

ミニ・レビュー

慢性心房細動患者の心房筋における筋小胞体Ca²⁺制御蛋白の変化

大草知子

山口大学医学部器官病態系・内科学第二講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 慢性心房細動, 心筋筋小胞体, リアノジンレセプター, Ca²⁺-ATPase

はじめに

心房細動 (AF) は日常臨床で最もよく見かける不整脈で, 近年の高齢化に伴いその発生頻度は増加し, 循環器科領域ではその対応が大きな課題となっている. AFの慢性化の要因の一つとして, AFにより引き起こされた心房筋の電気生理学的変化がある^{1,3)}. これは心房筋の活動電位持続時間や不応期の短縮する現象で, electrical remodelingと呼ばれており³⁾, 心房筋の様々な機能的, 器質的変化の関与が知られている. 図1にelectrical remodelingの成因のまとめを示す. その要因の主なものとして, 内向きCa²⁺電流の減少, 外向きK⁺電流の増加が考えられている. 加えて, 最近になり, イオンチャネル以外にも細胞間結合のgap junctionを形成する蛋白質, 主にconnexin 43の異常発現も報告されAFの慢性化におけるその関与が注目されている²⁾, 一方, これらの細胞膜の電気生理学的特性の変化の原因として, 細胞内のCa²⁺ overloadを含むCa²⁺ホメオスタシスの異常が考えられているが, その細胞内の分子生物学的な詳細なメカニズムはいまだ明らかではない. 図2に心筋細胞内Ca²⁺ホメオスタシスを維持するための細胞内Ca²⁺調節機構を簡単に示す. 心筋細胞内のCa²⁺濃度は, 主に筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum : SR) のリアノジンレセプターを介してのSRからのCa²⁺放出とCa²⁺-ATPaseによるCa²⁺取り込み機能により調節されており, その結果心筋細胞は収縮弛緩を繰り返す. ここで重要なことはリアノジンレセプターを介して放出されたCa²⁺や, Ca²⁺-

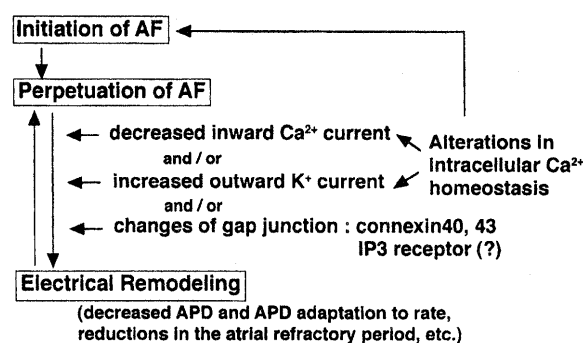
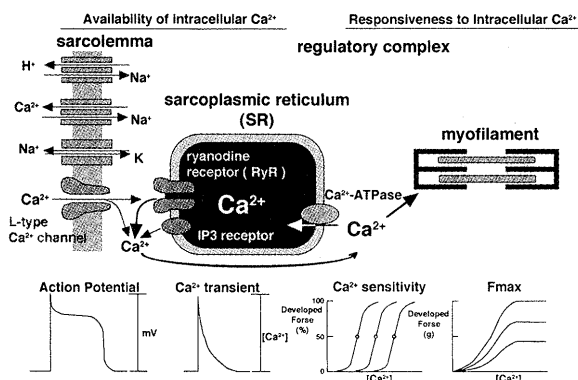


図1 electrical remodelingの成因

図2 心筋細胞内Ca²⁺ホメオスタシス調節機構

ATPaseにより調節されている細胞内のCa²⁺レベルは細胞膜のL型Ca²⁺チャネルに対してfeed back機構を有しており⁵⁾, これらSRのCa²⁺制御蛋白により調節されているCa²⁺ signalは, 心筋細胞の収縮, 弛緩のみでなく, 細胞膜の電気生理学的特性を調節する役割をも担っているという点である.

