肺静脈におけるカテコラミン誘発性不整脈の分子基盤

岡本洋介*

肺静脈は心房細動(AF)の発生起源として知られているが、心室筋や心房筋心筋と違って、肺静脈に存在する心筋細胞が不整脈基質を示す分子機構は不明な点が多い。われわれはラットの肺静脈心筋細胞を単離し、電気生理学的ならびに分子生物学的アプローチによって肺静脈におけるカテコラミン誘発性不整脈の分子基盤を解明してきた。ここでは、主に肺静脈不整脈のメカニズムとして、T管上で生じる Ca^{2+} 放出チャネルと $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体のクロストーク(Ca^{2+} 放出-NCX連関)、CIC-2/HSPA8複合体によって生じる過分極活性型 Cl^- 電流、ならびにアデニル酸シクラーゼのはたらきについて解説する。

(心電図, 2020 ; 40 : 141-148)

I. 不整脈の発生源としての肺静脈

肺静脈には豊富な自律神経が分布しており^{1), 2)}, 機能的には、交感神経刺激により、洞調律とは独立した自発興奮が発生することが、1980年代よりモルモットを使った実験で報告されている³⁾。ヒトでも肺静脈内で異所性興奮が発生し、これが心房細動(AF)のトリガーとなっていることが、1998年にフランスのHaut-Lévêque心臓病病院のHaïssaguerreらにより報告された⁴⁾。極めて画期的な発見であ

り、これ以降、抗不整脈薬や抗凝固薬による対症療法が中心だったAF治療に、肺静脈隔離術という治療戦略が開拓された。とはいえ、肺静脈隔離術には合併症や再発の問題があり、治療適応に制限がある。AFは患者人口が国内約120万人と膨大で、かつ増加傾向にあるため、病態解明・新規治療法開発を目的とした研究が今でも盛んに行われている。

II. 肺静脈心筋細胞におけるカテコラミン誘発性 Ca^{2+} 依存型自動能

肺静脈におけるAFトリガーの発見以来、多くの研究者が肺静脈の電気生理学的あるいは組織学的な研究に取り組んだ^{5), 6)}。われわれは、ラットの肺静脈心筋細胞を急性単離することに成功し、肺静脈研究に細胞生理学ならびに分子生物学実験の導入を試みた。ラット肺静脈を使った研究は、すでにフランスのIan Findlay博士のチームが、10 μM のノルアドレナリン投与によって活動電位を伴う自発興奮・

Keywords

- 肺静脈
- Ca^{2+} 放出-NCX連関
- Cl^- チャネル
- 構造的ヒートショック蛋白
- アデニル酸シクラーゼ

秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座
(〒010-8543 秋田県秋田市本道1-1-1)

*は責任者を示す

Molecular Characteristics of Catecholamine-Induced Arrhythmia in Pulmonary Vein
Yosuke Okamoto

2019年9月24日 原稿受領 / 2019年12月26日 掲載承認

収縮を観察していた。彼らは、この誘発性自動能にはカテコラミン α , β 両受容体のシグナル伝達が同時に必要であることを丁寧な実験によって示している^{6), 7)}。われわれは、細胞の電気生理データと Ca^{2+} 濃度変化を同時に記録することで、自動能が発生する分子基盤を明らかにした(図 1A, B)。自動能が生じている最中に電圧固定すると、活動電位の周期とほぼ同じ約 4 Hz の内向き電流が観察できる(図 1B)。この催不整脈性の電流は、固定電圧に依らず常に内向きで、完全に細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇と同期していた。細胞内外のイオン濃度勾配に依存せず、 Ca^{2+} 貯蔵サイトからの Ca^{2+} 放出に伴って内向きの電流を生じる起電性の膜機構は、 Na^+ - Ca^{2+} 交換体(NCX)のフォワードモードだけである。豊富に存在する IP_3 受容体が、ノルアドレナリン刺激で活性化され、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させるため、NCX を駆動するものと推察されている。NCX と IP_3 受容体の阻害剤は、それぞれこの肺静脈の誘発自動能を抑制する(図 1C)⁸⁾。以下の章では、 Ca^{2+} 放出が NCX と共役して脱分極をきたす機構を Ca^{2+} 放出 -NCX 連関と称することにする。

