心不全・致死的不整脈における 細胞内カルシウム放出異常の分子機序

矢野 雅文, 山本 健, 小林 茂樹, 松崎 益徳

要約: 心筋細胞膜の脱分極が生じると L 型 Ca^{2+} チャネル (LTCC) から少量の Ca^{2+} が流入し, その流入 Ca^{2+} がトリガーとなり筋小胞体 (SR) 膜上にある Ca^{2+} 放出チャネルのリアノジン受容体 (RyR) からの大量の Ca^{2+} 放出を引き起こす. 細胞内の増加した Ca^{2+} は, 収縮タンパク質を活性化した後, SR の Ca^{2+} -ATPase により SR 内に再び取り込まれるとともに, 一部は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構や細胞膜 Ca^{2+} ポンプを介して除去される. このような細胞内の Ca^{2+} 濃度変化は心筋の機械的収縮・弛緩に先行し心筋収縮・弛緩様式を規定する重要な因子となっている. 細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻は, SR 内 Ca^{2+} 含有量の低下や拡張期の Ca^{2+} 漏出を介して心不全や致死的不整脈の発症ないし病態の悪化に深く関与する. 一方, RyR は, 巨大な高分子タンパク質として存在し, チャネルポアを形成する膜貫通領域は全体の約 1 割を占め, 残りの約 9 割は細胞質側に突出した構造物として存在しチャネル開閉を調節していると考えられている. 最近著者らは, この RyR 内において arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) や catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) でみられる点突然変異集合領域 [N 末端ドメイン (1~600) および中央ドメイン (2000~2500)] 間のドメイン連関障害は, 異常な Ca^{2+} 漏出を生じ心不全や致死的不整脈の発症ないし病態の悪化に深く関与することを示した. 一方, このような RyR 機能異常を正常化することにより心不全の発症を抑制できる可能性が実験的に示されるようになり, RyR は新たな心不全・致死的不整脈の治療ターゲットとしても期待しうる.

はじめに

心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度は, 筋小胞体 (SR) を中心とする Ca^{2+} 調節器官により制御され, 拡張期に 100 nM 前後から収縮期には約 1 μM の範囲で変動している. 最近, 不全心では SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) や SR の Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR) の機能異常により細胞内 Ca^{2+} 過負荷が生じ, 心不全の発症ないし病態の悪化を引き起こしていることが明らかとなった(1). 特に, RyR とその調節タンパク質である FKBP12.6 の相互作用や RyR 内の特定領域の構造変化は生理的なチャネル開閉にとって極めて重要であり, それらの機能的異常は Ca^{2+} 漏出を生じ心不全や不整脈の発症ないし病態の悪化に深く関与する. このような細胞内 Ca^{2+} 制御異常を正常化することにより心不全の発現を抑制できる可能性が最近実験的に示され, SR の Ca^{2+} 制御タンパク質は新たな心不全治療ターゲットとしても期待されている.

1. 心筋細胞の興奮収縮連関

心筋細胞膜の脱分極に際して, L 型 Ca^{2+} チャネル (LTCC) から少量の Ca^{2+} が流入し, この流入 Ca^{2+} が RyR から大量の Ca^{2+} 放出を引き起こし細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇する [Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出 (CICR)] (2). 収縮期に CICR により細胞内で増加した Ca^{2+} は収縮タンパク質を活性化し, 弛緩期には SR の Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) により SR 内に再び取り込まれると同時に, 一部は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構や細胞膜 Ca^{2+} ポンプを介して除去される. このようなダイナミックな細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化 (0.1~1 μM) は, Ca^{2+} transient として知られる (2). この細胞内 Ca^{2+} transient は心筋の機

キーワード: リアノジン受容体, チャネル制御ドメイン, 点突然変異, zippering-unzippering

山口大学大学院 医学系研究科 器官病態内科学 (〒755-8505 宇部市南小串 1-1-1)

E-mail: yanoma@yamaguchi-u.ac.jp 原稿受領日: 2012 年 8 月 23 日, 依頼原稿

Title: Molecular mechanism of defective intracellular calcium release in heart failure and lethal arrhythmia

Author: Masafumi Yano, Takeshi Yamamoto, Shigeki Kobayashi, Masunori Matsuzaki

機械的収縮・弛緩に先行し、心筋収縮・弛緩様式を規定する重要な因子であり、SRを中心とした Ca^{2+} 制御タンパク質の発現量や活性によって調節される。

従来より、心不全時にはSERCA2のタンパク質量が減少し、またPLNのSer16, Thr17のリン酸化が低下することによりSRの Ca^{2+} 取り込み能が悪化し心筋収縮・弛緩能の低下をきたすことがよく知られているが(1)、近年になり、RyRの機能異常に起因する Ca^{2+} 放出障害も心筋収縮・弛緩能の低下のみならず致死的不整脈の発症要因として極めて重要であることが明らかとなった(3)。

