各パラメータ  $a_1 \sim a_4$  を求めた。ただし、 $a_4$  は遺伝子発現実験時に生じた誤差が現れたものであると考えられるため、Luo-Rudy model に組み込む際には無視した。

$$\bar{G}_{Ks} = a_1^2 \quad (6)$$

$$X_{S\infty}(E_m) = 1 / [1 + \exp\{-(E_m - a_2) / a_3\}] + a_4 \quad (7)$$

$$\sqrt{G_{Ks\infty}(E_m)} = \sqrt{\bar{G}_{Ks}} \cdot X_{S\infty}(E_m) = a_1 / [1 + \exp\{-(E_m - a_2) / a_3\}] + a_1 a_4 \quad (8)$$

次に、時定数については、上述の方法で得られた時定数に対して、Luo-Rudy model において  $I_{Ks}$  チャネルの時定数を記述する式を参考に設定した式(9)及び式(10)をフィッティングすることによって、時定数の膜電位依存性を導出した。

$$\tau_{Xs1}(E_m) = a_5 / \{7.19 \times 10^{-5} \cdot (E_m + a_7) / [1 - \exp(-0.148 \cdot a_6 \cdot (E_m + a_7))] + 1.31 \times 10^{-4} \cdot (E_m + a_7) / [\exp(0.0687 \cdot a_6 \cdot (E_m + a_7)) - 1]\} \quad (9)$$

$$\tau_{Xs2}(E_m) = a_5 / \{7.19 \times 10^{-5} \cdot (E_m + a_7) / [1 - \exp(-0.148 \cdot a_6 \cdot (E_m + a_7))] + 1.31 \times 10^{-4} \cdot (E_m + a_7) / [\exp(0.0687 \cdot a_6 \cdot (E_m + a_7)) - 1]\} \quad (10)$$

フィッティング手法はいずれも Nelder-Mead simplex method を用い、 $a_1 \sim a_{10}$  を調節し、フィッティング関数と実験によって求められたパラメータの誤差を最小化した。

以上によって同定された、KCNQ1 遺伝子 5 ng と KCNE1



遺伝子 0.2 ng を注入した場合の  $I_{Ks}$  チャンネルの動特性を Luo-Rudy model に組み込むことにより、この KCNE1 発現量比での心筋細胞膜活動電位数値計算モデルを構築した。ただし、Luo-Rudy model では最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスは膜容量  $1 \mu F$  当たりの数値で表現されているのに対し、遺伝子発現結果より導出された最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスは卵母細胞 1 個あたりの数値であるため、そのままでは Luo-Rudy model に組み込むことはできない。そこで本研究では、文献[6]における手法と同様に、KCNQ1 遺伝子 5 ng 及び KCNE1 遺伝子 1 ng を注入した場合を正常な心筋細胞に対応するものと仮定し、KCNQ1 遺伝子 5 ng と KCNE1 遺伝子 0.2 ng を注入した時の最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスは、Luo-Rudy model における最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスに式 (11) で導出される  $g_{ks} \times rate$  を乗じたものを使用した。

$$g_{ks\_rate} = (a_{1\_KCNE1\_0.2ng} / a_{1\_KCNE1\_1ng})^2 \quad (11)$$

### 2・3 シミュレーション

前節で構築した KCNE1 発現量比 0.2 ng/5 ng の場合の心筋細胞膜活動電位数値計算モデルと、文献[6]で構築した KCNE1 発現量比 1 ng/5 ng 及び 5 ng/5 ng の場合の心筋細胞膜活動電位数値計算モデルを用いてシミュレーションを行った。E-4031 の  $I_{Kr}$  チャンネルに対する作用は、時間及び膜電位に対して依存しないことが報告されているため [14]、E-4031 分子が  $I_{Kr}$  チャンネルに結合・解離する際の時定数を考慮しなくても十分再現することができると考えられる。そこで本研究では、E-4031 の  $I_{Kr}$  チャンネルに対する作用を、最大  $I_{Kr}$  コンダクタンスを 30% 低減させることによって再現した。刺激周期は 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 Hz とし、シミュレーションモデルの安定性とメモリ効果の影響を考慮して、刺激周期 1 Hz で 60 回刺激印可後、60 秒間の

静止時間を置き、その後設定した刺激周期で 60 回刺激し、60 回目の刺激印可時の活動電位及びイオン電流の変化を評価対象とした。シミュレーション周期は  $10 \mu s$  とした。

## 3. 結 果

### 3・1 $I_{Ks}$ チャンネルのモデル化

KCNE1 発現量比 0.2 ng/5 ng の場合の  $I_{Ks}$  チャンネルの最大活性化係数の膜電位依存性を図 2 に、時定数の膜電位依存性を図 3 及び図 4 に示す。比較のために、文献[6]において求めた KCNE1 発現量比 1 ng/5 ng, 5 ng/5 ng の場合の  $I_{Ks}$  チャンネルの最大活性化係数及び時定数の膜電位依存性も図中にあわせて示す。また、本研究及び文献[6]より求められた KCNE1 発現量比と最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスの関係は表 1 のように求められ、KCNE1 遺伝子の発現量が多いほど最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスが増加することが確認された。また、本研究及び文献[6]で求められたパラメータ  $a_1 \sim a_{10}$  を表 2 に示す。

### 3・2 シミュレーション結果

シミュレーション結果のうち、設定した刺激周期で 60 回目の刺激を印加した時の活動電位及び  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$  波形を図 5 ~ 7 に示す。また、各遺伝子発現量比での 90% 再分極活動電位持続時間 ( $APD_{90}$ ) の刺激頻度依存性を図 8 に示す。

## 4. 考 察

### 4・1 KCNE1 発現量比と APD

まず、シミュレーション結果の妥当性について検証するため、全てのイオン電流及び細胞膜内外の各イオン濃度について、正常な心筋細胞の Luo-Rudy model によるシミュレーション結果との比較を行った。その結果、 $I_{Ks}$  及び  $I_{Kr}$  電流量の変化、APD の変化、早期後脱分極 (early after

