

テラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究

所 属 九州大学大学院薬学研究院 薬物中毒学分野
研究者 西田 基宏

研究要旨 薬剤が不整脈を引き起こすかどうかを調べることはきわめて重要になっている。本研究は、先端的な手法を用い薬剤反応性の個人差にも適用可能な不整脈を誘起する薬剤のスクリーニング系の確立を目的とするものである。

A. 研究目的

薬剤によって引き起こされる不整脈は、しばしば心室細動へと移行し死に至る重篤な副作用である。しかしながら薬剤が不整脈を引き起こすかどうかをスクリーニングする系は、現在までのところ決定的な方法はなく、動物そのものを使ったスクリーニング系も種差や入手の困難さなどから問題があり、迅速でかつ正確な代替法が求められている。本研究では、2つのタンパク質の相互作用を検出する系として使われてきた蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を分子内の相互作用を検出する方法として、薬剤によって引き起こされる不整脈の主要な標的と考えられているカリウムチャンネル (HERG) に適用し、薬剤誘起性不整脈のスクリーニング系を確立することを目的としている。

B. 研究方法

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) とは、ある蛍光タンパク質 (タンパク質-1) の蛍光波長が別の蛍光タンパク質 (タンパク質-2) の励起波長とオーバーラップしていると、タンパク質-2 がタンパク質-1 の蛍光によって励起されるため、タンパク質-1 を励起してもタンパク質-1 の蛍光ではなくタンパク質-2 からの蛍光が観察される現象である。FRETの起り易さは2つのタンパク質間の距離や向きあっている角度に依存するという問題はあるものの、FRETは2つのタンパク質の相互作用を解析する手法として近年盛んに使われている手法である。HERGに励起および蛍光波長が異なる2つのGFP蛍光分子種 (CFPとYFP) を導入しキメラHERGを作製する。キメラHERGのCFPを励起すると、CFPの蛍光波長がYFPの励起波長とオーバーラップするため、蛍光がCFPからではなくYFPから生じる。すなわち、分子内での相互作用をFRETで検出できる。

HERGに励起および蛍光波長が異なる2つのGFP分子種 (CFPとYFP) を導入しキメラHERGを作製する。キメラHERGのCFPを励起すると、CFPの蛍光波長がYFPの励起波長とオーバーラップするため、蛍光がCFPからではなくYFPから生じる。すなわち、分子内での相互作用をFRETで検出できる。計画方法としては以下のように進めることにした。平成16年度は、CFPとYFPを導入したキメラHERGを哺乳動物細胞に発現させ、元の (野生型の) HERGと同じ電気生理学的特性を示すことを確認する。次に、不整脈を引き起こすことが知られている薬剤を作用させFRETが生じるか検討する。CFPとYFPを導入する部位を変えたいくつかのコンストラクトを作製し、もっとも感度よく薬剤との相互作用が検出できるキメラHERGを決定する。平成17および18年度は、一塩基多型 (SNP) として知られている変異をキメラHERGに導入し、薬剤によって引き起こされるFRETがどのように影響を受けるか検討する。この段階で、多くの薬剤を調べ、FRETの起り方とSNPとの関係を確立し、個人の遺伝情報と薬剤誘起性不整脈の関係を樹立することが可能となる。これを実行するため、以下のような根拠に基づいてCFPとYFPを導入したキメラHERGを作成することにした。HERGは細胞内にアミノ末端を持つ細胞膜を6回貫通する構造のモノマーが4量体を形成し、中央にカリウムイオンを通すポア (小さな穴) が存在する。そこで、チャンネルが閉じる際には、アミノ末端部分あるいは細胞膜貫通領域が移動してポアをふさぐように働くと仮定し、CFPを入れる位置はアミノ末端あるいは細胞膜近傍の細胞内領域に、一方YFPを入れる位置はポアが形成される細胞膜の近傍の細胞内領域あるいはカルボキシル末端に入れることにした。次に、作成したキメラHERGが野生型

HERG と同様の電気生理学的性質を保持しているかどうか調べるため、非興奮性動物細胞株 HEK293 または興奮性心室筋細胞の 2 つに発現させることで評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる動物 (ラット、マウスなど) は、本大学研究院の動物実験を行う際の指針 (正式名称「九州大学大学院薬学研究院、大学院薬学府及び薬学部における動物実験に関する指針」) に沿って行うため倫理面の問題はないと判断している。ヒトの一塩基置換の遺伝情報はすでに報告されている変異を使用するため、ヒトに対する倫理面での問題はない。

C. 研究結果

ヒト cDNA library から HERG 遺伝子をクローニングした。方法に示した理論に基づき、いくつかのキメラ HERG コンストラクトを作製した (図 1)。これらをヒト胎児腎臓由来の細胞株 (HEK293) に一過的発現させたところ、キメラ HERG タンパクは野生型 HERG と同様に形質膜に存在することが確認された (図 2)。

