

病態におけるT型カルシウムチャネルの発現とその役割

小野克重

大分大学 医学部 循環病態制御講座

1. はじめに

電位依存性Ca²⁺チャネルは活性化と不活性化電位の違いによって3分類される。L型、N型、P/Q型、及びR型Ca²⁺チャネルは大きな脱分極によって活性化されるため、高電位活性化チャネルに分類される。これに対して、T型Ca²⁺チャネルは小さな脱分極によって活性化されるため、低電位活性化チャネル(LVA)に分類される。低電位活性化チャネルは、僅かな膜電位変化によって機能が制御されるため、前述の高電位活性化チャネルと異なった役割を果たす。心筋細胞のT型Ca²⁺チャネルは高電位活性化チャネルであるL型Ca²⁺チャネルと活性化・不活性化の膜電位依存性や局在等の違い等によって異なった生理学的機能を分担している。また、肥大心筋、不全心筋、梗塞後心筋、あるいは心房細動の持続した心筋等で発現が増加しており病態下で特殊な役割を有することが明らかにされつつある。

2. T型Ca²⁺チャネルの心臓での局在

T型Ca²⁺チャネルはクローンの違いによって α_{1G} (Ca_v3.1)、 α_{1H} (Ca_v3.2)と α_{1I} (Ca_v3.3)に区別される¹⁾。心臓では α_{1G} チャネルと α_{1H} チャネルが発現するが、 α_{1I} は発現していない。心臓のT型Ca²⁺チャネルは洞房結節や房室結節等の刺激伝導系に主に局在する。洞房結節では α_{1G} が発現している。 α_{1G} チャネルと α_{1H} チャネルは胎生期と成人期で発現量が変化し、個体が成長するにつれて α_{1G} の割合が増加する。肥大心や血管中膜新生の増殖細胞に多量に発現することから、細胞の増殖や細胞間相互作用の機能構築に重要な役割を果たすと考えられている。

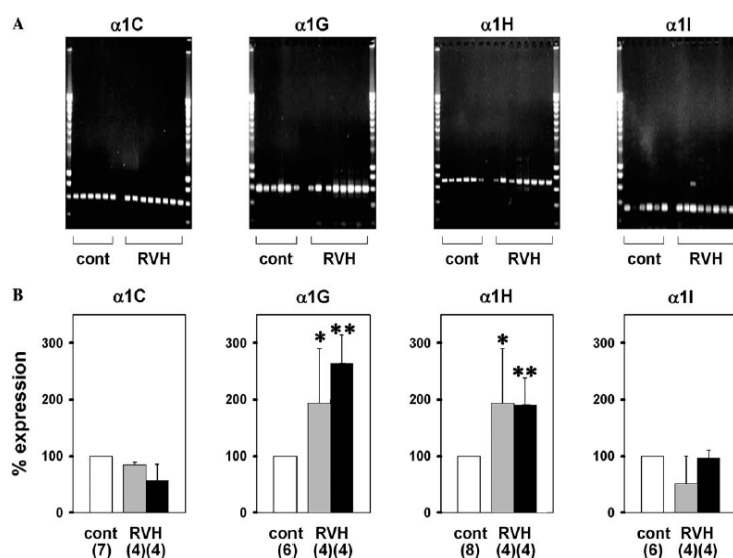


図1

右心室肥大心筋細胞(RVH)におけるCa²⁺チャネルmRNAの発現比較。L型Ca²⁺チャネル α_1 サブユニット(α_{1C})、及び心筋細胞において機能的発現を示さない α_{1I} サブユニットは細胞肥大によって影響を受けない。T型Ca²⁺チャネル α_1 サブユニット(α_{1G} 及び α_{1H})は肥大細胞で発現が増加する。対照心筋細胞(白抜き)と比較して肥大心筋細胞のmRNAの増加をconventional RT-PCR(灰色)、及びreal time RT-PCR(黒色)で定量評価した³⁾。