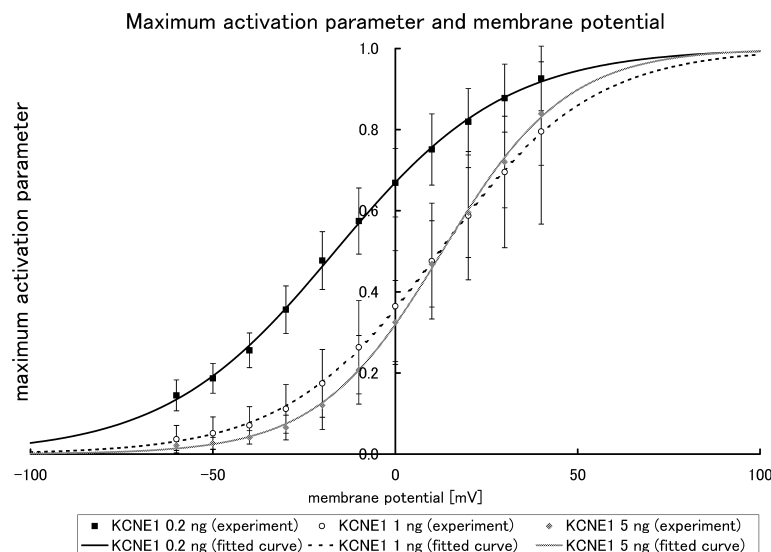


図 2  $I_{Ks}$  チャンネルの最大活性化係数の膜電位に対する依存性

Fig. 2 Relation between the maximum activation parameter of an  $I_{Ks}$  channel and membrane potential.

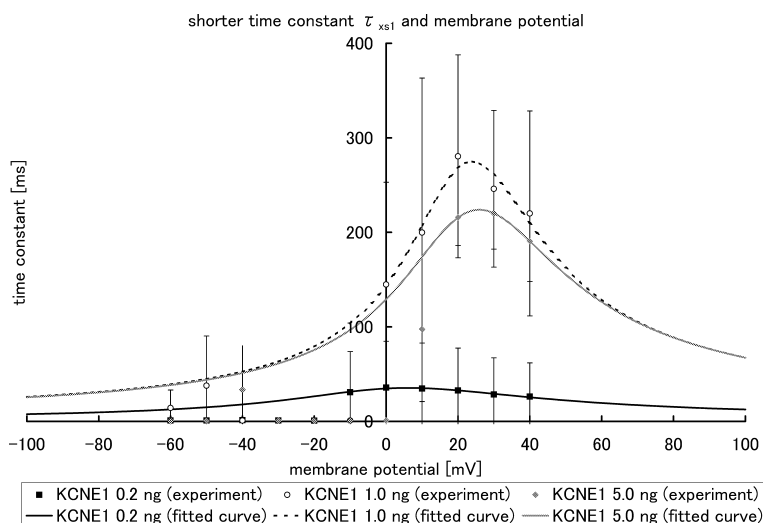


図3  $I_{Ks}$  チャンネルの短い時定数の膜電位に対する依存性

Fig. 3 Relation between shorter time constants of an  $I_{Ks}$  channel and membrane potential.

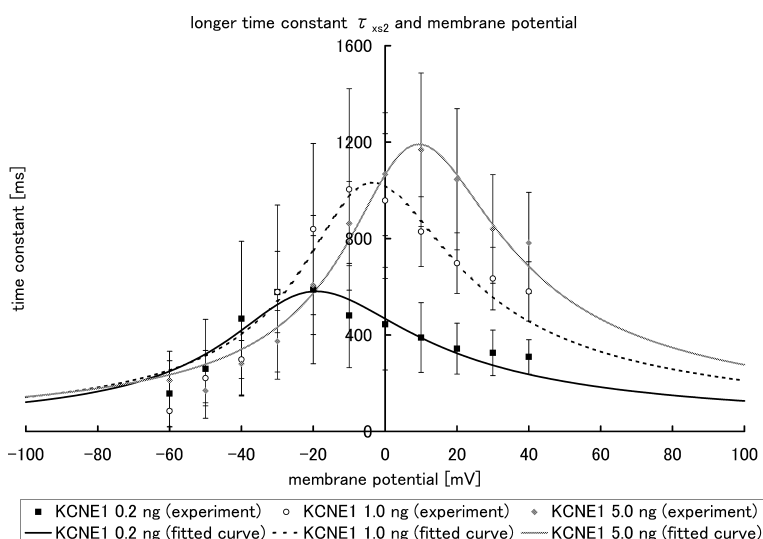


図4  $I_{Ks}$  チャンネルの長い時定数の膜電位に対する依存性

Fig. 4 Relation between longer time constants of an  $I_{Ks}$  channel and membrane potential.

表1 KCNE1 発現量比と最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスの関係

Table 1 Relation between KCNE1 expression ratio and maximum  $I_{Ks}$  conductance.

KCNE1/KCNQ1	Fitting parameter $a_1$	Maximum $I_{Ks}$ conductance obtained from $a_1$ [mS]	Maximum $I_{Ks}$ conductance ratio (KCNE1 1.0 ng = 100%)
0.2 ng/5.0 ng	0.2671	0.07134	63.31%
1.0 ng/5.0 ng	0.3357	0.1126	100.00%
5.0 ng/5.0 ng	0.3638	0.1323	117.44%

repolarization: EAD) の発生に伴う変化は見られたが、それらの変化は電気生理学的に不自然なものではなく、本研究で用いた KCNE1 発現量比の異なる 3 種類の心筋細胞膜活動電位数値計算モデルは妥当なものであると考えられる。

次に、KCNE1 発現量比と  $I_{Ks}$  チャンネルの動特性及び APD の関係について検証を行った。本研究で求められた KCNE1 発現量比 0.2 ng/5 ng の場合の  $I_{Ks}$  チャンネル動特性及び、文献[6]より求められた KCNE1 発現量比 1 ng/5 ng, 5 ng/5 ng の場合の  $I_{Ks}$  チャンネル動特性より、KCNE1 発現量

表 2 最大活性化係数及び時定数に対して連続関数をフィッティングする際に導出されたパラメータ

Table 2 Parameters adjusted to fit a continuous function to experimental maximum  $I_{Ks}$  conductance and time constants.

