心房細動の病態と治療の進歩

2. ヒト心房活動電位モデルを用いた各種 I_{Kr} 遮断薬と I_{Kur} 遮断薬による活動電位延長作用の検討

村上慎吾^{*1, 2} 辻前賢司^{*1, 3} 鈴木慎悟^{*1, 4} 倉智嘉久^{*1, 2}

心房細動(AF)に対する抗不整脈薬の有効な薬物像を探るためにヒト心房活動電位モデルを用い、遅延整流 K^+ 電流の速い成分(I_{Kr})の遮断薬と非常に速い活性化過程をもつ遅延整流 K^+ 電流(I_{Kur})の遮断薬の遮断様式が、どのように心房の活動電位延長作用に対して影響をもつかを考察した。まず最初に、三つの薬物(ドフェチリド、キニジン、ベスナリノン)の特徴的な I_{Kr} 遮断様式がもつ心房活動電位延長作用の刺激頻度依存性について、Courtemanche らによるヒト心房活動電位モデルを用いて検討を行なった。オリジナルのモデルの遅延整流 K^+ 電流の遅い成分(I_{Ks})に遅い活性化成分を導入すると、ドフェチリド、キニジンの逆頻度依存性が再現された。また、ベスナリノンは明確な逆頻度依存性を示さず、実験結果と一致した。慢性AFモデルを使った I_{Kur} 遮断特性の検討では、電位時間依存性の場合に遮断進行が速いほど活動電位延長作用が強くなり、活動電位延長作用は遮断様式に依存した。実験での薬物効果の確認では短いテストパルスが必要とわかり、薬物作用の検討にモデルの使用が有効であることが示された。

(心電図, 2009 ; 29 : 126 ~ 132)

I. はじめに

心房細動(AF)が発生すると、心房内で血液が滞留し、血栓が生じて、重篤な脳梗塞を引き起こす。また、心不全重症度との関連も指摘され、年齢と

もに有病率も高まるため、AFは我が国のような高齢化社会において重点的な対策を要する疾患である。しかし、AFの治療を目的とした既存の抗不整脈薬はその心室に対する副作用のため、使用に制限が設けられている。そのため、AFの治療には、従来と異なる機序の、重大な副作用をもたない新たな抗不整脈薬が必要とされている。

今回の報告では、新たな抗不整脈薬の機序を探るため、シミュレーションにより遅延整流 K^+ 電流の速い成分(I_{Kr} ; rapidly activating K^+ current)の遮断薬と非常に速い活性化過程をもつ遅延整流 K^+ 電流(I_{Kur} ; ultra-rapidly activating K^+ current)の遮断薬の理想的な特性を探った。前半では、発現系で計

Keywords

- 心房細動
- 抗不整脈薬
- シミュレーション
- I_{Kr}
- I_{Kur}

*1 大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座(分子・細胞薬理学)
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

*2 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

*3 大塚製薬株式会社探索第一研究所

*4 国立循環器病センター

Recent advances in the research and treatment of atrial fibrillation

In silico study on the effects of I_{Kr} and I_{Kur} block kinetics on prolongation of human action potential

Shingo Murakami, Kenji Tsujimae, Shingo Suzuki, Yoshihisa Kurachi

図1 電位時間依存性 I_{Kr} 遮断のモデル化

キニジン (A, D), ベスナリノン (B, E), ドフェチリド (C) の電位 (A-C) と時間 (D-E) に依存した I_{Kr} 遮断。シンボルは文献3)と文献4)からの実験結果、実線は今回作成したモデルによる計算結果。

〔文献1)より引用改変〕

測したドフェチリド、キニジン、ベスナリノンの I_{Kr} 遮断特性をモデル化し、ヒト心房筋細胞モデルに適用することで、 I_{Kr} 遮断特性の違いが活動電位延長作用の頻度依存性にどのように影響を与えるかを考察した¹⁾。後半では、近年AFを対象とした抗不整脈薬の機序として注目を集めている I_{Kur} 遮断薬の理想的な特性の考察を行った²⁾。

II. I_{Kr} 遮断薬による活動電位延長

遅延整流性 K^+ 電流は活動電位の2相、3相に寄与し、活動電位長を制御することが知られている。特に I_{Kr} と遅延整流 K^+ 電流の遅い成分 (I_{Ks} ; slowly activating K^+ current) は遅延整流性 K^+ 電流の主な構成成分であり、ヒトを含む様々な哺乳類の心臓に存在する。多数の薬物が I_{Kr} を遮断することで、QT 間隔を延長し、torsades de pointes (TdP) を含む不整脈を誘発することが知られている。 I_{Kr} を選択的に遮断するドフェチリドやE-4031のような薬物は徐脈