III. Ca^{2+} clock との違い

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の繰り返しが NCX を介して膜電位に反映される現象が、洞房結節細胞(SANC)の自動能メカニズムとして提唱されている Ca^{2+} clock とそっくりだと気づかれる方がいるかもしれないが、実際にメカニズムそのものは全く同じものだと言っている。ただ、生理的な心拍リズムとは関係ないため「clock」とは称さないことにしている。加えて、SANC の自動能よりも、肺静脈自動能のほうが、 Ca^{2+} 放出 -NCX 連関に依存していることを強調したい。SANC は弛緩電位が約 -60 mV であって、再分極後の緩徐脱分極相が Ca spike (Ca^{2+} チャネル開口に伴う活動電位)を繰り返させている。Ca spike $\rightarrow$ 再分極 $\rightarrow$ 緩徐脱分極相の繰り返しが SANC の正常自動能であって、Ca spike の根幹である電位依存性 Ca^{2+} チャネルと、再分極を生み出す電位依

存性 K^+ チャネルが、自動能の発生に決定的に重要であることは誰でも理解できる。したがって、正常自動能のメカニズムでは、常に緩徐脱分極相の発生機序が議論の争点となる。SANC における Ca^{2+} clock 理論とは、SANC 内の局所的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇がこの緩徐脱分極相の発生に欠かせない、という理論であるが、局所的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を記録したこと自体は大きな発見であっても、これが膜電位に反映されるか否かは、実は、報告によって異なる^{9)~11)}。たしかに NCX の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する K_m 値は約 $0.6 \mu\text{M}$ ¹²⁾ であるため、実験条件や細胞ごとに異なった実験結果が得られる可能性がある。実際には、SANC の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を排除しても自動能は止まらないという実験が報告されている¹³⁾。SANC の自動能は Ca^{2+} clock がなくなった程度では止まらないほど頑健な生体システムだ、とも言えるのかもしれない。一方で、肺静脈心筋の自動能は -70 mV 程度の比較的深い膜電位から生じ、活動電位の立ち上がりは電位依存性 Na^+ チャネルの活性化に依存する(Na spike)。ノルアドレナリン刺激で生じる散発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が、NCX 由来の内向き電流を介して、 Na^+ チャネルを活性化させる閾値まで膜電位を脱分極させるか否かは確率的に決まる。ラットの場合、自動能が生じるのは全肺静脈心筋細胞の約 30% である。ノルアドレナリンを細胞外液から洗い流してしまうと、多くの細胞で自動能が停止する。自動能が停止しない細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し続け、細胞死に至る⁸⁾。正常自動能と比べると極めて脆弱なシステムで、簡単に破綻してしまう。

IV. T 管と Ca^{2+} 放出チャネルと K^+ チャネル

さらに、肺静脈心筋には SANC や心房筋と比べ、NCX の働きを確実に細胞膜に反映させる細胞構造である T 管が豊富に存在する。 IP_3 受容体は筋小胞体上の Ca^{2+} 放出チャネルであり、T 管上の NCX と共局在している(図 1D)。肺静脈における IP_3 受容体の発現量は心室筋より多い(未発表データ)。このために、 IP_3 受容体から放出された Ca^{2+} は、より効果的

図1 ラット肺静脈心筋細胞におけるカテコラミン誘発性 Ca^{2+} 依存型自動能

- A: 単離肺静脈心筋細胞にノルアドレナリン(NA)10 μM を作用させ、自発活動電位が誘発される前後の記録. パッチクランプ法による膜電位と Indo-1 を使った $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の同時記録. 活動電位がトリガーされるのに先行して, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動が観察される.
- B: 自動能を記録している最中に電圧固定して, 催不整脈性の内向き電流を記録した. 内向き電流は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に同期して発生している.
- C: カテコラミン誘発性自動能は NCX 阻害剤(SEA0400 10 μM)で停止する. 自動能が停止した後も $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動は引き続く.
- D: 細胞免疫染色. Na^+ - Ca^{2+} 交換体(NCX1)と IP_3 受容体($\text{IP}_3\text{R2}$)がT管上で共局在している.