	KCNE1 0.2 ng	KCNE1 1 ng[6]	KCNE1 5 ng[6]
$a_1$	0.2671	0.3357	0.3638
$a_2$	-16.5152	12.1407	12.8825
$a_3$	23.3671	20.9619	17.0336
$a_4$	0.0234	0.0386	0.0518
$a_5$	1.1578	1.6732	1.9343
$a_6$	1.1326	1.3927	1.3906
$a_7$	27.4654	10.0351	-2.6781
$a_8$	0.0948	0.399	0.3949
$a_9$	0.8414	1.5549	1.2801
$a_{10}$	5.0611	-17.8881	-18.5452

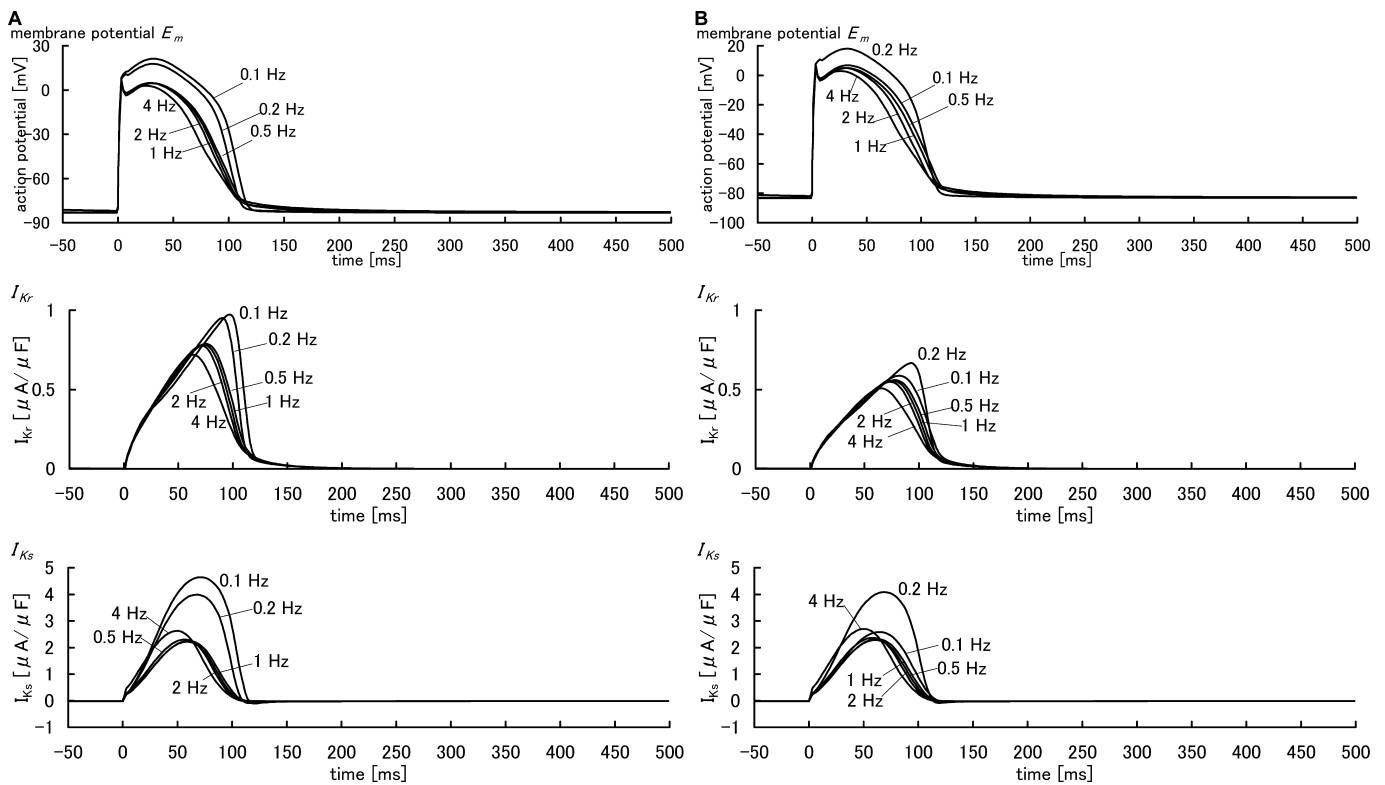


図 5 KCNQ1 遺伝子 5.0 ng に対して KCNE1 遺伝子 0.2 ng を注入した場合のシミュレーション結果 (A) control, (B)  $I_{Kr}$  30%抑制.

Fig. 5 Simulation results in the case of 0.2 ng KCNE1 co-injected. (A) Control, (B)  $I_{Kr}$  30% blocked.