3. T型Ca²⁺チャネルの電気生理学的特徴

T型Ca²⁺チャネルは α_1 サブユニット単独チャネルであり、目下のところ他の付属サブユニットの機能的関与はないと考えられている。 α_{1G} 及び α_{1H} サブユニットの基本分子骨格は他の電位依存性Ca²⁺チャネルと類似しており、6個の膜貫通領域からなるドメインを4個有するという共通構造である。L型Ca²⁺チャネル(α_{1C})とのチャネル全体の相同性は僅か25%程しかない。T型Ca²⁺チャネルは非選択的に多くの陽イオンを通過させる²⁾。

4. T型Ca²⁺チャネルと心血管疾患との関連

肥大大心筋や不全心筋等の病的な心筋細胞ではT型Ca²⁺チャネルの発現が増加し細胞内のカルシウム過負荷や不整脈の発生等に深く関与することが知られている。猫の大動脈狭窄モデルによって得られた肥大大心筋細胞では通常成獣で記録されないT型Ca²⁺チャネル電流が発現する。また、心筋症ハムスターの心臓では対照ハムスターと比較して2倍以上のT型Ca²⁺チャネル電流が発現しているが、L型Ca²⁺チャネルの発現には差が見られない。肥大大心筋、あるいは続発する不全心筋の細胞機能

に対してT型Ca²⁺チャネルの発現が防御的に働いているかの、あるいは増悪因子として作用しているのかに関しては結論が得られていない。鬱血性心不全患者を対象とした大規模研究(MACH-1 study)では、T型Ca²⁺チャネル遮断薬(mibefradil)の投与を受けた患者群では偽薬投与群に比べ、生命予後の改善作用が見られなかった。一方、不整脈発生に関与する電気的心筋リモデリングに対してはT型Ca²⁺チャネルの遮断が抗不整脈的に作用すると考えられている。犬の心房を高頻度刺激し電気的心筋リモデリングを生じたモデルにおいて、T型Ca²⁺チャネルの拮抗薬(mibefradil)の投与が心房筋の不応期を延長させ、心房細動の発症が抑制される。虚血後心筋では様々なイオンチャネルのリモデリングが生じ、心筋細胞の活動電位持続時間が延長することが知られている。ラット虚血後心筋において、T型Ca²⁺チャネル(α_{1G})の遺伝子発現量は増大し同時にT型Ca²⁺チャネル電流量が増大するという。病的な心筋でのT型Ca²⁺チャネルの発現増加は心筋の電気的心筋リモデリングの修飾だけに留まらない。肥大大心筋でのT型Ca²⁺チャネルの発現増加が心筋収縮に寄与することが明らかになった(図1)。心筋での興奮収縮連関はL型Ca²⁺チャネルから流入するCa²⁺が作用

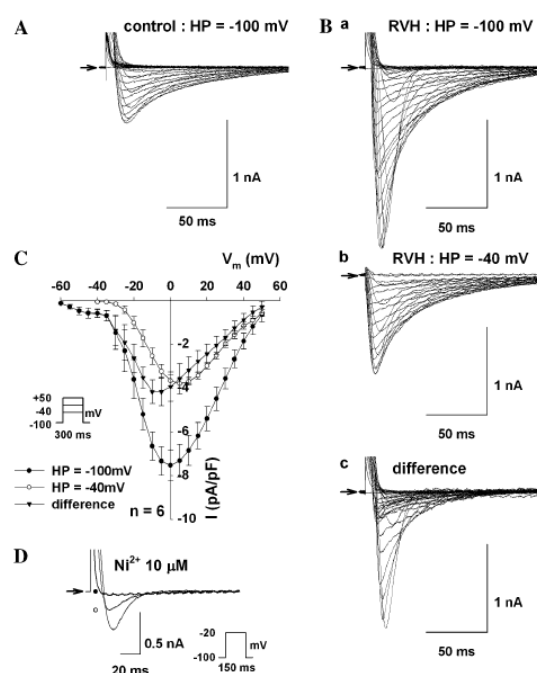


図2
右心室肥大大心筋細胞(RVH)におけるCa²⁺チャネル電流。L型Ca²⁺チャネル電流密度は変化しないが、正常心室筋細胞では通常認められないT型Ca²⁺チャネル電流が肥大大心筋細胞において記録される。A. 対照心筋細胞のCa²⁺チャネル電流。B. 肥大大心筋細胞Ca²⁺チャネル電流(a)、L型Ca²⁺チャネル電流成分(b)とT型Ca²⁺チャネル電流成分(c)。C. 肥大大心筋細胞のL型Ca²⁺チャネル電流とT型Ca²⁺チャネル電流の膜電位-電流関係。D. T型Ca²⁺チャネル電流のNi²⁺感受性³⁾。

