心臓電気生理機能の発生

Development of Electric Characteristics in Rat Heart

當瀬規嗣 小林武志 前田佐知子 一瀬信敏
佐藤達也

《Abstract》

心筋細胞の電気生理学的特性は、発生期の心臓の形態学的な変化に伴って大きく変容する。発生初期のラット胚では、大部分の細胞で自動能が認められる。膜電位ではペースメーカー電位が確認でき、活動電位全体の形状は、成体の洞房結節細胞のそれと同様である。その後、作業心筋の静止膜電位は過分極し、ペースメーカー電位は失われ、自動能は刺激伝導系の細胞に限定される。この過分極は、内向き整流性K⁺チャネルが増加してゆくことによって引き起こされる。さらに、活動電位持続時間は誕生後に伴い急速に短縮するが、これは一過性外向きチャネルの増加が原因である。このように、胎生期の電気生理学的特性の変化は、細胞膜上のイオンチャネルの遺伝子発現と特性の変化によって引き起こされる。早期のラット胚で心拍動は観察されないが、受精後10日目に心拍動が突然開始する。この拍動開始には、L型Ca²⁺チャネル(Cav1.3)の突然の遺伝子発現の増大が大きく関係していると考えられる。

I. はじめに

個体の発生において、心臓は実にダイナミックな変化を遂げる。受精後、まったく動きを見せない細胞が分裂を繰り返して胚が形成されるが、その後心臓原基が形成され、突然拍動が開始される。その後、拍動は継続し、そのなかで心臓が形成されていく。したがって、拍動を維持する電気活動も、発生期の非常に早い時期から確立すると考えられる。

心筋の電気活動はイオンチャネル機能によって引き起こされるが、イオンチャネルそのものの発生期における発現もダイナミックな変化を示すことがわかってきた。本稿では、哺乳類発生期の心筋におけるイオンチャネルの発現と機能の変化を概観する。そのなかでも、イオンチャネル機能が劇的に変化すると予想される、心拍動開始前後におけるイオンチャネルの消長についても論じる。

II. 発生期心筋における活動電位の変化

拍動開始以降の活動電位の変化に関する報告は多数あり¹⁾、とりわけラットを用いた研究が多い²⁾。それによると、受精後10日から12日頃、すなわち拍動開始直後には、心筋細胞は静止膜電位を示さず、ペースメーカー電位が生じている。つまり、この時期の心筋細胞はすべて自動能を有していると考えられる。活動電位の立ち上がりは遅く、基本的にCa²⁺依存性活動電位であると考えられる。こうして、この頃の活動電位は、成体の洞房結節で見られるのと同様な特徴を有していることがわかる。

この後、ペースメーカー電位は失われ、静止膜電位となり、次第に過分極していく。これは、ちょうどこの時期にD-ループ形成、心房・心室の分離、さらに心房・心室における左右分割など、心臓の形態のダイナミックな変化が起こっており、心筋細胞が刺激伝導系・心房筋・心室筋に分化していく時期に一致している。

札幌医科大学医学部細胞生理学講座 (〒060-8556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目)

Noritsugu Tohse, Takeshi Kobayashi, Sachiko Maeda, Nobutoshi Ichise, Tatsuya Sato

● **Key words** ; イオンチャネル, 発生, 活動電位, 自動能

静止膜電位の過分極は、自動能をもつ特殊心筋から、自動能をもたず収縮機能に徹する作業心筋に機能分化していくために必要な変化であると考えられる。静止膜電位の過分極は、活動電位自体に変化をもたらす。Na⁺チャンネルが不活性化から脱することでできる膜電位の範囲に静止膜電位が入ってくるからである。結果として、活動電位の立ち上がりは速くなり、Na⁺依存性活動電位となる。これは、発生により心臓が大きくなっていくので、興奮伝導速度が速くなる必要があることに呼応していると考えられる。

Ⅲ. 発生期における静止膜電位の過分極とイオンチャンネル

心房・心室の作業心筋の静止膜電位は-70~-90mVという深い範囲にある。これはK⁺の膜透過性が高いことを示しているが、その透過性を担保しているのが内向き整流性K⁺チャンネルである。受精後12日頃のラット心筋細胞をパッチクランプ法で観察すると、steady-stateでの背景電流に内向き整流特性は観察されない。しかし、出産寸前である受精後18日の心室筋では、はっきりとした内向き整流特性が観察される。これは胎生中期に内向き整流性K⁺チャンネルの電流量が増大したことを示している³⁾。