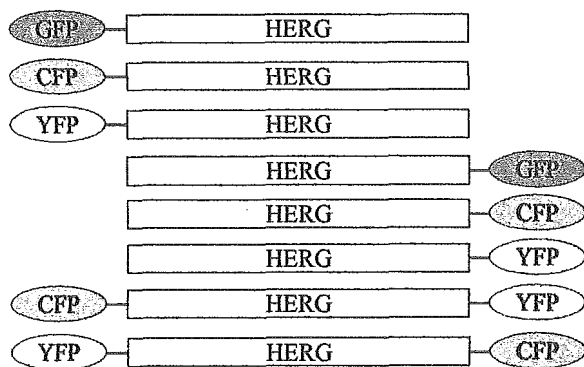


図1 作成したキメラHERGコンストラクト

HERG 発現細胞に高カリウム刺激を与えても、HERG チャンネルタンパクの局在に変化はなかった。次に、作成したキメラ HERG が野生型 HERG の電気生理学的性質を保持しているかどうかパッチクランプ法を用いて調べた。初年度は電気生理機器のセットアップおよび測定系を確立させることに尽力した。通常のトランスフェクション (Fugene 6; Roche 社) 法により、野生型 HERG チャンネルを一過的に発現させた HEK293 細胞を用いて、脱分極パルス刺激により惹起される電流量を測定し、HERG の電気的特性を解析した。GFP だけをコードしているコントロールプラスミドを発現させた HEK293 細胞と比べて、HERG 発現細胞では脱分極刺激により顕著な外向き電流

が観察された。これは、他のグループがすでに論文として報告されている HERG の電気的特性と一致していた。

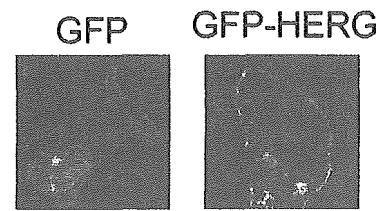


図2 HERGの局在

さらに、まだ予試験段階ではあるが、図 1 に示すカルボキシル末端に蛍光タンパクを付加したキメラ HERG が、野生型の HERG とチャンネルとして同じ電気生理学的性質を持つことがわかりつつある。次に、キメラ HERG が実際に細胞内で FRET を起こすかどうか、fugene 6 を用いたトランスフェクション法によりラット新生仔心室筋細胞に HERG を発現させて試してみた。しかしながら、この方法では遺伝子導入効率が低く、1%以下の細胞にしか HERG の発現が認められなかった。また、HERG チャンネル発現細胞に脱分極 (high KCl) 刺激を行っても FRET 現象を観察することはできなかった。Fugene 6 により遺伝子導入された細胞は、形態にも異常が認められたことから、トランスフェクションによる細胞毒性が HERG の FRET 測定を困難にしている可能性が考えられた。この問題をクリアするため、我々がこれまで培養心筋細胞への遺伝子導入法として頻用してきた組み換えアデノウイルス法を用いて、HERG の遺伝子導入を行おうとしている。また、HEK293 細胞にキメラ HERG を発現させることで FRET が起こるかどうか調べてみた。その結果、脱分極刺激または HERG 阻害作用を有するテルフェナジン処置によって有意な蛍光変化が認められなかった。本大学薬学部には共焦点顕微鏡が 1 台しかなかったため、初年度は FRET 実験を思うように進めることができなかった。そこで次年度からは、一部共同研究という形で他研究室の共焦点顕微鏡を使用し、FRET 解析を行うことにする。本年度、FRET 解析ができなかった代わりに、次年度に研究する予定であった不整脈誘起性薬剤のスクリーニングを先に着手することにした。具体的には、ラット新生仔の心室筋細胞を 64 点電極付培養ディッシュ上に初代培養し、細胞外電位変化を記録することで薬剤による活動電位持続時間 (action potential duration: APD) の延長作用を調べた。64 点電極付培養ディッシュおよび測定機器は、α MED サイエンス社 (松下電器) の協力を得てセ

ットアップすることができた。この測定システムを用いることで、心電図上のQT間隔を反映する心室筋細胞のAPDを培養レベルで観察することが可能となった。培養3-4日目において心室筋細胞は自発活動を示すようになり、活動電位のパターンは成人の心室筋細胞のそれと類似した波形を示した(図3A)。いくつかの薬剤のAPDに対する効果を調べた結果、アントラサイクリン系抗癌剤アドリアマイシンの高濃度(10 μ M)投与によって速やかな陽性変時作用およびAPDの延長作用が認められた(図3B, C)。アドリアマイシンによるAPD延長効果は約1時間持続し、3時間後には自発活動が全く認められなくなった。アドリアマイシンによる陽性変時作用およびAPD延長作用が抗酸化剤処置によって部分的に抑制されたことから、アドリアマイシンによる細胞内活性酸素(ROS)量の増加がHERGチャンネルの機能抑制とそれに続くAPD延長効果を引き起こす可能性が示された。この他に、これまでHERGチャンネルに対して抑制効果を示すことが報告されているテルフェナジン(H1 antagonist)やリチウムもまた、培養心室筋細胞のAPD延長を引き起こした。