して筋小胞体から筋細線維へ放出される Ca^{2+} によって筋収縮が開始される。しかし、肥大大心筋細胞ではT型 Ca^{2+} チャネルの発現が増大し、このT型 Ca^{2+} チャネルから流入した Ca^{2+} イオンが筋小胞体に作用するか、あるいは直接収縮蛋白に作用することで筋収縮を病的に制御する事が最近の研究で明らかになった(図2)。一方、虚血心筋において産生の亢進と分解の抑制によって生じる脂質代謝産物 lysophosphatidylcholine (LPC) の蓄積は虚血心筋の不整脈発生に密接に関わる。LPCは protein kinase C 依存性にT型 Ca^{2+} チャネル電流(α_{1H})を抑制することが明らかにされており、病態下でリモデリングを受けたT型 Ca^{2+} チャネルが様々な環境下で心臓の機能異常に関わる。心筋のリモデリングにおけるT型 Ca^{2+} チャネルの発現制御因子の解明とその制御過程が今後は明らかにされるものと考えられる。

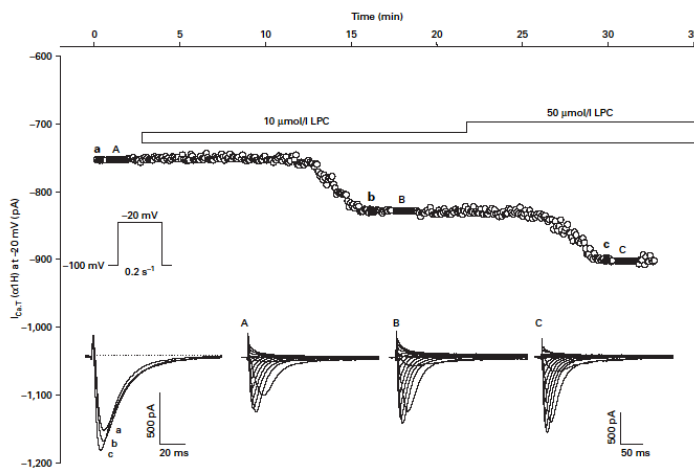


図3
リン脂質(Lyso phosphatidylcholine, LPC)によって増大したT型 Ca^{2+} チャネル電流。発現系T型 Ca^{2+} チャネル電流(α_{1H})はLPCの濃度依存性に電流振幅が増大する。この増大作用は α_{1H} T型 Ca^{2+} チャネル電流では認められない⁴⁾。

5. おわりに

低電位活性化型チャネルであるT型 Ca^{2+} チャネルと病的な心筋細胞機能との関わりを主概説した。この電位依存性 Ca^{2+} チャネルは1998年にクローニングされた後、急速に理解が深まった。T型 Ca^{2+} チャネルは心臓の歩調取りや刺激伝導系機能に寄与すると理解されているが、更に様々な病態下での臓器や細胞の分化過程で発現が亢進することも知られている。T型 Ca^{2+} チャネル遺伝子の転写制御と病的シグナルの解明が期待される。

6. 文献

- 1) Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A et al : Molecular characteristics of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 392: 896-900, 1998.
- 2) Kaku T, Lee TS, Arita M, Hadama T, Ono K: The gating and conductance properties of $\text{Ca}_v3.2$ low-voltage-activated T-type calcium channels. *Jpn J Physiol* 53: 165-172, 2003.
- 3) Takebayashi S, Li Y, Kaku T, Inagaki S, Hashimoto Y, Kimura K, Miyamoto S, Hadama T, Ono K: Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 766-773, 2006.
- 4) Zheng M, Uchino T, Kaku T, Kang L, Wang Y, Takebayashi S, Ono K: Lyso phosphatidylcholine Augments $\text{Ca}_v3.2$ but not $\text{Ca}_v3.1$ T-type Ca^{2+} Channel Current Expressed in HEK-293 Cells. *Pharmacology* 76: 192-200, 2006.