2. 心筋リアノジン受容体 (RyR2)

1) RyR2 は巨大分子複合体を形成している (図1)

RyR2は心筋筋小胞体に存在する Ca^{2+} 放出チャネルであり、分子量550 kDa、約5000のアミノ酸からなる巨大ポリペプチドの4量体である(3)。3つのisoformが存在し、骨格筋のSR上にはRyR1が、心筋SR上には主にRyR2が、脳などではRyR3が存在する。これらのisoformにおいては約60%のアミノ酸相同性がある。N末端側の約4000~4500アミノ酸からなる構造物は細胞質内に飛び出ており、この部分はチャネル活性を調整していると考えられている。一方、C末端側の500~1000アミノ酸部分には膜貫通構造があり、この部分は Ca^{2+} チャネルポアを形成していると考えら

れている(3)。

RyR2にはその細胞質側にFKBP12.6, Sorcin, mAKAP, PKA, PP1, PP2Aなどの修飾タンパク質が結合し、SR lumen側にはtriadin, junctin, calsequestrinなどが結合し、巨大な複合体を形成している(4)。交感神経刺激下では、 β 受容体-アデニル酸シクラーゼ-cyclic AMP経路を介して活性化されたprotein kinase A (PKA)がRyR2をリン酸化し、チャネルを開口状態へと調節する。これにより筋小胞体から細胞内への Ca^{2+} 放出の振幅・速度が増大し、収縮性が増強される。

2) RyR2 内の突然変異集中部位は、チャネル制御に極めて重要なドメインであり、その点突然変異はドメイン連関障害によるチャネル不安定化を誘導する

骨格筋型RyRの突然変異病である悪性高熱症(MH)およびcentral core disease (CCD)では、その突然変異アミノ酸が、約5000アミノ酸という巨大分子の4量体であるRyRの中の限られた3箇所(N末端: 0~600, 中央: 2000~2500, C末端: 4000~5000)に集中している。著者らは、N末端と中央のいずれのドメインで生じた突然変異も同様のチャネル異常、すなわち Ca^{2+} やある種のagonistに対して感受性が亢進することに注目した。そこでこの2つのドメインをチャネル制御ドメイン(N末端ドメインと中央ドメイン)と名付け、通常は互いに連関しチャネルを安定化

図1 リアノジン受容体複合体

リアノジン受容体は5000アミノ酸という巨大ポリペプチドの4量体で、C末端部分に膜貫通構造がありチャネル孔を形成しており、N末端側の大部分は細胞質に飛び出し、いわゆるfoot構造を形成している。特にアイソフォーム間で相同性が低い部分が3カ所あり、DR1、DR2、DR3と呼ばれている。リアノジン受容体にはFKBP, CaM, PKA, PP-1, PP2Aなど数多くのタンパク質が結合しリアノジン受容体複合体(macromolecular complex)を形成している。

しているが (zipping), MH/CCD ではどちらかのドメインの一箇所の突然変異がチャネル制御ドメイン間の連関障害を引き起こし (unzipping), チャネルを不安定化するという仮説をたて, この zipping-unzipping 仮説の正当性を single channel assay, 心筋筋小胞体 (SR) を用いた結合実験, skinned fiber における筋収縮能測定など, 様々なシステムで証明してきた (5-8).

一方, 心筋型リアノジン受容体 (RyR2) においては 2001 年になり初めて突然変異病が報告された (9-11). これは不整脈源性右室心筋症 (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: ARVC), あるいはカテコラミン誘発性多源性心室心拍 (CPVT) という臨床的な病態をとる. 現在までに約 70 以上の点突然変異が報告されている. その点突然変異部位は RyR2 のごく限られた部位に集中しており, その分布は骨格筋型アイソフォーム (RyR1) における点突然変異病である MH/CCD の点突然変異の分布と非常によく似ている. このことは, これら 2 つのチャネル制御ドメインが骨格筋に限らず心筋においてもチャネル安定化にきわめて重要であることを示唆する.