比の増加に伴って、最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスが増加する傾向が見られた (表 1). ここで、2つの時定数を有するシステム全体の時定数は、その2つの時定数の積で評価できることから、本研究で求められた KCNE1 発現量比の異なる3つの  $I_{Ks}$  チャンルのモデルについて、その2つの時定数の積を求め、その膜電位依存性を図 9 に示す. これを見ると、KCNE1 発現量比の増加に伴って  $I_{Ks}$  チャンルの開閉速度を規定する時定数が増加し、そのピークが脱分極側にシフトする傾向が見られた. また、最大活性化係数の膜電位

依存性に注目すると、KCNE1 発現量比の増加に伴って、 $I_{Ks}$  チャン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傾向が見られた (図 2). これらの KCNE1 発現量比の増加に伴って生じる変化のうち、最大  $I_{Ks}$  コンダクタンスの増加は  $I_{Ks}$  を増大させ、再分極を促進するため APD を短縮する方向に作用すると考えられる. しかし、時定数の増加及びピークの脱分極側へのシフト、活性化閾値の脱分極側へのシフトは  $I_{Ks}$  の立ち上がりを抑制し、 $I_{Ks}$  を減少させるため、APD を延長させる方向に作用

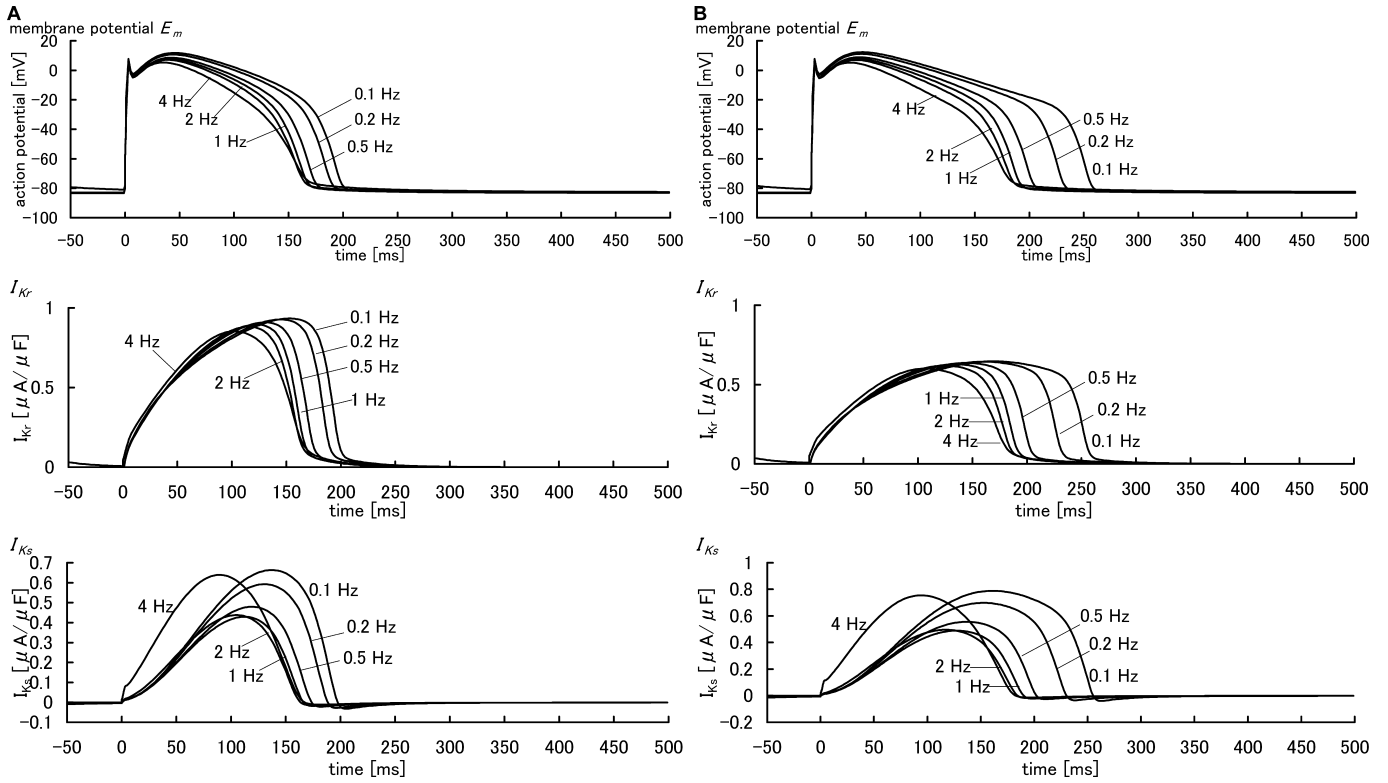


図 6 KCNQ1 遺伝子 5.0 ng に対して KCNE1 遺伝子 1.0 ng を注入した場合のシミュレーション結果 (A) control, (B)  $I_{Kr}$  30%抑制.

Fig. 6 Simulation results in the case of 1.0 ng KCNE1 co-injected. (A) Control, (B)  $I_{Kr}$  30% blocked.

