

学 位 論 文 題 名

心筋 Na チャネルのフィルター領域はイオン選択性と ともに抗不整脈薬の薬物動態もコントロールする

－特発性心室細動変異チャネルを用いた解析－

学位論文内容の要旨

【はじめに】膜電位依存性 Na チャネルは脱分極による活性化とそれに引き続く不活性化という開閉機構（ゲート機構）によってイオンの通過がコントロールされている。I 群抗不整脈薬は Na チャネルに結合しこれを遮断する薬剤であるが、活性化チャネルよりも不活性化チャネルに対する親和性が高い。それは Na チャネル遮断薬の薬効が薬剤感受性を決定する「チャネルの分子構造」よりも、むしろ薬剤そのものの特性である「ゲート依存性」に由来するためであると考えられている。しかし最近、「Na チャネルの通過孔に存在するイオン選択フィルターと呼ばれる部位は、Na チャネル遮断薬が結合部位へアクセスする過程を規定する」という報告がなされた。この仮説を検証するために、我々はイオン選択フィルターに隣接する部位に見出された心筋 Na チャネル遺伝子(*SCN5A*)変異 S1710L を用いて、Na チャネル遮断薬の分子薬理学的機構を検討した。この変異は心室細動によって突然死をきたす特発性心室細動（Brugada 症候群）に見出された変異である。Brugada 症候群では、Na チャネル遮断薬の投与によって右側胸部誘導の特徴的な ST 上昇の増悪や不整脈発生を来たすが、その機序として心筋 Na チャネル不活性化の亢進とそれによる二次的な薬剤感受性の亢進が唱えられている。我々は S1710L の不活性化が非常に亢進していることをすでに見出しており、もし Na チャネル遮断薬の薬効がゲート機構だけで規定されていれば、強力な遮断効果が観察されると推測される。

【方法・結果】S1710L 及び正常 (WT) の心筋 Na チャネルを培養細胞に発現させて、ホールセルパッチクランプ法により Na 電流を測定した。単回の脱分極刺激で得られるブロック（トニックブロック; TB）は、静止状態において不活性化しているチャネルの割合を反映するが、保持電位-120 mV で測定したメキシレチン(50 μ M)による TB は S1710L で有意に亢進していた。これは過分極側に大きく偏位した S1710L チャネルの不活性化膜電位依存性と一致する所見である。不活性化の膜電位依存性から、保持電位を-150 mV と深くすると WT と S1710L の不活性化チャネルの割合はほぼ同程度（約 1%）になるため、S1710L と WT の差は小さくな

ることが推測されたが、-150 mVにおいてもメキシレチン(100 μ M)による TB は S1710L で亢進していた。これらの結果は、S1710L の TB 亢進が変異によって生じたゲート機構の変化のみでは説明できないことを示唆している。一方、メキシレチン(50 μ M)における頻度依存性ブロック (use-dependent block; UBD) は S1710L の方が WT よりも逆に減弱しており、メキシレチンによるブロックからの回復も S1710L で亢進していた(50%回復までの時間; WT=601 $\pm$ 22 ms, S1710L=176 $\pm$ 9 ms)。さらに不活性化チャネルに対する親和性も S1710L で低下していた(解離定数: KI; WT=3.4 $\pm$ 0.9 μ M, S1710L=13.8 $\pm$ 1.5 μ M)。このことから、S1710L チャネルでは不活性化が亢進しているものの、必ずしもそれがメキシレチン感受性の増強につながっておらず、薬物結合部位からの解離や細胞外への薬物移動が促進している可能性が考えられた。一般に Na チャネル遮断薬が細胞外から細胞内の結合部位に至るに経路としては、チャネル孔を介する親水性経路と細胞膜を介する疎水性の経路があると考えられ、S1710L 変異によるチャネル孔(親水性経路)を介した薬物動態の変化を検討するために、細胞膜を通過しないリドカイン誘導体 QX314 を用いた検討を行った。細胞外に投与された QX314(100 μ M)による TB は、メキシレチンと同様に S1710L で亢進していた(WT= 4.1 $\pm$ 1.8%, S1710L= 19.6 $\pm$ 4.1%)。また、細胞内に投与した QX314(100 μ M)によってもたらされたブロックからの回復は S1710L で亢進していた(時定数 τ : WT= 905.4 $\pm$ 212.4 s, S1710L= 207.4 $\pm$ 22.7 s)。これにより、S1710L では細胞外からチャネル孔を介する受容体へのアクセスが容易になっていること、受容体からチャネル孔を介した薬物解離が亢進していることが示唆された。S1710 がイオン通過孔に面してイオン選択性を変化させているか否かを見るために、K⁺と Na⁺の透過性の比率(PK/PNa)を測定した。S1710L の PK/PNa は WT の約 1.9 倍となっており、変異によって Na⁺のみならず K⁺も通し易い性質をもつことが示された。これらの結果から、S1710 はチャネル孔の親水性経路に面して存在しており、S1710L 変異によってチャネル孔の構造変化が Na チャネル遮断薬の親和性とイオン選択性の変化をもたらすものと考えられた。