我々は従来より様々な病的な心筋細胞の細胞内Ca²⁺調節機構の異常を, 主にSR機能とSRのCa²⁺制御蛋白を中心として検討してきたが^{6,8)}, 慢性AF患者の

平成13年6月7日受理

	NSR (n=9)	MVD + AF (n=13)
RAP (mmHg)	3.1 ± 2.5	6.2 ± 3.0 *
mPAP (mmHg)	13.4 ± 1.4	24.2 ± 8.4 *
PCWP (mmHg)	6.9 ± 2.7	15.7 ± 4.7 *
LA diameter (mm)	38.9 ± 4.4	62.8 ± 12.5 *
LVEF (%)	64 ± 5	59 ± 9

mean ± SD, * p<0.05 vs NSR

表1 慢性心房細動患者及び正常洞調律患者における臨床データの比較

心房筋においてもSRのCa²⁺制御蛋白に変化が生じている可能性を考え、開心術中に得られた慢性AF患者の心房筋を用いてこれらの変化を検討した。加えて、近年、細胞内および細胞膜に存在するイノシトール3リン酸受容体 (IP3 receptor) が細胞膜を介するCa²⁺流入や細胞間のelectrical couplingにおいて重要な役割を担っているとの報告もあり⁹⁾、このIP3 receptorの発現とAFの関係についてのデータの一部を合わせて報告する。

方 法

対象は13例の僧帽弁膜置換術中に得られた6ヵ月以上持続する慢性AF患者の右心房、左心房筋で、コントロールとして9例の正常洞調律 (NSR) 患者 (CABGまたは胸部大動脈瘤術中患者) の右心房筋を用いた。右心房及び左心房筋のリアノジンレセプターの結合実験は [³H] ryanodineを用いて行い、同時にguanidinium法にて心房筋よりtotal RNAを抽出し、リアノジンレセプター mRNA及びCa²⁺-ATPase mRNAの発現量を測定した。各mRNA発現量はreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて解析し、internal controlとしてGAPDH mRNAの発現量を用いて相対的比較を行った。用いたprimerは我々の先の報告に基づいて作成した^{10, 12)}。なお、本研究の実施にあたり研究内容は山口大学医学部附属病院臨床研究審査委員会による審査、承認を得て行われた。

結 果

各患者群の術前血行動態指標と心エコー所見のまとめを表1に示す。慢性AF群においてはNSR群に比べ、右房圧 (RAP)、平均肺動脈圧 (mPAP)、

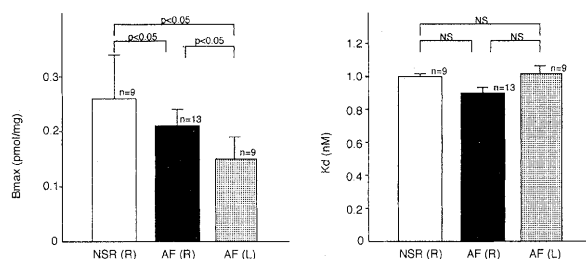


図3 [³H] ryanodine結合実験の結果。NSR：正常洞調律患者群，AF：慢性心房細動患者群，R：右心房，L：左心房，Bmax：最大結合数，Kd：解離定数