3) 不全心でも Ca^{2+} 漏出につながるドメイン連関障害が生じている—誘発因子としての RyR2 過リン酸化による FKBP12.6 の解離および酸化ストレスの重要性— (図 2)

著者らはこれらのチャネル制御に関わる 2 つのドメインが心筋の RyR2 においてもチャネル開閉機能において非常に重要であり, 前述の心不全時の RyR2 から Ca^{2+} 漏出にドメイン連関障害が深く関与していることを示した (12). すなわち, 不全心筋 RyR2 において RyR2 の Ser2808 の過リン酸化→FKBP12.6 解離が N 末端ドメインと中央ドメイン間のドメイン連関障害を誘導し, その結果 Ca^{2+} 漏出をもたらし, SR 内の Ca^{2+} 貯蔵量の減少から心筋の収縮性低下をきたすことを報告した. このことは, 正常心筋 SR において中央ドメイン内の突然変異部分を含む DPc10 (DP2460~2495) というドメインペプチドが, (同じアミノ酸配列の native ドメインとの競合により N 末端ドメインと連関する結果) RyR2 内の N 末端ドメインと中央ドメイン間のドメイン連関障害 (unzipping) を誘導して, 病的な不全心の状態を再現できるという事実により裏付けされる (12).

図2 チャネル制御ドメイン連関障害が Ca^{2+} 漏出を引き起こす

N 末端ドメイン (1~600 AA) と中央ドメイン (2000~2500 AA) が互いに連関し (zipping), チャネルを安定化しているが, 先天的にどちらかのドメインに生じた点突然変異または, 後天的な心不全時の FKBP12.6 解離や酸化ストレスがチャネル制御ドメイン同士の連関を弱くし (unzipping), その結果チャネルは構造上不安定となり Ca^{2+} 漏出を生じる. 点突然変異部位を内在するドメインペプチドは native なドメインと競合し, 対応するドメインに結合することによって native なドメイン同士の結合はルースになる (unzipping). すなわち, ドメインペプチドは突然変異を模倣できる. 不全心では点突然変異と同様のドメイン unzipping を生じチャネルは不安定化している. ARVC: arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, CPVT: catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.

一方、酸化ストレスは、心機能の低下や心筋リモデリング（心拡大）を引き起こし、心不全の進展に深く関わっていると考えられている(13)．心不全モデルにおいて、我々は、正常培養心筋細胞に活性酸素種（ROS）を投与することにより、RyR2内の反応性の高いシステイン基が酸化されることでドメイン連関障害（unzipping）が生じ、RyR2から Ca^{2+} 漏出が生じることを示した(14)．不全心筋細胞においては、すでに、細胞内にROSが多く産生されており、このROSにより、RyR2が酸化状態となっており、ドメイン連関障害（unzipping）が引き起こされ、RyR2から Ca^{2+} 漏出が生じ、心筋細胞機能が低下することを明らかにした(14)．これらの結果から、心不全では、 β 受容体の過剰刺激によるRyR2の過リン酸化によるFKBP12.6の解離や、酸化ストレスにより、RyR2内のドメイン連関障害が生じ、RyR2から Ca^{2+} 漏出が起きていると考えられる．

4) ドメイン連関障害の是正によるチャネル安定化の抗心不全効果

著者らは頻脈誘発性犬心不全モデルにおいて、ベンゾジアゼピン誘導体であるK201（JTV519）がRyR2内ドメイン連関障害を是正することにより直接RyR2を安定化させ、 Ca^{2+} 漏出を防ぐことにより心筋細胞機能を是正し心不全の進行を抑制することを示した(12, 15)．さらに著者らは、RyR2内の中央ドメイン内のアミノ酸配列（2114～2149）がK201の作用部位であることを見出した(16)．すなわち、K201は2114～2149に結合することにより、N末端ドメインと中央ドメイン間のunzippingを抑制しRyR2を安定化することが判明した．興味深いことに、K201結合部位のドメインペプチド（DP, 2114～2149）はK201と同様にRyR2安定化作用がある．このことは、RyR2内にチャネル安定化制御部位が内在されており、この部位は全く新しい心不全・致死的不整脈の治療ターゲットとなりうる可能性を示唆する．

また、MHの治療薬であるダントロレンの分子学的作用機序に関しては長らく不明であったが、著者らは最近、ダントロレンもN末端ドメインと中央ドメイン間の連関を強めることにより、チャネルを安定化させ、RyR1からの Ca^{2+} 漏出を抑制することを示した(17)．さらにダントロレンはRyR2においても、その結合部位（N末端、601～620）はK201と異なるものの同様にドメイン連関障害を是正し、 Ca^{2+} 漏出を抑制し心機能を改善し、心不全の発症を抑制することを示した(18)．

