

ジーンターゲティングマウスを用いた心筋
ATP 感受性 K^+ チャネルの個体機能解析

(研究課題番号 11670081)

平成 11～平成 12 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)(2))
研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 中谷晴昭
(千葉大学医学部教授)

はしがき

ATP 感受性 K⁺ チャンネルは 1983 年、野間によってはじめて心筋細胞において見いだされ、その研究が緒につくこととなった。続いて、このチャンネルが膵臓ランゲルハンス島β細胞にも存在し、血糖値の変化によるインスリン分泌調節において大きな役割を果たすことが明らかとなり、1980 年代の後半には、sulfonyleurea 系経口抗糖尿病薬がこの ATP 感受性 K⁺ チャンネルを抑制する薬物であることが明らかにされた。同時に、本邦で開発され抗狭心症薬として用いられてきていた nicorandil という薬物が ATP 感受性 K⁺ チャンネルを活性化する薬物、すなわち K⁺ チャンネル開口薬であることが証明された。1980 年代後半から 1990 年代前半にかけて、多くの K⁺ チャンネルのクローニングがなされ、その分子構造が明らかとなった。しかしながら、ATP 感受性 K⁺ チャンネルの分子構造はなかなか同定されなかったが、1995 年、共同研究者である千葉大学の清野教授らのグループが、膜 2 回貫通型のポア部分を形成する蛋白 (Kir6.2) に ABC 蛋白の一種である sulfonyleurea 受容体 (SUR) 蛋白を共発現させると、見事に ATP 感受性 K⁺ チャンネルの機能を再現できることを示し、それ以降、ATP 感受性 K⁺ チャンネルに関する研究は大きな進歩を遂げることとなった。その後、千葉大学の三木らが Kir6.2 のジーンターゲティングによってノックアウトマウスの作成にも成功し、各種組織における ATP 感受性 K⁺ チャンネルの役割を検討することが可能となりつつある。

ATP 感受性 K⁺ チャンネルはその発見当時より、心筋細胞の低酸素時あるいは虚血時の活動電位幅短縮に関与すると考えられてきた。心筋虚血時には活動電位幅が短縮し、その結果活動電位プラトー相での Ca⁺⁺ 流入が減少して細胞障害が軽減し、心筋保護的に働くと考えられてきた。すなわち ATP 感受性 K⁺ チャ

ネルの活性化は病態における一種の適応現象と考えられてきた。事実、このチャンネルを活性化する K^+ チャンネル開口薬は虚血心筋保護作用を示すことが多く報告されてきた。しかしながら、最近 K^+ チャンネル開口薬の心筋保護作用は細胞膜に存在する ATP 感受性 K^+ チャンネルではなく、ミトコンドリアに存在するある種の ATP 感受性 K^+ チャンネルが活性化して発現するという仮説も提唱されている。また、心筋に短時間の虚血負荷を与えるとその後の冠動脈閉塞時の心筋梗塞巣が減少するという“ischemic preconditioning”という現象が存在するが、その成立にもミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャンネルの活性化が関与するとされている。そこで本研究では、Kir6.2 ノックアウトマウスを用い、心筋細胞膜に存在する ATP 感受性 K^+ チャンネルの病態生理的役割を明らかにするため本研究を遂行した。

得られた実験成績より、代謝阻害時あるいは K^+ チャンネル開口薬投与時の活動電位短縮には Kir6.2 をポア成分とする心筋細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルの存在が必須であること、ischemic preconditioning の成立にも心筋細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルの活性化が重要であることが明らかとなった。また、虚血・再灌流後の心機能の回復にも心筋細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルが重要な役割を果たしており、その活性化が Ca^{++} 過負荷を軽減させ、再灌流後の心収縮機能回復を増強することが明らかとなった。

本研究の目的の大部分は達成されたと考えているが、ischemic preconditioning の成立におけるミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャンネルはなんら役割を果たしていないのか、あるいはミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャンネルの選択的開口薬とされる diazoxide の虚血心筋保護作用がミトコンドリアあるいは細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルのうち、どちらのチャンネルの活性化を介しているかなどについて現在検討中である。今後、細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネル

ネルの心筋保護効果の細胞内機構、ミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャネルといわれるものの本体、および細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャネルとの関係なども検討しなければならないであろう。本研究が心筋細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャネルの病態生理学的役割の見直しとその再評価、そして新しい心筋保護薬開発などに関連した今後の研究の発展に少しでも寄与出来れば幸いである。

この冊子には本研究の成果のみならず、本研究の背景となった論文あるいは投稿中の論文も含めている。本研究は平成 11 年度および平成 12 年度科学研究補助金により行われたものであり、本助成に心より感謝したい。

研究組織

研究代表者 中谷晴昭（千葉大学・医学部・教授）

研究分担者 清野 進（千葉大学・大学院・医学研究科・教授）

三木隆司（千葉大学・大学院・医学研究科・助手）

本研究を遂行するにあたっては、大学院生鈴木将医師、関根（大本）由樹博士、坂本直哉博士に負うところが多く、また植村展子講師、小倉武彦助手、玉川正次技官、霊園良恵技官、坂下育美教務職員の協力をもって行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

研究経費

平成 11 年度	2,300 千円
平成 12 年度	1,200 千円
計	3,500 千円

研究発表

(1) 学会誌等

A. 雑誌論文

1. Ohmoto-Sekine Y, Uemura H, Tamagawa M, Nakaya H. Inhibitory effects of aprindine on the delayed rectifier K^+ current and the muscarinic acetylcholine receptor-operated K^+ current in guinea-pig atrial cells. *Br J Pharmacol* 126: 751-761, 1999
2. Takahara A, Uneyama H, Sasaki N, Ueda H, Dohmoto H, Shoji M, Hara Y, Nakaya H, Yoshimoto R. Effect of AH-1058, a new antiarrhythmic drug, on experimental arrhythmias and cardiac membrane currents. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 625-632, 1999
3. Ohtani H, Hanada E, Hirota M, Sato H, Kotaki H, Sawada Y, Uemura H, Nakaya H, Iga T. Inhibitory effects of the antihistamines epinastine, terfenadine, and ebastine on potassium currents in rat ventricular myocytes. *J Pharm Pharmacol* 51: 1059-1063, 1999
4. Matsumoto Y, Ogura T, Uemura H, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Histamine H_1 -receptor-mediated modulation of the delayed rectifier K^+ current in guinea-pig atrial cells: opposite effects on I_{Ks} and I_{Kr} . *Br J Pharmacol* 128: 1545-1553, 1999
5. Uemura H, Sakamoto N, Nakaya H. Electropharmacological effects of UK-1745, a novel cardiotonic drug, in guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 383: 361-371, 1999

6. Hirota M, Ohtani H, Hanada E, Sato H, Kotaki H, Uemura H, Nakaya H, Iga T. Influence of extracellular K⁺ concentrations on quinidine-induced K⁺ current inhibition in rat ventricular myocytes. *J Pharm Pharmacol* 52: 99-105, 2000
7. Nakaya H, Furusawa Y, Ogura T, Tamagawa M, Uemura H. Inhibitory effects of JTV-519, a novel cardioprotective drug, on potassium currents and experimental atrial fibrillation in guinea-pig hearts. *Br J Pharmacol* 131: 1363-1372, 2000
8. Nakaya H, Suzuki M, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto Y, Ogura T, Tamagawa M, Furusawa Y, Sakashita I, Suzuki T, Miki T, Seino S. Sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels and cardiovascular function. *Jpn J Electrocardiology* 20: S3-113-119, 2000
9. Suzuki T, Tatsuoka H, Chiba T, Sekikawa T, Nemoto T, Moriya H, Sakurada S, Nakaya H. Beneficial effects of nitric oxide synthase inhibition on the recovery of neurological function after spinal cord injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363: 94-100, 2001
10. Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E, Nakaya H. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Cir Res* 2001 (in press)

B. 和文総説

1. 中谷晴昭. K^+ チャネル遮断薬の展望— I_{Kr} 遮断薬から次世代へ—. 循環器
45 : 227-232, 1999
2. 中谷晴昭、小倉武彦、松本泰典、大本由樹. 不整脈を起こす心臓病の分子
生物学的背景. Therapeutic Research 20: 9-14, 1999
3. 中谷晴昭. 薬物と QT 延長. 日本製薬業協会医薬品評価委員会基礎研究部
会部会通信 19 : 17-61, 2000
4. 中谷晴昭. 21 世紀の抗不整脈薬—新規 K^+ チャネル遮断薬の現状と展望—.
不整脈治療の最前戦—薬物治療と非薬物治療—55:58-64, 2000
5. 中谷晴昭、小倉武彦、古澤良恵、植村展子、大本由樹、玉川正次、渡邊康
秀、原幸男、坂下育美、鈴木俊雄、森 勝巳、小林 智. 抗不整脈薬の K^+ チ
ャネル遮断作用とその電気生理学的意義. 心電図 20 : 195-201, 2000
6. 中谷晴昭. 医学教育のなかの心電図読解. 心電図 20 : 193-194, 2000

C. 単考書

1. Nakaya H. Potassium channel modulation: an antiarrhythmic
pharmacotherapy for the next century. Current aspects of cellular and
subcellular mechanism of drug actions. Edited by Kanno M, Hattori Y.
Hokkaido University School of Medicine Sapporo, Japan pp45-53, 2000

(2) 口頭発表

1. Nakaya H, Mori K, Kobayashi S, Ohmoto Y, Ogura T, Hara Y, Uemura H,

- Tamagawa M, Suzuki T : Effects of bepridil on cardiac K⁺ currents : A comparison with amiodarone. New Strategies for Antiarrhythmic treatment 「抗不整脈療法の新しい潮流」公開研究会 1999年5月 東京
2. Ohmoto Y, Ogura T, Kobayashi S, Uemura H, Tamagawa M, Nakaya H : Inhibitory effects of aprindine on cardiac K⁺ currents : possible mechanism of its efficacy against atrial fibrillation. New Strategies for Antiarrhythmic Treatment 「抗不整脈療法の新しい潮流」公開研究会 1999年5月 東京
3. 鈴木俊雄、関川敏彦、根元哲治、中谷晴昭：ラット脊髄圧迫障害モデルの運動機能回復に対するMS-153の効果 第100回日本薬理学会関東部会 1999年6月 鶴見
4. Nakaya H : Modulation of cardiac ligand-gated K⁺ channels by antiarrhythmic drugs and the pharmacological significance. Second European Congress of Pharmacology Symposium 1999年7月 ブタペスト
5. 中谷晴昭：病態におけるK⁺チャネルの異常化と不整脈治療 第10回九州不整脈研究会 1999年7月 福岡
6. 中谷晴昭：慢性心不全とレニンアンジオテンシン系の薬理学 第3回レニン・アンジオテンシン系の薬理学 教育講演 1999年9月 千葉
7. 山口浩史、Schwartz A、Varadi G、中谷晴昭：電位依存性Ca²⁺チャネルのゲーティングにおける電位センサー内のプロリンの役割 第101回日本薬理学会関東部会 1999年10月 東京

8. 植村展子、中谷晴昭：モルモット心房筋細胞の K^+ 電流系と実験的心房細動に対する JTV-519 の抑制効果 第 16 回日本心電学会学術集会 1999 年 10 月 甲府
9. 中谷晴昭：抗不整脈薬の K^+ チャネル遮断作用とその電気薬理学的意義 第 16 回日本心電学会学術集会 パネルディスカッション 1999 年 10 月 甲府
10. 中谷晴昭：アミオダロンと心筋リガンド作動性 K^+ チャネル 第 16 回日本心電学会学術集会 ランチョンセミナー 1999 年 10 月 甲府
11. 松本泰典、中谷晴昭：心筋症ハムスターにおける心室筋細胞の膜電流変化とそれに対する ET_A 受容体拮抗薬の影響 第 16 回日本心電学会学術集会 1999 年 10 月 甲府
12. 中谷晴昭：Role of ATP-sensitive K^+ channel in cardiovascular system : A functional study using Kir6.2 deficient mice K^+ チャネルワークショップ「心臓 K^+ チャネルの構造と機能」 学術講演 1999 年 10 月 名古屋
13. 中谷晴昭：循環器系における ATP 感受性 K^+ チャネルの役割 ——Kir6.2 ノックアウトマウスを用いた検討—— 第 7 回心筋虚血と K チャネル研究会 特別講演 1999 年 10 月 京都
14. Nakaya H : New insights into ATP-dependent potassium channels : Knockout mice American Heart Association 72 nd Scientific Sessions 1999 年 11 月 アトランタ
15. 中谷晴昭、松本泰典、増田義昭：心筋症ハムスターにおける心不全に伴う電氣的リモデリングとそれに対する ET_A 受容体拮抗薬慢性投与の影響 第 9 回日本循環薬理学会 1999 年 12 月 京都

16. 中谷晴昭、鈴木 将、大本由樹、坂本直哉、三木隆司、清野 進：遺伝子欠損マウスを用いた心血管系における Kir6.2 の役割の解析 平成 11 年度生理研究会 1999 年 12 月 岡崎
17. 中谷晴昭：「21 世紀の循環器用薬剤」2000 年 1 月 静岡
18. 中谷晴昭：「ATP 感受性 K⁺ チャネルの薬理」 第 4 回虚血心と麻酔研究会 特別講演 2000 年 1 月 東京
19. 中谷晴昭：「不整脈治療の現状と未来」 東京フラテの会 講演 2000 年 3 月 東京
20. 中谷晴昭：「イオンチャネルを標的とする薬剤の最近の進歩」 Na⁺ チャネル遮断薬の電気薬理学的作用 第 73 回日本薬理学会年会 シンポジウム 2000 年 3 月 横浜
21. 西田 淳、植村展子、小倉武彦、古澤良恵、矢花秀雄、中谷晴昭：モルモット単離心筋細胞のカリウム電流に対するアジミライドの抑制作用 第 73 回日本薬理学会年会 2000 年 3 月 横浜
22. 山口浩史、斎藤俊弘、増田善昭、中谷晴昭：心筋 L 型 Ca⁺⁺ チャネルの細胞膜発現に対する付属サブユニットの協同的効果 第 63 回日本循環器学会年会 2000 年 4 月 大阪
23. 大本由樹、坂本直哉、鈴木 将、中谷晴昭：Kir6.2 ノックアウトマウスを用いた細胞膜 ATP 感受性 K⁺ チャネルの病態生理的役割の解析 —虚血・再灌流の心収縮能からの検討— 第 63 回日本循環器学会年会 2000 年 4 月 大阪
24. 中谷晴昭：薬物と QT 延長 山之内製薬株式会社 安全性研究所講演会 講

演 2000年5月 東京

25. Ishihara M, Nakaya H, Ito H : Pharmacodynamic interaction of sildenafil with various vasodilators in isolated rat vascular tissues 第3回アジア・オセアニア・アンドロロジー学会 2000年5月 幕張
26. 鈴木 将、植村展子、坂本直哉、大本由樹、小倉武彦、三木隆司、清野 進、中谷晴昭 : Kir6.2 ノックアウトマウスを用いた血管平滑筋 ATP 感受性 K⁺ チャネル機能分子の同定 第102回日本薬理学会関東部会 2000年6月 東京
27. 櫛田俊一、小倉武彦、増田善昭、中谷晴昭 : HERG チャネルの遅い活性化、脱活性化速度の規定因子となる分子機構について 第10回 循環基礎研究会 2000年 9月 千葉
28. 西田 淳、植村展子、小倉武彦、中谷晴昭 : アジミライドの心筋 K⁺ チャネル抑制作用の電気薬理的解析 第17回日本心電学会学術集会 2000年 10月 東京
29. 鈴木 将、植村展子、大本由樹、小倉武彦、中谷晴昭 : Kir6.2 ノックアウトマウスを用いた心筋および血管 ATP 感受性 K⁺ チャネル機能分子の同定 第17回日本心電学会学術集会 2000年 10月 東京
30. 中谷晴昭 : 病態における心筋 K⁺ チャネルの役割 第7回表蔵王心臓・血管討論会 2000年 10月 宮城
31. 櫛田俊一、小倉武彦、増田善昭、中谷晴昭 : HERG チャネルの遅い活性化・脱活性化速度の規定因子となる分子機構について 第103回 日本薬理学会関東部会 2000年 11月 東京

32. 中谷晴昭：ATP 感受性 K^+ チャネル遺伝子 (Kir6.2) のノックアウトマウスにおける心臓機能の変化と虚血耐性 第 24 回細胞情報伝達系北海道研究会 基調講演 2000 年 11 月 札幌
33. 中谷晴昭：薬理学から見たレニン・アンジオテンシン系薬とその治療学的意義 学術講演会 特別講演 2000 年 11 月 千葉
34. 松本泰典、中谷晴昭：心筋症ハムスター心筋細胞の電気生理学的特性変化に対するエンドセリン受容体遮断薬長期投与の影響 平成 12 年度生理研究会「心・血管系イオンチャネルの発生分化とその適応」 2000 年 11 月 岡崎
35. Matsumoto H, Masuda H, Nakaya H : Long-term treatment with an endothelin-A receptor antagonist improves the survival rate by inhibiting electrical remodeling in cardiomyopathic hamsters 第 17 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 2000 年 12 月 大阪
36. 中谷晴昭：アミオダロンのマルチチャネル遮断作用とその電気薬理的意義 東北アミオダロン研究会 2000 年 12 月 盛岡
37. 小倉武彦、古川哲史、稲垣暢也、中谷晴昭：蛋白-蛋白結合による Cl^- チャネルの機能制御 第 74 回日本薬理学会年会 シンポジウム 2001 年 3 月 横浜
38. 植村展子、鈴木 将、梶沢政司、石原順就、小倉武彦、中谷晴昭：Kir6.2 ノックアウトマウスを用いた膀胱平滑筋における ATP 感受性 K^+ チャネル機能分子の同定 第 74 回日本薬理学会年会 2001 年 3 月 横浜
39. Nakaya H, Matsumoto Y, Aihara H, Yamaguchi-Kohno R, Ogura T, Yabana

H, Masuda Y : Long-term endothelin A receptor blockade inhibits electrical remodeling in cardiomyopathic hamsters. 10th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy 2001年3月 京都