心血管疾患とカルシウムチャネル

大屋 祐輔

琉球大学医学部 病態解析医科学講座 循環系総合内科学

高血圧の病態では血管緊張の亢進が認められ、L型Ca²⁺チャネルを抑制するCa²⁺拮抗薬がこれを有効に改善する。したがって、L型Ca²⁺チャネルがその病態に重要な役割を持っていると考えられている。我々は、高血圧モデルラットを用いて、血管平滑筋のL型Ca²⁺チャネルとその開口刺激である細胞膜電位の変化について検討を行った。腸間膜動脈平滑筋の膜電位は高血圧自然発症ラット（SHR）ではそのコントロールラット（WKY）に比較し脱分極していた（Fig.1）¹。この脱分極は高血圧の発症とともに顕著となった。また、食塩感受性高血圧モデルであるDahl食塩感受性ラットにおいても食塩負荷後に脱分極が生じた²。さらに、これらの高血

圧モデルラットでは脱分極と同時にL型Ca²⁺チャネルブロッカーで抑制される自発電気活動を認めた。これらのことより、高血圧において、平滑筋細胞の脱分極がL型Ca²⁺チャネル活性亢進の一部に寄与することがわかった。次に、高血圧ラット腸間膜動脈より平滑筋細胞を単離し、パッチクランプ法によりCa²⁺チャネルを直接評価した。SHRではWKYに比較し単位膜面積あたりのL型Ca²⁺電流量が多かった（Fig.2）³。しかし、非L型Ca電流にはこのような差を認めなかった。また、Dahl食塩感受性ラットにおいても高血圧の発症とともにL型Ca²⁺電流量が増加していた⁴。単一チャネルで評価したコンダクタンスや開口時間はSHRとWKY間で差がなかった

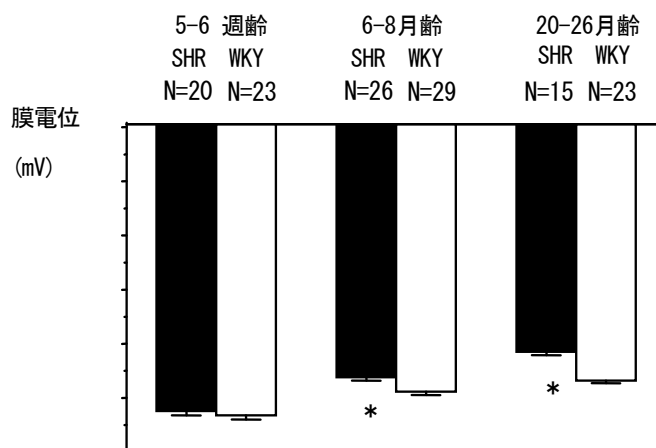


Figure 1. SHRとWKYの腸間膜動脈平滑筋細胞の膜電位。
文献1より引用し作図。

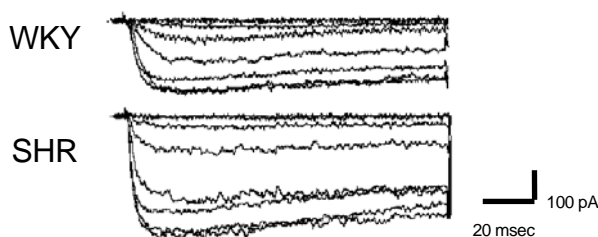


Figure 2. SHRとWKYの腸間膜動脈から単離した平滑筋細胞より記録されたCa²⁺チャネル電流。細胞容量はいずれも17pS。外液は50mmol/Lバリウムを含む。指示電位は-30 mVから+40 mVで、保持電位は-40 mV。文献5より引用（一部改変）。