時に活動電位を大きく延長する。この特性は逆頻度依存性とよばれ、徐脈時の過度の活動電位延長とTdPを誘発する原因になると考えられており、薬物における催不整脈特性の指標の一つとされている。ドフェチリドやE-4031は電位時間非依存的に I_{Kr} を遮断する。われわれは、以前の研究でIa群のキニジンや強心剤のベスナリノンが、発現系でのHERG (human ether-a-go-go) 電流を電位時間依存的に遮断することを明らかにした^{3), 4)}。その結果、 I_{Kr} 遮断薬は少なくとも三つの分類、①電位時間非依存性 I_{Kr} 遮断〔(例)ドフェチリド, E4031〕, ②速い電位時間依存性 I_{Kr} 遮断〔(例)キニジン〕, ③遅い電位時間依存性 I_{Kr} 遮断〔(例)ベスナリノン〕に分けられることがわかった(図1参照)。キニジンとベスナリノンはともに細胞膜電位が脱分極するほど I_{Kr} を強く遮断するが、 I_{Kr} 遮断の進行についてはキニジンのほうが速いことがわかった(図1D, E)。ドフェチリドとキニジンは逆頻度依存性をもつ、ベスナリノンはもたな

い、ドフェチリドとキニジンはTdPを起こすという報告があるが、ベスナリノンにはいずれの報告もない、などの背景にこのような薬物動態の違いが存在する可能性がある。

選択的 I_{Kr} 遮断薬であるドフェチリドはAFを適応疾患として米国で承認されており、そのような観点から、心房における I_{Kr} 遮断薬の作用特性は重要であると考えられる。そこでわれわれは、前述の三つの I_{Kr} 遮断薬による異なる作用特性をヒト心房モデルに導入し、 I_{Kr} 遮断薬ごとに異なる活動電位延長作用と逆頻度依存性の機序を考察した。

まず最初に、Courtemancheらによるヒト心房筋細胞モデル⁵⁾の I_{Ks} に遅い活性化成分を導入し、ドフェチリドによる逆頻度依存性を再現できるようにした。このヒト心房筋細胞モデルは、膜容量、膜抵抗などの電気的特性や、Hodgkin-Huxley型の方程式によって計算される12種のイオン電流(I_{Na} , I_{K1} , I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks} , $I_{Ca,L}$, $I_{p,Ca}$, I_{NaK} , I_{NaCa} , $I_{h,Na}$, $I_{h,Ca}$)により構成される。さらに、以前の研究で明らかにしたドフェチリド、キニジン、ベスナリノンの実験データ^{3), 4)}から、ドフェチリド型、キニジン型、ベスナリノン型の I_{Kr} 遮断モデルを作成した(図1, 実線)。電位時間非依存性の遮断についてはドフェチリド型と名づけ(図1C)、この研究では10%まで電流量を遮断した。 I_{Ks} 電流モデルに遅い活性化成分を導入すると、実験的な知見と同様にドフェチリド型の I_{Kr} 遮断により活動電位延長は逆頻度依存性を示した(図2)。一方、電位時間依存性遮断を示すキニジン型、ドフェチリド型 I_{Kr} 遮断モデルでシミュレーションを行ったところ、実験結果と同様に、キニジン型は逆頻度依存性を示したが、ベスナリノン型は明確な逆頻度依存性を示さなかった。

次に、逆頻度依存性が異なる機序の解析を行った(図3)。静止電位や活動電位の大きさに影響を与えることなく、刺激周期が500 msec, 1,000 msec, 1,500 msecいずれの場合でも全ての薬物型 I_{Kr} 遮断で活動電位が延長した。刺激周期が長くなるにつれ、キニジン型 I_{Kr} 遮断やドフェチリド型 I_{Kr} 遮断はさら

図2 I_{Kr} 遮断によるヒト心房筋細胞モデルの活動電位の延長

I_{Ks} を修正したヒト心房筋細胞モデルを使用し、刺激周期を変化させ、各 I_{Kr} 遮断型下での-70 mVによる活動電位長を計算した。
〔文献1)より引用改変〕