研究成果

緒言

1983年の心筋細胞でのATP感受性K⁺チャネルの発見(1)以来、このK⁺チャネルは心筋虚血時に活性化し、活動電位幅を短縮させてCa⁺⁺過負荷を軽減させると考えられている。事実、ATP感受性K⁺チャネルを活性化する薬物、すなわちK⁺チャネル開口薬が虚血心筋に対して保護作用を持つということは多くの研究によって明らかにされている(2, 3, 4)。また、短時間の虚血負荷によってその後の心筋梗塞巣が減少するという“ischemic preconditioning”という現象も存在するが(5)、その成立にもATP感受性K⁺チャネルの活性化が関与するとされてきた(6, 7)。しかしながら、K⁺チャネル開口薬の虚血心筋保護作用が必ずしも活動電位幅の短縮を伴わないこと(8, 9)、あるいはK⁺チャネル遮断作用をもつIII群抗不整脈薬を用い、虚血時の活動電位幅の短縮を抑制してもischemic preconditioningが消失しないこと(10, 11)から、細胞膜ATP感受性K⁺(Sarc K_{ATP})チャネル活性化以外のなんらかの細胞内機構が関与することが示唆された。

最近、この虚血心筋保護に関与する細胞内機構のひとつとしてミトコンドリアに存在するK⁺チャネルが注目されている。このチャネルはミトコンドリアの内膜に存在し、ATP、glibenclamideで抑制され、各種K⁺チャネル開口薬で活性化するためミトコンドリアATP感受性K⁺(Mito K_{ATP})チャネルと呼ばれることとなった(12)。また、diazoxideがこのチャネルを選択的に活性化する薬物であり、5-hydroxydecanoate (5HD)が抑制する薬物であることが明らかとなり(13)、ミトコンドリアATP感受性K⁺チャネルの活性化がK⁺チャネル開口薬あるいはischemic preconditioningによる心筋保護の機序と考えられる

ようになった (14, 15, 16, 17)。

それでは、細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルはどのような役割をはたしているのでしょうか？この疑問に答えるべくジーンターゲット法を用いて作製したノックアウトマウスを用いて実験を行うこととした。細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルの分子構造は膜 2 回貫通型のポア成分 (Kir6.X) に ABC 蛋白の一種である sulfonylurea 受容体 (SUR) が合わさり機能することが明らかとなっている (18)。これまでの研究により、膵臓型の ATP 感受性 K^+ チャンネルは Kir6.2 と SUR1 からなり、心臓型の ATP 感受性 K^+ チャンネルは Kir6.2 と SUR2A からなると考えられている (19, 20, 21)。最近、三木らは Kir6.2 のノックアウトマウス (Kir6.2^{-/-}) の作製に成功し、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞のグルコースあるいは sulfonylurea 系抗糖尿病薬によるインスリン分泌が消失していることを示されている (22)。われわれもこのノックアウトマウス (Kir6.2^{-/-}) を用い、心臓機能調節には Kir6.2 は重要であるが、血管平滑筋の機能調節には重要でないことを明らかにしている (23)。本研究では Kir6.2 のノックアウトマウスを用い、心筋の細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルの病態生理学的役割を明らかにするため実験を行った。

実験方法

1. 電気生理学的実験

野生型 (WT, C57BL/6 マウス) および Kir6.2 ノックアウト (KO) マウスを urethane 麻酔し、ランゲンドルフ法によって心臓を灌流した。正常 HEPES-Tyrode 液で灌流した後、コラゲナーゼを含有する Ca^{++} 除去 HEPES-Tyrode 液に変え、20 分灌流して心室筋細胞を単離した。単離した心筋細胞を高 K^+ 、低 Cl^- 液である KB 液中に浮遊させ使用まで冷蔵庫に保存した。

正常 HEPES-Tyrode 液の組成は NaCl 143、KCl 5.4、CaCl₂ 1.8、MgCl₂ 0.5、NaH₂PO₄ 0.33、glucose 5.5、HEPES-NaOH buffer (pH 7.4) 5 mM である。また KB 液の組成は KOH 70、l-glutamate 50、KCl 40、taurine 20、KH₂PO₄ 20、MgCl₂ 3、glucose 10、EGTA 1、HEPES-KOH buffer (pH 7.4) 10 mM である。

パッチクランプ法によって単一チャネル電流および全細胞膜電流を記録した。単離心室筋細胞を倒立顕微鏡のステージ上に固定した実験槽（容量約 1 ml）に撒き、実験を行った。パッチ電極は二段引き電極作製器（成茂 PB-7）を用い作製し、先端を熱処理した。

単一チャネル電流は室温で以前報告した方法（24）に従って open cell-attached 法で記録した。この時の電極液は KCl 150、CaCl₂ 2、HEPES-NaOH buffer (pH 7.4) 5 mM を含むものを用い、細胞内液を KCl 150、ATP-Na₂ 0.001、EGTA 1、HEPES-KOH buffer (pH 7.4) 5 mM として実験を行った。記録は室温（20-25 °C）でパッチクランプ アンプ（日本光電 CEZ-2300）を用いて行い、パルスコードモジュレーター（Instrutech Corp. VR-10B、米国）を経てビデオテープレコーダー（Hitachi VT-F 20）に保存した。Gaussian filter で処理後、pCLAMP のソフトウェア（Axon Instrument、米国）の入った IBM 型コンピューター（Compaq Prolinea 4/50、米国）で解析した。

全細胞膜電流記録および活動電位記録は 36 ± 1 °C で行った。電極内液は KOH 110、L-aspartate 110、KCl 20、MgCl₂ 1、ATP-K₂ 1、phosphocreatinine-K₂ 1、EGTA 10、HEPES-KOH buffer (pH 7.4) 5 mM を含むものであり、pCa 8 に調整したものを使用した。また、細胞外液は HEPES-Tyrode 液を用いた。パッチ電極を細胞に接着させ陰圧で吸引してギガオームシールを作製した後、

さらにパッチ膜を破壊し、全細胞膜電流記録モードとした。全細胞膜電流の記録は単一チャンネル電流記録と同じアンプを用い、コマンドパルスの生成、電流の記録などはやはり pCLAMP のソフトウェアの入ったコンピュータを用いて行った。擬似定常電流を記録するために ramp pulse protocol を用いた。すなわち保持電位 -40 mV から 1.2 mV/ms の割合で $+50$ mV へ脱分極させ、その後 -100 mV へ -1.2 mV/ms の速度で過分極させ、過分極時に記録された電流記録から電流・電圧関係を得た。また心室筋細胞よりカレントクランプモードで膜電位を記録し 0.1 Hz で電気刺激を与え活動電位を記録した。

2. in vivo 虚血再灌流実験

野生型および Kir6.2 のノックアウトマウスを urethane 麻酔して人工呼吸を行った。開胸後左冠動脈を 45 分結紮してその後 120 分再灌流した。再灌流後 120 分たったところで冠動脈を再び結紮し、色素を注入し灌流域を同定した。その後心臓をいくつかの切片に切り、1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 液で 37 °C、5 分間処置し、非梗塞部の染色を行い area at risk のうち梗塞巣の占める割合を重量比で算出した。Ischemic preconditioning は 45 分の冠動脈閉塞に先立ち、3 分間の冠動脈閉塞を 5 分間隔で 3 回繰り返して行った。

3. in vitro 虚血再灌流実験

野生型 (WT, C57BL/6 マウス) および Kir6.2 ノックアウト (KO) マウスを urethane 麻酔し、心臓を摘出してランゲンドルフ法によって Krebs-Henseleit 液で定流灌流した (3 ml/min)。Krebs-Henseleit 液の組成は NaCl 119、KCl 4.8、CaCl₂ 2.5、MgSO₄ 1.2、KH₂PO₄ 1.2、NaHCO₃ 24.9、glucose 10 mM であり、95% O₂ + 5% CO₂ で飽和した (pH 7.4)。左房から左室にポリエチレンビニル製のバルーンを挿入し、左室拡張期圧が $5-10$ mmHg となるように生理的食塩水で満たし、圧トランスジューサーにつないで左室内圧を連続的に測定した。灌流

を 15 分間停止してその後 30 分間再灌流して左室機能変化を観察した。また、再灌流時の心筋逸脱酵素である LDH (lactate dehydrogenase) および CK (creatin kinase) の灌流液への流出量を測定した。

4. 統計学的検討

すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、統計学的解析に Student t-test を用いて行って、危険率は 5 % 以下を有意とした。

実験成績

1. 野生型および Kir6.2 ノックアウトマウス心室筋細胞の電気生理学的反応

図 1 に示すように、野生型マウスの心室筋細胞の open cell-attached patch では細胞膜を破壊し、内膜側を ATP を 1 μ M しか含まない液にさらすと単一チャネル活動が記録された。この単一チャネル電流は 1 mM の ATP を灌流することにより開口が抑制され、10 μ M glibenclamide で抑制されたことから、ATP 感受性 K⁺ チャネルの活動ということが明らかとなった。

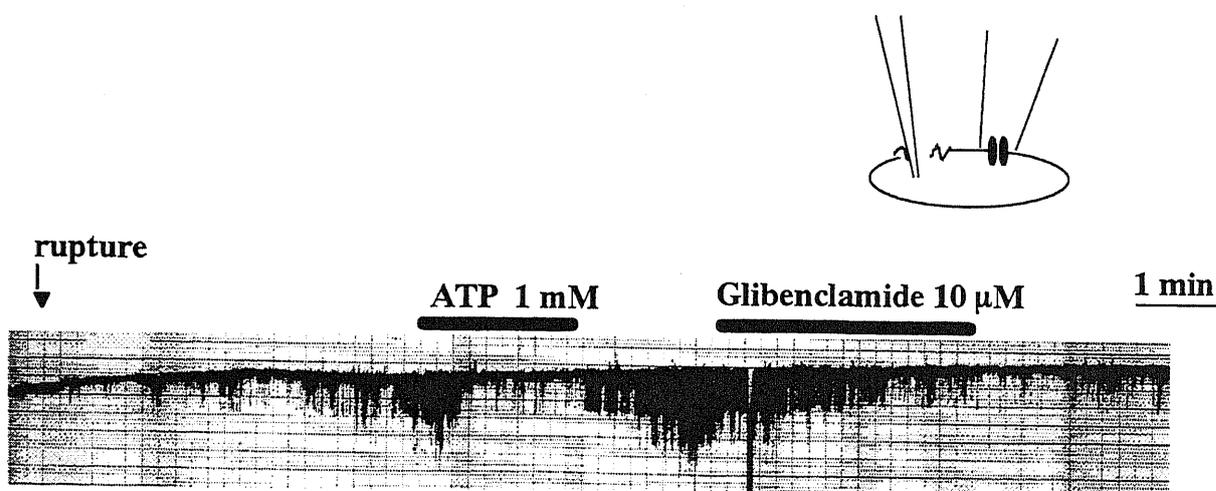


図1. 野生型マウス心室筋細胞のopen cell-attached patchで観察されたATP感受性 K⁺ チャネル電流と1 mM ATPあるいは10 μ M glibenclamideによる抑制。

また、図2に示すように、単一チャンネル電流のスロープコンダクタンスは 82 pS であり、この値は他の動物種の心筋細胞で観察されたものと近似するものであった (21)。

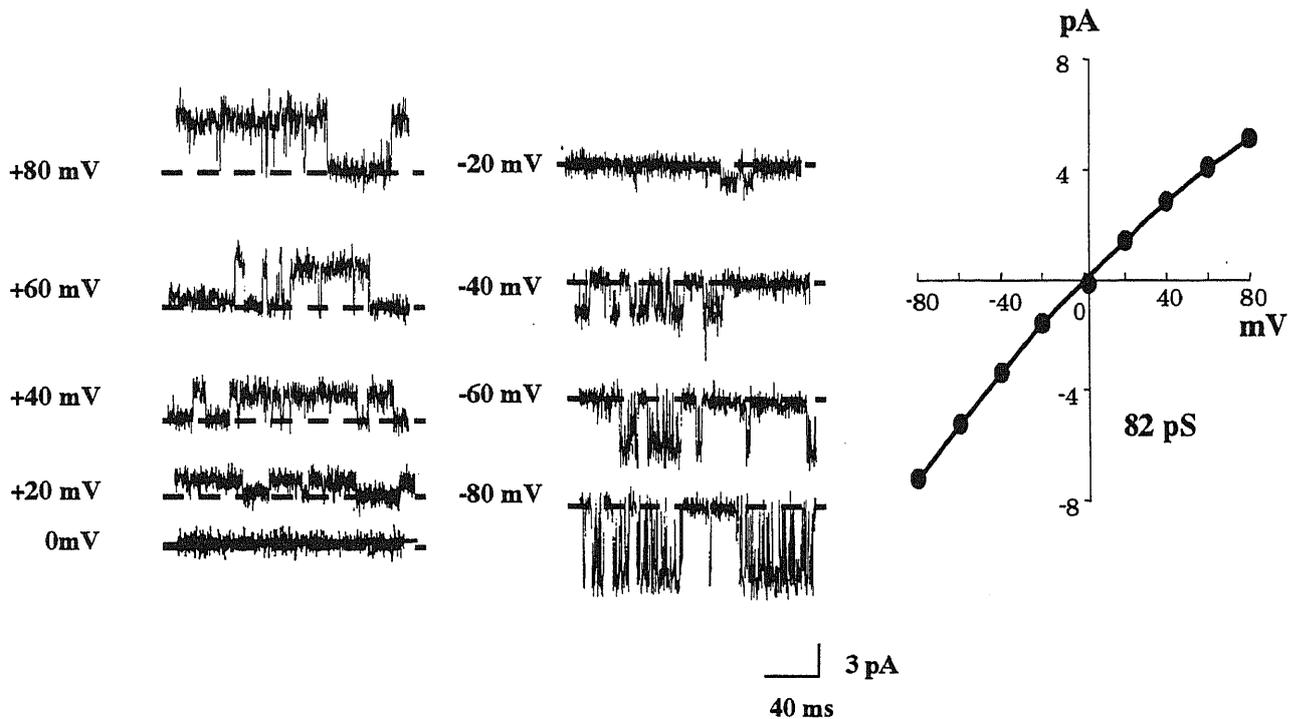


図2. 野生型マウス心室筋細胞で観察された種々の電位における単一ATP感受性 K^+ チャンネル電流とそのスロープコンダクタンス。

一方、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では内膜側を低 ATP 溶液にさらしても単一チャンネル活動は記録されず、UDP あるいは cromakalim を加えても、やはり ATP 感受性 K^+ チャンネルの活動は認められなかった (図 3)。

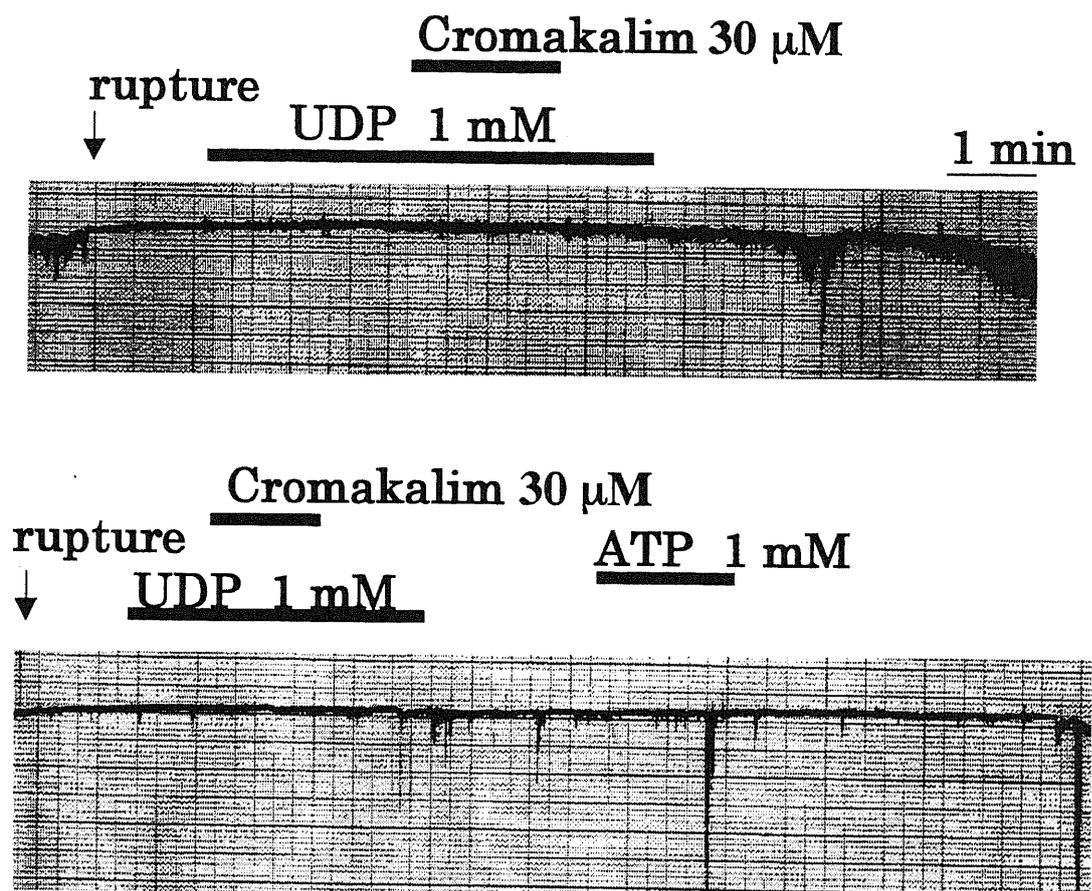


図3. Kir6.2ノックアウトマウス心室筋細胞のopen cell-attached patchでの電流記録。UDP存在下あるいは K^+ チャンネル開口薬のcromakalim存在下でも単一ATP感受性 K^+ チャンネル活動は記録されなかった。

次に K^+ チャンネル開口薬に対する全細胞膜電流および活動電位の変化を観察した。野生型の心室筋細胞において 30 μ M cromakalim を与えると図4に示すように外向き電流が増強し、その反応は 1 μ M glibenclamide の添加で元に戻った。しかし、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では 30 μ M cromakalim を与えても外向き電流の活性化は認められなかった (図5)。