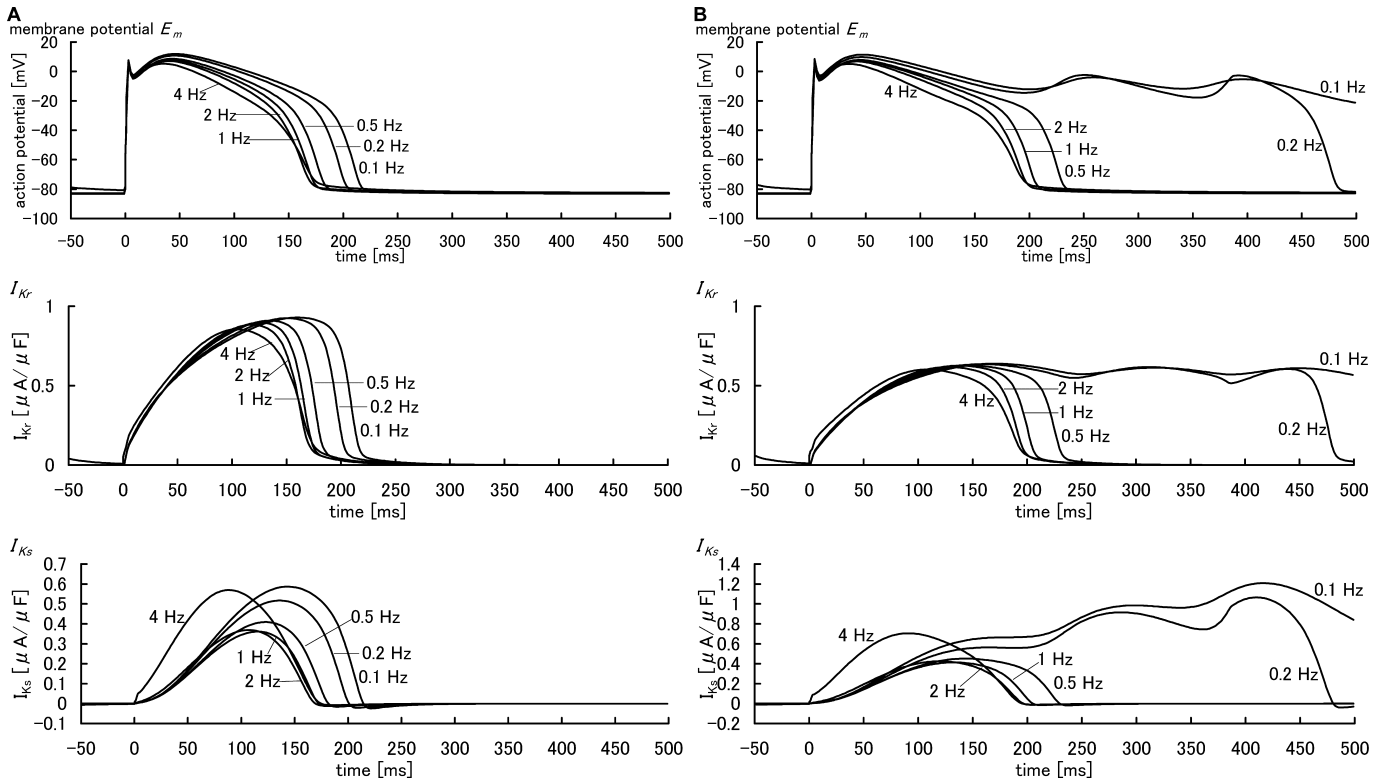


図 7 KCNQ1 遺伝子 5.0 ng に対して KCNE1 遺伝子 5.0 ng を注入した場合のシミュレーション結果 (A) control, (B)  $I_{Kr}$  30%抑制.

Fig. 7 Simulation results in the case of 5.0 ng KCNE1 co-injected. (A) Control, (B)  $I_{Kr}$  30% blocked.

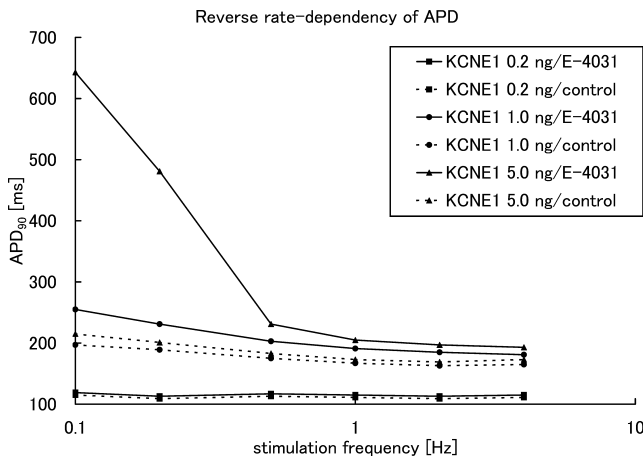


図 8 APD の刺激頻度依存性

Fig. 8 Frequency-dependency of APD in simulations.

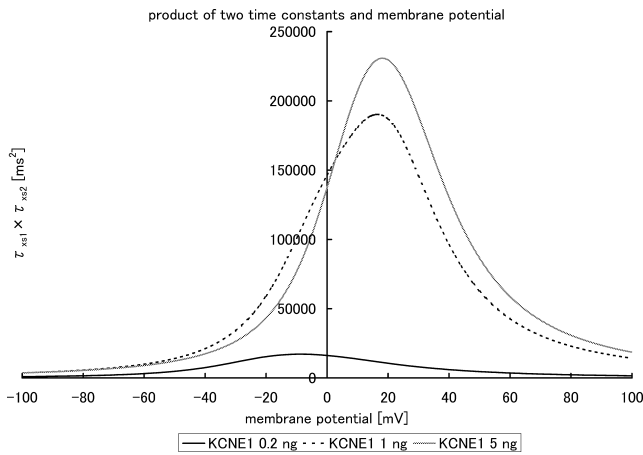


図 9 I<sub>Ks</sub> チャネルの 2 つの時定数の積の膜電位に対する依存性  
Fig. 9 Relation between the production of two time constants of the I<sub>Ks</sub> channel and membrane potential.

すると考えられる。刺激頻度 1 Hz の場合の KCNE1 発現量比 1 ng/5 ng 及び 5 ng/5 ng のモデルを用いたシミュレーション結果を見ると、I<sub>Ks</sub> の立ち上がりが顕著に抑制され、最大 I<sub>Ks</sub> コンダクタンスは KCNE1 遺伝子発現量比 0.2 ng/5 ng の場合より大きいにもかかわらず、I<sub>Ks</sub> のピークも低く抑えられていることがわかる。以上より、KCNE1 発現量比と APD の関係は KCNE1 発現量比によって変化する最大 I<sub>Ks</sub> コンダクタンス、時定数の膜電位依存性、最大活性化係数の膜電位依存性のバランスによって決定され、KCNE1 発現量比が増大すると、それらのバランスが I<sub>Ks</sub> を減少させる方向に作用し、APD が延長されると考えられる。

#### 4・2 KCNE1 発現量比と I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用

まず、シミュレーション結果 (図 8) を基に、各 KCNE1 発現量比における APD 延長率の刺激頻度依存性を算出し、図 10 に示す。これを見ると、KCNE1 発現量比が増加する

