

ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進による心室不整脈の抑制

萩原 光* 渡邊昌也 安斉俊久

細胞内カルシウム(Ca)濃度の上昇は、心不全に関連する心室不整脈(VA)の原因となるが、ミトコンドリア(mit)へのCaの取り込みが、心不全患者のVAに与える影響は明らかにされていない。そこで、mitへのCa取り込みの促進が、細胞内Ca濃度とVAに与える影響を検討した。心筋梗塞後心不全モデルマウスを使用し、ケンペロール(Kaemp)によってmitへのCaの取り込みを促進した。蛍光顕微鏡でCaウェーブを、共焦点レーザー顕微鏡でCaスパークを、穿孔パッチクランプ法で活動電位を観察した。VAの誘発性は、ランゲンドルフ灌流心と浸透圧ポンプでKaempを投与したマウスで評価した。Kaempは、Caウェーブ、Caスパーク、活動電位の回数を減少させ、VAの発生を抑制した。Kaempは、細胞内Ca濃度の上昇を代償し、VAを抑制する可能性が示唆された。MitへのCa取り込み能を促進する治療戦略は心不全におけるVAへの新たな選択肢になることが期待される。

(心電図, 2024 ; 44 : 231-240)

I. はじめに

不整脈の成因には、何らかの異常により洞結節以外で自発性の活動電位が発生する異所性自動中枢、回路の形成により巡回するリエントリー型、そして、活動電位の発生から再分極終了直後までに起き

る一過性の脱分極である triggered activity の三つの機序が知られている。活動電位の初期の段階に起こる早期後脱分極、または再分極終了直後に起こる遅延後脱分極(delayed after depolarization : DAD)が、活動電位を伴うことで triggered activity を引き起こし、不整脈の原因となる。

DADは、細胞内カルシウム濃度の上昇を代償する過程での、ナトリウム-カルシウム交換体(Na^+ - Ca^{2+} exchanger : NCX)を介する脱分極である。このような細胞内カルシウム濃度の上昇の原因に、ライアノジンレセプター2(Ryanodine Receptor 2 : RyR2)の構造的、機能的変化による calcium leak が知られている。

Keywords

- 心不全
- 心室不整脈
- カルシウムハンドリング
- ミトコンドリア

北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室
(〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目)
*は責任者を示す

Enhanced Calcium Uptake into Mitochondria Mitigates Ventricular Arrhythmia in Heart Failure
Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Toshihisa Anzai

2024年1月25日 原稿受領 / 2024年4月13日 掲載承認

RyR2は、小胞体上に存在し細胞内カルシウムの調整に関与している。活動電位に伴い電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内へ流入したカルシウムが、RyR2に結合することで、小胞体から細胞質へカルシウムが放出される (calcium induced calcium release : CICR)。細胞内に放出されたカルシウムは、細胞外への流出や、小胞体内へ再度取り込まれ、拡張期における細胞質カルシウム濃度は下がる。この心筋細胞内のカルシウムの生理的制御をカルシウムハンドリング (calcium handling) と呼ぶ。RyR2や関連タンパク質の構造的機能障害は、拡張期に小胞体内からのカルシウムの漏出であるカルシウムリーク (calcium leak) を起こす¹⁾。その際、漏出したカルシウムが、ほかの RyR2 に結合することで CICR を起こす。それが次々に伝搬することで、細胞内のカルシウム濃度が上昇する。この CICR が次々と伝搬する現象はカルシウムウェーブ (calcium wave) : と呼ばれ、その代償過程で、NCX を介した、一過性内向き電流による DAD が誘起され、その DAD に起因する triggered activity が発生する。

虚血性心疾患の増加や、社会の高齢化により、わが国の心不全患者は増加し²⁾、突然死を起こしうる致死性不整脈への治療が重要となっている。しかしながら、既存の抗不整脈薬は、左室収縮の抑制などから心不全患者への使用において制限があり³⁾、新規抗不整脈薬の開発は依然として今後の課題である。

心不全に関連する心室不整脈の原因の一つに、DAD が知られている。RyR2 は、ホモ 4 量体により形成され、カルシウム放出チャネルとしてカルシウムハンドリングに関与している。健常心では、 β 受容体刺激によって活性化されるプロテインキナーゼ A により、RyR2 のうちの 1 つの受容体の Ser2809 がリン酸化される。これによってチャネルの開口確率が上昇し、心筋収縮力が増加する。一方、不全心では、脱リン酸化酵素であるプロテインホスファターゼ 1 とプロテインホスファターゼ 2A の活性が低下