[文献8より引用改変]

に NCX に作用する. もう一つの強力な Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体(RyR)もT管近傍の筋小胞体膜上に局在しており, 自動能発生に関与している可能性が考えられる. IP_3 受容体と RyR が協調して自動能を誘発するという数理モデルが構築されている(図2)¹⁴⁾. このモデルでは, 肺静脈自動能が細胞内総 Ca^{2+} (Ca_{tot}) に依存していることがよ

くわかる(図2A). 複数の RyR を一つのユニットとして計算する couplon モデルに, 実験値に基づく IP_3 受容体の動態を実装したモデルで(図2B), IP_3 受容体 Ca^{2+} 放出チャネルの開口でナノドメインの Ca^{2+} 濃度が上昇したのに引き続いて, RyR も活性化することが観察できる. その結果, NCX 直下の Ca^{2+} 濃度がブーストされ, NCX 由来脱分極が繰り返し Na

図2 肺静脈心筋細胞(PVC)数理モデル

A: 細胞内総 Ca^{2+} (Ca_{tot}) を変化させた際の細胞質 Ca^{2+} 濃度 (Cafree_bulk) のシミュレーション. Ca_{tot} が増加すると, Cafree_bulk の振動と自発活動電位に伴う Ca^{2+} transient が発生する.

B: PVCモデルにおける細胞構造と Ca^{2+} 調節機構の模式図.

AC: アデニル酸シクラーゼ, AR: アドレナリン受容体, blk, bulk: InsP_3R , IP_3 受容体, iz: intermediate zone, jnc: junctional zone, LCC: L型 Ca^{2+} チャネル, nd: nano domain, SERCA: 筋小胞体カルシウム ATPアーゼ, SR: 筋小胞体

[文献 14 より転載]

spike を誘発して自動能が発生する¹⁴⁾. しかし, T管構造が Ca^{2+} 放出チャネルと NCX を共役させる基礎になっているとすると, T管が発達している心室筋になぜ自動能が生じないのかという, 疑問が生じる. 心室筋では内向き整流性 K^+ 電流 (I_{K1}) が大きく, 静止膜電位が保たれている. このため, NCX 活性化による遅延性後脱分極 (DAD) が発生しても, それが持続することはまれである. 言い換えると,

肺静脈のカテコラミン誘発性不整脈は, I_{K1} の電流密度が小さいために持続してしまう DAD と考えることができるかもしれない. 肺静脈心筋や心房筋の K^+ 電流の主体は外向き整流特性を示す遅延整流 K^+ 電流とリーク電流であり, 肺静脈心筋の I_{K1} のコンダクタンスは心室筋の半分以下である (未発表データ).

V. 過分極活性型チャネル

われわれは、さらに、ラット肺静脈心筋細胞において、過分極で活性化される、不活性化のない電流を発見した(図 3A)。この電流の時間動態は刺激伝導系細胞で観察される I_f 電流に類似していたが、 I_f の無機のプロッカーである CsCl で微塵も抑制されず、細胞内外の Cl^- 濃度を変えながら Tail 電流の振幅を測定すると、電流の向きが逆転する逆転電位が、Nernst の式で計算される Cl^- についての平衡電位と一致して変化したため、 Cl^- に選択性の高い電流であることがわかった。過分極で活性化される Cl^- 電流として、CIC-2 電流がすでに知られている。ただし、CIC-2 電流は細胞内 Cl^- 濃度 ($[Cl^-]_i$) の上昇に伴って活性化曲線が脱分極側にシフトする(より浅い膜電位で活性化する)と考えられていたのに対し、われわれが見つけた Cl^- 電流は過分極側にシフトする(より深い膜電位で活性化する)ため(図 3B)、当初は CIC-2 とは異なる、新規の Cl^- 電流であるとして報告した¹⁵⁾。この電流は活動電位の再分極時に活性化し、次の脱分極の発生を助けている可能性がある。実際に、カテコラミン誘発性自動能は Cl^- チャネル遮断薬で抑制される¹⁵⁾。また、自発興奮発生時には、NCX が過剰に働いているため、細胞内 Na^+ 濃度が上昇し、引き続いて Na/K pump の活性が向上するため、拡張期電位が静止電位レベルより深くまで過分極するという現象がしばしば観察される。したがって、過分極で活性化する肺静脈固有の Cl^- チャネルが存在すれば、異所性興奮を選択的に狙った、有力な AF 治療薬の標的分子になりえた。われわれは、まず、発見した Cl^- 電流の分子実態として、CIC-2 チャネルのバリエーションを想定した。CIC-2 を鋳型として、肺静脈から RT-PCR 法でクローニングを試みたところ、完全長の CIC-2 のみがクローニングされた。なぜ、 $[Cl^-]_i$ に対する応答が既知の報告と異なるのだろうか？われわれは、さらに抗 CIC-2 抗体を使って共免疫沈降質量分析を行い、構造的ヒートショック蛋白の一つで