5) RyR2点突然変異がチャネル開閉異常を介して致死的不整脈を生じるメカニズム

CPVT患者でみられるRyR2の点突然変異がCPVTの決定因子であるか否かを明らかにするために、最近、CPVT患者でみられた点突然変異（R4496C, R176Q, R2474S）を内在したknock-inマウスが作成された(19-21)．いずれのマウスにおいても運動負荷ないしカテコラミン負荷により心室頻拍が誘発されたことよりRyR2の点突然変異がCPVTの決定因子であることが明らかとなった．しかしながら、RyR2の各サブユニットを構成する5000アミノ酸のうちのただ1箇所のアミノ酸変異が、いかなるチャネル開閉異常を介してCPVTにつながるかは明らかではない．そこで著者らも、R2474S KIマウスを作成し、RyR2の点突然変異によりCPVTが発症する分子機序について検討した(22)．その結果、①安静時、R2474S/+KIマウスの心臓の構造・機能は、WTマウスの心臓と比較して有意な差を認めなかったが、R2474S/+KIマウスでは、運動や薬物（エピネフリン、カフェイン）投与により心室頻拍が誘発された、②R2474S/+KI心筋細胞のRyR2は、イソプロテレノール、PKAによるリン酸化、そしてSR内 Ca^{2+} によるチャネルの活性化に対して感受性が亢進した、③R2474S/+KIでは、ドメイン連関障害（unzipping）が生じていた、④ダントロレンはR2474S/+KIにおいて、ドメイン連関障害を是正し、 Ca^{2+} 漏出を抑制した．以上の結果より、点突然変異によるRyR2のドメイン連関障害に起因して、protein kinase A（PKA）依存性のリン酸化により感受性が増大しチャネル開口の際の小胞体内 Ca^{2+} 濃度の閾値が低下し、CPVTを発症することが示された．Cryo電顕法によりMengらはN末端ドメインと中央ドメイン間の境界部にSer2808が存在することを示した(23)．この所見は、再び前述のドメイン連関調節（zipping-unzipping 仮説）を強く支持する．

おわりに

心不全および致死的不整脈の共通の発症要因としてRyR2機能異常が深く関わるのが著者らの一連の研究により明らかとなった．すなわち、点突然変異やRyR2の過リン酸化などによりRyR2内の特定の2箇所のドメイン間の連関障害が生じ、その結果、カルモジュリンの結合親和性が低下しチャネルの Ca^{2+} 感受性が増大、 Ca^{2+} 漏出が誘導されdelayed afterdepolarization（DAD）を引き起こし致死的不整脈を発症する．さらに、不全心筋では Ca^{2+} 漏出は Ca^{2+} 取り込み能の低下とあいまってSR内の Ca^{2+} 貯蔵量の低下をきたし収縮

不全をも生じる。実験的にドメイン連関障害を是正することにより不整脈が抑制され収縮能の改善効果がみられたことから、RyR2は新たな心不全・致死的不整脈治療ターゲットとして期待しうる。

文 献

- 1) Yano M, et al. J Clin Invest. 2005;115:556-564.
- 2) Bers DM. Nature. 2002;415:198-205.
- 3) Yano M, et al. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2006;3:43-52.
- 4) Bers DM. J Mol Cell Cardiol. 2004;37:417-429.
- 5) Yamamoto T, et al. J Biol Chem. 2000;275:11618-11625.
- 6) Ikemoto N, et al. Trends Cardiovasc Med. 2000;10:310-316.
- 7) Yamamoto T, et al. Biochemistry. 2002;41:1492-1501.
- 8) Ikemoto N, et al. Front Biosci. 2002;7:671-683.
- 9) Laitinen PJ, et al. Circulation. 2001;103:485-490.
- 10) Priori SG, et al. Circulation. 2001;103:196-200.
- 11) Lahat H, et al. Circulation. 2001;103:2822-2827.
- 12) Oda T, et al. Circulation. 2005;111:3400-3410.
- 13) Tsutsui H, et al. Circulation. 2001;104:2883-2885.
- 14) Yano M, et al. Circulation. 2005;112:3633-3643.
- 15) Yano M, et al. Circulation. 2003;107:477-484.
- 16) Yamamoto T, et al. Circulation. 2008;117:762-772.
- 17) Kobayashi S, et al. J Biol Chem. 2005;280:6580-6587.
- 18) Kobayashi S, et al. J Am Coll Cardiol. 2009;53:1993-2005.
- 19) Cerrone M, et al. Circ Res. 2005;96:e77-e82.
- 20) Kannankeril PJ, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:12179-12184.
- 21) Lehnart SE, et al. J Clin Invest. 2008;118:2230-2245.
- 22) Uchinoumi H, et al. Circ Res. 2010;106:1413-1424.
- 23) Meng X, et al. J Biol Chem. 2007;282:25929-25939.