め、チャネルの開口確率、利用率、チャネル蛋白の発現に差があると考えられた⁵。他のグループからの報告では、高血圧ラットの血管平滑筋ではL型チャネルタンパクの発現が増加しており、細胞膜の脱分極がこのL型Ca²⁺チャネルのタンパク発現変化に関与している⁶。以上の結果より、L型Ca²⁺チャネルタンパクの増加も血管緊張の亢進に関与すると考えられる。一方、現在のところ高血圧動物でCa²⁺チャネルタンパクに変異があるとの報告はない。

高血圧の病態ではレニン・アンジオテンシン系が重要な働きをしていることが知られている。アンジオテンシンIIなどのアゴニストはL型Ca²⁺チャネル電流を増加させるため高血圧動物での血管の緊張変化や構造変化に寄与するとされている。さらに、アンジオテンシンIIは細胞外より受容体に作用するのみならず、細胞内部から作用する可能性も指摘されている。我々は、細胞

内のアンジオテンシンIIがL型Ca²⁺チャネルに及ぼす影響を血管平滑筋で検討した。細胞内にアンジオテンシンIIを投与するとL型Ca電流量は増加した⁷(Fig.3)。この反応はアンジオテンシンII 1型受容体(AT1-R)拮抗薬で抑制されたことより、AT1-R類似の結合部位が細胞内アンジオテンシンIIの作用を仲介していることがわかった。

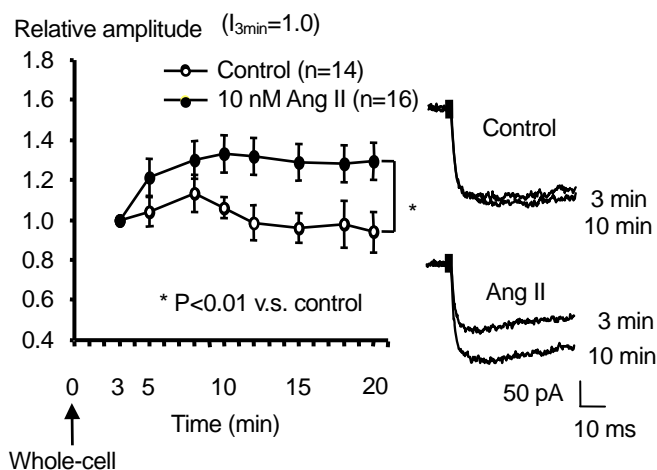


Figure 3. 細胞内へのアンジオテンシンII (Ang II) 投与によるCa²⁺チャネル電流の増強。文献7より引用。

一方、高血圧動物で認められる血管平滑筋細胞の脱分極の原因には、局所で産生される液性因子の変化、内皮依存性過分極因子の減弱、血管平滑筋細胞の進展刺激で開口する陽イオンチャネル活性の増加、電位依存性Kチャネル活性の低下など複数の因子が関与している⁸。血管平滑筋に多く存在するCa²⁺依存性Kチャネル電流は高血圧動物ではむしろ増加しており、脱分極の原因とはならないとされている。

以上のように、高血圧でみられる血管緊張の亢進は、単一のチャネルの異常ではなく、複数のチャネルの変化の総和と考えられる。これらのイオンチャネルに生じている変化を修正する戦略は、血管障害の新しい治療へつながる可能性がある。

