
総 説

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

矢野雅文

山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学(内科学第二) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 筋小胞体, リアノジン受容体, チャンネル制御ドメイン, 点突然変異

和文抄録

心筋細胞膜の脱分極が生じるとL型Ca²⁺チャンネル(LTCC)から少量のCa²⁺が流入し, その流入Ca²⁺がトリガーとなり筋小胞体(SR)膜上にあるCa²⁺放出チャンネルのリアノジン受容体(RyR)からの大量のCa²⁺放出を引き起こす。細胞内の増加したCa²⁺は, 収縮蛋白を活性化した後, SRのCa²⁺-ATPaseによりSR内に再び取り込まれるとともに, 一部はNa⁺/Ca²⁺交換機構や細胞膜Ca²⁺ポンプを介して除去される。このような細胞内のCa²⁺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Ca²⁺ホメオスタシスの破綻は, SR内Ca²⁺含有量の低下や拡張期のCa²⁺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, 巨大な高分子蛋白として存在し, チャン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ン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-terminalドメイン(1-600)およびcentralドメイン(2000-2500)}間のドメイン連関障害は, 異常なCa²⁺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現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。

1. はじめに

心筋細胞内のCa²⁺濃度は, 筋小胞体(SR)を中心とするCa²⁺調節器官により制御され, 拡張期に100nM前後から収縮期には約1μMの範囲で変動している。最近, 不全心ではSR Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) やSRのCa²⁺放出チャン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Ca²⁺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とその調節蛋白である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ン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Ca²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺制御蛋白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。

2. 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Ca²⁺チャン

ネル (LTCC) から少量のCa²⁺が流入し, この流入Ca²⁺がRyRから大量のCa²⁺放出を引き起こし細胞内Ca²⁺濃度は上昇する [Ca²⁺依存性 Ca²⁺放出 (CICR)]²⁾. 収縮期にCICRにより細胞内で増加したCa²⁺は, 収縮蛋白を活性化し, 弛緩期にはSRのCa²⁺-ATPase (SERCA2a) によりSR内に再び取り込まれると同時に, 一部はNa/Ca²⁺交換機構や細胞膜Ca²⁺ポンプを介して除去される. この様な, ダイナミックな細胞内Ca²⁺濃度の変化(0.1–1 μM)は, Ca²⁺transientとして知られる²⁾. この細胞内Ca²⁺transient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であり, SRを中心としたCa²⁺制御蛋白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の蛋白量が減少し, またPLNのSer16, Thr17のリン酸化が低下することによりSRのCa²⁺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Ca²⁺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⁾.

3. 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Ca²⁺放出チャネルであり, 分子量550kDa, 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Ca²⁺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などの修飾蛋白が結合し, 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

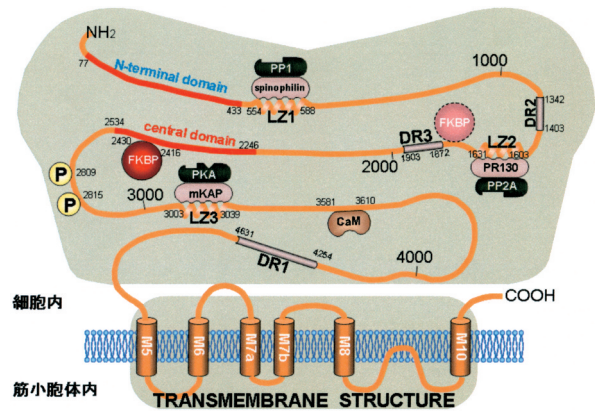


図1 リアノジン受容体複合体

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など数多くの蛋白が結合しリアノジン受容体複合体 (macromolecular complex) を形成している.

ゼー-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Ca²⁺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カ所 (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, 即ちCa²⁺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しているが (zipping), MH/CCDではどちらかのドメインの一カ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Ca²⁺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からのCa²⁺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⁾。即ち、不全心筋RyR2においてRyR2のSe2808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Ca²⁺漏出をもたらす、SR内のCa²⁺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、(同ジアミノ酸配列のnativeドメインとの競合によりN-terminal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⁾。

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

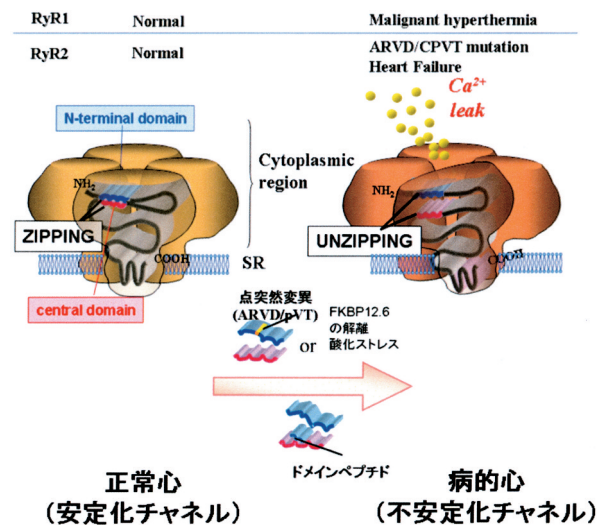


図2 チャネル制御ドメイン連関障害がCa²⁺漏出を引き起こす

N-terminal domain (1-600 AA) と central domain (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Ca²⁺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ズになる (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。