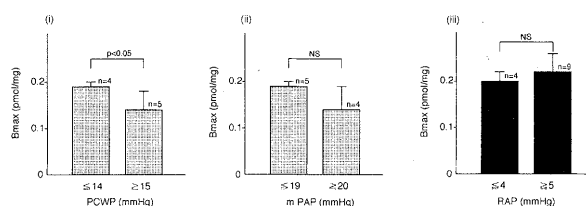


図4 リアノジンレセプター最大結合数 (Bmax) と血行動態指標の比較。PCWP：肺動脈楔入圧，mPA：平均肺動脈圧，PAR：右心房圧

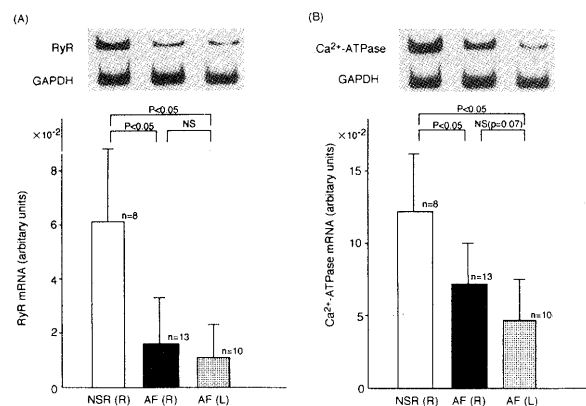


図5 リアノジンレセプター mRNA及びCa²⁺-ATPase mRNA発現量の比較。NSR：正常洞調律患者群，AF：慢性心房細動患者群，R：右心房，L：左心房，RyR：リアノジンレセプター

肺動脈楔入圧 (PCWP)、左心房径 (LA diameter) は有意に増加していた。一方、左室駆出率 (LVEF) は両群間に有意差を認めなかった。図3にSRのリアノジンレセプターの結合実験のデータを示す。慢性AF患者の右心房及び左心房筋のリアノジンレセプターのチャンネル最大結合数 (Bmax) はNSR群に比べて有意に減少していた。また、慢性AF患者の左心房筋 (L) のBmaxは右心房筋 (R) に比べ、有意に減少していた。一方、チャンネルの解離定数 (Kd) には各群間で有意差は認められなかった。図

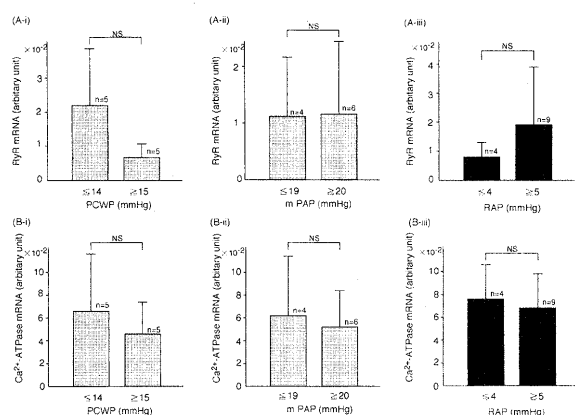


図6 リアノジンレセプター mRNA (上段) 及びCa²⁺-ATPase mRNA (下段) 発現量と血行動態指標の比較. PCWP: 肺動脈楔入圧, mPA: 平均肺動脈圧, PAR: 右心房圧

4に, 慢性AF患者のリアノジンレセプターのBmax, と血行動態指標との関係を示す. 左心房筋のBmaxはPCWPの増加により有意に減少したが右心房筋のBmaxと右房圧(RAP)の変化との間には相関関係は認められなかった.

図5にリアノジンレセプター mRNA及びCa²⁺-ATPaseのmRNA発現量を比較検討したデータを示す. 上段には各群の代表例を示す. 慢性AF群の右心房筋(R)及び左心房筋(L)のリアノジンレセプター mRNA発現量はNSR群に比べ有意に減少しており, 同様に, Ca²⁺-ATPase mRNA発現量も減少していた. しかし, 慢性AF群における両遺伝子発現量の各心房間における有意差は認められなかった. 次に慢性AF群の両遺伝子発現量と血行動態指標を比較検討した(図6). 図6上段にはリアノジンレセプター mRNAと, 下段にはCa²⁺-ATPase mRNAと各血行動態指標の比較を示す. リアノジンレセプター mRNA及びCa²⁺-ATPase mRNA発現量はPCWPの増加に伴い減少する傾向にあったが, 有意差は認められなかった. RAPの変化と両遺伝子発現量の間には有意差は認められなかった.