参考文献

1. Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1992;70:660-669.
2. Fujii K, Onaka U, Ohya Y, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Fujishima M. Role of eicosanoids in alteration of membrane electrical properties in isolated mesenteric arteries of salt-loaded, Dahl salt-sensitive rats. *Br J Pharmacol.* 1997;120:1207-1214.
3. Ohya Y, Abe I, Fujii K, Takata Y, Fujishima M. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1993 ;73:1090-1099.
4. Ohya Y, Fujii K, Eto K, Abe I, Fujishima M. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in resistance arteries from Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res.* 2000;23:701-707.
5. Ohya Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, Abe I, Fujishima M. Single L-type calcium channels in smooth muscle cells from resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;31:1125-1129.
6. Pesic A, Madden JA, Pesic M, Rusch NJ. High blood pressure upregulates arterial L-type Ca²⁺ channels: is membrane depolarization the signal? *Circ Res.* 2004 May 28;94(10):e97-104. Epub 2004 May 6.
7. Eto K, Ohya Y, Nakamura Y, Abe I, Iida M. Intracellular angiotensin II stimulates voltage-operated Ca(2+) channels in arterial myocytes. *Hypertension.* 2002;39:474-478.
8. Ohya Y, Fujishima M. Alterations of ion channels in vascular muscle and endothelia cells during hypertension and aging. In T. Hagen (ed): *Mechanisms of Cardiovascular Aging. Advances in Cell Aging and Gerontology* vol11. pp165-182, Elsevier, Amsterdam, 2002

代謝内分泌系疾患とカルシウムチャネル

砂川昌範、中村真理子、小杉忠誠

琉球大学医学部 形態機能医科学講座 生理学第一分野

緒言

心筋細胞内エネルギー代謝はアデノシン三リン酸 (ATP) の産生と消費の収支バランスが保たれているが故に、細胞の生存および機能発現が可能となる。ホルモンや神経伝達物質等の心臓刺激により、心筋細胞内エネルギー代謝は定常状態からの急速な逸脱を余儀なくされる (負の収支バランス)。心臓は、細胞構成要素の代償的变化 (質的または量的変化) を介して、エネルギー代

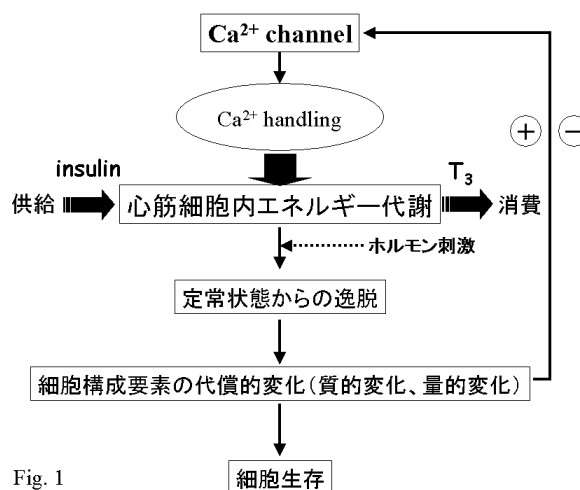


Fig. 1

謝の収支バランスを保つことで細胞生存を可能にする。心筋細胞内エネルギー消費の大部分は細胞内カルシウムの汲み出し等の Ca^{2+} ハンドリングによって規定されている。 Ca^{2+} チャネルによる細胞内への Ca^{2+} 流入は Ca^{2+} ハンドリングの負荷の大きさを決定することになる。したがって、細胞内エネルギー代謝の定常状態からの逸脱は Ca^{2+} チャネルにおいても量的・質的变化を惹起すると予想される。細胞内エネルギーの供給を調節する主要なホルモンがインスリンであり、消費を規定するのが甲状腺ホルモンである (Fig. 1)。我々は心筋細胞内エネルギー代謝の定常状態からの逸脱を引きこす病態として、糖尿病および甲状腺中毒症に着目し、 Ca^{2+} チャネル等のイオンチャネルの変化について検討を行った。

甲状腺中毒症ラット心房筋細胞におけるL型 Ca^{2+} チャネル電流の検討: 甲状腺ホルモンは、心臓に作用してその電気的特性および収縮特性を調節している。甲状腺ホルモンの心臓調節機序には大別すると二通りある¹⁾。細胞内核受容体 ($\text{TR}\alpha$ 、 $\text{TR}\beta$) と結合し甲状腺ホルモン応答遺伝子の転写を調節する genomic action および細胞膜や細胞質等の蛋白質機能を直接調節する nongenomic action である。甲状腺中毒症では、頻脈や心房細動等の不整脈が生じるのが知られているが、不整脈基質の成立に関与するイオンチャネルの量または質的な変化の詳細は不明である。我々は、甲状腺中毒症モデルラットを作製し、心房のイオンチャネルの電流変化について検討した^{2, 3)}。7週齢の Sprague-Dawley 雄性ラットに L-thyroxin (500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) を腹腔内に2週間連日投与し、甲状腺中毒症ラットを作製した。また、生理的食塩水投与ラットを対照群とした。2週間の投与終了後心電図を測定し、ランゲンドルフ装置を用いて摘出心臓をコラゲナーゼ溶液にて 37°C 、1時間灌流し、心房