することによって、RyR2 のうち 3 受容体以上がリン酸化され⁴⁾、これにより、チャネルの開口確率が増大し、カルシウムリークが起こる。このカルシウムリークによって CaW が起き、最終的に triggered activity による心室不整脈を起こす。したがって、カルシウムハンドリング異常を改善することは治療戦略の一つとなるが、これまでの抗不整脈薬は、カルシウムハンドリング異常に焦点を当てていない。

カルシウムハンドリングには、RyR2、NCX 以外に、ミトコンドリアが関与している⁵⁾。ミトコンドリアからのカルシウムの放出を促進することで CaW の頻度が上昇し、さらにミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することでカルシウムウェーブが抑制された報告がある⁶⁾。また、RyR2 機能障害に起因したカルシウムウェーブによる心室不整脈を認めるカテコラミン誘発性多型性心室頻拍モデルマウスにおいて、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することで CaW が抑制され、抗不整脈作用が示された¹⁾。一方、心不全に関連する心室不整脈に対する、このようなミトコンドリアへのカルシウム取り込み促進が効果的であるかは、わかっていない。そこでわれわれは、RyR2 から漏れ出たカルシウムをミトコンドリアに取り込ませることが、心不全に関連した心室不整脈を抑制すると仮説を立てた (図 1)。

II. 方 法

10~11 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの心臓の左冠動脈前下行枝を結紮して心筋梗塞を作製した (図 2)。心筋梗塞を作製したマウスを心不全群 (HF 群) とし、偽手術をしたマウスをコントロール群 (sham 群) とした。本研究では非麻酔下で術後 1 日、7 日、14 日、28 日に心エコーを行い、2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進は、主なカルシウム流入経路と報告されている Mitochondrial calcium uniporter (MCU) を活性化するケンペロールを用い、MCU の阻害薬として Ruthenium Red を

表 術後28日の体重および臓器重量評価

	sham群 n = 6	HF群 n = 6
体重及び臓器重量		
体重, g	25.8 ± 0.6	25.3 ± 0.6
左室重量 / 体重, mg/g	3.01 ± 0.06	4.74 ± 0.26 *
肺重量 / 体重, mg/g	5.21 ± 0.08	6.59 ± 0.27 *

データは平均値 ± 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. sham 群

〔文献7より引用〕

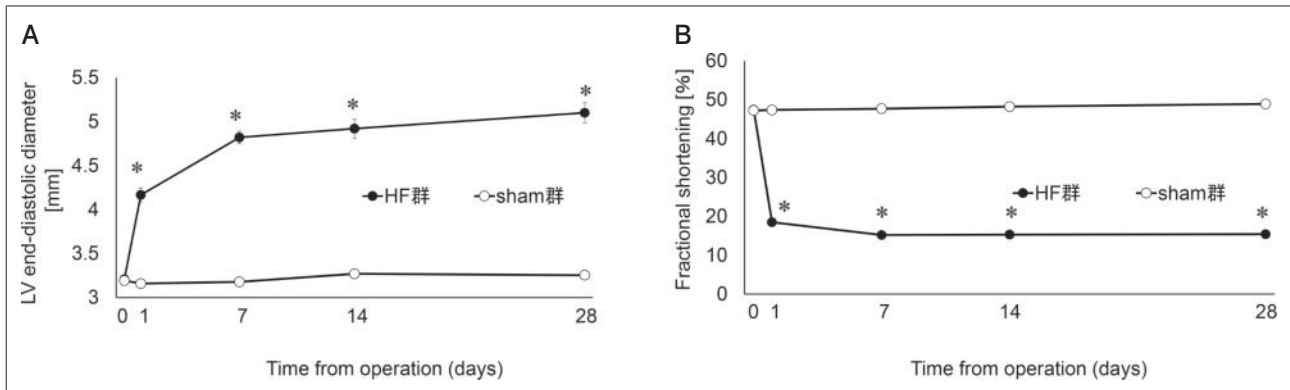


図3 左室拡張末期径と左室内径短縮率の経時的な変化

心エコーで測定した左室拡張末期径(A)と、左室内径短縮率(B)の変化。横軸が術後日数、縦軸は径(A)、短縮率(B)を表す。データは平均値 ± 標準誤差。* $P < 0.05$ vs. 術後日数が一致した sham 群。LV：左室