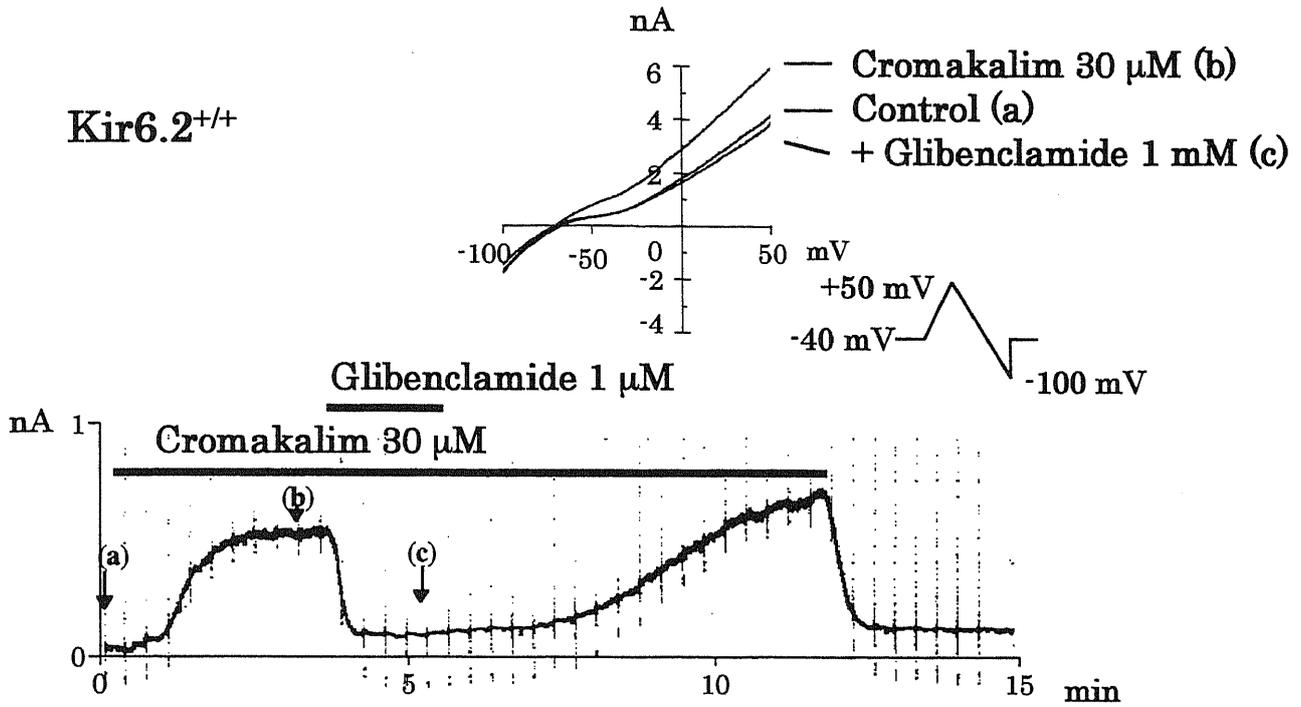


図4. 野生型マウス心室筋細胞の全細胞膜電流に対するcromakalimの作用。図に示した様なランプパルスプロトコールを20秒に1回与えながら擬似定常電流を記録した。

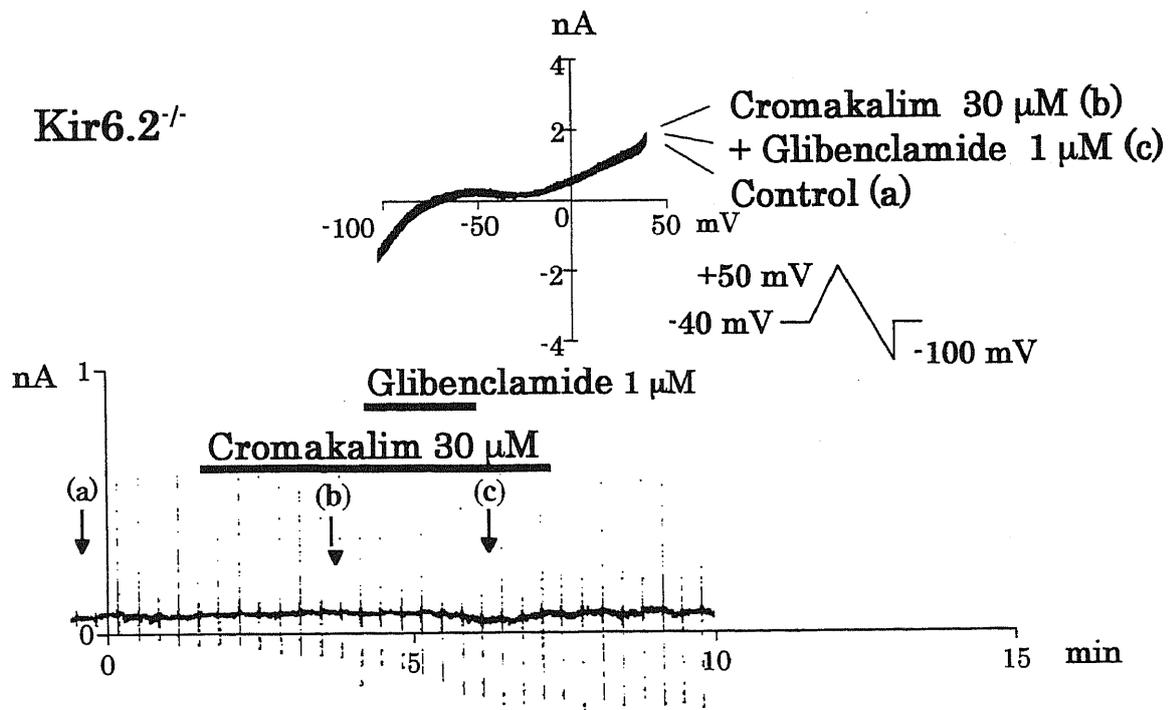


図5. Kir6.2ノックアウトマウス心室筋細胞の全細胞膜電流に対するcromakalimの作用。Cromakalim (30 μ M) で外向き電流の活性化は認められなかった。

図6はこれらの実験において ramp pulse を与えて記録した擬似定常電流の 0 mV での電流密度をまとめたものである。Kir6.2^{+/+} の心室筋細胞では有意の電流密度の増加が認められたが、Kir6.2^{-/-} の心室筋細胞ではその変化は見られなかった。

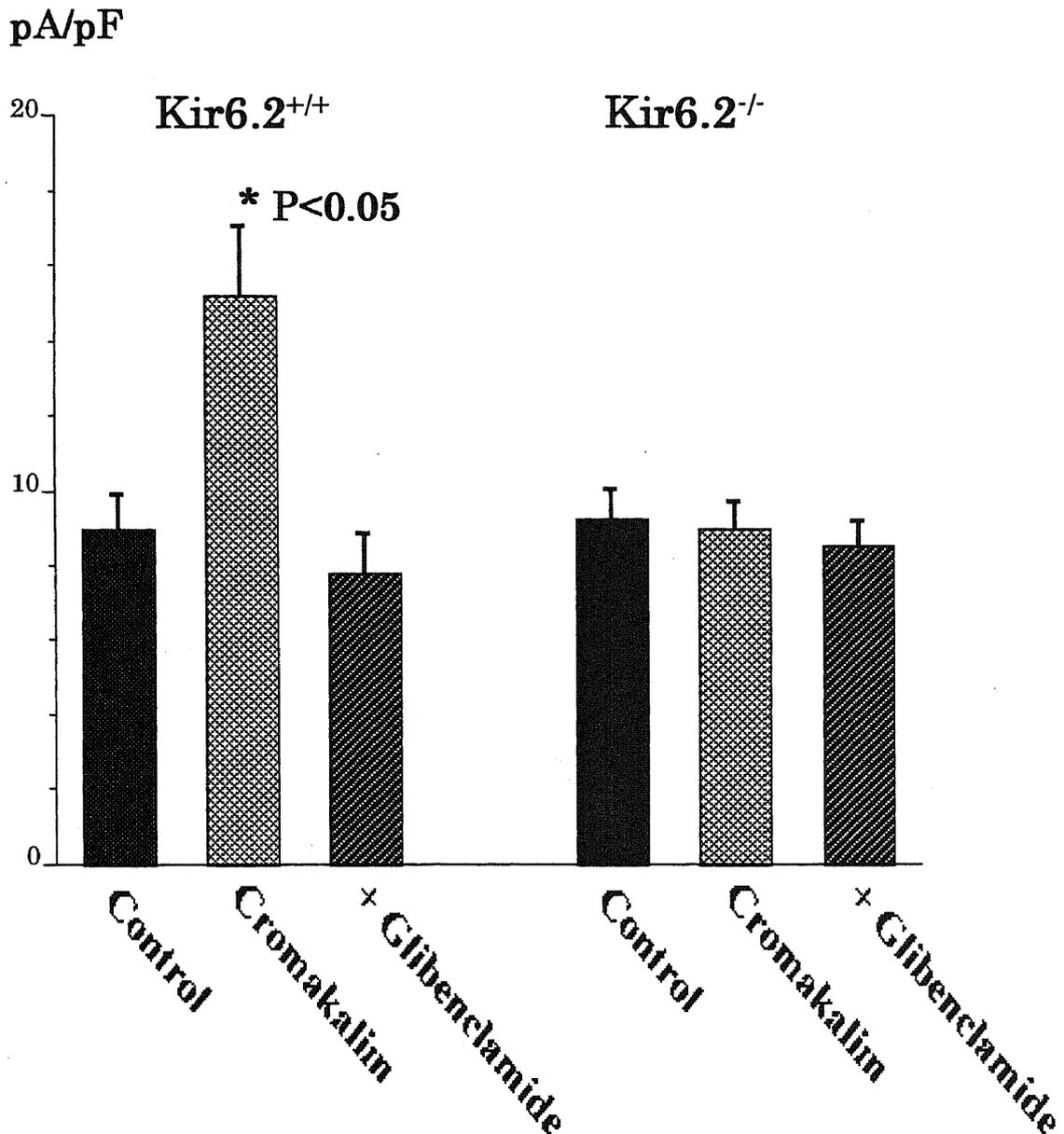


図6. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) あるいはノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス心室筋細胞での外向き電流に対する cromakalim (30 μ M) あるいは glibenclamide (1 μ M) 添加の影響。擬似定常電流の 0 mV における電流密度をまとめてある。

もうひとつの K^+ チャンネル開口薬である pinacidil でも同様の現象が認められた。野生型の心室筋細胞において $200 \mu\text{M}$ pinacidil を与えると図7に示すように外向き電流が増強し、その反応は $1 \mu\text{M}$ glibenclamide の添加で元に戻った。

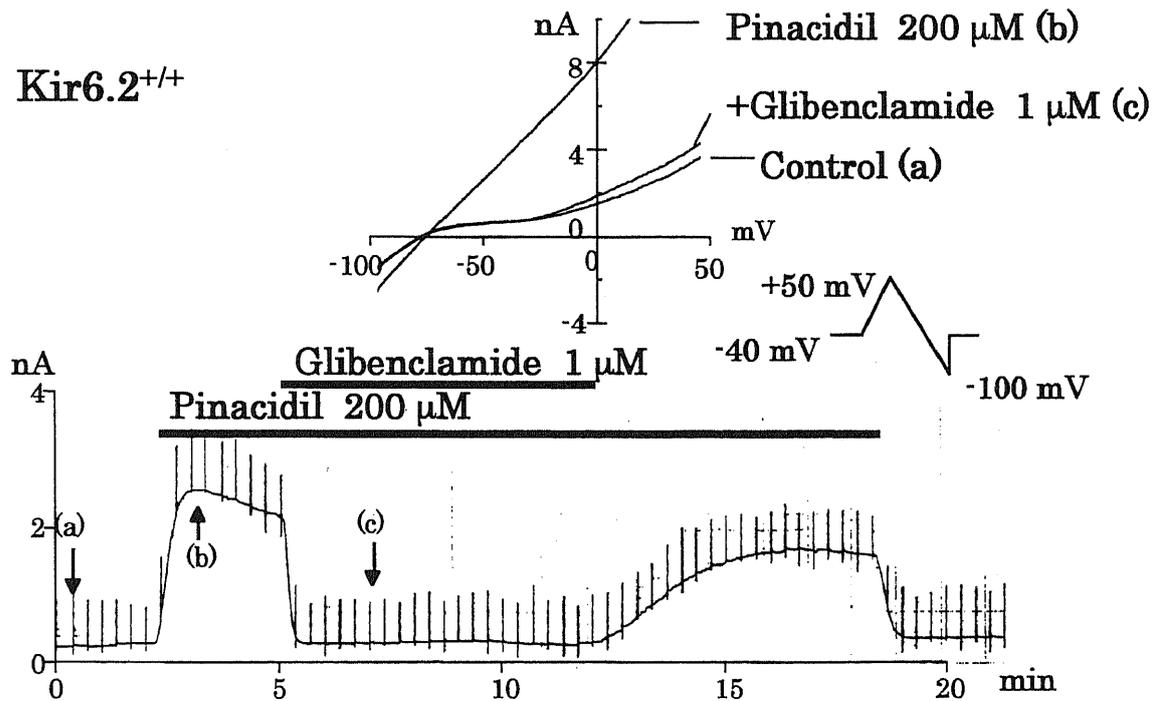


図7. 野生型マウス心室筋細胞の全細胞膜電流に対するpinacidilの作用。図に示した様なランプパルスプロトコールを20秒に1回与えながら擬似定常電流を記録した。 $200 \mu\text{M}$ pinacidilで外向き電流が活性化し、その電流は $1 \mu\text{M}$ glibenclamideの添加で抑制された。下段にレコーダーの実記録、上段には擬似定常電流の実記録を示してある。

しかしながら、図8に示すように、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では $200 \mu\text{M}$ pinacidil を与えても外向き電流の活性化は認められなかった。

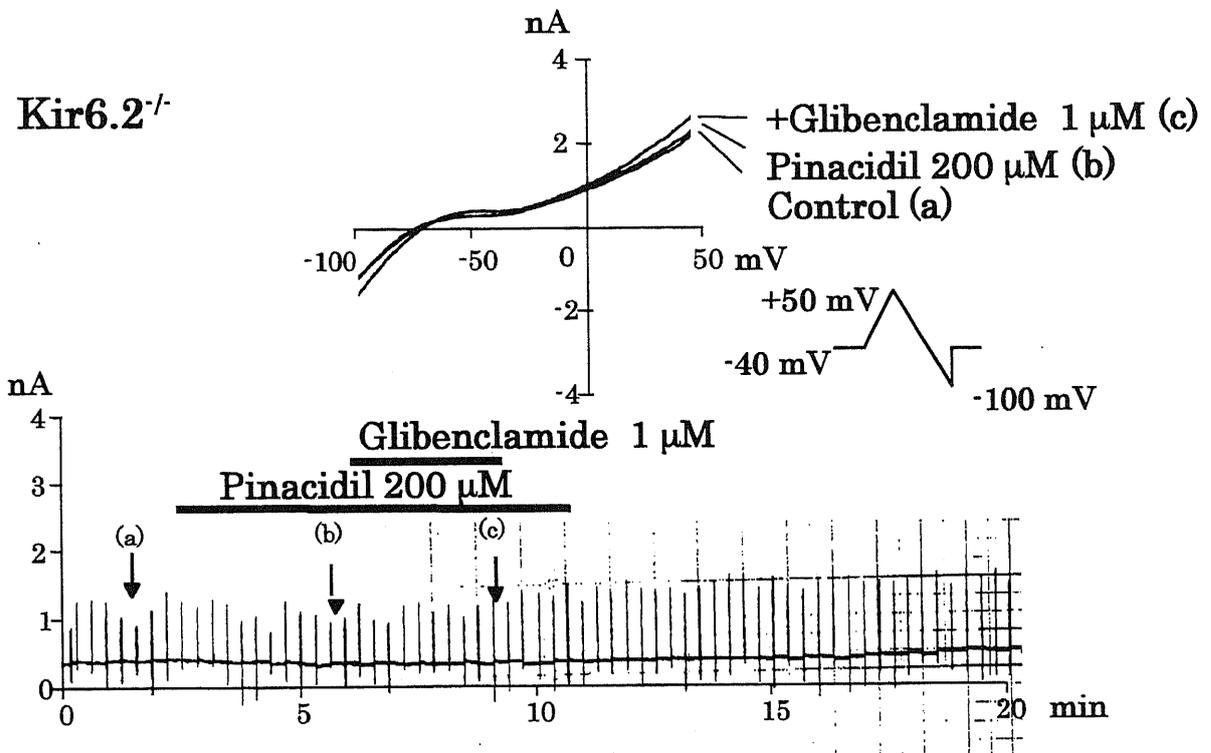


図8. Kir6.2ノックアウトマウス心室筋細胞の全細胞膜電流に対するpinacidilの作用。Pinacidil (200 μ M) で外向き電流の活性化は認められなかった。

図9は擬似定常電流の0 mVでの電流密度をまとめたものであるが、Kir6.2^{+/+}の心室筋細胞では有意の電流密度の増加が認められたが、Kir6.2^{-/-}の心室筋細胞ではその変化は見られなかった。