筋細胞の単離を行った。パッチクランプ法にて心房筋の活動電位及び各種イオンチャネル電流を測定した。

甲状腺中毒症ラットの体重は有意に減少し左室重量は有意に増加した。また、心拍数、収縮期圧及び拡張期圧も対照群に比して有意に上昇した。体表心電図の比較では、RR 間隔が有意に短縮していたが、P 波、PQ 間隔、QRS 幅、補正 QT 間隔の有意な変化はみられなかった。単离心房筋細胞の活動電位を比較すると、甲状腺ホルモン投与群の APD_{20} 及び APD_{50} の値が対照群に比して有意に減少していた。活動電位持続時間短縮の原因を追求するため各種イオンチャネル電流を測定した。内向き電流として電位依存性 Na^+ 電流と L 型 Ca^{2+} 電流 ($I_{Ca(L)}$) を測定した。その結果、電位依存性 Na^+ 電流の電流密度の比較では、両群間に差はみられなかった。 $I_{Ca(L)}$ の電流密度電圧曲線の比較では、甲状腺中毒症群の電流密度は有意に減少した (Fig. 2)。インプットレジスタンス (R_{input}) が甲状腺中毒群で有意に減少していたことから、内向き整流性 K^+ 電流を測定したが、対照群と甲状腺中毒群間に有意な差はみられなかった。すなわち、 R_{input} の減少は、細胞肥大に基づくものであるのが判明した。外向き K^+ 電流として、一過性外向き電流 (I_{to}) と遅延整流性 K^+ 電流 ($I_{K(de lay)}$) を測定した結果、 I_{to} では有意な差はなく、 $I_{K(de lay)}$ は甲状腺中毒群で有意に増加した。これらの結果より、単离心房筋細胞における活動電位持続時間の短縮の本体は、少なくとも $I_{Ca(L)}$ 減少および $I_{K(de lay)}$ 増加が関与していると予想された。

従って、甲状腺中毒症ラット心房では心房筋細胞の肥大と活動電位持続時間短縮により心房細動が生じると考えられた。

II 型糖尿病ラットにおける心室筋イオンチャネル電流およびギャップジャンクションの検討：ストレプトゾトシン誘発 I 型糖尿病モデルラットを用いた病態生理学的追求により、心室肥大、心室拡張障害を特徴とする diabetic cardiomyopathy の原因は、 Ca^{2+} ハンドリング低下による Ca^{2+} overload が原因であるとされている⁴⁾。また、外向き K^+ 電流や Ca^{2+} 電流減少等のチャネルリモデリングにより、活動電位持続時間の延長が生じ、不整脈基質が形成される。これらの変化に加え、肥満を伴う II 型糖尿病では、さらに脂質代謝異常が心筋障害を助長すると予想されている⁵⁾。II 型糖尿病に伴う心室筋イオンチャネル電流とギャップジャンクションの変化を調べるために、自然発症 II 型糖尿病モデルである OLETF ラットとその対照ラット (LETO ラット) を比較検討した。経口糖負荷試験にて、糖尿病と確定された OLETF ラットと対照 LETO ラットの尾動脈血圧を tail-cuff 法にて測定し、体表心電図を記録後、心臓を摘出し、コラゲナーゼ溶液で灌流し、心室筋を単離した。パッチ