内向き整流性K⁺チャンネルには、いくつかのサブタイプがあることが知られているが、ラットの発生中期における内向き整流性K⁺チャンネルの増大を担っているのは、*Kir2.2*の遺伝子でコードされる内向き整流性K⁺チャンネルであった³⁾。

Ⅳ. ラット新生仔期における活動電位の変化とイオンチャンネルの変化

ラットやマウスの成体心筋では、活動電位持続時間(APD)は短く、速い心拍数に対応していると考えられる。しかし、胎生期のラット心筋のAPDは比較的長く、誕生後に急速に短くなることが指摘されていた²⁾。この原因は、ラットの再分極相を担う一過性外向き電流(I_{to})が誕生前に少なく、新生仔期に急速に大きくなるためと考えられた。そこで、この機能的変化の原因は、I_{to}の遺伝子発現の変化によるものであるか否か、検討を加えた⁴⁾。

I_{to}の責任遺伝子は、*Kv4.2*および*Kv4.3*である。心筋細胞を用いてRT-PCRを行い、遺伝子の発現量を測定すると、両遺伝子ともに、胎生早期から誕生後10日目まで、発現量に有意な変化は見られなかった。そこで、このチャンネルのβサブユニットにあたるKChIP2

の遺伝子発現を検討すると、胎生期後半から誕生時期にかけて発現量が飛躍的に増大していた。したがって、KChIP2がtrafficking factorであることを合わせて考えると、誕生後のI_{to}増大は、KChIP2の発現増加により、翻訳されたチャンネルタンパクが膜へ移行しやすくなったためと考えられた。そこで、まだI_{to}が発現していない胎生期心筋に、アデノウイルスによりKChIP2を強制発現させてみると、I_{to}が増大し、細胞膜へのチャンネルタンパクの移行が増大することを確認した。以上のように、心筋細胞でのイオンチャンネルのダイナミックな変化が新生仔期の機能に大きく影響を及ぼしていることが明らかになった。

Ⅴ. 心拍動開始時期の特定

これまで、心臓原基における心拍動開始の時期については、古い研究のみが存在し、極めて大まかな日ごとのレベルでの特定しかなされていなかった。しかし、この時期の心臓発生の進展は非常に速く、日ごとのレベルでは形態上も劇的な変化が連続しており、心拍動開始のメカニズムを研究する上で、より詳細な時期の特定は必須であると考えられた。そこで、われわれは、顕微鏡にインキュベーターを取り付け、そこに心拍動開始直前と思われるラット胚を置いて、長期間ビデオ記録を行いながら、拍動開始の瞬間を観察した⁵⁾。その結果、ラットでは受精後約240時間、すなわち満10日目に入ったところで、拍動を開始することを明らかにした。

開始された直後の拍動の特性を分析すると、拍動は徐々に速くなるのではなく突然に始まり、短い期間に限定するとその頻度は一定であることがわかった。また、その拍動は細胞外のCa²⁺を除去すると停止し、戻すとまた再開したので、Ca²⁺依存性活動電位で制御されていると考えられた。さらにCa²⁺チャンネルブロッカーであるニフェジピンで停止するが、筋小胞体機能の抑制薬であるリアノジンでは影響はなく、少なくともL型Ca²⁺チャンネルを通ったCa²⁺流入によって拍動が起こるものと結論づけられた。この結論は、胎生12日頃の心筋細胞が生体の洞房結節と同じようなペースメーカー電位と遅い立ち上がりの活動電位を示すという、従来の知見に呼応するものである。

心拍動が突然一定のリズムで開始されるという事実と併せて考えると、心拍動開始直前までに心筋自動拍動に必要な分子はほぼ出そろっており、最後にスタートのきっかけをあたえる分子の発現が起こって拍動が開始されると推論された。

図 胎生 11 日目のラット心臓原基細胞で観察された Ca^{2+} 電流

電流電圧特性の縦軸はピークの内向き電流とパルスエンドの定常電流との差電流を表す。内向き電流の閾電位は -70 mV であり、この電流がペースメーカー電流の可能性をもつことを示している。