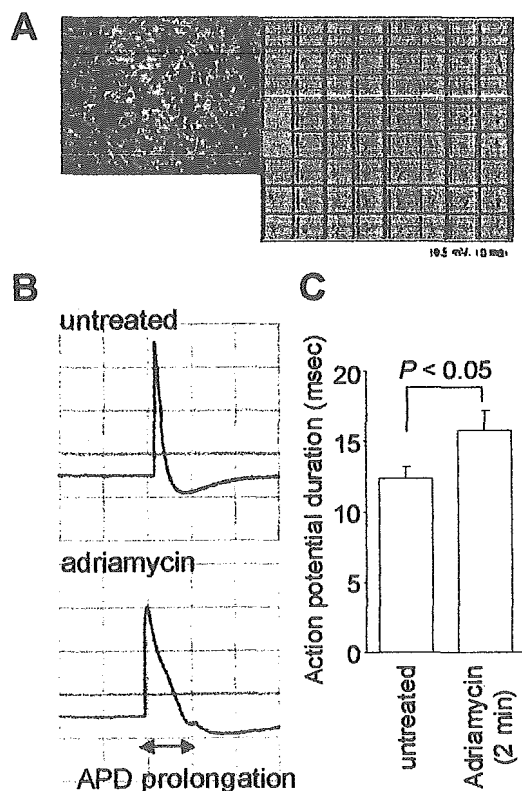


図3 64点電極付培養ディッシュを用いた細胞外電位変化記録。A. ラット新生仔培養心室筋細胞(4日目)と電気刺激で誘発される活動電位の様子。B. 自発活動として観察された心室筋細胞の活動電位パターンとアドリアマイシン処置によるAPD延長効果。C. APDを定量した結果(n=3)。

以上の結果から、HERGチャンネルがラット新生仔培養心室筋細胞の活動電位の時間的制御において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

D. 考察

本年度、研究者は不整脈誘発薬剤のスクリーニング系の確立に向けて、ヒトHERG遺伝子のクローニングおよび蛍光タンパクを付加したいくつかのキメラHERG遺伝子のコンストラクトを作成した。電位依存性チャンネルの中には、蛍光タンパクをアミノ末端またはカルボキシル末端に付加させることでチャンネルの特性が変わるものがあるという報告がいくつかなされている。しかし、本研究で、キメラHERGタンパクが形質膜に発現しており、電気生理学的にも野生型HERGと同様の性質を保持していることが明らかとなり、FRET定量的解析に有効なプローブとなる可能性が示された。薬剤によるHERGチャンネルのポア閉口に伴うチャンネルの構造変化を利用してFRETを起させるというアプローチから考えると、作成したコンストラクトで十分なFRETを起させるかどうかかわからない。例えば、チャンネルのポア近傍の細胞内ループに蛍光タンパクを挿入したほうがよりダイナミックな構造変化に伴うFRETを起させるのではないかと考えられる。しかし、チャンネルタンパクのアミノ末端およびカルボキシル末端にGFPを挿入した場合と違い、ポア近傍にGFPを挿入させる場合は、チャンネルそのものの構造が大きく変化する可能性が考えられる。従って、細胞内ループに蛍光タンパクを挿入したコンストラクトについては、チャンネルの電気生理学的特性が野生型のそれと一致するかどうか特に慎重に解析する必要があると考えられる。今後はFRET実験系の確立と並行してコンストラクションも引き続き行おうと考えている。本年度は、ラット新生仔の培養心室筋細胞の細胞外電位測定法を用いて、自発的な活動電位や電気刺激で誘発される活動電位変化を測定する系を立ち上げた。この測定システムを用いて、これまでHERGを抑制することが報告されているテルフェナジンやリチウムが心室筋のAPDを延長させることを明らかにした。この結果は、新生仔の培養心室筋細胞の電気的活動においても、HERGがAPDの時間的制御に重要な役割を果たしていることを明らかにするものである。高濃度のアドリアマイシンは、培養心室筋細胞のAPD延長を引き起こした。アドリアマイシンによる心毒性は、主にミトコンドリアからの活性酸素生成に依存することがわかっている。さらに、HERGは活性酸素によってメチオニン残基の酸化修飾を受け、機能抑制を引き起こすことも報