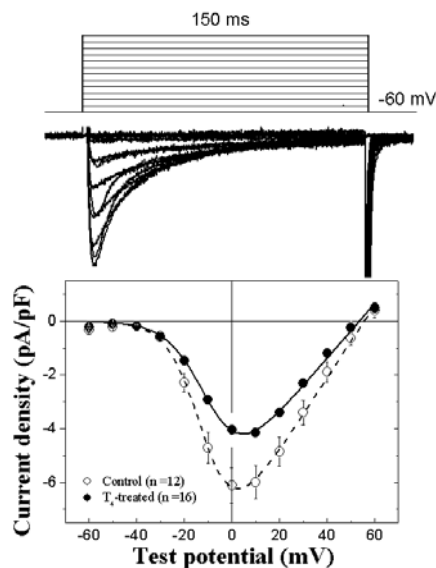


Fig. 2 甲状腺中毒症ラットと対照ラットのL型 Ca^{2+} チャネル電流電圧曲線

クランプ法を用いて $I_{Ca(L)}$ 、 I_{to} および $I_{K(delay)}$ を測定した。体重、心拍数及び血圧の比較では、OLETF ラットの体重が有意に増加し、収縮期血圧及び拡張期血圧も有意に上昇していた。一方、心拍数に変化はみられなかった。体表心電図の結果、OLETF ラットの PQ 間隔と QRS 幅が有意に延長していた。 $I_{Ca(L)}$ 、 I_{to} 及び $I_{K(delay)}$ の電流密度に LETO 及び OLETF ラット群間に有意な差は見られなかった。OLETF ラット単離心室筋細胞は、LETO ラットに比して有意に肥大していた。そこで、肥大心で増加するとの報告がある Na/Ca^{2+} exchanger 電流の測定を行ったが、両群間に有意な差はみられなかった。次に、興奮伝導の受動的要素として、心筋組織の線維化とギャップジャンクションについて検討した。アザン染色にて膠原線維を染色した結果、OLETF ラット心室では LETO ラットに比して線維化の軽度増強がみられた。心筋ギャップジャンクションを構成するコネクシン 43 蛋白の発現量を western blot 法にて測定した結果、OLETF ラット心室 Cx43 蛋白発現量は、LETO ラットに比して有意に減少していた。

従って、II 型糖尿病心室筋では、イオンチャネル等の能動特性以外の要因、即ちギャップジャンクション機能低下、及び心筋細胞間の線維化さらに心室筋細胞肥大に伴うインピーダンスミスマッチ等の受動特性変化による興奮伝導の遅延や途絶を生じ、不整脈基質を形成すると考えられる。

参考文献

1. Klein I. and Ojamaa K. :Thyroid hormone and the cardiovascular system. N Engl J Med. 344: 501-509, 2001.
2. Yamakawa M., Sunagawa M., Shimabukuro M., Higa N., Takasu N. and Kosugi T. :Effect of sodium channel blocker, pilsicainide hydrochloride, on net inward current of atrial myocytes in thyroid hormone toxicosis rats. Thyroid. 15: 653-659, 2005.
3. Sunagawa M., Yamakawa M., Shimabukuro M., Higa N., Takasu N. and Kosugi T. :Electrophysiologic characteristics of atrial myocytes in levo-thyroxine-treated rats. Thyroid. 15: 3-11, 2005.
4. Ganguly P.K., Pierce G.N., Dhalla K.S. and Dhalla N.S. :Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. Am J Physiol. 244: E528-535, 1983.
5. Mizushige K., Yao L., Noma T., Kiyomoto H., Yu Y., Hosomi N., Ohmori K. and Matsuo H. :Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. Circulation. 101: 899-907, 2000.

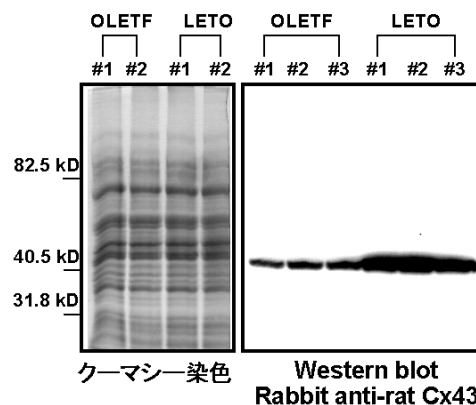


Fig. 3 OLETFとLETOラット心室筋コネクシン43 蛋白発現量の比較