図7は, 細胞膜を介するCa²⁺流入や細胞間のelectrical couplingにおいて重要な役割を担っているとされているIP3 receptorの蛋白質および遺伝子発現量を, NSR患者, 僧帽弁膜疾患患者のNSR群, 僧帽弁膜疾患患者の慢性AF群で比較したものである. 非常に興味深いことに僧帽弁膜疾患ではIP3 receptorの蛋白質およびmRNA発現量がNSR群に比

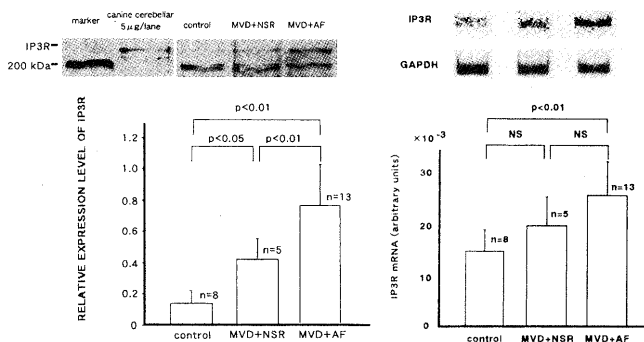


図7 IP3受容体蛋白質(A)およびmRNA発現量(B)の比較. イヌ小脳IP3受容体蛋白質またはGAPDH mRNA発現量に対する相対的発現量として表示. NSR: 正常洞調律患者, NVD: 僧帽弁膜疾患患者, AF: 慢性心房細動患者

べてup regulateされており, 慢性AFを合併するとさらにその発現量が増加していた.

まとめ

本研究では, 慢性AF患者では(1)両心房筋のリアノジンレセプター最大結合数(Bmax)はNSR患者のBmaxに比べ有意に低下していた.(2)左心房筋のリアノジンレセプターのBmaxは右心房筋のBmaxに比べ有意に低下していた.(3)左心房筋のリアノジンレセプターのBmaxはPCWPの上昇に伴い低値を示した.(4)リアノジンレセプター mRNA及びCa²⁺-ATPase mRNA発現量は両心房筋においてNSR群に比べ有意に低下していた.(5)IP3 receptorの蛋白質およびmRNA発現量はNSR群に比べ有意に増加していた. これらの結果より, 僧帽弁膜疾患による心房への機械的負荷は, リアノジンレセプター数及びリアノジンレセプターやCa²⁺-ATPaseの遺伝子発現量の減少を, 一方でIP3 receptorの増加を引き起こすことが示された. その結果, 細胞内Ca²⁺ handlingに異常が生じ, 心房筋の電気生理学的特性が変化しAFの発生, 維持につながると考えられた. 先に述べたように, AFの発生, 維持に心筋細胞膜の電気生理学的特性の異常や, その原因としての細胞内Ca²⁺ overloadが論じられてきたが, 細胞内のCa²⁺ handlingやCa²⁺制御因子の変化を直接検討した報告は少ない. 今回の我々の結果はAFの直接的な原因であるのか, または結果である

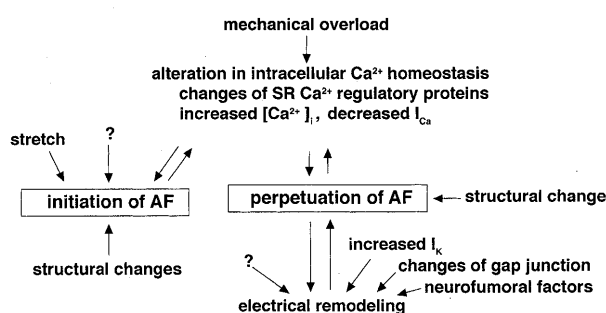


図8 慢性心房細動のelectrical remodeling

のかについてはさらなる検討を要するが、少なくともAF begets AF¹²⁾の一つの要因となりAFの維持に関与していることが示された。

今回は僧帽弁膜疾患患者のNSR例の数が少なく、AF群と比較検討した結果を報告できなかったが、NSR例では、リアノジンレセプター数、リアノジンレセプター mRNA及びCa²⁺-ATPase mRNA発現量は僧帽弁膜疾患患者の慢性AF群のそれぞれの値と比較して大きい傾向にあった。また、本研究では慢性AF患者の心房筋SRのCa²⁺制御蛋白の変化につき報告したが、慢性AF心房筋の細胞内Ca²⁺ transientを測定しCa²⁺ overloadを直接報告した研究は皆無であり、今後の研究が期待される。