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Ca²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺漏出が起こっ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、Ca²⁺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⁾。即ち、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。

また最近、MHの治療薬であるダントロレンの分子的作用機序に関しては長らく不明であったが、著者らは、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Ca²⁺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-terminal 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、Ca²⁺漏出を抑制し心機能を改善、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アミノ酸のうちただ1カ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、2. R2474S/+KI心筋細胞のRyR2は、isoproterenol, PKAによるリン酸化、そしてSR内Ca²⁺によるチャネルの活性化に対して感受性が亢進した、3. R2474S/+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、Ca²⁺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Ca²⁺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。

4. 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カ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Ca²⁺感受性が増大、Ca²⁺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Ca²⁺漏出はCa²⁺取り込み能の低下とあいまってSR内のCa²⁺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。

5. 引用文献

1) Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered

- intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005 ; **115** : 556-564.
- 2) Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002 ; **415** : 198-205.
 - 3) Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y, et al. Mechanisms of Disease : ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006 ; **3** : 43-52.
 - 4) Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 2004 ; **37** : 417-429.
 - 5) Yamamoto T, El-Hayek R, Ikemoto N. Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca²⁺ channel regulation. *J Biol Chem* 2000 ; **275** : 11618-11625.
 - 6) Ikemoto N, Yamamoto T. Postulated Role of Inter-domain Interaction within the Ryanodine Receptor in Ca²⁺ Channel Regulation. *Trends Cardiovasc Med* 2000 ; **10** : 310-316.
 - 7) Yamamoto T, Ikemoto N. Spectroscopic Monitoring of Local Conformational Changes during the Intramolecular Domain – Domain Interaction of the Ryanodine Receptor. *Biochemistry* 2002 ; **41** : 1492-1501.
 - 8) Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of Calcium Release by Interdomain Interaction within Ryanodine Receptors. *Front Bioscience* 2002 ; **7** : 671-83.
 - 9) Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001 ; **103** : 485-490.
 - 10) Priori SG, Napolitano C, Tiso N, et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001 ; **103** : 196-200.
 - 11) Lahat H, Eldar M, Levy-Nissenbaum E, et al. Autosomal recessive catecholamine- or exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia. Clinical features and assignment of the disease gene to chromosome 1p13-21. *Circulation* 2001 ; **103** : 2822-2827.
 - 12) Oda T, Yano M, Yamamoto T, et al. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation* 2005 ; **111** : 3400-3410.
 - 13) Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, et al. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing heart. *Circulation* 2001 ; **104** : 2883-2885.
 - 14) Yano M, Okuda S, Oda T, et al. Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 2005 ; **112** : 3633-3643.
 - 15) Yano M, Kobayashi S, Kohno M, et al. FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 2003 ; **107** : 477-484.
 - 16) Yamamoto T, Yano M, Xu X, et al. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation* 2008 ; **117** : 762-772.
 - 17) Kobayashi S, Bannister ML, Gangopadhyay JP, et al. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2005 ; **280** : 6580-6587.
 - 18) Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol* 2009 ; **53** : 1993-2005.
 - 19) Cerrone M, Colombi B, Santoro M, et al. Bidirectional ventricular tachycardia and

- fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2005 ; **96** : e77-82.
- 20) Kannankeril PJ, Mitchell BM, Goonasekera SA, et al. Mice with the R176Q cardiac ryanodine receptor mutation exhibit catecholamine-induced ventricular tachycardia and cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; **103** : 12179-12184.
- 21) Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, et al. Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest* 2008 ; **118** : 2230-2245.
- 22) Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, et al. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Is Caused by Mutation-Linked Defective Conformational Regulation of the Ryanodine Receptor. *Circ Res* 2010 ; **106** : 1413-1424.
- 23) Meng X, Xiao B, Cai S, et al. Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2007 ; **282** : 25929-25939.

Defective Intracellular Calcium Release in Heart Failure and Lethal Arrhythmia

Masafumi YANO

Department of Medicine and Clinical Science (Internal Medicine II.) Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Two domains within the ryanodine receptor (RyR2) of sarcoplasmic reticulum (SR) {N-terminal (0-600) and central (2000-2500) domains : N-C domains}, harboring many mutations in CPVT, was found to interact with each other as a regulatory switch for channel gating. Here, we investigated the role of inter-domain interaction in the pathogenesis of heart failure (HF) and lethal arrhythmia.

In the SR from pacing-induced failing hearts, domain unzipping in N-C domains has already taken place. In failing (but not normal) cardiomyocytes, the frequency of Ca²⁺ sparks (SpF) was markedly increased at baseline. To assess whether the defective inter-domain interaction also causes CPVT, we developed knock-in (KI : RyR2R2474S/+) mice model harboring a human Arg-to-Ser (R2474S) mutation. In all KI mice, ventricular tachycardia was observed by exercise with treadmill. In response to isoproterenol (ISO), the SpF was markedly increased in KI, in association with the domain unzipping. Co-addition of dantrolene markedly diminished the SpF in both failing and KI cardiomyocytes. In conclusion, the defective inter-domain interaction within the RyR2 may induce the de-stabilized channel gating, as a common key mechanism of heart failure and lethal arrhythmia.