ある HSPA8 が CIC-2 と結合することを明らかにした(図 3C)。この分子との結合が CIC-2 チャネルの活性化に影響を与え、既知の CIC-2 とは異なる活性化特性の $[Cl^-]_i$ 依存性変化をもたらすと考えられた¹⁶⁾。CIC-2 が属する CLC ファミリーは、多くの陽イオンチャネルと異なり、ホモ 2 量体で 2 つのポアを有する。ポアが 2 つあるために、ゲート機構も 2 つ存在する。2 つのポアが独立して別々に開閉する protopore gate と、必ず両方同時に開閉する common gate である。Protopore gate の分子機構は具体的にわかっており、実験的に改変することができる。CIC-2 の protopore gate を改変して common gate を優位にすると、われわれが見つけた Cl^- 電流同様に、 $[Cl^-]_i$ に応じた電位依存性が過分極側にシフトする¹⁷⁾。ドッキング・シミュレーションの結果、HSPA8 は CIC-2 の両サブユニットにまたがって結合しており、common gate を安定させて、このゲート機構の特徴が表面化されているのではないかと推測された(図 3D)。ところで、この CIC-2/HSPA8 複合体は、実は心室筋にも存在する。また、肺静脈の過分極活性型電流は、他の動物種では別のチャネルが担っていることがわかってきた¹⁸⁾。したがって、今では、このチャネルが肺静脈の異所性興奮だけにかかわる特別な分子である可能性は小さい。

VI. アデニル酸シクラーゼ

肺静脈における自発活動電位の誘発には、カテコラミン β 受容体のシグナル伝達経路も重要な働きを担っている。 β 受容体刺激に伴ってアデニル酸シクラーゼが活性化し、細胞内 cAMP 濃度が上昇すると、cAMP 依存性プロテインキナーゼが RyR、L 型 Ca^{2+} チャネル、ホスホランパンをリン酸化する。それぞれの分子機能が增強され、RyR からの Ca^{2+} 放出が促進するのみならず、 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入や筋小胞体における Ca^{2+} 再取り込みというフィードバックが補強されることになる。この結果、 Ca^{2+} 依存性自動能が持続しやすくなる。 β 受容体シグナルの中心となるのはアデニル酸シクラーゼ

図3 ラット肺静脈心筋細胞における過分極活性型 Cl^- チャンネル

- A: ラット肺静脈心筋細胞における過分極活性型 Cl^- 電流。 $[\text{Cl}^-]_i$ を増加させると電流の振幅が大きくなり、時間動態が速くなった。
- B: $[\text{Cl}^-]_i$ を増加させると、過分極活性型 Cl^- 電流の活性化曲線は過分極側にシフトした。パルスプロトコルは挿入図の通り。
- C: 細胞免疫染色。構造ヒートショック蛋白である HSPA8 が、 Cl^- チャンネル (CLCN2) と細胞膜上で共発現している。Na/K pump は細胞膜のマーカー。バーは $10 \mu\text{m}$ 。
- D: CLCN2 と HSPA8 のドッキング・シミュレーション。CLCN2 は CLCN2 の遺伝子シンボル。静電ポテンシャルの高い部分 (点線内の濃い青) が両蛋白の結合部位。HSPA8 はホモ 2 量体である CLCN2 の両サブユニットにまたがって結合し、common gate を安定化させていると考えられた。

[A, B は文献 14, C, D は文献 16 より転載]

であるが、われわれは、心室で主要であるアイソタイプ (タイプ 5 と 6) とは別のアイソタイプが肺静脈では優位であることを見出している。カテコラミン誘発性自動能の持続には、このアイソタイプが主に Ca^{2+} のリサイクルを支えているものと考えている

(論文投稿中)。

謝辞

研究をご指導していただき、本原稿を最初に閲読していただいた所属教室の尾野恭一教授に深謝したい。

付記

本稿は第 65 回日本不整脈心電学会で口頭発表した内容を、著作権に抵触しない範囲で文章として書き改めたものである。また、当教室では実験動物を使った病態モデルや遺伝子改変動物も積極的に取り入れて研究を行っている。興味のある方は、どうか遠慮なく連絡をいただきたい。ご意見、ご質問、研究協力の相談等をお待ちしております。