ほど APD 延長作用は大きくなり、その逆頻度依存性もより顕著になることがわかる。ただし、KCNE1 発現量比が 5 ng/5 ng の場合に注目すると、低頻度刺激時に I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用が顕著に強まっていることがわかる。ここで図 7 (B) を見ると、刺激頻度 0.1 Hz 及び 0.2 Hz の場合において EAD が発生していることがわかる。したがって、低頻度刺激時の APD の顕著な延長は EAD の発生によるものと考えられる。また、刺激頻度 0.5 Hz 及び 1 Hz の場合でも EAD が発生しており、それぞれ 57 回目、43 回目の刺激時に消滅していた。EAD の発生は I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用に伴って再分極相が不安定化することによって引き起こされた、I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用とは別のメカニズムの現象であると考えられる。

次に、I<sub>Kr</sub> 及び I<sub>Ks</sub> の活動電位再分極相に対する寄与率を検証するため、E-4031 の作用がない場合において、I<sub>Kr</sub> が外向き電流に占める割合の時刻歴を図 11 に、I<sub>Ks</sub> が外向き電流に占める割合の時刻歴を図 12 に示す。これを見ると、KCNE1 発現量比が大きくなるほど、I<sub>Ks</sub> の割合は低下し、I<sub>Kr</sub> の割合が増加することがわかる。また、図 12 を見ると、KCNE1 発現量比の小さいモデルでは刺激頻度の上昇に伴って I<sub>Ks</sub> 寄与率が低下しているが、KCNE1 発現量比の大きいモデルでは、刺激頻度の上昇に伴う I<sub>Ks</sub> 寄与率の低下はわずかであり、刺激周期 4 Hz では、刺激周期 2 Hz の場合と比較して、I<sub>Ks</sub> 寄与率が顕著に増加する結果が得られた。

ここで、前節より、KCNE1 発現量比の増大に伴って I<sub>Ks</sub> チャネルの時定数が増加し、結果として I<sub>Ks</sub> が減少することが明らかになっている。したがって、シミュレーションにおいて、KCNE1 発現量比が大きいモデルほど I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用が顕著になるメカニズムは、I<sub>Ks</sub> チャネルの時定数の増加に伴って I<sub>Ks</sub> が減少し、I<sub>Kr</sub> の活動電位に対する寄与率が相対的に上昇し、I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる作用も相対的に強くなったためと思われる。また、KCNE1 発現量比が大きいモデルほど I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用の逆頻度依存性が顕著になるメカニズムは、KCNE1 発現量比の増大に伴う I<sub>Ks</sub> チャネルの時定数の増加により、I<sub>Ks</sub> チャネルの不活性化が遅くなり、高頻度刺激印可時に不活性化せずに残るチャネルの割合が増大し、I<sub>Ks</sub> が蓄積されて増加して、I<sub>Kr</sub> の活動電位に対する寄与率が相対的に低下したためと考えられる。

一方、動物種と KCNE1 発現量比の関係に注目すると、マウスやヒトの KCNQ1 遺伝子に対する KCNE1 遺伝子の mRNA コピー比は 0.5 ~ 1/1、ウサギやネコの場合は KCNQ1 遺伝子に対する KCNE1 遺伝子の mRNA コピー比は 1 ~ 2/1、モルモットは KCNQ1 遺伝子に対する KCNE1 遺伝子の mRNA コピー比は 5 ~ 10/1 である。ここで、それぞれの動物種における I<sub>Kr</sub> ブロッカーによる APD 延長作用を比較すると、KCNE1 発現量比の小さいヒトやマウス



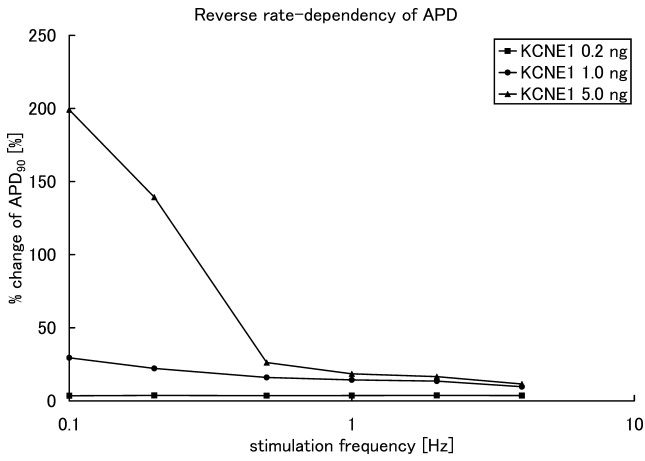


図 10 APD 延長率の刺激頻度依存性

Fig. 10 Frequency-dependency of % change of APD in simulations.

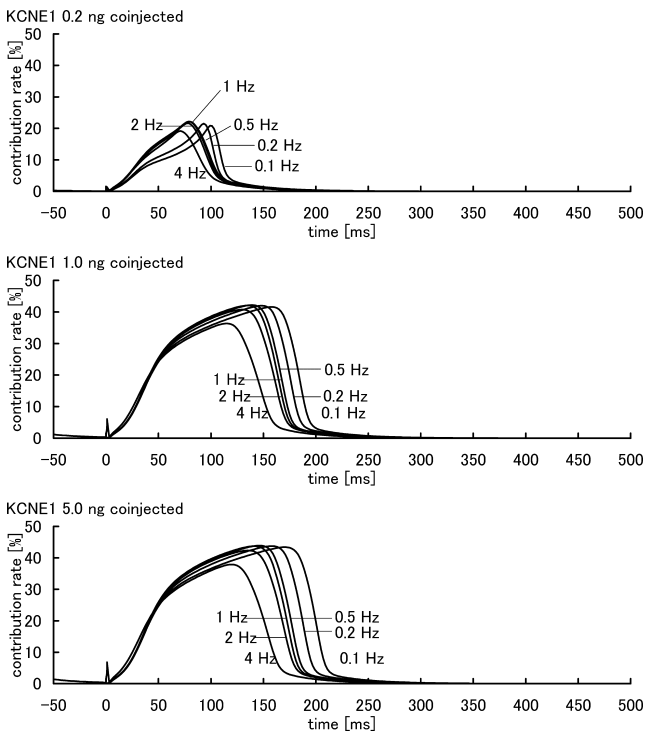


図 11  $I_{Kr}$  寄与率

Fig. 11 Contribution ratio of  $I_{Kr}$  to outward ion current.