告されている。アドリアマイシンによるミトコンドリアからの活性酸素生成が HERG チャネルの不活性化を引き起こし、心室筋の APD 延長を引き起こすという仮説が考えられる。今後、アドリアマイシンの HERG 構造変化や APD 延長作用に対する活性酸素依存性を検討することで、アドリアマイシンによる不整脈誘発作用の分子メカニズムを解明することが可能となろう。また、心室筋における APD 延長は、心電図上の QT 区間の延長を反映することから、培養心筋細胞を用いた活動電位持続時間測定系もまた不整脈誘発薬剤のスクリーニングに有効な手法になりうると考えられる。電極付培養ディッシュを用いたスクリーニング系は、HERG の FRET システムに比べてコスト上の問題が大きいものの、薬剤のもつ不整脈誘発作用を HERG チャネル分子の構造変化のみならず、ネイティブな心室筋細胞の自発性の活動電位に与える効果の両方で評価することによって、より正確に評価することが可能になると考えている。特に、第二次世界大戦後、感染症に対する抗生物質をはじめとする多くの薬剤が治療に使われるようになった。治療に用いられる薬剤の数が増加するにつれ、薬剤によって引き起こされる副作用も頻度を増してきた。近年薬剤の投与により、心臓の再分極過程を表す心電図の QT 間隔を延長させる多形性の心室頻拍を示す症例が注目されてきた。理由は心室頻拍が心室細動に移行し死につながる病態であると認識されるようになったこと、また心臓に作用する薬剤でなくても QT 間隔を延長させ心室頻拍から心室細動を経て突然死を引き起こすことからである。これらにより、開発の際に薬剤が薬剤誘起性の不整脈を引き起こすかどうか調べる必要性が認識されるようになった。この目的のために、*in vitro* および *in vivo* のスクリーニング系が開発されてきた。しかし、ラットなどの動物を使ったスクリーニングは、ヒトと心臓の再分極過程が異なるため、得られた結果をそのまま適用できないという問題があること、サルやイヌなどを使ったスクリーニングは不整脈の出現が心拍数に依存するという心拍数の問題があること、あるいはこれらの動物を入手する困難さなどから、いずれもベストの方法とはいえない。ヒトの遺伝子を使った場合も定量性の点で問題があるとされている。本研究は、個人差の遺伝情報をスクリーニング系に取り込むことのできる評価系である。すなわち、薬剤によって引き起こされる不整脈の出現をスクリーニングする方法であると共に、個人の遺伝情報を用いる副作用の軽減へ向けた一歩となる評価法でもある。遺伝情報の違いによって薬剤誘起性不整脈の出現頻度が異なる可能性を検

討するために、HERG の SNP としてすでに報告されている一塩基置換をデータベースより得て、CFP と YFP をすでに導入しているキメラ HERG に変異を導入する。このチャンネルは、HERG に作用する薬剤による不整脈の誘起、すなわち薬剤による副作用発現の個人差を反映するはずである。SNP の変異を導入した変異型キメラ HERG を用いて、さまざまな薬剤を作用させ FRET がどのように影響を受けるか検討する。薬剤により不整脈が生じる時の特徴的な変化が観察されることを SNP の変異を導入した変異型キメラ HERG にて電気生理学的に確認する。これにより、特定の遺伝子型を持つヒトには、どのような薬剤を用いるべきか明らかになると期待される。

E. 結論

本年度は、FRET システム確立のために必要なキメラ HERG タンパクの作成を行った。また、これらキメラ HERG は形質膜に発現すること、および野生型 HERG と同様のチャンネル特性を保持していることを明らかにし、FRET 解析可能なコンストラクトであることがわかった。本システムの開発は、ただ動物を使わないスクリーニングの代替法の確立のみならず、薬剤による副作用を軽減するという患者への直接的な効果、新規薬剤を開発する際のスクリーニングコストを下げる効果、あるいは副作用により生じる個人の社会活動の喪失からくる社会的生産性の低下を防ぐ効果といった成果につながると期待できる。また、FRET 実験系の立ち上げと並行して、ネイティブなラット新生仔心室筋の初代培養細胞の活動電位測定系を立ち上げることに成功した。新生仔の心室筋細胞においても、これまでに HERG チャネル抑制作用があると報告されているいくつかの薬剤が APD を延長させることを示した。電極付培養ディッシュを用いたネイティブ心筋細胞の活動電位測定系は、コストがかかることや、ネイティブな細胞の準備に技術を要するなど、実用化までにいくつかの問題を抱えているものの、不整脈誘発薬剤のスクリーニングとしては有用なシステムとなりうる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- な し
- 2. 実用新案登録
- な し
- 3. その他
- な し