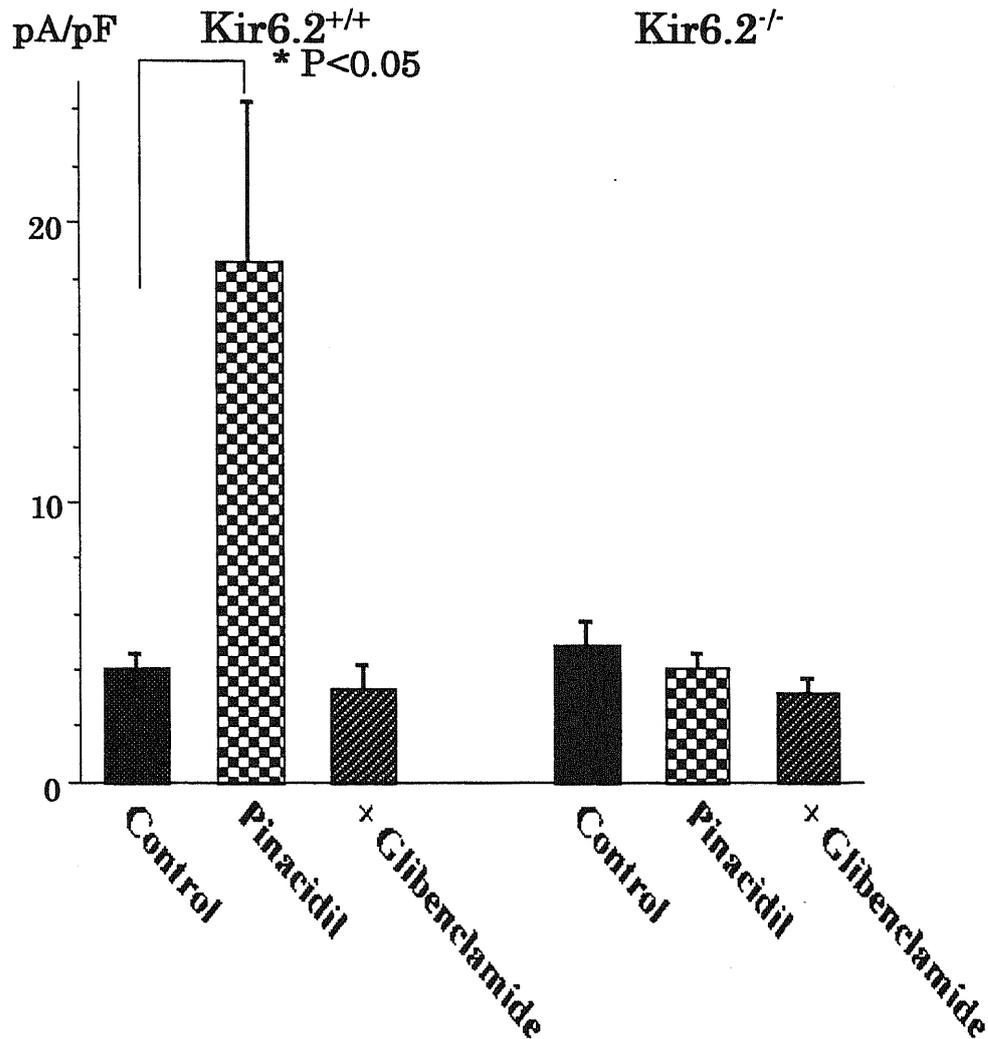


図9. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) あるいはノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウスでの外向き電流に対するpinacidil (200 μ M) あるいはglibenclamide (1 μ M) 添加の影響。擬似定常電流の0 mVにおける電流密度をまとめてある。

これらの膜電流変化は活動電位変化の差として表れた。図 10 に示すように野生型心室筋細胞では 30 μ M cromakalim によって活動電位幅の著明な短縮がおきたが、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では活動電位幅の変化は認められなかった。Pinacidil (200 μ M) においても活動電位幅の著明な短縮が野生型心室筋細胞でおき、その反応は 1 μ M glibenclamide の添加で元に戻ったが、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では 200 μ M pinacidil を与えても活動電位幅の変化は認められなかった (図 11)。

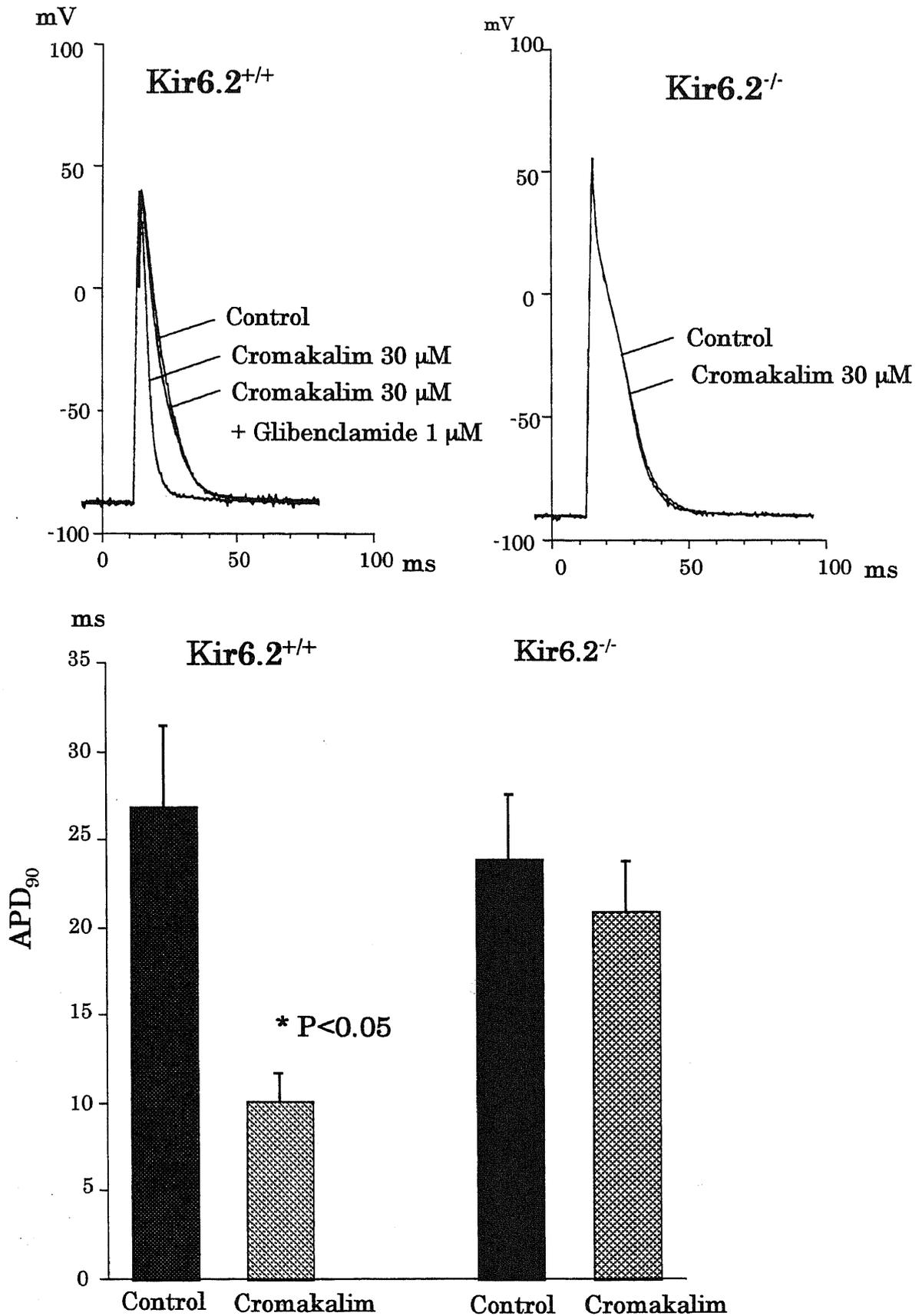


図10. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス心室筋細胞に対する cromakalim (30 μM) の作用。カレントクランプモードで膜電位を記録し、0.1 Hzで電気刺激を行った。下段に90%再分極時点での活動電位幅 (APD₉₀) のまとめを示してある。Cromakalimは野生型心室筋細胞のみで活動電位幅を短縮させた。

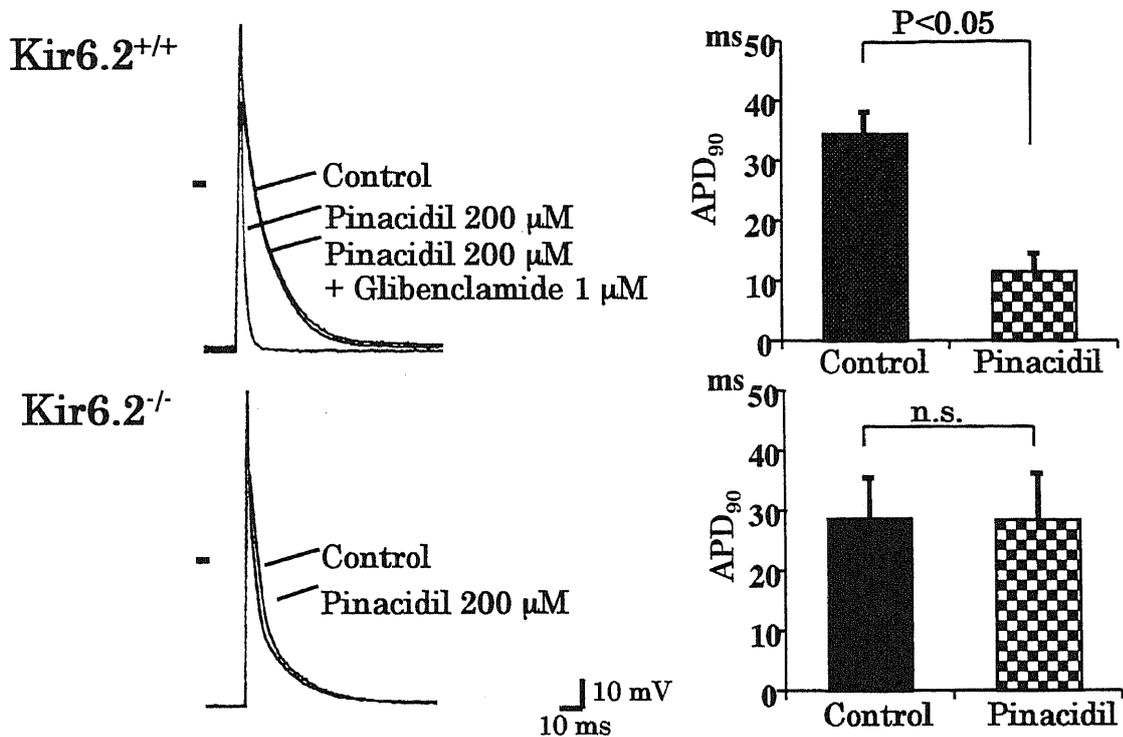


図11. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス心室筋細胞に対する pinacidil (200 μM) の作用。カレントクランプモードで膜電位を記録し、0.1 Hzで電気刺激を行った。右側に90%再分極時点での活動電位幅 (APD₉₀) のまとめを示してある。Pinacidilは野生型心室筋細胞のみで活動電位幅を短縮させた。

次に虚血類似状態における活動電位変化の差異について検討した。単離した心筋細胞を無グルコース、dinitrophenol (DNP, 50 μM) 含有液で灌流すると、野生型の心室筋細胞では外向き電流が活性化したが、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では電流変化は認められなかった (図 12)。それを反映するかのよう、野生型の心室筋細胞ではこの代謝障害による活動電位幅の有意の短縮が観察されたが、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞ではその反応は認められなかった (図 13)。

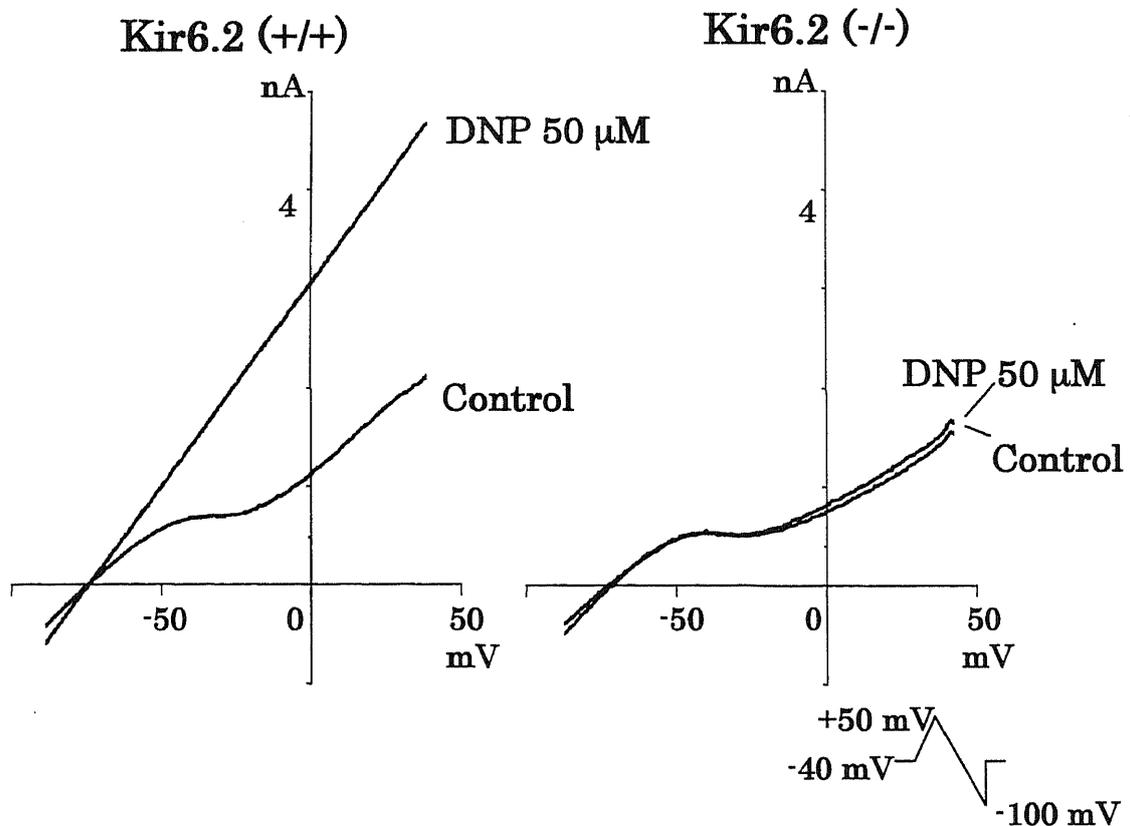


図12. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス心室筋細胞の擬似定常電流に対する代謝阻害の影響。心室筋細胞を無グルコース dinitrophenol (DNP) 50 μ M 含有液で灌流して全細胞膜電流の変化を観察した。

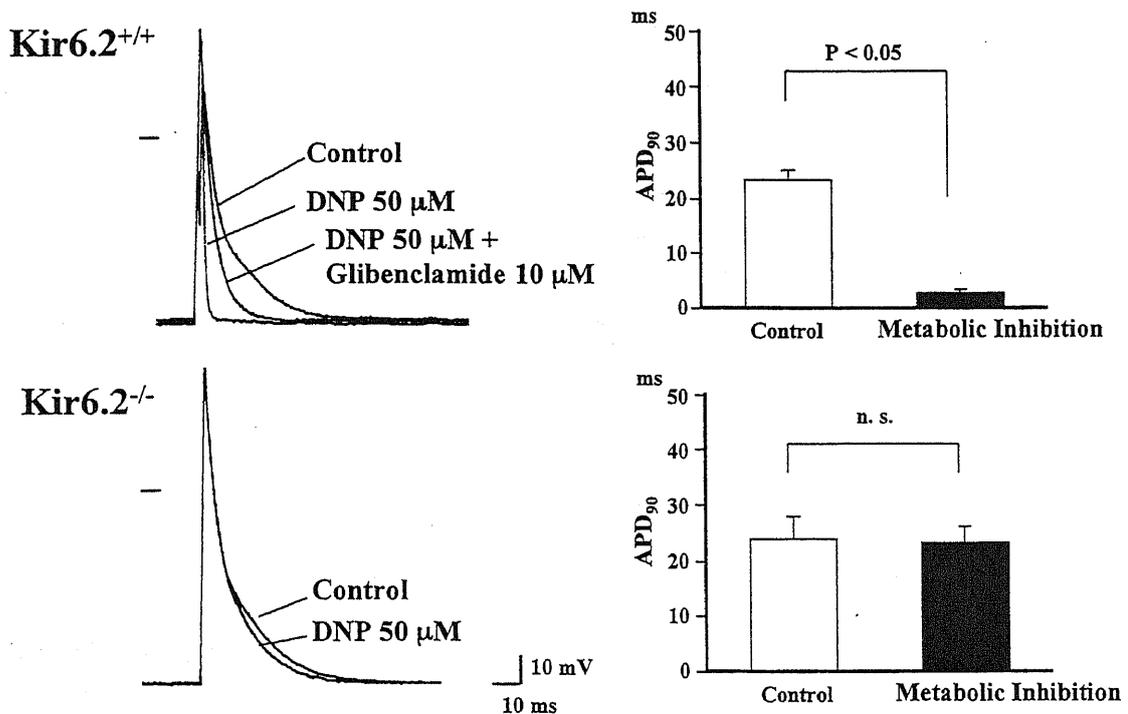


図13. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス心室筋細胞活動電位に対する代謝阻害の影響。左側に 0.1 Hz で刺激して得られた活動電位の実記録と右側に 90 % 再分極時の活動電位幅に対する作用をまとめている。野生型心室筋細胞では代謝阻害によって活動電位幅が短縮し、glibenclamide 10 μ M の添加で部分的に回復した。

図 14 は活動電位幅の経時的変化をまとめたものであるが、野生型の心室筋細胞では代謝阻害によって徐々に活動電位幅の短縮が見られ、10 μM glibenclamide の添加で部分的に回復したが、Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では代謝阻害によっても活動電位幅の変化はほとんど認められなかった。これらから虚血類似状態における活動電位の短縮には Kir6.2 をポア成分とする心筋細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャンネルの存在が必須であることが明らかとなった。