に活動電位を延長する(逆頻度依存性の活動電位延長)が、ベスナリノン型 I_{Kr} 遮断では延長効果が弱い。この違いは I_{Kr} 遮断挙動の違いによって説明できる。ドフェチリド型の I_{Kr} 遮断は刺激周期にかかわらず常に一定であるが、キニジン型やベスナリノン型では電位に依存して I_{Kr} 遮断が変化する。活動電位発生に伴う脱分極により I_{Kr} 遮断は強くなり、活動電位終了後の静止膜電位で I_{Kr} 遮断は次の活動電位の直前まで回復する。刺激周期が延びるにつれ、キニジン型とベスナリノン型の I_{Kr} 遮断の回復の度合いは大きくなる。そのため、活動電位が発生した時点での I_{Kr} 遮断は刺激周期に依存している。しかし、キニジン型 I_{Kr} 遮断に関しては、活動電位中の遮断の進行が速いため、刺激周期に関係なく活動電位中に強い I_{Kr} 遮断が実現される。そのため、キニジン型 I_{Kr} 遮断はドフェチリド型と同様に逆頻度依存性の活動電位延長を示すことになった。一方、ベスナリノン型 I_{Kr} 遮断では、活動電位中の I_{Kr} 遮断は刺激周期に依存し、刺激周期が延長するにつれ I_{Kr} 遮断効果が弱くなり、逆頻度依存性が低くなった。以上のような解析を実験的に行

図3
異なる刺激周期での I_{Kr} 遮断効果
異なる刺激周期でのコントロールおよび各種 I_{Kr} 遮断型下での活動電位(上)と I_{Kr} 遮断の時間変化。
〔文献1)より引用改変〕

うことは不可能であるため、こうした作用機序の解明を行えることは、モデル研究の大きな利点であると考えられる。

Ⅲ. I_{Kur} 遮断薬による活動電位延長

近年、AFを対象とする新規抗不整脈薬の機序として、 I_{Kur} が注目を集めている。 I_{Kur} は $Kv1.5$ で構成されるチャネル電流で、ヒト心房筋細胞において活動電位の再分極に寄与する。実験的に I_{Kur} はヒト心室においてほとんど検出されないため、選択的 I_{Kur} 遮断薬はほかの K^+ チャネル遮断薬と異なり、心室においてTdPのような不整脈を起こさないと期待されている。そのため、現在、多数の I_{Kur} 遮断薬が開発中である。しかし、これらの I_{Kur} 遮断薬は、不応期延長、頻度依存性といった面で、抗不整脈薬として多様な特性をもっている。この特性の違いによる理由の一つとして、 I_{Kur} 遮断薬は実験的に様々な電位時間依存性を示すことがあげられ、各 I_{Kur} 遮断薬が活動電位に対して現実には異なる作用をもつ可能性が考えられる。

異なる様々な特性のなかから、 I_{Kur} 遮断薬が抗不整脈薬としてどのような特性をもつべきかを考察するため、同じヒト心房筋細胞モデルに電位時間依存性の I_{Kur} 遮断を導入した。この検討では電気的リモデリングを経たヒト心房筋細胞モデルも使用した。AFでは、慢性的な細動が心房の電気生理的性質に

変化を生じさせる、いわゆる電気的リモデリングとよばれる現象が問題となっている。この電気的リモデリングにより活動電位と不応期が短縮し、AFが発生・持続されやすくなる。この検討では、慢性AFのヒト心房筋細胞モデルで電位時間依存性の I_{Kur} 遮断薬の活動電位延長効果をシミュレーションした。慢性AFにおける電気的リモデリングは、実験的な知見に基づいて各電流の最大コンダクタンスを変化させることで実現した。

通常のヒト心房筋細胞と電気的リモデリングを経たヒト心房筋細胞で検討を行うために、各モデルの I_{Kur} を電位時間非依存的に遮断した(図4)。 I_{Kur} 遮断に伴い、通常的心房筋細胞モデルの活動電位では2相のふくらみが脱分極側に増幅したが、 -70 mVで計算された活動電位長に大きな変化は生じなかった(図4 Normal)。一方、電気的リモデリングを考慮した心房筋細胞モデルでは活動電位が延長した。これは実験による知見や過去のモデル研究と一致し⁶⁾、 I_{Kur} 遮断薬が慢性AFを対象とした抗不整脈薬として高い可能性をもっていることを示している。以後、電気的リモデリングを経た心房筋細胞モデルのみを対象に解析を行った。

次に、同じモデルを使用し、電位時間依存性 I_{Kur} 遮断を導入した(図5)。 I_{Kur} 遮断の大きさを90%に固定し、 I_{Kur} 遮断の立ち上がりの時間定数を変化させたところ、最も小さい時間定数(=速い遮断の立ち上