〔文 献〕

- 1) Baluk P, Gabella G : Fine structure of the autonomic ganglia of the mouse pulmonary vein. *J. Neurocytol*, 1986
- 2) Tan AY, Chen PS, Chen LS, et al. : Autonomic nerves in pulmonary veins. *Heart Rhythm*, 2007 ; 4 : 57-60
- 3) Cheung DW : Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig. *J Physiol*, 1981 ; 314 : 445-456
- 4) Haïssaguerre M, Jais P, Shah DC, et al. : Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*, 1998 ; 339 : 659-666
- 5) Namekata I, Tsuneoka Y, Takahara A, et al. : Short communication involvement of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400. *J Pharmacol Sci*, 2009 ; 116 : 111-116
- 6) Doisne N, Maupoil V, Cosnay P, et al. : Catecholaminergic automatic activity in the rat pulmonary vein : electrophysiological differences between cardiac muscle in the left atrium and pulmonary vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009 ; 297 : H102-H108
- 7) Maupoil V, Bronquard C, Freslon JL, et al. : Ectopic activity in the rat pulmonary vein can arise from simultaneous activation of α - and β -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*, 2007 ; 150 : 899-905
- 8) Okamoto Y, Takano M, Ohba T, et al. : Arrhythmogenic coupling between the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger and inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2012 ; 52 : 988-997
- 9) Noma A, Irisawa H : A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1976 ; 366 : 251-258
- 10) Irisawa H, Hagiwara N : Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. *Prog Clin Biol Res*, 1988 ; 275 : 33-52
- 11) Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhu W, et al. : High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca^{2+} store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res*, 2006 ; 98 : 505-514
- 12) Miura Y, Kimura J : Sodium-calcium exchange current. dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *J Gen Physiol*, 1989 ; 93 : 1129-1145
- 13) Himeno Y, Toyoda F, Satoh H, et al. : Minor contribution of cytosolic Ca^{2+} transients to the pacemaker rhythm in guinea pig sinoatrial node cells. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*, 2011 ; 10.1152/ajpheart.00764.2010
- 14) Umehara S, Tan X, Okamoto Y, et al. : Mechanisms underlying spontaneous action potential generation induced by catecholamine in pulmonary vein cardiomyocytes : a simulation study. *Int J Mol Sci*, 2019 ; 10.3390/ijms20122913
- 15) Okamoto Y, Kawamura K, Nakamura Y, et al. : Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2014 ; 66 : 53-62
- 16) Okamoto Y, Nagasawa Y, Obara Y, et al. : Molecular identification of HSPA8 as an accessory protein of a hyperpolarization-activated chloride channel from rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2019 ; 294 : 16049-16061
- 17) Niemeyer MI, Cid LP, Zúñiga L, et al. : A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *J Physiol*, 2003 ; 553 : 873-879
- 18) Takagi D, Okamoto Y, Ohba T, et al. : Comparative study of hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from rat, guinea pig, and rabbit. *J Physiol Sci*, 2020 ; 70 : 6. doi : 10.1186/s12576-020-00736-3

Molecular Characteristics of Catecholamine-Induced Arrhythmia in Pulmonary Vein

Yosuke Okamoto

Department of Cell Physiology, Akita University Graduate School of Medicine

It is known that pulmonary veins (PVs) are an origin of the most frequent arrhythmia, atrial fibrillation. However, molecular characteristics of the arrhythmogenicity unique to PV myocytes is still unclear. We have investigated the molecular mechanism of catecholamine-induced arrhythmia using both electrophysiology and molecular biology with isolated PV cardiomyocytes of rats. In this paper, I mainly discuss cross-talk among a cluster of Ca^{2+} -releasing channels on the sarcoplasmic reticulum and Na^+ - Ca^{2+} exchanger on T-tubule (Ca^{2+} -releasing-NCX coupling), a hyperpolarization activated Cl^- current originated in ClC-2/HSPA8 complex, and influence of the adenylate cyclase.

Keywords : Pulmonary vein, Ca^{2+} -releasing-NCX coupling, Cl^- channel, Constitutive heat shock protein, Adenylate cyclase