ではほとんど APD 延長が生じないことが知られている。ウサギでは APD は延長し、逆頻度依存性も現れるようになり、KCNE1 発現量比の大きいモルモットでは APD がさらに顕著に延長する。したがって、実際の動物種においても、KCNE1 発現量比の大きい種ほど  $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用が顕著に表れる傾向があると言える。以上より、本研究によって得られた、KCNE1 発現量比と  $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用の関係は、動物種による  $I_{Kr}$  ブロッカーに対する感受性と符合していると言え、そのメカニズムを客観的に説明できていると言える。

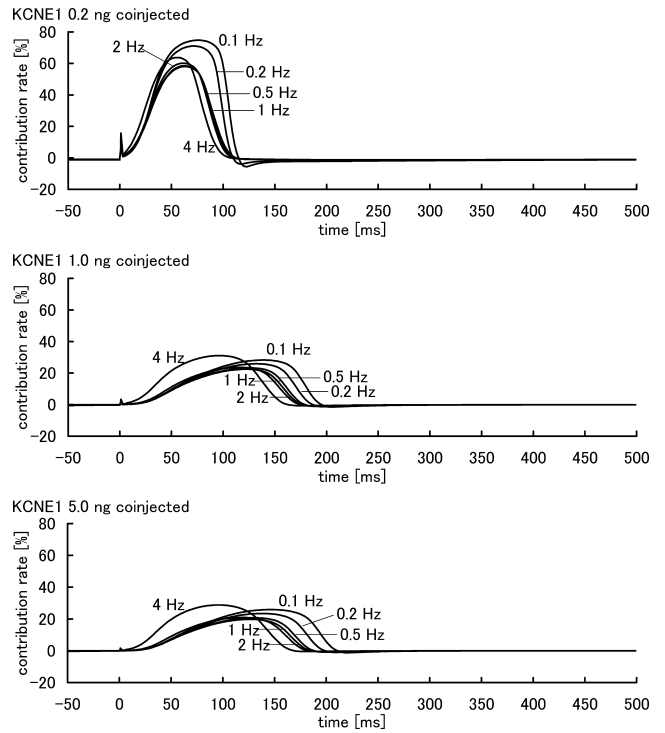


図 12  $I_{Ks}$  寄与率

Fig. 12 Contribution ratio of  $I_{Ks}$  to outward ion current.

## 5. 結 論

KCNE1 発現量比の異なる  $I_{Ks}$  チャンルの動特性を再現した遺伝子発現実験に基づき、KCNE1 発現量比の異なる心筋細胞膜活動電位を構築した。 $I_{Kr}$  ブロッカーの作用した心筋細胞の APD の刺激頻度依存性を構築したモデルを用いたシミュレーションによって求め、KCNE1 発現量比が増加するほど  $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用が強まり、その逆頻度依存性もより顕著になることを示した。また、以上の結果より、KCNE1 発現量比が増加するほど  $I_{Ks}$  チャンルの時定数が増加し、 $I_{Ks}$  が減少するため、 $I_{Kr}$  の活動電位再分極相に対する寄与率が上昇して  $I_{Kr}$  ブロッカーの作用が強まり、それによる APD 延長作用も強まることを示した。さらに、KCNE1 発現量比の増加による  $I_{Ks}$  チャンルの時定数の増加によって、高頻度刺激時に  $I_{Ks}$  チャンルが不活性化の不完全性が強まり、 $I_{Ks}$  が増加し、 $I_{Kr}$  の寄与率がより低下するため、 $I_{Kr}$  ブロッカーによる APD 延長作用が減弱し、逆頻度依存性が強まることを示した。動物種による  $I_{Kr}$  ブロッカーに対する感受性の違いは KCNE1 発現量比の違いによる  $I_{Kr}$  の外向き電流に占める割合の違いによるものと考えられる。

## 文 献

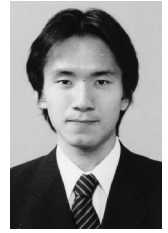
1. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The Cardiac Arrhythmia Sup-