また、図7に示すように、興味深いことに僧帽弁膜疾患ではIP₃ receptorの蛋白質および遺伝子発現量がNSR群に比べてup regulateされており、慢性AFを合併するとさらにその発現量が増加していた¹³⁾。免疫組織学的検討により、IP₃ receptorの過剰発現は細胞質内、核膜上、さらに興味深いことにgap junction一致して認められた¹³⁾。IP₃ receptorはリアノジンレセプター同様に細胞内Ca²⁺制御蛋白の一つであり、不全心筋細胞においてはリアノジンレセプターの発現低下の代償として発現増加が報告されている¹⁴⁾。慢性AF時における、その発現量増加の詳細な意義については現在検討中であるが、gap junctionの構成蛋白質のひとつであるconnexin 43の発現が慢性AFではup regulateされているという報告¹⁾と考え合わせると、AFの維持には細胞内Ca²⁺制御イオンチャンネルのみでなく、細胞間結合構成蛋白質の変化も重要な因子であると推測された。

最後に慢性AFのelectrical remodelingのまとめを図8に示す。我々のデータで示したように心房筋への機械的負荷は細胞内Ca²⁺ホメオスタシスの変化を

引き起こす一因となり、AFを誘発すると考えられる。AFが発生すると細胞内Ca²⁺レベルの変化は同時に細胞膜の電気生理学特性を変化させる重要な因子の一つとなり、gap junctionの変化やneurofumoral factorなどの他の様々な因子とともに心房筋のelectrical remodelingを引き起こし、AFを維持する可能性が考えられた。

謝 辞

本論文は山口大学医学会小西賞受賞講演（平成13年7月21日）の内容に基づき記載したものである。本研究に対してご指導いただいた、山口大学医学部器官制御医科学講座循環病態内科学 松崎益徳教授、ならびにご協力いただいた山口大学医学部器官制御医科学講座（旧内科学第二講座および旧外科学第一講座）の皆様、心より感謝の意を捧げる。

また、この研究の一部は平成11年度厚生省厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）により行われたものである。

文 献

- 1) Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnant JP, Holmes DR, Ilstrup DM, Frev RL. The Natural History of Lone Atrial Fibrillation: a Population-based Study over Three Decades. *N Eng J Med* 1987; **317**: 669-694.
- 2) Greer GS, Wilkinson WE, McCarthy EA, Pritchett ELC. Random and non Random Behavior of Symptomatic Paroxysmal Atrila Fibrillation. *Am J Cardiol* 1989; **64**: 339-342.
- 3) Allessie M, Konings K, Wijffels M. Electrophysiological Mechanism of Atrial Fibrillation. In: Dimarco JP, Prystowsky EN, eds. *Atrial Arrhythmias: State of the Art. Armonk*, Future Publishing Co, NY, 1995, p155-161.
- 4) Elvan A, Huang X, Pressler ML. Radiofrequency Catheter Ablation of the Atria Eliminates Pacing-Induced Sustained Atrial Fibrillation and Reduces Connexin 43 in Dods. *Circulation* 1997; **96**: 1675-1685.