図4 電位時間非依存性 I_{Kur} 遮断による活動電位の延長作用

A: I_{Kur} の最大コンダクタンスを段階的に減らしたときの通常のヒト心房筋細胞モデル (Normal) と、電氣的リモデリングを経たヒト心房筋細胞モデル (AF) での活動電位の変化。

B: 活動電位長と I_{Kur} 遮断強度との相関関係。

[文献2) より引用改変]

図5 電位時間依存性 I_{Kur} 遮断による電氣的リモデリングを経たヒト心房筋細胞モデルでの活動電位の延長作用

A: I_{Kur} 遮断の立ち上がりの速さ (左より時間定数 5 msec, 10 msec, 20 msec, 40 msec, 80 msec, 160 msec) が活動電位長に与える影響。太線はコントロール、点線は電位時間非依存性 I_{Kur} 遮断の結果。

B: 活動電位長と I_{Kur} 遮断の立ち上がりの時間定数との関係。

C: 立ち上がりの時間定数を 10 msec と 160 msec に設定したときの、 I_{Kur} 遮断の回復の時間定数と活動電位長の関係。

[文献2) より引用改変]

がり)にて活動電位は最も延長した(図5A, B)。一方、立ち上がりの時間定数を 10 msec に固定し、回復の時間定数を変化させた場合には、活動電位長に対する影響がほとんど認められなかった(図5C)。しかし、立ち上がりを遅く(時間定数 160 msec)設定し、回復を遅く(時間定数を大きく)するに従い活動

電位が延長した。これらの特性の違いは I_{Kr} 遮断と同様に、遮断の進行、回復によって説明することができる(詳細は文献2参照)。

では、このような特性をもった薬物をスクリーニングするにはどのような手法を用いるべきであろうか? 例えば、*in vitro* の K^+ チャンネル遮断薬のスク

図6 ボルテージクランプにおける I_{Kur} シミュレーション

A: -80 mV $\sim$ 0 mVパルスを加えたときの電位時間依存性 I_{Kur} 遮断下での I_{Kur} 電流. 下から上へ, 電位時間非依存 I_{Kur} 遮断, 電位時間依存 I_{Kur} 遮断(時間定数5 msec, 10 msec, 20 msec, 40 msec, 80 msec, 160 msec), コントロール.
B: パルス終了時の I_{Kur} 電流量と予測される活動電位延長の関係. [文献2)より引用改変]

リーニングの場合, イオンチャネル発現系を用いたパッチクランプ法での遮断効果の確認が行われている. しかし, 電位固定パルスを用いたパッチクランプでの電流遮断の挙動と, 実際の活動電位での挙動は大きく異なっている可能性が高い. そこでわれわれは, どのようなパッチクランプのプロトコルが活動電位中の I_{Kur} 遮断薬の効果を探るのに適しているかを考察した. 例えば, 図6は200 msecという一般によく使われる長さのパルス長を利用した I_{Kur} 電流のシミュレーション結果である. 立ち上がりの時間定数を変えてシミュレーションしたところ, I_{Kur} 遮断がパルス中にほぼ進行し終わることがわかる(図6A左). そのため, このパルス長とパルス終了時の電流では, I_{Kur} 遮断の立ち上がりの速さの影響を推測することが難しいとわかる. さらに, 立ち上がりの時間定数を変化させて活動電位のシミュレーションを行い, 図6B(四角)のように200 msecのパルス終了時の電流と活動電位延長の関係をグラフにすると, 相関関係が取りにくく, パルス終了時の電流から活動電位延長効果が推量できないことがわかる. これに対して, 10 msecという短いパルス長を用いたプロトコルのシミュレーションでは, 遮断の立ち上がりステップ終了時の電流で捉えることができ(図6A右), パルス終了時の電流から活動電位延長の度合いが

予測可能である. これらの結果は, ステップの長さを注意深く選ぶことにより電位時間依存性遮断の薬物効果を予測できることを示唆している. 例えば, 遮断の回復についてもヒト心房筋細胞の活動電位長に近い長さのパルスを繰り返し加えた後に, 短いパルスを加えることにより予測が可能になる²⁾.

IV. 考 察

本研究では以下のようなことが明らかになった. ① I_{Ks} に遅い活性化成分を導入することで I_{Kr} 遮断時の逆頻度依存性を再現できること, ②異なる薬物動態をもつ三つの薬物型 I_{Kr} 遮断の効果の説明できること, ③ I_{Kur} 遮断薬の効果を検討する際には電位時間依存性を考慮する必要があること, ④そのスクリーニングにはパルス幅の短いプロトコルが有効であること.