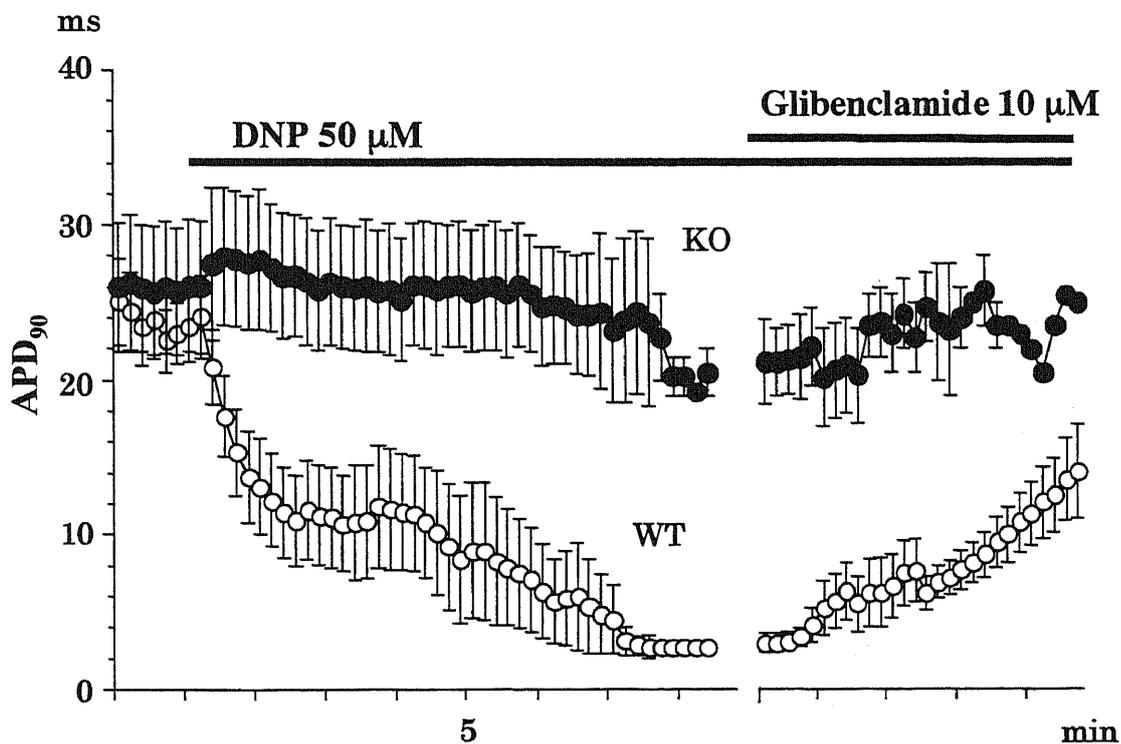


図14. 野生型 (WT) およびノックアウト (KO) マウス心室筋細胞活動電位幅の代謝阻害時の経時的変化。野生型心室筋細胞では無グルコース、dinitrophenol (DNP, 50 μM) で活動電位幅は短縮し、glibenclamide (10 μM) の添加により部分的に回復した。しかしながら Kir6.2^{-/-} 心室筋細胞では活動電位幅はほとんど変化しなかった。

2. 野生型および Kir6.2 ノックアウトマウスにおける ischemic preconditioning

Kir6.2 ノックアウトマウスにおいて ischemic preconditioning が影響を受けるか否かについて検討を行った。図 15 に示すように左室に占める area at risk の割合には 4 群間で差が認められなかった。野生型マウスにおいて、45 分の冠動脈閉塞に先立ち、3 分間の冠動脈閉塞を 5 分間隔で 3 回繰り返して、ischemic preconditioning を行うと、梗塞巣は有意に減少した。Kir6.2 ノックアウトマウスにおいて冠動脈を 45 分結紮してその後 120 分再灌流した際の梗塞巣は野生型で認められたものと差異が認められなかった。しかしながら、同様のプロトコールで ischemic preconditioning を行った場合、梗塞巣の減少は認められず、むしろ増加していた。このように、Kir6.2 ノックアウトマウスにおいては ischemic preconditioning が消失することが明らかとなった。

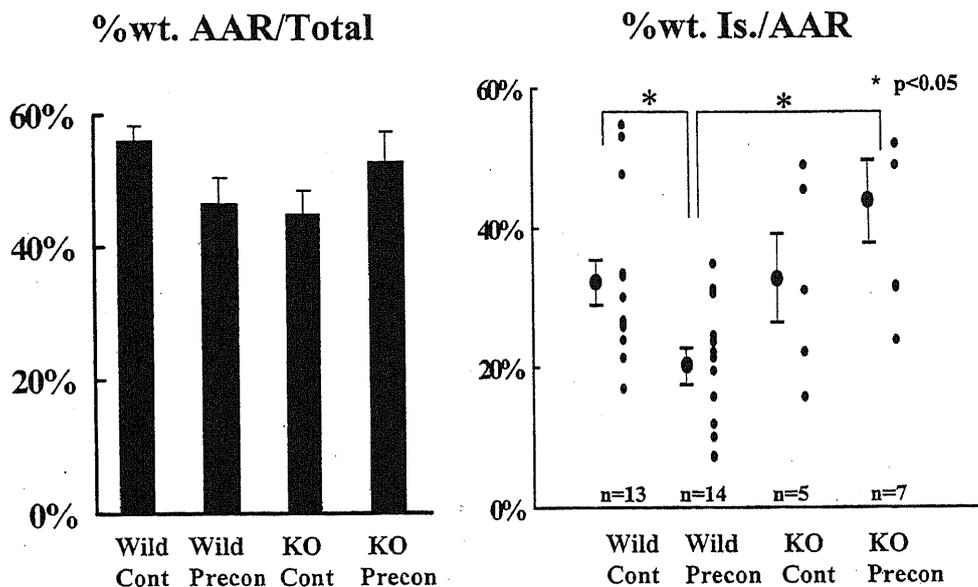


図 15. 野生型 (Wild) および Kir6.2 ノックアウトマウスで冠動脈閉塞・再灌流時の心筋梗塞巣。左側に左心室における危険領域 (area at risk, AAR) の割合 (重量比) を示し、右側には AAR に示す梗塞巣の割合を示してある。野生型マウスでは ischemic preconditioning で梗塞巣の減少が認められたが、ノックアウトマウスでは梗塞巣の減少は認められず、むしろ増加していた。

3. 野生型および Kir6.2 ノックアウトマウス摘出心における虚血・再灌流時の収縮機能変化

左室内圧を持続的に計測しながら定流灌流を 15 分停止した後 30 分間再灌流してその変化を観察した。図 16 に野生型および Kir6.2 ノックアウトマウス摘出心における虚血・再灌流時の収縮機能変化を示す。野生型摘出心においては虚血後速やかに収縮は停止し、虚血後期になって拡張期圧の上昇が観察されたが、再灌流後その収縮機能は比較的早く回復した。これに対して、Kir6.2 ノックアウトマウス摘出心では虚血早期では心筋の収縮が完全に停止せず、左室拡張期圧が徐々に上昇しはじめ、15 分の虚血最終時点では非常に高度なものとなった。また、再灌流後もその回復は遅く不完全なものであった。

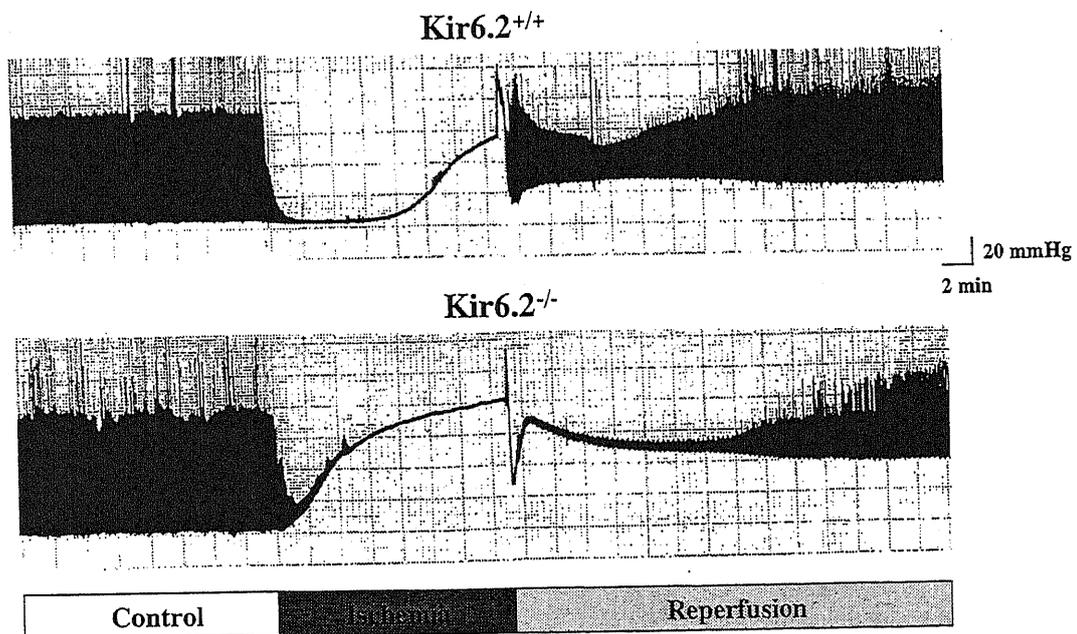


図 16. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス摘出心における虚血・再灌流時の左室収縮能の変化。左室内圧を計測しながら 15 分間の灌流停止、その後 30 分の再灌流を行い、左室収縮能の経時的変化を観察した。

図 17 に左室収縮期圧および拡張期圧の経時的变化をまとめてある。Kir6.2 ノックアウトマウス摘出心では虚血時の拡張期圧の上昇は早くかつ高度であり、再灌流時の収縮機能回復は不完全なものであった。また、再灌流時に流出する CK および LDH も野生型摘出心よりも Kir6.2 ノックアウトマウス摘出心で高度であった (図 18)。

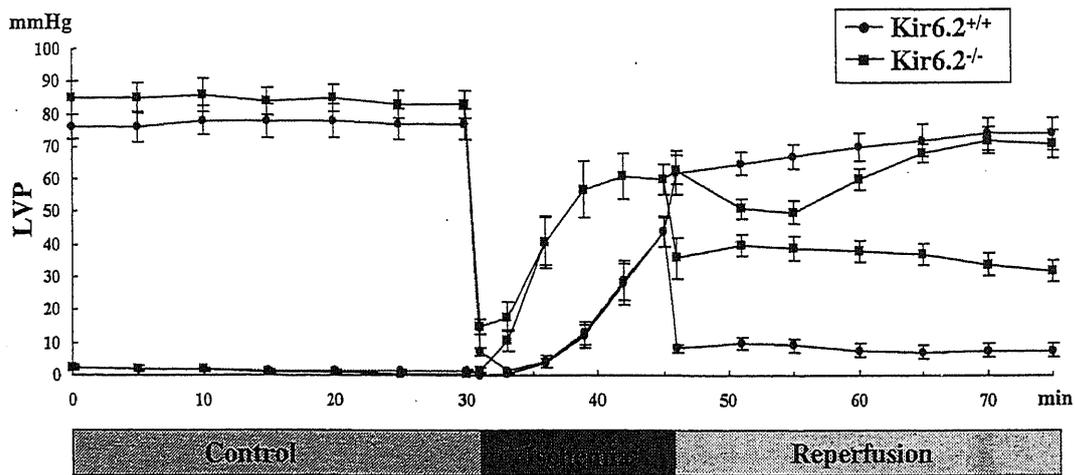


図 17. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス摘出心における虚血・再灌流時の収縮期圧および拡張期圧の経時的变化。

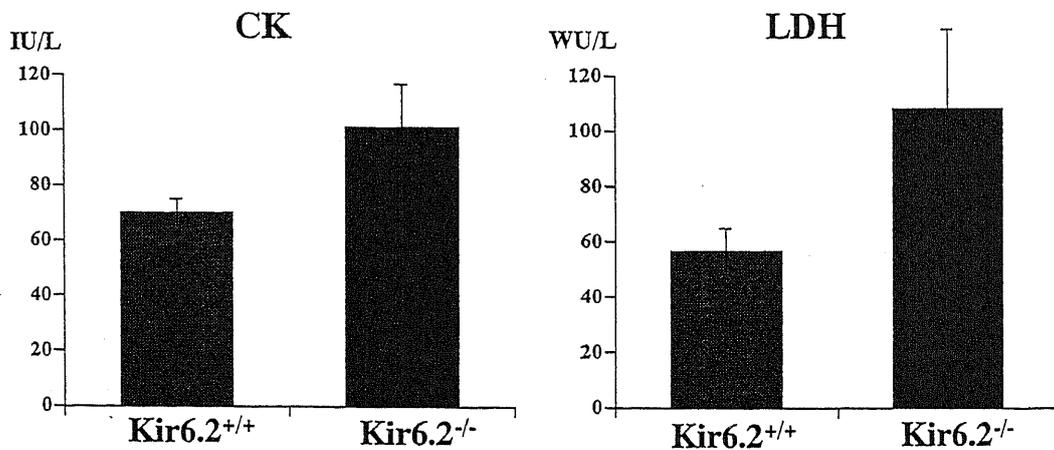


図 18. 野生型 (Kir6.2^{+/+}) およびノックアウト (Kir6.2^{-/-}) マウス摘出心の creatine kinase (CK) および lactate dehydrogenase (LDH) の 15 分間虚血後、再灌流した際の最大流出量。

考察

本研究によって Kir6.2 が心筋細胞膜 ATP 感受性 K⁺ チャネルのポア成分であることが明らかとなった。いままでのこの Kir6.2 のノックアウトマウスを用いた機能的実験により、血管平滑筋の細胞膜 ATP 感受性 K⁺ チャネルのポア成分は Kir6.2 以外のサブユニットからなると予想され (23)、これらは対照的であり興味深い。Kir6.2 ノックアウトマウスの心室筋細胞では K⁺ チャネル開口薬に対する反応、すなわち外向き K⁺ 電流の活性化あるいは活動電位幅の短縮は認められなかった。また、虚血類似状態における活動電位幅の短縮には Kir6.2 をポア成分とする心筋細胞膜 ATP 感受性 K⁺ チャネルの存在が必須であることが明らかとなった。

以前の報告 (25, 26) と一致して、野生型マウスにおいても他の動物種と同様に *ischemic preconditioning* という現象が認められた。しかしながら、Kir6.2 のノックアウトマウスにおいては、45 分の冠動脈閉塞に先立ち、3 分間の冠動脈閉塞を 5 分間隔で 3 回繰り返したが *ischemic preconditioning* は認められず、梗塞巣はむしろ 45 分の冠動脈閉塞単独に比しやや大きいほどであった。ミトコンドリア膜の ATP 感受性 K⁺ チャネルの機能は保たれているということも確認されており (Marban ら、未発表データ)、今回の現象は心筋細胞膜の ATP 感受性 K⁺ チャネルの欠損に起因するものと解釈される。この実験成績はウサギの心筋あるいは心室筋細胞において *ischemic preconditioning* や diazoxide の心筋保護作用が細胞膜 ATP 感受性 K⁺ チャネルの特異的遮断薬である HMR1098 (HMR1883) で抑制されなかったという報告 (27, 28) と矛盾するものである。内因性心筋保護機構には動物種によって多少差があるのかもしれないが、少なくとも本研究の結果からは、細胞膜 ATP 感受性 K⁺ チャネルの活性化は *ischemic preconditioning* の成立に非常に重要であると考えられる。

摘出灌流心で左室内圧を測定しながら虚血再灌流を行うと、Kir6.2 のノックアウトマウスにおいては左室収縮機能の回復は野生型の心臓に比べて明らかに悪かった。虚血時の左室拡張期圧の上昇が高度であり、細胞内 Ca^{++} 過負荷を示唆する実験結果が観察された。この理由として虚血後も活動電位の短縮がおこらず、活動電位プラトー相での Ca^{++} 流入がおきたと解釈される。最近、培養細胞の細胞膜に ATP 感受性 K^+ チャネルの構成成分である Kir6.2 と SUR2A を発現させると代謝障害時の細胞内 Ca^{++} 過負荷を抑制したとの報告がある(29)。この細胞は活動電位を発生していないと考えられるので、どのような機構で細胞内 Ca^{++} 過負荷を抑制したかは不明であるがミトコンドリアを含めた細胞内 Ca^{++} 制御機構を考慮しなければならないであろう(30, 31)。

Kir6.2 のノックアウトマウスを用いた本研究により心筋細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャネルの役割が非常に大きいことがわかった。最近、ischemic preconditioning や K^+ チャネル開口薬による心筋保護作用におけるミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャネルの重要性が非常に強調されている。ミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャネルを介する心筋保護機構を否定するものではないが、その機構が発現するためには、細胞膜の ATP 感受性 K^+ チャネルがわずかでも機能していなければならないのかもしれない。今後、ミトコンドリア ATP 感受性 K^+ チャネルの心筋保護機構への関与がどの程度か、あるいは細胞膜 ATP 感受性 K^+ チャネルとの機能的関係など更なる検討が必要と思われる。

文献

1. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature 305:147-148, 1983
2. Cole W, McPherson C, Sontag D. ATP-regulated K^+ channels protect the

- myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 69:571-581, 1991
3. Yao Z, Gross G. Activation of ATP-sensitive potassium channels lowers the threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 267:H1888-H1894, 1994
 4. Mizumura T, Nithipatikom K, Gross GJ. Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs. *Circulation* 92:1236-1245, 1995
 5. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136, 1986
 6. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70:223-233, 1992
 7. Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol* 267:H1341-H1352, 1994
 8. Yao Z, Gross GJ. Effects of the K_{ATP} channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation* 89:1769-1775, 1994
 9. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS, Darbenzio RB. Cardioprotection with the K_{ATP} channel opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol*

26:145-152, 1995

10. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Darbenzio RB. Preconditioning is not abolished by the delayed rectifier K⁺ blocker dofetilide. *Am J Physiol* 271:H1207-H1214, 1996
11. Schultz JEJ, Kwok WM, Hsu AK, Gross GJ. Terikalant, an inward-rectifier potassium channel blocker, does not abolish the cardioprotection induced by ischemic preconditioning in the rat. *J Mol. Cell Cardiol* 30:1817-1825, 1998
12. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267:26062-26069, 1992
13. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Dabenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81:1072-1082, 1997
14. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: Novel effectors of cardioprotection ? *Circulation* 97:2463-2469, 1998
15. Sato T, O'Rourke B, Marban E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ Res* 83:110-114, 1998
16. Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive

- K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 84:973-979, 1999
17. O'Rourke B. Myocardial KATP channels in preconditioning. *Circ Res* 87:845-855, 2000
 18. Inagaki N, Gono T, Clement JPIV, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of I_{KATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270:1166-1170, 1995
 19. Inagaki N, Gono T, Clement JPIV, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16:1011-1017, 1996
 20. Seino S: ATP-sensitive potassium channels model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 61:337-362, 1999
 21. Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274:C25-C37, 1998
 22. Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake T, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10402-10406, 1998
 23. Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E, Nakaya H. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by

Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* (in press)

24. Nakaya H, Takeda Y, Tohse N, Kanno M. Effects of ATP-sensitive K⁺ channel blockers on the action potential shortening in hypoxic and ischaemic myocardium. *Br J Pharmacol* 103:1019-1026, 1991
25. Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol* 275:H1375-H1387, 1998
26. Morrison RR, Jones R, Byforde AM, Stell AR, Peart J, Heardrick JP, Matherne GP. Transgenic overexpression of cardiac A1 adenosine receptors mimics ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 279:H1071-H1078, 2000
27. Jung O, Englert HC, Jung W, Gogelein H, Scholkens BA, Busch AE, Linz W. The KATP channel blocker HMR1883 does not abolish the benefit of ischemic preconditioning on myocardial infarct mass in anesthetized rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361:445-451, 2000
28. Sato T, Sasaki N, Seharaseyon J, O'Rourke B, Marban E. Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K_{ATP} channels in ischemic cardioprotection. *Circulation* 101:2418-2423, 2000
29. Jovanovic A, Jovanovic S, Lorenz E, Terzic A. Recombinant cardiac ATP-sensitive K⁺ channel subunits confer resistance towards chemical hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 98:1548-1555, 1998
30. Jovanovic N, Jovanovic S, Jovanovic A, Terzic A. Gene delivery of Kir6.2/SUR2A in conjunction with pinacidil handles intracellular Ca²⁺

homeostasis under metabolic stress. FASEB J 13:923-929,1999

31. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. J Physiol (Lond) 519:347-360, 1999

**Inhibitory Effects of Bepridil on the Ultra-rapid Delayed
Rectifier K⁺ Current and hKv1.5 Channel Current:
Comparison with Amiodarone and E-4031**

Satoru Kobayashi¹

Yoshie Reien²

Takehiko Ogura²

Toshihiro Saito¹

Yoshiaki Masuda¹

&

Haruaki Nakaya²

¹The Third Department of Internal Medicine

&

**²Department of Pharmacology,
Chiba University School of Medicine**

Word count:5074

Correspondence: Haruaki Nakaya, MD, PhD

Department of Pharmacology

Chiba University School of Medicine

1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

Tel: +81-43-226-2050

Fax: +81-43-226-2052

e-mail:nakaya@med.m.chiba-u.ac.jp

Satoru Kobayashi, Yoshie Reien, Takehiko Ogura, Toshihiro Saito, Yoshiaki Masuda, and Haruaki Nakaya - Inhibitory effects of bepridil on the ultra-rapid delayed rectifier K⁺ current and hKv1.5 channel current: Comparison with amiodarone and E-4031.