- 5) Lee KS, Marban E, Tsien RW. Inactivation of Calcium Channels in Mammalian Heart Cells: Joint Dependence on Membrane Potential and Intracellular Calcium. *J Physiol* 1985 ; **364** : 395-411.
- 6) Ohkusa T, Hisamatsu Y, Yano M, Kobayashi S, Tatsuno H, Saiki Y, Kohno M, Matsuzaki M. Altered Cardiac Mechanism and Sarcoplasmic Reticulum Function in Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997 ; **29** : 45-54.
- 7) Hisamatsu Y, Ohkusa T, Kihara Y, Inoko M, Ueyama T, Yano M, Sasayama S, Matsuzaki M. Early Changes in the Function of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum in Volume-Overloaded Cardiac Hypertrophy in Rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997 ; **29** : 1097-1109.
- 8) Ueyama T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Nakamura Y, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Alterations in Cardiac SR Ca-Release Channels (Ryanodine Receptors) during Development of Heart Failure in Cardiomyopathic Hamsters. *Am J Physiol* 1998 ; **274** : H1-H7.
- 9) Kijima Y, Saito A, Jetton TL, Magnuson MA, Fleischer S. Different Intracellular Localization of Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Ryanodine Receptors in Cardiomyocytes. (*J Biol Chem*). 1993 ; **268** : 3499-3506.
- 10) Ohkusa T, Noma T, Hisamatsu Y, Nakazawa A, Ueyama T, Tsuboi H, Esato K, Matsuzaki M. Differences in Sarcoplasmic Reticulum Gene Expression in Myocardium from Patients Undergo Cardiac Surgery;-Quantification of Steady-State Levels of Messenger RNA Using the Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction-. *Heart & Vessels* 1997 ; **12** : 1-9.
- 11) Ohkusa T, Ueyama T, Yamada J, Yano M, Fujimura Y, Esato K, Matsuzaki M. Alteration in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Regulatory Protein in the Atrial Tissue of Patients with Chronic Atrial fibrillation. *JACC* 1999 **34** : 255-263.
- 12) Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial Fibrillation begets Atrial Fibrillation. *Circulation* 1995 ; **92** : 1954-1968.
- 13) Yamada J, Ohkusa T, Yano M, Ueyama T, Kobayashi S, Hamano K, Esato K, Matsuzaki M. Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in atrial tissue in patients with chronic atrial fibrillation. *JACC* 2001. **37** : 1111-1119.
- 14) Go LO, Moschell MC, Watras J, Handa KH, Flfe BS, Marks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1995 ; **95** : 888-894.

Alterations in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Regulatory Proteins in the Atrial Tissue of Patients with Chronic Atrial Fibrillation

Tomoko OHKUSA

*Dept of Internal Medicine II. and. Medical Bioregulation,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi, 755-8505, Japan*

SUMMARY

Background Clinically, atrial fibrillation (AF) is the most frequently encountered arrhythmia. Recent studies indicate that an inability to maintain intracellular Ca²⁺ homeostasis with a consequent increase in membrane-triggered activity could be the primary initiating factor in some circumstances, and that cytosolic Ca²⁺ abnormalities are an important mediator of sustained AF.

Objectives The purpose of this study was to determine whether AF patients have alterations in the SR Ca²⁺ regulatory proteins in the atrial myocardium.

Methods and Results We measured the maximum number of [³H] ryanodine binding sites (Bmax) and the expression levels of ryanodine receptor (RyR) mRNA and Ca²⁺-ATPase mRNA in atrial myocardial tissue from 13 patients with AF due to mitral valvular disease (MVD) and 9 patients with normal sinus rhythm (NSR). In AF patients: (i) Bmax was significantly lower in each atrium [0.21 ± 0.03 pmol/mg (right), 0.16 ± 0.04 pmol/mg (left)] than in the right atrium (0.26 ± 0.08 pmol/mg) of NSR patients, (ii) Bmax was significantly lower in the left atrium than in the right atrium, (iii) Bmax in the left atrium was significantly lower at higher levels of pulmonary capillary wedge pressure, (iv) the expression level of RyR mRNA was significantly lower in both the left (1.24 × 10⁻² ± 1.28 × 10⁻²) and right (1.70 × 10⁻² ± 1.78 × 10⁻²) atrium than in the right atrium of NSR patients (6.11 × 10⁻² ± 2.79 × 10⁻²), and (v) the expression level of Ca²⁺-ATPase mRNA was significantly lower in both the left (5.67 × 10⁻² ± 4.01 × 10⁻²) and right (7.71 × 10⁻² ± 3.56 × 10⁻²) atrium than in the right atrium (12.60 × 10⁻² ± 3.92 × 10⁻²) of NSR patients.

Conclusions These results may suggest that, in the patients with chronic AF due to MVD, mechanical overload of the atrial myocardium decreases Bmax for RyRs and the expression of both RyR mRNA and Ca²⁺-ATPase mRNA. This might result in abnormal intracellular Ca²⁺ handling and alter the electrophysiologic properties of the atrium, leading to the initiation and maintenance of AF.