[文献 7) より引用改変]

VI. 心拍動開始の切っ掛けとなるタンパク分子の検索

心拍動の開始にかかわるイオンチャネルは、いかなるものであるのかについて検討を加えた。受精後 10 日前後のラット胚を用いて、心拍動開始前後でのイオンチャネル分子の消長を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した⁶⁾。この結果、多くのイオンチャネル分子は拍動開始前から心臓発生領域に存在し、その発現量は発生の進展につれて増大していくことが確認された。とりわけ、まだ拍動が起こっていない受精後 9 日の心臓原基において、L 型 Ca^{2+} チャネルの一種である *Cav1.2* はすでに相当量発現しており、拍動開始後に発現量は多くなっていた。*Cav1.2* は心筋細胞の主要な Ca^{2+} 流入経路であるが、これが拍動開始のきっかけとなる分子とは考えにくかった。

一方、同じく L 型 Ca^{2+} チャネルと分類されるが、成体において洞房結節などの特殊心筋細胞に強く発現していると指摘されている *Cav1.3* の発現について検討を加えた。*Cav1.3* は、受精後 9 日の心臓原基にはまったく発現していなかったが、受精後 10 日、すなわち、まさしく拍動開始時期に相当量の *Cav1.3* の発現が観察された。この *Cav1.3* の突然の発現は、心拍動開始に連動

するものと考えられ、これが心拍動開始のきっかけを与える分子であると考えられた。

では、心拍動が起こっているときに、実際に *Cav1.3* が機能しているのだろうか。拍動している心筋細胞にパッチクランプ法を適用して観察すると、閾電位が *Cav1.2* より深い膜電位であることを示す Ca^{2+} 電流が観察できた(図)⁷⁾。これは *Cav1.3* の特徴を示すものであり、*Cav1.3* が心拍動開始後の電気活動において機能していることを示している。以上の知見より、心拍動開始は *Cav1.3* の発現開始により引き起こされると推論された。

VII. おわりに

発生期における心筋電気生理機能の変化について、概観した。特に活動電位における変化は、イオンチャネル分子の発現の変化によって引き起こされていることが明らかとなった。今後は、すでに心臓の発生を起こすと報告されている様々な転写因子と、これらイオンチャネル分子の遺伝子との間の関係性、とりわけ遺伝子発現を引き起こすメカニズムに関して、発生のタイムテーブルに基づいて説明する必要がある。また、より定時的、定量的なチャネル遺伝子発現機構の分析が必要となる。

〔文 献〕

- 1) Tohse N, Yokoshiki H, Sperelakis N : Developmental changes in ion channels. Cell physiology sourcebook (Sperelakis N) , 3rd ed. Academic Press, San Diego, 2001 ; 585 ~ 599
- 2) Kojima M, Sada H, Sperelakis N : Developmental changes in beta-adrenergic and cholinergic interactions on calcium-dependent slow action potentials in rat ventricular muscles. Br J Pharmacol, 1990 ; 99 : 327 ~ 333
- 3) Nagashima M, Tohse N, Kimura K, Yamada Y, Fujii N, Yabu H : Alternation of inwardly rectifying background K⁺ channel during development of rat fetal cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 2001 ; 33 : 533 ~ 543
- 4) Kobayashi T, Yamada Y, Nagashima M, Seki S, Tsutsuura M, Ito Y, Sakuma I, Hamada H, Abe T, Tohse N : Contribution of KChIP2 to the developmental increase in transient outward current of rat cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, 2003 ; 35 : 1073 ~ 1082
- 5) Kobayashi T, Maeda S, Ichise N, Sato T, Iwase T, Seki S, Yamada Y, Tohse N : The beginning of the calcium transient in rat embryonic heart. J Physiol Sci, 2011 ; 61 : 141 ~ 149
- 6) Maeda S, Kobayashi T, Ichise N, Iwase T, Yamada Y, Tohse N : Expression of ionic channels contribute to action potential configuration in the period of heart beat initiation in the Early rat embryo. J Physiol Sci, 2010 ; 60(Suppl) : S160
- 7) Sato T, Ichise N, Kobayashi T, Maeda S, Tohse N : Characteristics of Voltage dependent inward current in the rat embryonic heart after the initiation of heartbeat. J Physiol Sci, 2013 ; 63(Suppl) : S230