ABSTRACT

Objective: This study was undertaken to examine the effects of bepridil on the ultra-rapid delayed rectifier K⁺ current (I_{Kur}) in rat atrial myocytes and the human cardiac K⁺ (hKv1.5) channel current stably expressed in HEK293 cells in comparison with the effects of amiodarone and E-4031. **Methods:** Membrane currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in enzymatically isolated rat atrial myocytes and HEK293 cells expressing hKv1.5 channels. **Results:** Bepridil inhibited I_{Kur} elicited by a depolarization pulse to +40 mV in rat atrial cells with the IC_{50} value of 0.48 μ M. Bepridil also inhibited the hKv1.5 channel current with the IC_{50} value of 6.6 μ M. The inhibitory effects of bepridil on I_{Kur} in rat atrial cells and hKv1.5 current in HEK293 cells were voltage-dependent. Amiodarone weakly inhibited rat atrial I_{Kur} and hKv1.5 current. In contrast, E-4031 at a concentration of 10 μ M had little influence on these currents. **Conclusion:** Bepridil inhibits I_{Kur} and hKv1.5 channel current in a voltage-dependent manner. The inhibitory effects of bepridil may be useful for the antiarrhythmic effects against atrial fibrillation.

Discipline: Experimental; **Object of Study:** Heart; **Level:** Cellular;

Expertise: Electro-physiol.

Key Words: Antiarrhythmic agents, Ion channels, Membrane currents,
Repolarization

1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common persistent cardiac arrhythmia and prevalence of AF is estimated to be 6 % in those older than 65 years [1]. Since AF is associated with considerable morbidity and mortality [2-4], the insight is growing that it may be necessary to restore and maintain sinus rhythm rather than to control the ventricular rate during AF. Although the precise mechanism of AF is not fully understood, random reentry of coexisting multiple wavelets in the atria is the most likely mechanism [5]. As action potential duration is a major determinant of the refractory period, it would be of importance to evaluate the effects of antiarrhythmic drugs on repolarizing K^+ currents in atrial cells. Many K^+ currents including the delayed rectifier K^+ current (I_K), the transient outward current (I_{to}), the inward rectifier K^+ current (I_{K1}) and the muscarinic acetylcholine receptor-operated K^+ current (I_{KACH}) are involved in the repolarization of the atrial action potential [6]. One of the primary K^+ currents involved in atrial repolarization is the ultra-rapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) because the K^+ current activates very rapidly and inactivates little during the whole plateau phase of the atrial action potential. The I_{Kur} has been recorded from rat [7], dog [8] and human atrial myocytes [9]. It has been proposed that human Kv1.5 (hKv1.5) underlies the I_{Kur} found in human atrial myocytes [9-11]. In addition, electrophysiological studies [12, 13] have shown that the hKv1.5-like

current could not be recorded from human ventricular myocytes. Therefore, antiarrhythmic drugs having inhibitory action on I_{Kur} would be expected to suppress reentrant atrial arrhythmias more effectively.

Bepridil is assumed to be an antiarrhythmic drug possessing class I and IV properties. Several reports from our and other laboratories have demonstrated that bepridil inhibits the L-type Ca^{++} current as well as the Na^+ current in isolated cardiomyocytes [14,15]. In addition, bepridil inhibits several K^+ currents such as the delayed rectifier K^+ current (I_K), $I_{K,ACh}$, I_{to} , the Na^+ -activated K^+ current ($I_{K,Na}$) and the ATP-sensitive K^+ current ($I_{K,ATP}$) [15-19]. Such a multichannel blocker has been shown to be effective against not only ventricular arrhythmias but also atrial arrhythmias [20]. However, effects of bepridil on I_{Kur} have not been evaluated. Accordingly, this study was undertaken to determine the effects of bepridil on the I_{Kur} in rat atrial myocytes and the hKv1.5 channel current expressed in HEK293 cells using the whole-cell patch clamp technique. In addition, the effects of bepridil were compared with those of amiodarone, a prototype multichannel blocker, and E-4031, a class III antiarrhythmic drug.

2. Methods

2.1 Isolation of single atrial cells

The experiments were performed under the regulations of the Animal Research Committee of Chiba University School of Medicine. This investigation conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996). Single atrial myocytes were obtained from rats by enzymatic dissociation, as described previously [21]. The hearts were rapidly removed from the rats (200-300 g) anesthetized with pentobarbital sodium, and mounted on a modified Langendorff perfusion system for retrograde perfusion with a normal HEPES-Tyrode solution (37 °C). The perfusate was then changed to a nominally Ca⁺⁺-free Tyrode solution, and changed to a solution containing 0.04 % w/v collagenase (Wako, Osaka, Japan). After digestion, the heart was perfused with high K⁺, low Cl⁻ solution (modified Kraftbrühe (KB) solution) [21]. Atrial tissue was cut into small pieces in the modified KB solution, and the pieces were gently agitated to dissociate cells. The cell suspension was stored in a refrigerator (4 °C) and used on the same day. The composition of the normal HEPES-Tyrode solution was (mM) : NaCl 143, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.33, glucose 5.5 and HEPES-NaOH buffer (PH 7.4) 5.0. The nominally Ca⁺⁺-free Tyrode solution was prepared by simply omitting CaCl₂

from the normal HEPES-Tyrode solution. The composition of the modified KB solution was (mM) : KOH 70, L-glutamic acid 50, KCl 40, taurine 20, KH₂PO₄ 20, MgCl₂ 3, glucose 10, ethylene glycol-bis-2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) 1.0 and HEPES-KOH (PH 7.4) 10.

2.2 Transfection and Cell culture

Full-length cDNA of human Kv1.5 was ligated to the mammalian expression vector pcDNA-3.1 (Invitrogen). HEK293 cells were transfected with this plasmid using Lipofect AMINE PLUS (Gibco) followed by selection and propagation in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco), 100 u/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 mg/ml Geneticin (G 418, Gibco). The cultures were passed every 3-5 day by use of a brief trypsin treatment. The cells were maintained at 37 °C in 5 % CO₂ and plated on glass cover slips 2-3 days before electrophysiological experiments.

2.3 Electrophysiological study

Whole-cell membrane current recordings were performed by the patch clamp method. Single atrial myocytes or HEK293 cells were placed in a recording chamber (1 ml volume) attached to an inverted microscope

(Olympus IMT-2, Tokyo, Japan), and superfused with the HEPES-Tyrode solution at a rate of 3 ml/min. The temperature of the external solution was kept constant at 36 ± 1 °C. Glass patch pipettes with a tip diameter of 2-3 μM were heat-polished and filled with an internal solution composed of (mM): KOH 110, L-aspartate 110, KCl 20, MgCl_2 1, ATP- K_2 5, phosphocreatine- K_2 5, EGTA 10 and HEPES-KOH (PH 7.4) 5. The free Ca^{++} concentration in the pipette solution was adjusted to pCa 8. The resistance of the pipette filled with the internal solution was 1-3 M Ω . After the gigaohm seal between the tip and the cell membrane was formed, the membrane patch was disrupted by applying more negative pressure to make the whole cell voltage-clamp mode. The electrode was connected to a patch/whole cell clamp amplifier (Nihon Kohden CEZ-2300, Japan). Recording signals were filtered at 1 kHz band width, and series resistance was compensated by 40-70 %. Voltage command pulses were generated, and data were acquired by an IBM compatible computer (Compaq Prolinea 4/50 with a 200 Mbyte hard disc, U.S.A.) using pCLAMP software (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A.). Current signals were digitized with a sampling interval of 2 kHz and stored on the hard disc of the computer. A liquid junction potential between the internal solution and the bath solution of -8 mV was corrected.

In the experiments using rat atrial myocytes, membrane currents were recorded by delivering 100 ms depolarizing pulses from a holding potential of -60 mV to voltages between -40 mV and +40 mV in increments of 10 mV

at a rate of 0.1 Hz. After the stabilization of the membrane currents in the control condition, the bath solution was switched from normal HEPES-Tyrode solution to Na⁺-free and Co⁺⁺-containing Tyrode solution to block Ca⁺⁺ current and Na⁺ current. The composition of the solution was (mM) : choline Cl 143, KCl 5.4, KH₂PO₄ 0.33, MaCl₂•6H₂O 0.5, glucose 5.5, HEPES 5, atropine sulphate 0.005, CaCl₂ 1.8, CoCl₂ 2. After the stabilization of the membrane current, rat atrial cells were exposed to antiarrhythmic drugs. After exposure to one of the antiarrhythmic drugs, 4-aminopyridine (4-AP, 3 mM) was applied to the cells since 4-AP was reported to inhibit I_{Kur} in rat atrial cells at a relatively high concentration [7]. The 4-AP-sensitive current was designated as I_{Kur}, and the percent inhibition of the current by an antiarrhythmic drug was calculated.

In a part of experiments effects of bepridil on the action potential were examined in rat atrial cells. The action potential was recorded in the current-clamp mode using the same pipette solution and the normal HEPES-Tyrode solution. The cells were stimulated by passing 2 ms currents through the pipette at a rate of 0.2 Hz.

In patch clamp experiments using HEK293 cells, membrane currents were elicited by 200-ms depolarizing pulses from -80 mV to voltages between -60 mV and 60 mV, and then clamp back to -40 mV for 200 ms in normal Tyrode solution. After the attainment of stable membrane currents the cells were exposed to one of various antiarrhythmic drugs.

2.4 Drugs

The following drugs were used: bepridil (Sankyo Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), amiodarone (Taisho Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), E-4031(N-[4-[[1-[2-(6-methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-piperidinyl]carbonyl-phenyl] methanesulphonamide dihydrochloride dihydrate) (Eisai Co., Ltd. Tsukuba, Japan), atropine sulfate monohydrate (Wako, Osaka, Japan). Bepridil and amiodarone were prepared as a stock solution of 10 mM in dimethyl sulphoxide. It was confirmed that the solvents had no influence on the membrane currents. Other drugs were dissolved in distilled water.

2.5 Statistics

All values are presented in terms of mean \pm SEM. Student's *t*-test for paired or unpaired observations was used for statistical analysis. P values of less than 0.05 were considered significant. The concentration-effect data were fitted and IC₅₀ values were obtained using Delta Graph Professional (Delta Point, Polaroid computing, Tokyo, Japan).

3. Results

3.1 Effects of bepridil, amiodarone and E-4031 on I_{Kur} in rat atrial cells

Effects of bepridil on the I_{Kur} that was recorded from rat atrial myocytes in the Na^+ -free and Co^{++} -containing Tyrode solution were examined. Figure 1 shows representative tracings of I_{Kur} before and after 1 and 3 μM bepridil. The outward current rose rapidly to a maximal level and then slowly and partially inactivated. The outward current was largely inhibited by 3 mM 4-aminopyridine (4-AP), as previously reported by Boyle and Nerbonne [7]. Here we designated the rapidly activating, sustained component (I_{sus} or I_{ss}) of the outward current, which Kv1.5 probably underlies [22], as I_{Kur} . Bepridil at a concentration of 1 μM significantly depressed the steady state outward current, which was measured at the end of the depolarization pulse to 40 mV, from 1.1 ± 0.2 nA to 0.7 ± 0.1 nA, ($P < 0.05$, $n=6$). Bepridil at a concentration of 1 μM reduced the steady state currents (66.3 ± 4.6 %) more effectively than the peak current (29.5 ± 7.2 %) at +40 mV, suggesting that bepridil might act as an open channel blocker. The current-voltage (I-V) relationships for the steady state outward currents in the absence and presence of 1 or 3 μM bepridil are summarized in Figure 1. Bepridil reduced I_{Kur} over whole voltage range over which this current was activated. Bepridil inhibited I_{Kur} of rat atrial myocytes in a concentration-dependent manner (Figure 2). The calculated IC_{50} value of

bepiridil for inhibiting I_{Kur} , which was measured at the end of depolarization pulse to +40 mV, was 0.48 μ M.

Amiodarone also inhibited I_{Kur} in rat atrial cells although the potency was less potent than bepridil on molar basis. Figure 3A shows representative tracings of I_{Kur} in the absence and presence of 10 μ M amiodarone. The outward current was markedly suppressed by 3 mM 4-AP. The outward current measured at the end of the 100 ms depolarizing pulses to +40 mV before and after 10 μ M amiodarone was 1.2 ± 0.3 nA and 0.6 ± 0.1 nA ($P < 0.05$, $n=5$), respectively. The calculated IC_{50} value of amiodarone for inhibiting I_{Kur} , which was measured at the end of depolarization pulse to +40 mV, was 7.0 μ M. In contrast, E-4031 hardly affected I_{Kur} in rat atrial cells, as shown in Figure 3C. The I_{Kur} was insignificantly changed from 1.0 ± 0.2 nA to 1.1 ± 0.1 nA after 10 μ M E-4031 (n.s., $n=7$).

3.2 Effects of bepridil on the action potential

Effects of bepridil on the action potential of rat atrial cells were examined in the current clamp mode. The baseline characteristics of action potentials recorded from single atrial myocytes stimulated at 0.2 Hz were as follows: resting membrane potential, -78.6 ± 1.1 mV; action potential amplitude, 139.5 ± 4.8 mV; action potential duration at -50 mV (APD_{-50mV}),

59.8±5.3 ms (n=5). Bepridil at a concentration of 1 μM prolonged APD_{-50mV} by 53.5±7.8 % (P<0.05, n=5), and the prolongation was reverted toward the control after washout (Figure 4).

3.3 Effects of bepridil, amiodarone and E-4031 on hKv1.5 channel current in HEK293 cells

Effects of bepridil, amiodarone and E-4041 on the potassium current through hKv1.5 channels stably expressed in HEK293 cells were examined. Representative current tracings in the absence and presence of bepridil are shown in Figure 5. The cell was held at -80 mV and 200 ms depolarizing pulses from -60 mV to +60 mV in increments of 10 mV steps were applied every 10 s. The hKv1.5 current rose rapidly to a peak and then slowly and partially inactivated. Bepridil at a concentration of 10 μM reduced the steady state current at +40 mV by 62.3±3.0 % (from 5.6±0.3 nA to 2.1±0.2 nA, P<0.05, n=5), and the peak current by 17.3±2.7 % (from 6.3±0.3 nA to 5.2±0.4 nA, P<0.05). Bepridil inhibited the steady state current measured at the end of the depolarizing pulses more effectively than the peak current, suggesting that bepridil binds preferentially to the open state of the channel. The current-voltage relationships of the steady state current before and after 3 and 10 μM bepridil are shown in Figure 5. Bepridil reduced hKv1.5 channel current over the whole voltage range over which this current was

activated, but the inhibitory effect was more prominent at more positive potentials. The fractional block of hKv1.5 channel current by 10 μ M bepridil at the end of depolarizing pulses to 0 mV and +60 mV was 0.31 ± 0.04 and 0.65 ± 0.03 , respectively. Figure 6 shows the concentration-dependent inhibition of the hKv1.5 channel current measured at the end of 200 ms depolarizing pulses to +40 mV by bepridil, and the calculated IC₅₀ value was 6.6 μ M.

In contrast, amiodarone and E-4031 failed to inhibit the hKv1.5 channel current markedly. Figure 7 illustrates representative tracings of hKv1.5 channel current in the absence and presence of 10 μ M amiodarone or 10 μ M E-4031 in HEK293 cells. The current measured at the end of the 200 ms depolarizing pulses to +40 mV was 4.3 ± 0.4 nA and 4.0 ± 0.4 nA before and after 10 μ M amiodarone, respectively ($P < 0.05$, $n = 12$). The steady state hKv1.5 channel was insignificantly changed from 4.4 ± 1.1 nA to 4.2 ± 1.2 nA by 10 μ M E-4031 ($n = 4$).

4. Discussion

The ultra-rapid delayed rectifier K⁺ current (I_{Kur}) has been recorded in cardiomyocytes of many animal species such as rat [7, 23], dog [8,24] and mouse [25]. The K⁺ current is an outwardly rectifying and highly selective K⁺ channel with a rapid time course of activation. The close biophysical correspondence between I_{Kur} identified in human atrial cells and hKv1.5 current suggests that hKv1.5 underlies I_{Kur} channel. Support for this concept derives from the observation that antisense oligodeoxynucleotides directed against the Kv1.5 coding sequence reduced I_{Kur} in cultured human atrial myocytes by 50 %, without affecting other currents [26]. Thus, the I_{Kur} has been postulated to be the predominant delayed rectifier K⁺ current responsible for human atrial but not ventricular repolarization. Therefore, it can be expected that antiarrhythmic drugs inhibiting I_{Kur} may effectively prevent the occurrence of atrial fibrillation without fear of excessive QT prolongation.