【考察】Brugada 症候群の病態は、Na チャネルの活性化の亢進による Na 電流の減少であり、Na チャネル遮断薬による ST 上昇の増悪の機序は変異がもたらすゲート機構の変化による二次的な薬物親和性の亢進であると理解されている。しかし、今回我々が検討した S1710L 変異チャネルは、亢進した不活性化と一致して強い TB を示すものの、UBD は逆に減弱しており、不活性化チャネルに対する薬剤親和性も低下していた。これらの事実は、I 群抗不整脈薬の薬効を規定する主たるメカニズムとして考えられている「Na チャネルのゲート機構」だけでは説明することができない。QX314 を用いた実験からは、むしろ S1710L 変異によってもたらされたイオン選択フィルターの構造変化が薬物のアクセス経路を変化させることにより薬物の解離が促進し、それが UDB の減弱や薬剤親和性の低下につながっていると考えられる。Na チャネルのイオン選択性フィルター近傍の構造がイオン選択性のみならず薬剤の動態や感受性を規定するということが、基礎研究レベルの事実だけではなく、臨床的な病態にも関与していることが自然発生の心筋 Na チャネル変異を用いた本研究によって明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

心筋 Na チャネルのフィルター領域はイオン選択性と ともに抗不整脈薬の薬物動態もコントロールする

－特発性心室細動変異チャネルを用いた解析－

膜電位依存性 Na チャネルは静止、活性化および不活性化状態という開閉（ゲート）機構によりイオンの通過をコントロールしている。多くの Na チャネル遮断薬は不活性化チャネルに対する親和性が高く、これは受容体との親和性がチャネルの状態によって変化すること（ゲート依存性）に由来している。特発性心室細動の一群である Brugada 症候群(BS)は心筋 Na チャネル α サブユニット遺伝子(SCN5A)の変異を原因とするが、Na チャネル遮断薬の投与により特徴的な ST 上昇の増悪や不整脈発生などの薬剤感受性の亢進を示し、その機序は変異チャネルの不活性化亢進による薬物親和性の亢進であるとされている。また近年、「Na チャネルのイオン選択フィルターは薬剤が結合部位へアクセスする過程を規定している」という説が提唱された。本研究では、特発性心室細動症例の SCN5A 内イオン選択フィルター隣接部位に同定された S1710L 変異チャネルを用いて、薬理作用の分子学的機構を検討した。この変異チャネルは BS と同様な不活性化亢進を示すことから、薬物親和性がゲート機構のみに規定されるならば、薬物感受性の亢進が予想される。S1710L 及び正常 (WT)の心筋 Na チャネルを培養細胞に発現させて、ホールセルパッチクランプ法による Na 電流を測定した。S1710L の不活性化膜電位依存性は WT よりも過分極側に偏位していたが、これに一致して、保持電位 -120 mV におけるメキシレチン(Mex)によるトニックブロック(TB)は S1710L で亢進していた。また、不活性化チャネルの割合が WT、S1710L とともに約 1%である保持電位 -150 mV においても Mex の TB は S1710L で亢進しており、両チャネルの TB の違いはゲート機構の変化のみでは説明できないと考えられた。一方、Mex による使用頻度依存性ブロック (UDB)は S1710L で WT よりも逆に減弱しており、また Mex によるブロックからの回復

は S1710L で亢進し、不活性化チャネルに対する Mex の親和性は S1710L で低下していた。次に、細胞膜不透過のリドカイン誘導体 QX314 を用いて、親水性経路であるチャネル孔のみを介する薬物動態を検討した。細胞外に投与した QX314 による TB は S1710L で亢進しており、細胞内に投与した QX314 によるブロックからの回復は S1710L で亢進していた。このことから、S1710L では細胞外からチャネル孔を介する受容体へのアクセスが容易となり、さらに受容体からチャネル孔を介した薬物解離が容易となると考えられた。さらに、イオン選択性の指標である K^+ と Na^+ の透過性の比率 (PK/PNa) を検討したところ、S1710L の PK/PNa は WT の 1.9 倍であり、S1710L がイオンの通過経路であるチャネル孔の構造変化を来たしてイオン選択性と薬剤動態の変化をもたらすものと考えられた。BS の病態は変異 Na チャネルの不活性化亢進による Na 電流の減少であり、ゲート機構の変化により Na チャネル遮断薬の感受性が亢進していると考えられている。しかし、S1710L は亢進した不活性化に一致して強い TB を示すが、UDB は逆に弱く、不活性化チャネルに対する薬剤親和性も低下していた。これらの結果は Na チャネル遮断薬の薬効を規定するメカニズムとして考えられている「ゲート機構による変化」だけでは説明できない。QX314 を用いた検討とイオン選択性の変化から、イオン選択フィルター近傍の構造変化が薬物の動態を亢進させて、TB の亢進や UDB の減少、薬剤親和性の低下をもたらすものと考えられた。Na チャネルのイオン選択性フィルター近傍の構造がイオン選択性のみならず薬物動態や感受性に影響し、臨床的な病態にも関与していることが自然発生の心筋 Na チャネル変異をもちいた本研究によって明らかになった。

口頭発表に際し、佐々木教授から他の変異による特発性心室細動症例に対する Na チャネル遮断薬の影響、薬物治療の可能性についての質問がなされた。次いで、丸藤教授から検討に用いた薬剤の性質や、他の薬剤で予想される結果、構造変化以外の機序の可能性についての質問がなされた。最後に北畠教授から臨床的な考察、新たな薬剤の開発についての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、適切な回答を行った。この論文は、イオン選択性フィルター領域が及ぼす薬物動態への影響を明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。