〔文献7より引用〕

単離心筋細胞を用いて、細胞質カルシウム濃度に依存するカルシウムスパークを観察した。穿孔パッチクランプ法で30秒間に発生する自発的な活動電位の発生回数とDADの発生回数を測定した。不整脈誘発性を、①ランゲンドルフ灌流心にペーシングを行った場合、②ランゲンドルフ灌流心にペーシングを行わず高濃度 β -アドレナリン受容体刺激を行った場合、③浸透圧ポンプを用いてケンペロールを投与したHF群とVehicleを投与したHF群に対して、エピネフリンとカフェインを投与した場合、の3通りの誘発で評価した。血行動態測定は、マイクロマノメータチップカテーテルを右頸動脈へ挿入し左室へカテーテルを進め、左室圧を測定して評価した。

Ⅲ. 結 果

1. 動物特性、心エコーデータ

表⁷⁾に術後28日の体重、臓器重量の結果を示す。体重で標準化した左室重量や肺重量はHF群でsham群と比較し、有意に増加していた。図3⁷⁾に心エコーによる左室内径と左室内径短縮率の経時的な変化を示す。HF群でsham群と比較し、術後1日より左室内径は有意に増加し、左室短縮率は有意に低下していた。

2. MCUのタンパク質発現とミトコンドリアへのカルシウム取り込み

MCUタンパク質発現量は、HF群とsham群で有意差がなかった(図4A)⁷⁾。蛍光吸光度計によって測定した蛍光強度の傾きは、ケンペロールにより絶

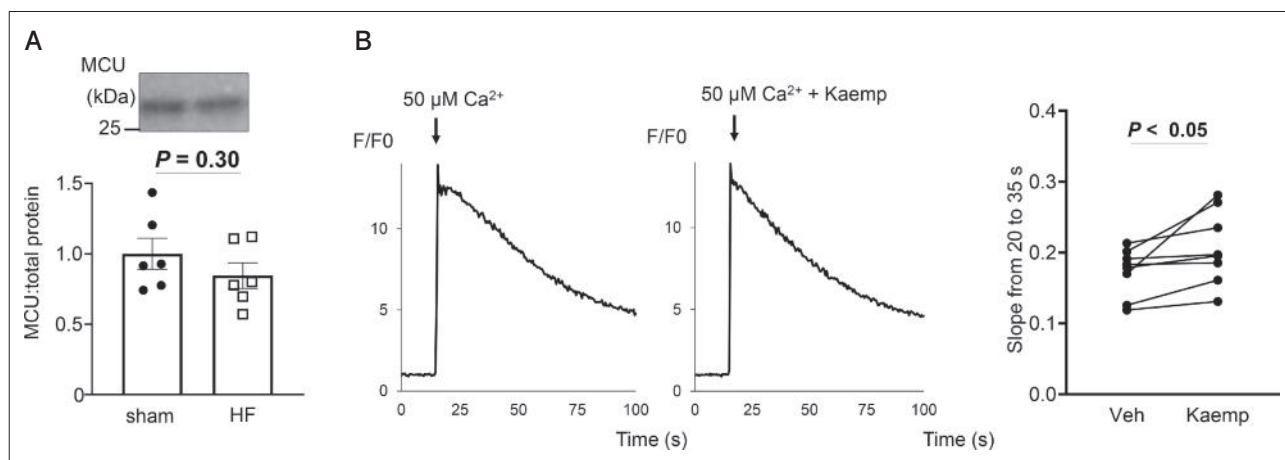


図4 MCUタンパク質発現の評価と単離ミトコンドリア外の蛍光強度

ウエスタンブロット解析での代表的なプロットと、sham群のMCUタンパク発現量を1として規格化したときのデータ(A). 各群 $n = 6$. 蛍光吸光度計で単離ミトコンドリア外のカルシウム濃度の変化を評価した. 測定開始20秒までの蛍光強度の平均値をF0とし、F0との比(F_x/F_0)を求めた. 代表的な蛍光強度比の変化と測定開始20から35秒の間の傾きの絶対値のグラフ(B). 各群 $n = 6$. データは平均値 $\pm$ 標準誤差.