It has been reported that several antiarrhythmic drugs inhibit I_{Kur} and/or Kv1.5 current. Quinidine was shown to inhibit I_{Kur} at clinically relevant concentrations (IC_{50} : 5 μ M) in human atrial myocytes although flecainide produced little effect on the K⁺ current [27]. Propafenone, a class Ic antiarrhythmic drug, was also reported to inhibit I_{Kur} in human atrial cells and hKv1.5 current at the therapeutic concentrations [28, 29]. In terms of effects of class III antiarrhythmic drugs on I_{Kur} , ambasilite and

clofilium were shown to inhibit I_{Kur} in human atrial myocytes although both d-sotalol and E-4031 failed to alter the K^+ current [30, 31]. Consistent with the report, E-4031 hardly affected the I_{Kur} in rat atrial myocytes and hKv1.5 current expressed in HEK293 cells. Amiodarone is classified as a class III antiarrhythmic drug although the electropharmacological effects are really complex and the drug inhibits many membrane currents including Na^+ , Ca^{++} and K^+ currents [32]. Recent studies [33-36] have suggested that acute and chronic administration of amiodarone inhibit different kinds of K^+ currents. Acute amiodarone inhibits I_{Kr} , I_{K1} , $I_{K.ACh}$ and $I_{K.Na}$ in addition to the inhibition of the Na^+ and Ca^{++} currents whereas chronic amiodarone inhibits I_{to} and I_{Ks} . The present study demonstrated that acute administration of amiodarone weakly suppressed hKv1.5 current in HEK293 cells and I_{Kur} in rat atrial cells. In this context, a recent report [37] showed that a high concentration (100 μM) of amiodarone slightly (by 18 %) inhibited Kv1.5 current expressed in *Xenopus* oocytes. However, it was reported that chronic treatment with amiodarone reduced Kv1.5 mRNA level in rat ventricle [38]. Therefore, we cannot exclude the possibility that long-term treatment with amiodarone decreases the density of I_{Kur} in atrial cells and prolongs the action potential duration.

Bepridil is an antiarrhythmic drug possessing multichannel blocking action like amiodarone although the drug does not have antiadrenergic effects on the heart. Bepridil was shown to inhibit many K^+ currents such as I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{to} , $I_{K.ACh}$, $I_{K.Na}$ and $I_{K.ATP}$ in addition to its inhibitory action on

the Na⁺ and Ca⁺⁺ currents [14-19]. In this study bepridil also inhibited I_{Kur} of rat atrial cells and hKv1.5 current at the therapeutic concentrations.

Bepridil inhibited the steady-state currents than the peak currents more effectively, suggesting that the drug inhibits I_{Kur} and hKv1.5 current as an open channel blocker. The inhibition of these currents by bepridil was greater at more depolarized potentials. Most of the voltage dependent block might be attributable to voltage dependence of I_{Kur} and hKv1.5 current activation. Thus, bepridil inhibited these currents in a time- and voltage-dependent fashion. Similar mode of blocking action was observed with quinidine [27] and propafenone [28, 29].

It is well known that electrical remodeling, i.e., alteration of electrophysiological properties, can be induced in the atrial myocardium during repetitive electrical activity [39]. Although initially atrial fibrillation terminates spontaneously within a few seconds, the repetitive induction of atrial fibrillation leads to progressive prolongation of the duration of the induced paroxysms of atrial fibrillation. This phenomenon is called as "atrial fibrillation begets atrial fibrillation" and probably due to the electrical remodeling such as shortenings of atrial action potential and atrial refractoriness [39]. Although the precise mechanism(s) underlying the electrical remodeling have not been well established, the decreased density of the L-type Ca⁺⁺ current may play an important role in the electrical remodeling in the chronic phase [40]. More recently it has been demonstrated that high-rate atrial pacing increased the mRNA level of the

Kv1.5 channel within a few hours in rat hearts [41]. Therefore, the antiarrhythmic drugs possessing Kv1.5 channel blocking action may be useful to prevent or terminate the recurrence of paroxysmal atrial fibrillation within a short period.

Bepridil has been shown to inhibit I_{Kr} , I_{Ks} , [19] and $I_{K,ACh}$ [15] in addition to Na^+ and Ca^{++} channel blockade. This study has demonstrated that bepridil can also inhibit I_{Kur} . These electrophysiological effects of bepridil may be useful for the antiarrhythmic effects, especially for the prevention or termination of atrial fibrillation.

Acknowledgments

The authors want to express their thanks to Dr. M. M. Tamkun for providing us the clone of hKv1.5 channels. The authors thank M. Tamagawa and I. Sakashita for their technical and secretarial work. This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan and K. Watanabe Research Fund.

References

- [1] Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution and gender of patients with atrial fibrillation. *Arch Intern Med* 1995;155:469-473.
- [2] Braud FN, Abbott RD, Kannel WB, Wolf PA. Characteristics and prognosis of lone atrial fibrillation. 30 years follow-up in the Framingham study. *JAMA* 1985;254:3449-3453.
- [3] Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnant JP, Holmes DR, Ilstrup DP, Frye RL. The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. *N Engl J Med* 1987;317:669-674.
- [4] Alpert JS, Peterson P, Godtfedsen J. Atrial fibrillation: natural history, complication and management. *Ann Rev Med* 1988;69:519-529.
- [5] Allesie MA, Lammers WJEP, Bonke IM, Nollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. In: Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac Arrhythmias*. New York, Grum & Stratton. 1985: 265-276.
- [6] Roden DM, George AlJr. Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am J Physiol* 1997;273:H511-H525.
- [7] Boyle WA, Nerbonne JM. A novel type of depolarization-activated K⁺ current in isolated adult rat atrial myocytes. *Am J Physiol* 1991;260:H1236-H1247.

- [8] Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Characterization of an ultra rapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J Physiol (Lond)* 1996;496:647-662.
- [9] Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;73:1061-1076.
- [10] Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 1993;73:210-216.
- [11] Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart. Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;101:513-543.
- [12] Korarzewska H, Peeters GA, Sanguinetti MC. Repolarizing K⁺ currents in nonfailing human hearts: Similarities between right septal subepicardial and left subepicardial ventricular myocytes. *Circulation* 1995;92:1179-1187.
- [13] Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78:689-696.
- [14] Yatani A, Brown A, Schwartz A. Bepridil block of cardiac calcium and sodium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237:9-17.

- [15] Hara Y, Nakaya H. SD-3212, a new class I and IV antiarrhythmic drug: a potent inhibitor of the muscarinic acetylcholine-receptor-operated potassium current in guinea pig atrial cells. *Br J Pharmacol* 1995;116:2750-2756.
- [16] Berger F, Bohchard U, Hafner D. Effects of the calcium entry blocker bepridil on repolarizing and pacemaker currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989;339:638-646
- [17] Mori K, Kobayashi S, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Inhibitory effects of class I and IV antiarrhythmic drugs on the Na⁺-activated K⁺ channel current in guinea pig ventricular cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998;358:641-648.
- [18] Wang JC, Kiyosue T, Kiriyaama K, Arita M. Bepridil differentially inhibits two delayed rectifier K⁺ currents, I_{Kr} and I_{Ks}, in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1999;128:1733-1738.
- [19] Li Y, Sato T, Arita M. Bepridil blunts the shortening of action potential duration caused by metabolic inhibition via blockade of ATP-sensitive K⁺ channel and Na⁺-activated K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 1999;291:562-568.
- [20] Roden DM. Antiarrhythmic drugs. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1995:839-874.
- [21] Mori K, Hara Y, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Anticholinergic effects

- of class III antiarrhythmic drugs in guinea-pig atrial cells: different molecular mechanisms. *Circulation* 1995;91:2834-2843.
- [22] Barry DM, Nerbonne JM. Myocardial potassium channels: Electrophysiological and molecular diversity. *Annu Rev Physiol* 1996;58:363-394.
- [23] Guo W, Kamiya K, Liu W, Toyama J. Developmental changes of ultra rapid delayed rectifier K⁺ current in rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1997;433:442-445.
- [24] Jeck C, Boyden P. Age-related appearance of outward current may contribute to developmental differences in ventricular repolarization. *Circ Res* 1992;71:1390-1403.
- [25] Fiset C, Clark RB, Larsen TS, Giles WR. A rapidly activating sustained K⁺ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (Lond)* 1997;504:557-563.
- [26] Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligonucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultra rapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997;80:572-579.
- [27] Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine and 4-aminopyridine on transient outward and ultra rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:184-196.

- [28] Franqueza L, Valenzuela C, Delpon E, Longobardo M, Caballero R, Tamargo J. Effects of propafenone and 5-hydroxy-propafenone on hKv1.5 channels. *Br J Pharmacol* 1998;125:969-978.
- [29] Seki A, Hagiwara N, Kasanuki H. Effects of propafenone on K⁺ currents in human atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 1999;126:1153-1162.
- [30] Feng J, Wang Z, Li GR, Nattel S. Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:384-392.
- [31] Snyders DJ, Yeola SW. Determinants of antiarrhythmic drug action. Electrostatic and hydrophobic components of block of the human cardiac hKv1.5 channel. *Circ Res* 1995;77:575-583.
- [32] Kodama I, Kamiya K, Toyama J. Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res* 1997;35:13-19.
- [33] Kiehn J, Thomas D, Karle CA, Schöls W, Kübler W. Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999;359:212-219.
- [34] Watanabe Y, Hara Y, Tamagawa M, Nakaya H. Inhibitory effects of amiodarone on the muscarinic acetylcholine receptor-operated potassium current in guinea pig atrial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:617-624.
- [35] Mori K, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Effects of class III

- antiarrhythmic drugs on the Na⁺-activated K⁺ channels in guinea pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:133-141.
- [36] Varro A, Virag L, Papp JG. Comparison of chronic and acute effects of amiodarone on the calcium and potassium currents in rabbit isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1996;117:1181-1186.
- [37] Rolf S, Haverkamp W, Borggrefe M, MuBhoff U, Eckardt L, Mergenthaler J, Snyder DJ, Pongs O, Speckmann EJ, Breithardt G, Madeja M. Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000;362:22-31.
- [38] Kamiya K, Cheng J, Kodama I, Toyama J. Modulation of repolarizing potassium channels and Kv1.5 mRNA by long-term treatment with amiodarone. *Circulation* 1995;92:S1-373 (Abstract)
- [39] Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation : A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954-1968.
- [40] Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;81:512-525.
- [41] Yamashita T, Murakawa Y, Hayami N, Fukui E, Kasaoka Y, Inoue M, Omata M. Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K⁺ channels in rat atrium: Electrical remodeling in paroxysmal atrial tachycardia. *Circulation* 2000;101:2007-2014.

Figure Legends

Fig. 1. Effects of bepridil on I_{Kur} in rat atrial myocytes. Membrane currents were elicited by 100 ms depolarizing pulses from -60 mV to voltages between -40 mV and +40 mV in steps of 10 mV in control condition and in the presence of 1 μ M (upper) or 3 μ M bepridil (lower). The steady-state current-voltage (I-V) relationships before (Control) and after bepridil (Bep) are shown on the right side. Each point represents the mean \pm SEM of 5 - 6 rat atrial myocytes.

Fig. 2. Concentration-response curve for the inhibitory effect of bepridil on I_{Kur} in rat atrial cells. Percent inhibition of the 4-AP-sensitive current at the end of 100 ms depolarizing pulses to +40 mV is indicated on the ordinate and the concentrations of bepridil are on the abscissa. The calculated IC_{50} value was 0.48 μ M. Each point represents the mean \pm SEM of 5 - 6 experiments.

Fig. 3. Effects of amiodarone and E-4031 on I_{Kur} in rat atrial cells. Effects of amiodarone and 4-aminopyridine (4-AP) on I_{Kur} are shown in panel A. The steady-state current voltage relationships before and after 10 μ M amiodarone are shown on the right side. Concentration-response curve for the inhibitory effect of amiodarone on I_{Kur} is shown in panel B. Representative changes of after 10 μ M

E-4031 are shown in panel C. Pulse protocol was the same as shown in panel A.

Fig. 4. Effects of bepridil on the action potential recorded from rat atrial cells. Representative changes of the action potential configuration after 1 μ M bepridil are depicted in upper panels. Summarized changes of action potential duration at -50 mV (APD_{-50mV}) are shown in lower panel. Values are expressed as mean \pm SEM of 5 cells. * $P < 0.05$ vs control.

Fig. 5. Effects of bepridil on hKv1.5 channels stably expressed in HEK 293 cells. Representative current traces after 3 μ M and 10 μ M bepridil are shown in upper and lower panels, respectively. The steady-state current-voltage (I-V) relationships before and after bepridil (Bep) are shown on the right side of each panel. Each point represents the mean \pm SEM of 5 experiments.

Fig. 6. Concentration-response curve for the inhibitory effect of bepridil on hKv1.5 channel current in HEK293 cells. Percent inhibition of the current after 200 ms depolarizing pulse to $+40$ mV was used as an index of block and the calculated IC_{50} value was 6.6 μ M. Each point represents the mean \pm SEM of 5 experiments.

Fig. 7. Representative current traces of hKv1.5 channels expressed in HEK293 cells after amiodarone (upper panel) and E-4031 (lower panel). Pulse protocol is shown in the upper inset. Note that neither amiodarone nor E-4031 produces a marked inhibition of hKv1.5 current in HEK cells at a concentration of 10 μ M.