現在の薬物開発における大きな課題の一つとして, 多数の薬物が心筋の I_{Kr} を遮断し, 逆頻度依存的に活動電位を延長するため, TdPのような不整脈を引き起こすことがあげられる. この副作用のために多数の薬物が市場から撤退もしくは使用が制限され, ほかに多数の潜在的な候補薬物が, 市場に出る前に開発を止められている. こうしたリスクの評価・予測方法の一つとして本研究で用いたようなモデル研究があげられる.

本研究ではCourtemancheらによるヒト心房筋細胞モデルを使用した。彼らのオリジナルのモデルでは I_{Kr} 遮断下での逆頻度依存性が再現できない。そこでわれわれは、 I_{Ks} に修正を加えることで逆頻度依存性を再現できるように改良した。さらに、発現系を用いた研究において、 I_{Ks} にはさらに遅い成分が存在する可能性が示唆されている。このような遅い I_{Ks} 成分をモデルに取り入れれば、さらに逆頻度依存性が明確になると考えられ、逆頻度依存性の機序という観点からも、 I_{Ks} のさらなる研究の重要性があると推測される。

慢性AF患者からの単離心房筋細胞の活動電位長は、通常のものとは比べて短いことが知られている。これは I_{CaL} 、 I_{to} 、 I_{Kur} 、 I_{K1} などの量に変化する電気的リモデリングによる。Courtemancheらはこの変化をモデルに導入することで、慢性AF患者での薬物効果の可能性を考察した⁶⁾。本研究ではさらに I_{Kur} 遮断の電位時間依存性を考慮することで、理想的な薬物像とそのスクリーニング方法を検討した。考察により、慢性のAFに有効な I_{Kur} 遮断は速い立ち上がり、もしくは、遅い回復という特性をもっていると予測された。こうした観点は今まで考慮されていなかったが、実際に有効であるとされる I_{Kur} 遮断薬（例えばAVE0118など）はこの予測されたプロファイルに一致している。さらに今回の研究では長いパルス長によると I_{Kur} 遮断薬の不整脈薬としての特性を捉えきれない可能性を示唆したが、従来の*in vitro*の実験では、 I_{Kur} 遮断を強調するために長いパルス長が使用されてきた。そのため、過去のスクリーニングが効率的でなかった可能性がある。

ここで使われているように、*in silico*のアプローチを使うことで、*in vitro*の結果を再現できるだけでなく、予測や効率化さえも可能になる。実際問題として*in silico*のアプローチが*in vitro*や*in vivo*をすべて代用するということは考えられにくいだが、目的とする効果をもつ薬物の検証のために必要とされる実験の数を減らすことができると考えられる。例えば、単離ヒト心房筋細胞の入手は非常に難しく、*in*

*vitro*に用いることができるサンプルは量・質ともに限られている。慢性AFの単離ヒト心房筋細胞となると入手の状況はさらに悪くなる。そういった意味で、今回予測されたプロファイルに属していない薬物を排除することにより、薬物開発の効率化が図れるのではないかと考えられる。

V. おわりに

本研究はヒト心房筋細胞モデルを使用したものであるが、現在ヒト心房以外にも、各種動物の心臓のいろいろな部位を用いた心筋細胞モデルが存在している。完璧なモデルは存在しないが、目的に適したモデルを適切に選ぶことによって、本研究のように再現のみならず、薬物像の予測を行い、開発の効率化を図ることができると考えられる。

〔文 献〕

- 1) Tsujimae K, Suzuki S, Murakami S, Kurachi Y : Frequency-dependent effects of various IKr blockers on cardiac action potential duration in a human atrial model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007 ; 293 : H660~H669
- 2) Tsujimae K, Murakami S, Kurachi Y : In silico study on the effects of IKur block kinetics on prolongation of human action potential after atrial fibrillation-induced electrical remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008 ; 294 : H793~H800
- 3) Katayama Y, Fujita A, Ohe T, Findlay I, Kurachi Y : Inhibitory effects of vesnarinone on cloned cardiac delayed rectifier K⁺ channels expressed in a mammalian cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000 ; 294 : 339~346
- 4) Tsujimae K, Suzuki S, Yamada M, Kurachi Y : Comparison of kinetic properties of quinidine and dofetilide block of HERG channels. *Eur J Pharmacol*, 2004 ; 493 : 29~40
- 5) Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S : Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties : insights from a mathematical model. *Am J Physiol*, 1998 ; 275 : H301~H321
- 6) Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S : Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling : insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res*, 1999 ; 42 : 477~489