[文献7より引用]

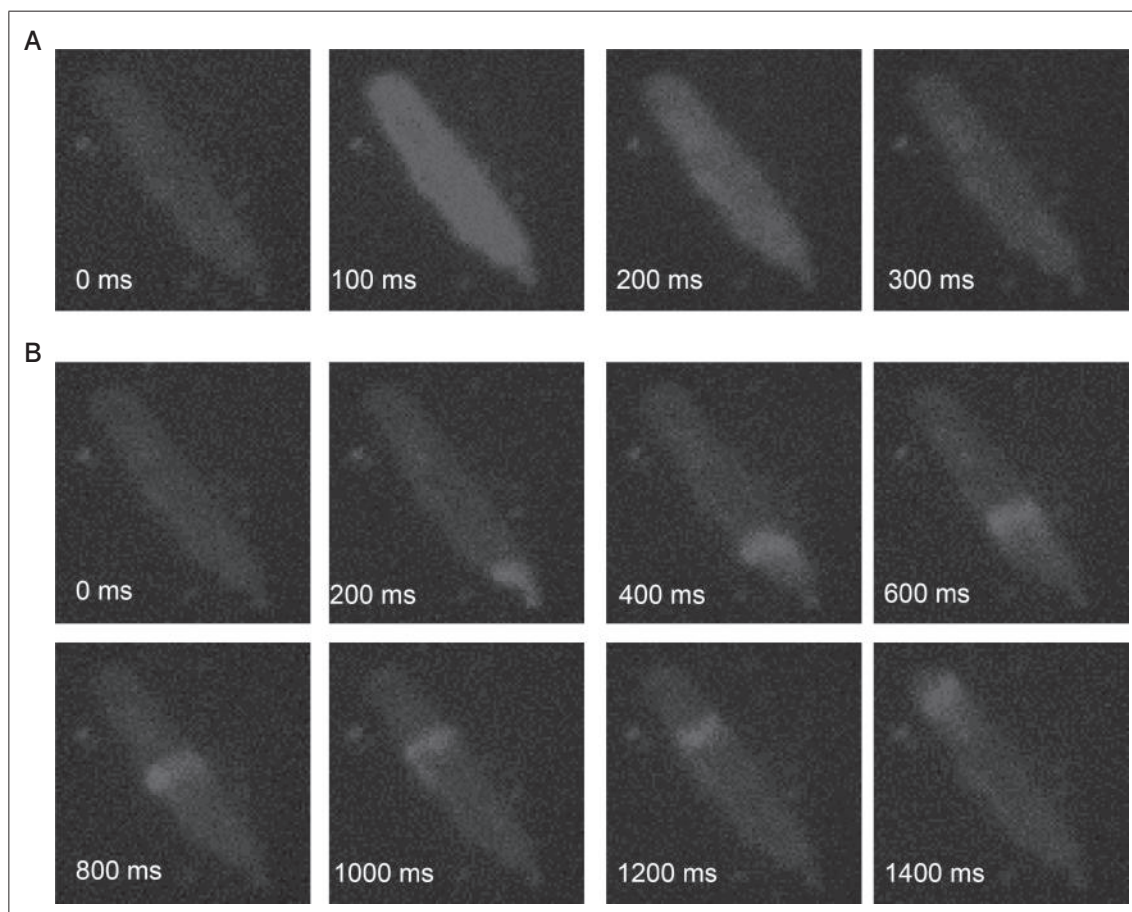


図5 蛍光顕微鏡を用いた単離心筋細胞のカルシウムイメージング

Fluo-4 AMでカルシウム色素染色を行った単離心筋細胞のカルシウムイメージング. すべての画像は擬似カラー表示している. 電気刺激によって細胞質全体のカルシウム濃度が上昇するカルシウムトランジェント(A)と、右下から左上に向かってカルシウム濃度上昇部位が伝搬しているカルシウムウェーブ(B).

[文献7より引用]