Figure 1

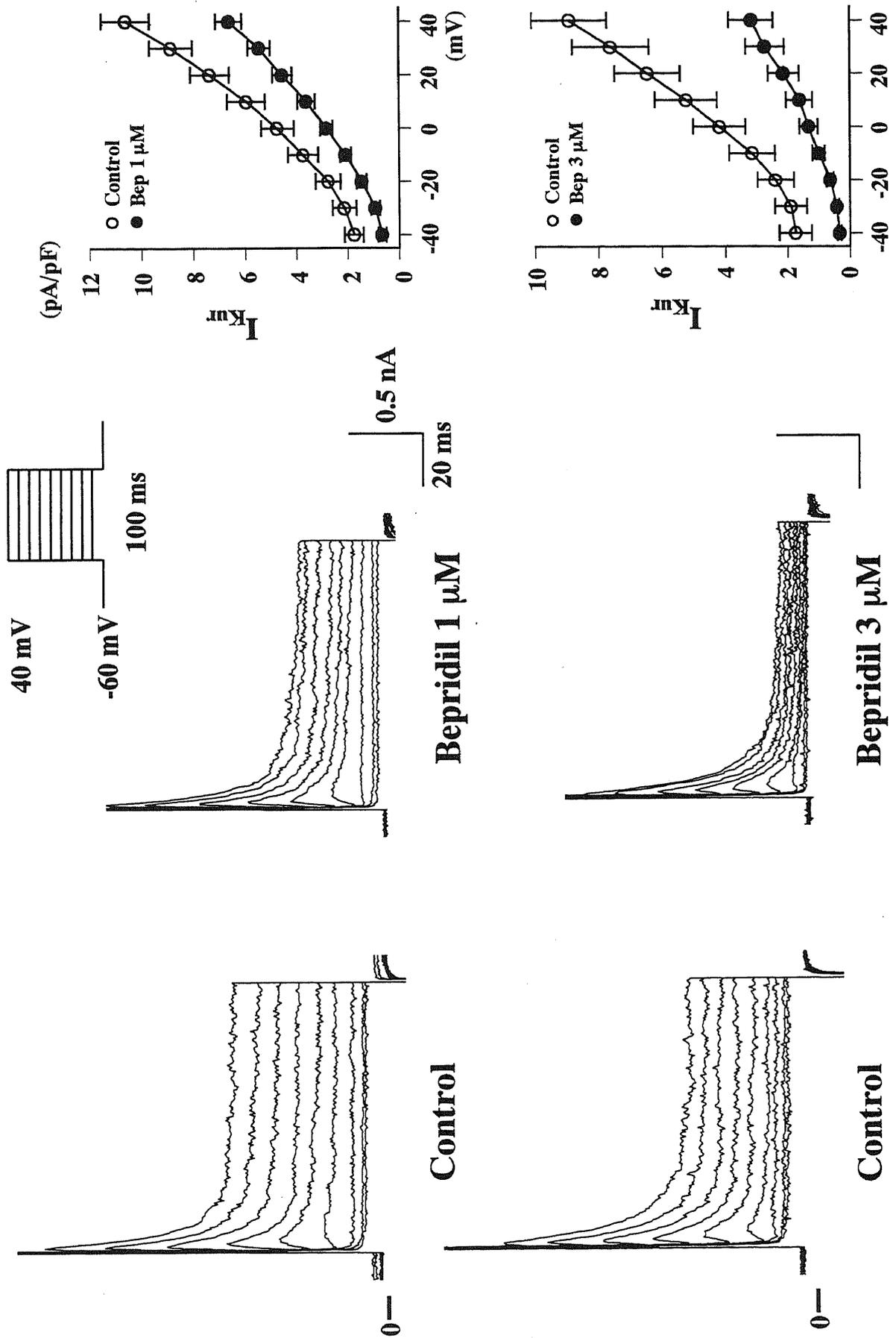


Figure 2

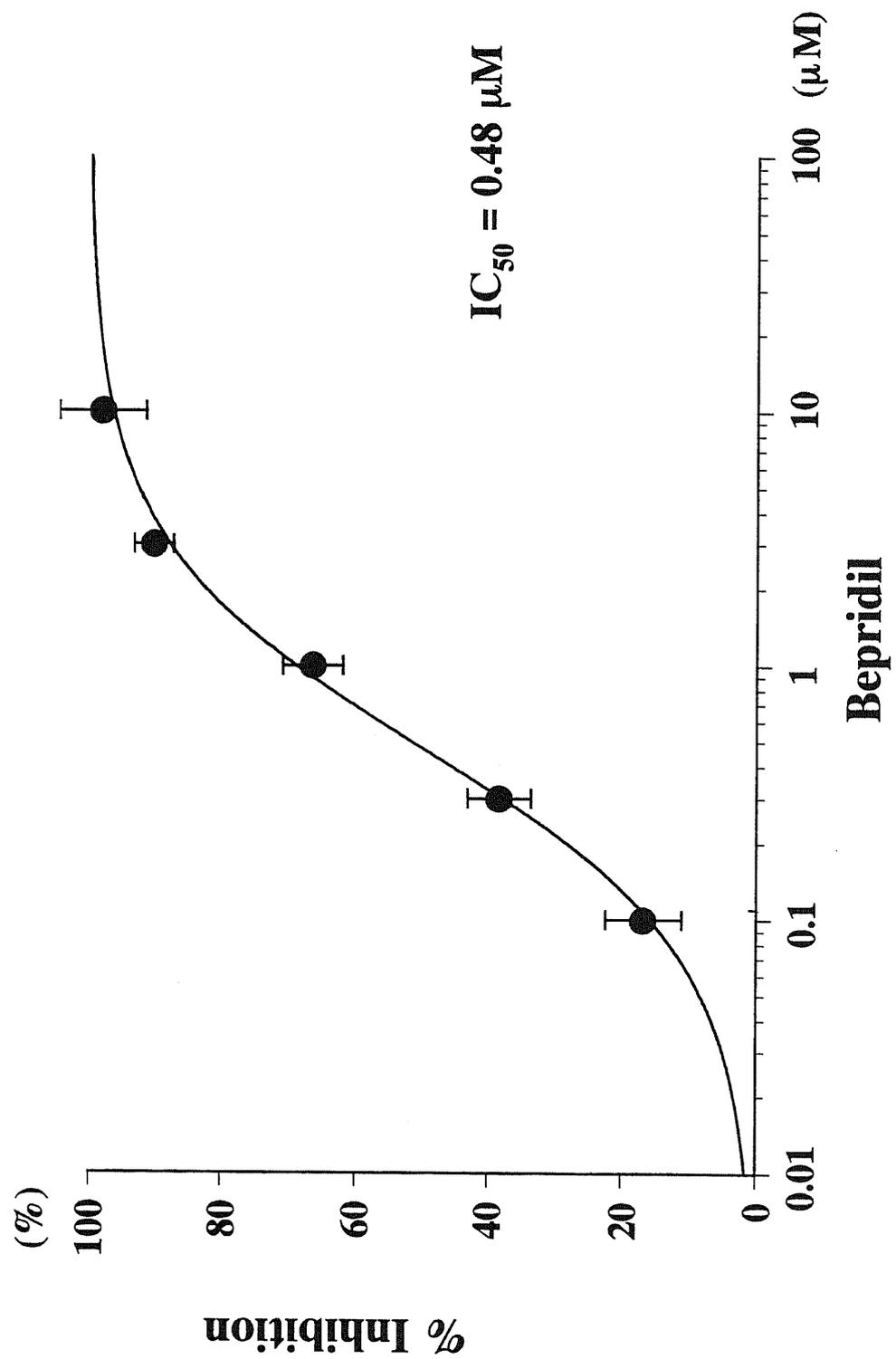


Figure 3

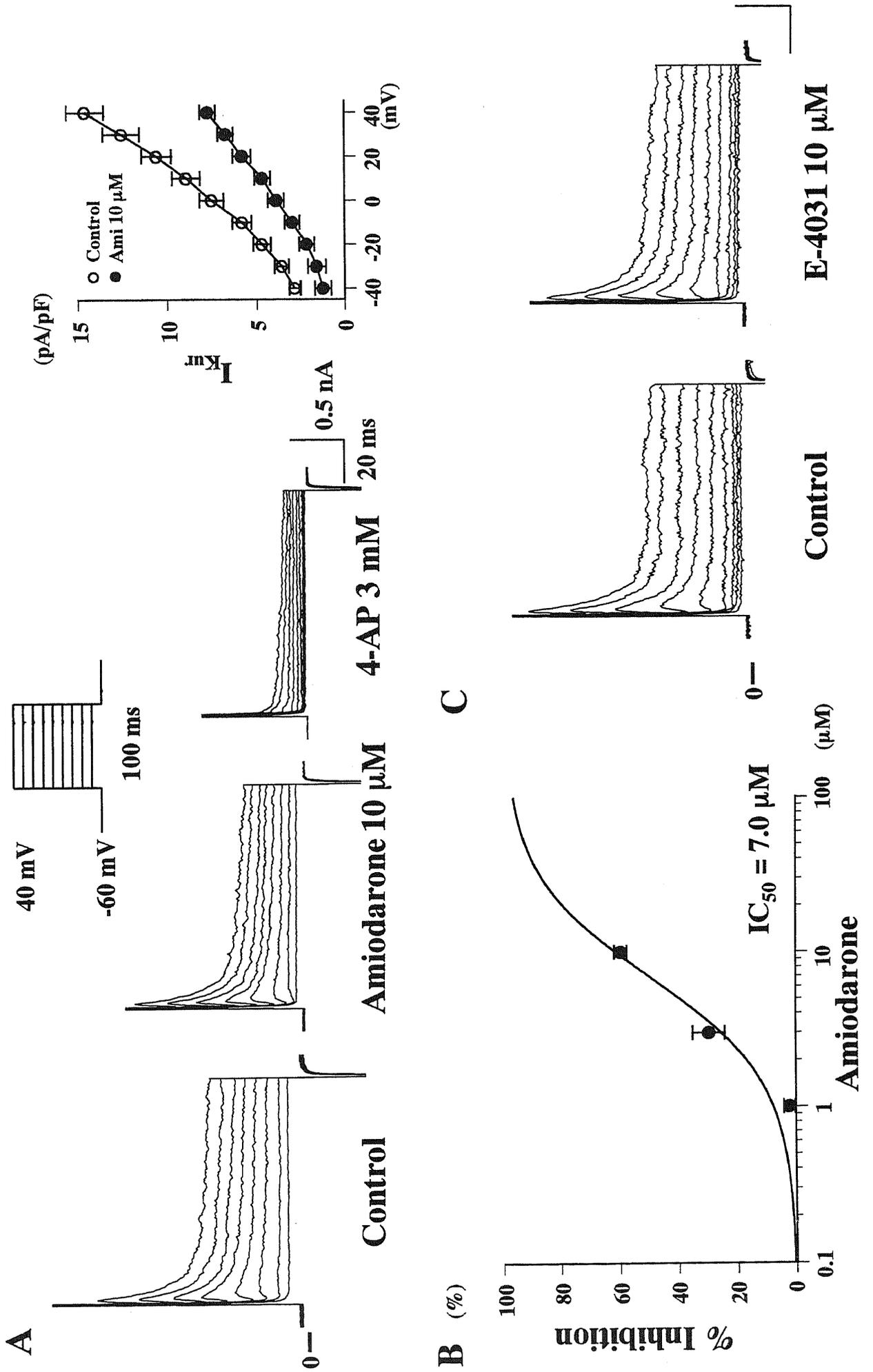


Figure 4

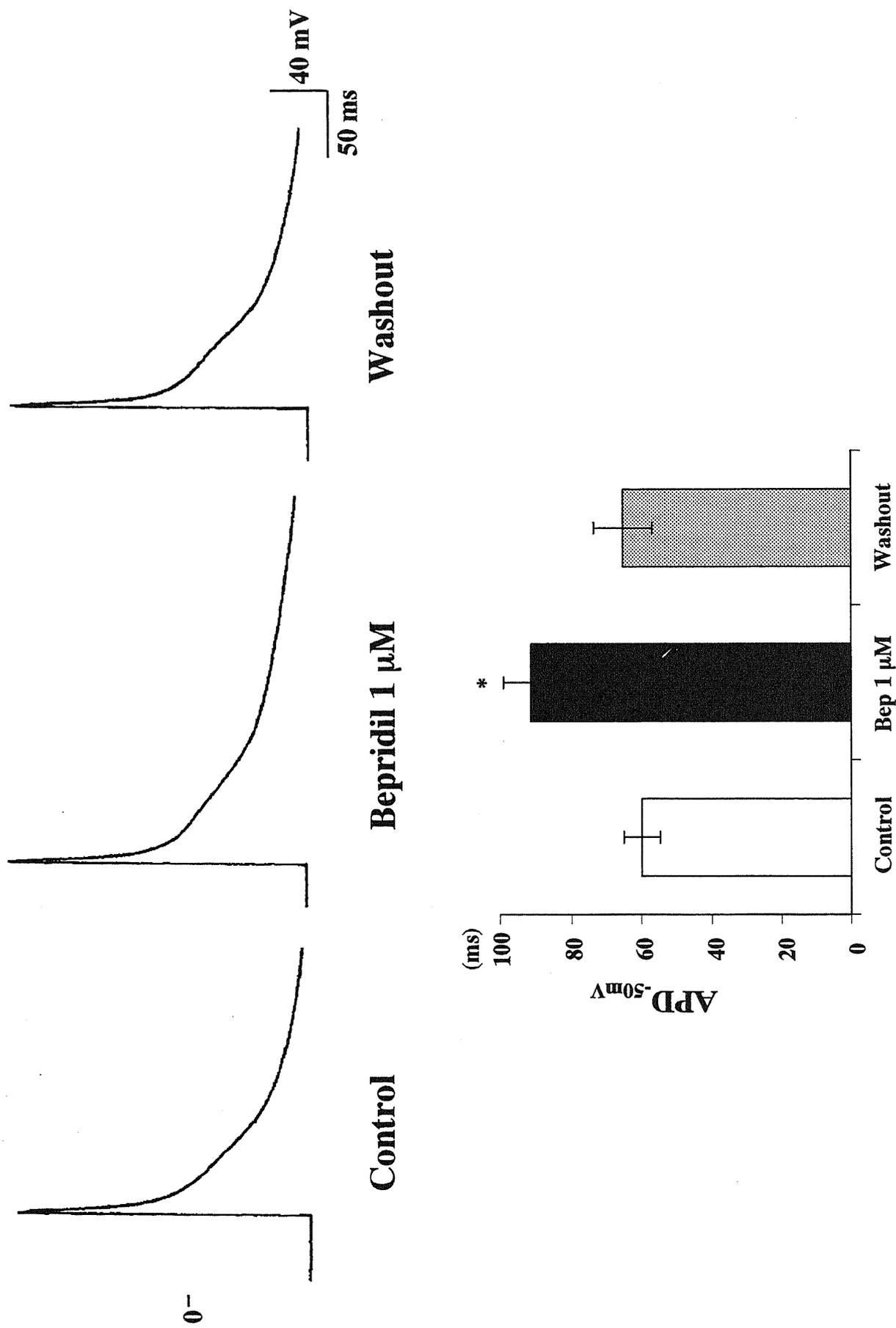


Figure 5

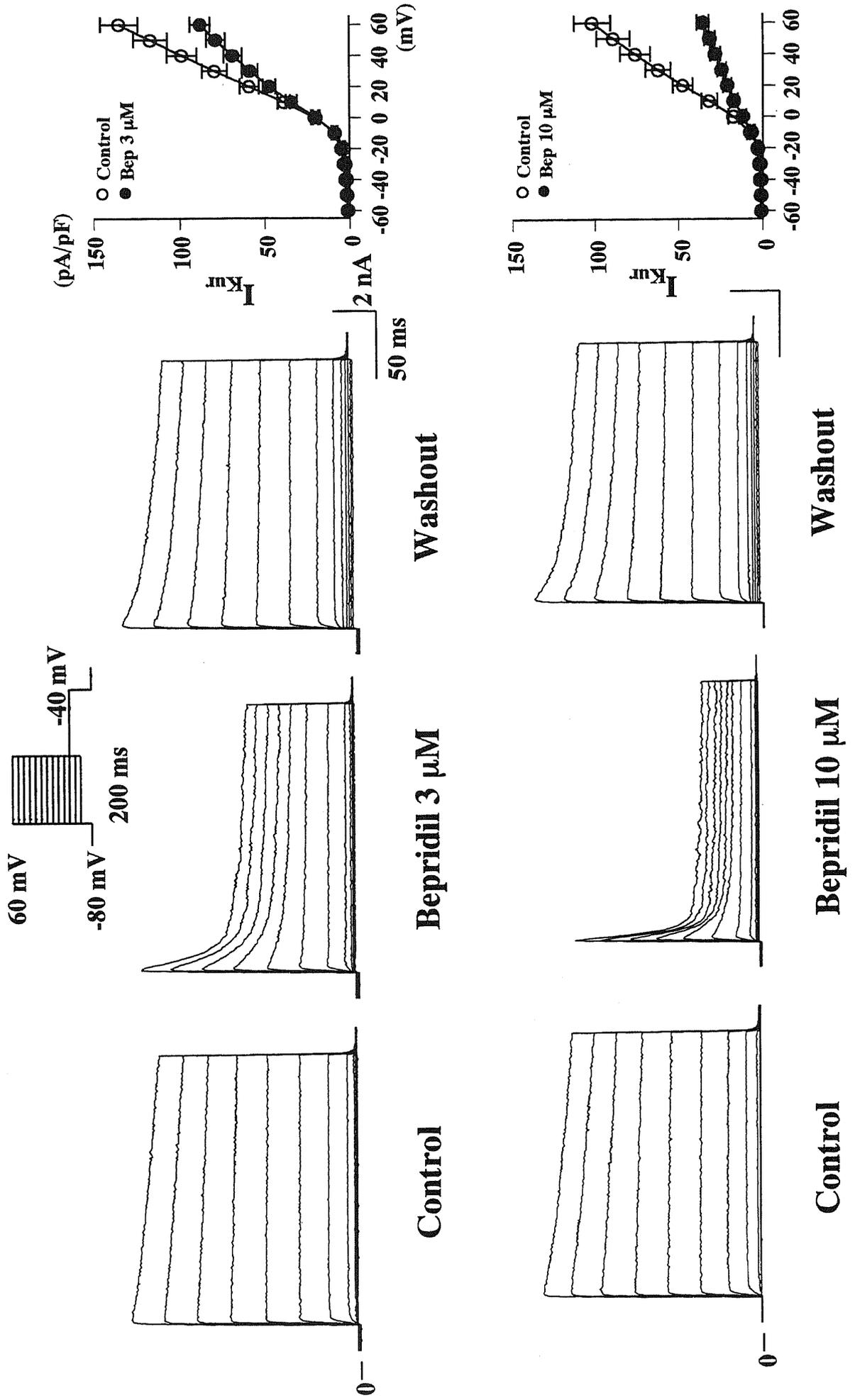


Figure 6

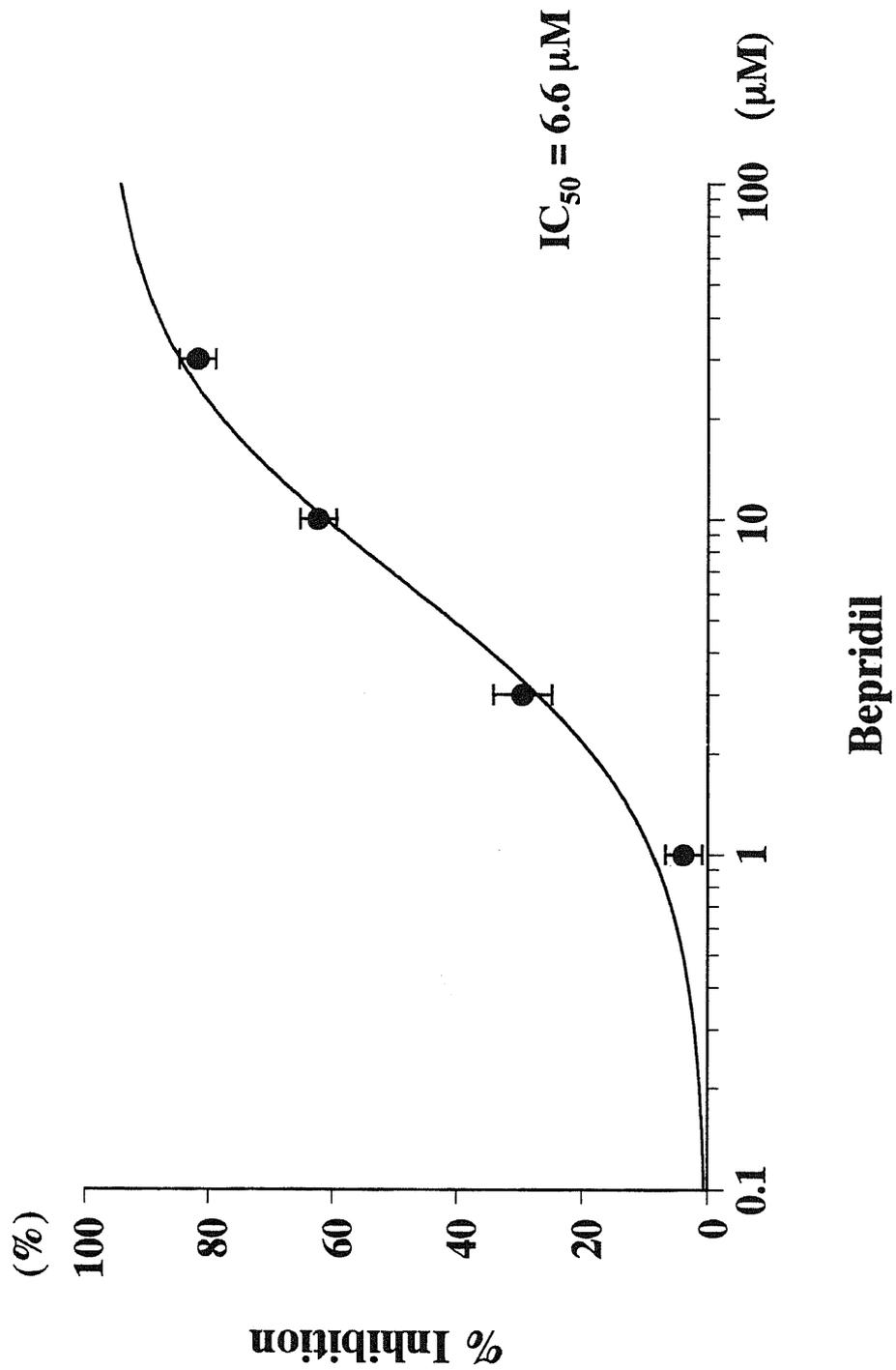


Figure 7