- pression Trial (CAST) Investigators. *N Engl J Med.* **321**: 406-412, 1989.
2. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP: Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. *Lancet.* **348**: 7-12, 1996.
  3. Ohler A, Amos GJ, Wettwer E, Ravens U: Frequency-dependent effects of E-4031, almokalant, dofetilide and tedisamil on action potential duration: no evidence for "reverse use dependent" block. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **349**(6): 602-610, 1994.
  4. 中谷晴昭: ニフェカランとソタロールの電気生理学と臨床薬理学. 日本心電学会学術諮問委員会編, 新Ⅲ群抗不整脈薬ソタロールとニフェカランをどう使うか. ライフメディアコム, 東京, 2005, pp. 7-24.
  5. Lu Z, Kamiya K, Opthof T, Yasui K, Kodama I: Density and kinetics of  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of  $I_{Ks}$  blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation.* **104**: 951-956, 2001.
  6. 山口喬弘, 荒船龍彦, 佐久間一郎, 大内克洋, 柴田仁太郎, 本莊晴朗, 神谷香一郎, 児玉逸雄: 心筋細胞活動電位シミュレーションを用いたQT延長メカニズムの検討. *生体医工学.* **43**(1): 43-49, 2005.
  7. Luo C-H, Rudy Y: A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ. Res.* **68**: 1501-1526, 1991.
  8. Luo C-H, Rudy Y: A dynamic model of cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* **74**: 1071-1096, 1994.
  9. Luo C-H, Rudy Y: A dynamic model of cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res.* **74**: 1097-1113, 1994.
  10. Chen J, Laurita KR, Rosenbaum DS, Rudy Y: Two components of the delayed rectifier  $K^+$  current in ventricular myocytes of guinea pig type theoretical formulation and their role in repolarization. *Circ Res.* **77**: 140-152, 1995.
  11. Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y: Effects of  $I_{Kr}$  and  $I_{Ks}$  heterogeneity on action potential duration and its rate dependence a simulation study. *Circulation.* **99**: 2466-2474, 1999.
  12. Ouchi K, Fukui Y, Sakuma I, Shibata N, Honjo H, Kodama I: A dynamic action potential model analysis of shock induced aftereffects in ventricular muscle by reversible breakdown of cell membrane. *IEEE Trans Biomed Eng.* **49**: 18-30, 2002.
  13. Lagarias JC, Reeds JA, Wright MH, Wright PE: Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. *SIAM J Optim.* **9**(1): 112-147, 1998.
  14. Cheng J, Kamiya K, Kodama I, Toyama J: Differential effects of MS-55 I and E-4031 on action potentials and the delayed rectifier  $K^+$  current in rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* **31**: 963-974, 1996.

山口 喬弘 (ヤマガチ タカヒロ)

平成14年度慶應義塾大学理工学部卒業. 平成16年東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻修士課程修了. 同博士課程在籍. 環境学修士. 心筋細胞活動電位光学マッピング, 心筋細胞活動電位数値計算シミュレーション, 血管内皮機能検査システムの開発等の生体医用精密工学研究に従事.

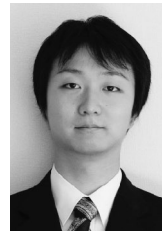
日本生体医工学会, 日本心電学会等の会員.



荒船 龍彦 (アラフネ タツヒコ)

平成9年東京大学工学部卒業. 平成11年同大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻修士課程修了. 平成16年同博士課程修了. 科学博士. 同年東京大学大学院新領域創成科学研究科助手, 現在に至る. 心筋細胞活動電位光学マッピング, 心筋数値シミュレーション, 遺伝子導入等の生体医用精密工学研究に従事.

日本生体医工学会, 日本心電学会, ライフサポート学会等の会員.



佐久間 一郎 (サクマ イチロウ)

昭和60年東京大学大学院工学系研究科博士課程中退, 平成元年工学博士 (東京大学). 平成10年東京大学大学院工学系研究科助教授. 平成11年同大学院新領域創成科学研究科助教授, 平成13年同教授, 現在に至る. 専門研究分野: 医用精密工学, コンピュータ外科.

所属学会名: 日本生体医工学会, 日本コンピュータ外科学会, ライフサポート学会, 精密工学会, 日本人工臓器学会等の会員.



寺澤 敏昭 (テラザワ トシアキ)

1983年信州大学繊維学部繊維機械学科卒業. 同年(株)スズケン入社. 以来医療機器関連の事業部に所属し, 現在, 同社ケツ事業部製品開発課に勤務. ホルター心電計, 12誘導解析付心電計及びカロリー計測器等の製品開発及び関連する生体情報処理の研究に従事.

日本生体医工学会, 日本循環器学会, 日本心電学会の会員.



柴田 仁太郎 (シバタ ニタロウ)

1979年女子医科大学大学院修了, 1983年アメリカデューク大学留学. 榊原記念病院, 仙台循環器病センター, 済生会栗橋病院で循環器内科勤務の後, 1995年より東京都保健医療公社大久保病院. 現在内科部長. 東京女子医科大学, 名古屋大学の非常勤講師. 医学博士, 循環器専門医. 不整脈の生成と治療, 心臓生理と電気現象, 医学教育, 病院医療などの研究に従事.

ライフサポート学会, 日本心電学会の評議員, 日本生体医工学会, 日本循環器学会の会員.



## 本庄 晴朗 (ホンジョウ ハルオ)

昭和 58 年名古屋大学医学部卒業。名古屋市立東市民病院で臨床研修，名古屋大学大学院医学研究科博士課程修了。英国リーズ大学生理学研究員，名古屋大学環境医学研究所助手などを経て，同大学助教授として現在に至る。医学博士。心臓における電気興奮の生成・伝播に関わる研究に従事。

日本生体医工学会，日本生理学会（評議員），日本心電学会（評議員），日本循環器学会などの会員。



## 神谷 香一郎 (カミヤ カイチロウ)

1977 年名古屋大学医学部卒業。社会保険中央病院勤務を経て，1984 年同大学医学系研究科博士課程修了。1985 年米国心臓病学会上級研究員，1987 年名古屋大学環境医学研究所助手，1997 年同大学助教授，2001 年同大学教授。医学博士。心筋イオンチャネルの分子生物学的調節機構，抗不整脈薬の電気生理学的機序，心筋再生医療の実用化に関わる研究に従事。

日本生体医工学会，日本生理学会（評議員），日本循環器学会（評議員），日本心電学会（評議員）等の会員。



## 児玉 逸雄 (コダマ イツオ)

昭和 46 年名古屋大学医学部卒業。静岡済生会病院内科勤務，名古屋大学環境医学研究所研究生，同文部教官助手，助教授を経て，同教授として現在に至る。医学博士。抗不整脈薬の作用機序（電気生理），洞房結節の歩調取り機能，光シグナルによる不整脈解析の研究に従事。

日本生体医工学会（会員），日本循環器学会（理事），日本心電学会（理事長），国際心臓研究学会日本部会（理事），日本生理学会（評議員）。