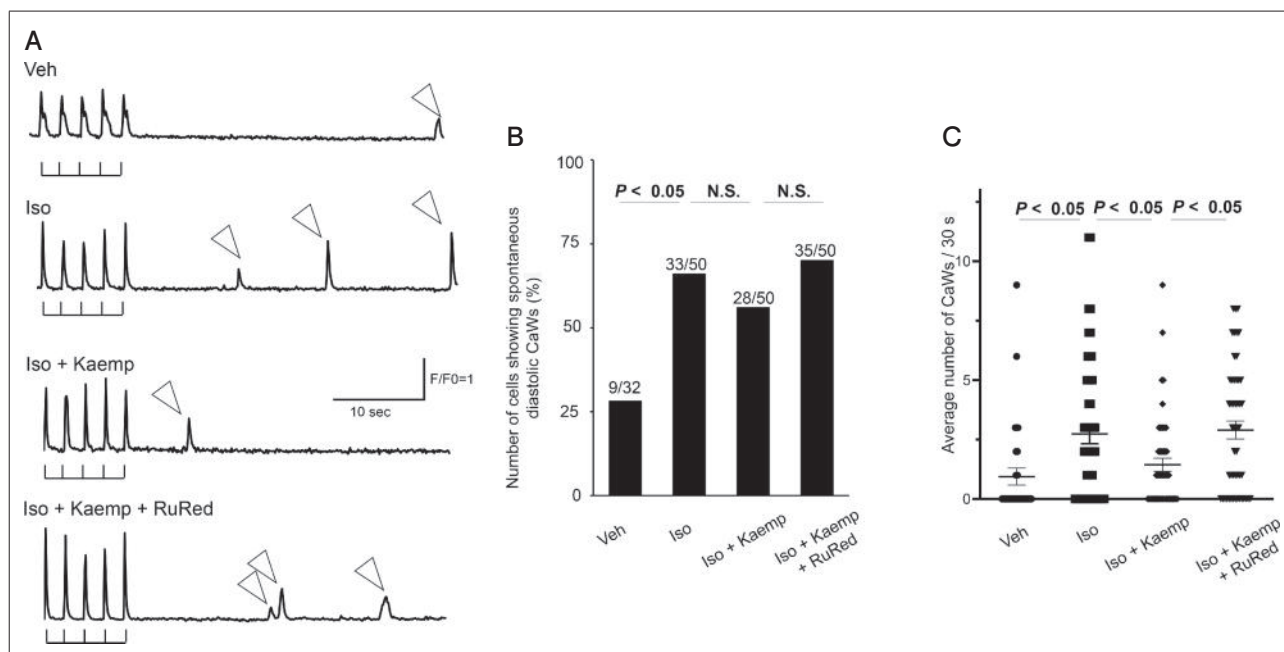


図6 HF群心筋細胞におけるカルシウムウェーブ

対照, イソプロテレノール, イソプロテレノールとケンペロール, イソプロテレノールとケンペロールと Ruthenium Red 処理後の HF 群の単離心筋細胞における代表的な蛍光強度比のプロット (A). 黒いバーはペーシングを表す. カルシウムウェーブを認める細胞の割合 (B), 30 秒間に 1 細胞あたりに認められるカルシウムウェーブの回数のグラフ (C).

データは平均値±標準誤差. CaWs: カルシウムウェーブ, Iso: イソプロテレノール, Kaemp: ケンペロール, N.S.: 有意差なし, RuRed: ruthenium red, Veh: vehicle.

[文献7より引用]

対値が増加した(図 4B)⁷⁾.

3. カルシウムウェーブの比較

蛍光顕微鏡による単離心筋細胞のカルシウムイメージングでは, 細胞全体で同時に蛍光強度が上昇するカルシウムトランジェント(図 5A)⁷⁾と, 細胞質内で蛍光強度上昇部位が伝搬するカルシウムウェーブ(図 5B)⁷⁾を観察できる. カルシウムウェーブを認める細胞の割合は, 対照に比べてイソプロテレノール処理で増加を認めたが, ケンペロールの追加で, 有意な減少を認めなかった. しかし, イソプロテレノールにより増加した 30 秒間の平均カルシウムウェーブ数は, ケンペロールの追加により有意な減少を認めた. さらにイソプロテレノール, ケンペロール存在下に, MCU 阻害薬である Ruthenium Red を加えたところ, カルシウムウェーブを認める細胞の割合は軽度増加し, 平均カルシウ

ムウェーブ数は有意差をもって増加した(図 6)⁷⁾.

4. カルシウムスパークの比較

カルシウムスパーク頻度は, 対照に比べ, イソプロテレノールにより増加し, イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えることで減少した(図 7)⁷⁾.

5. 穿孔パッチクランプ法による膜電位記録

図 8A⁷⁾に HF 群心筋細胞における穿孔パッチクランプ法による膜電位の代表例を示す. 自発的な活動電位の回数, 自発的な活動電位と DAD の合計の回数は, 対照に比べ, イソプロテレノールにより増加し, イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えることで減少した(図 8B)⁷⁾.

6. MCU の活性化による心室不整脈への影響

ランゲンドルフ灌流心にペーシングを行った場合, イソプロテレノール (100 nM) による SVA の発

症率は、ケンペロールにより有意に低下した(図 9A)⁷⁾。ランゲンドルフ灌流心にペーシングを行わず、高濃度イソプロテレノール(1 μ M)で β -アドレナリン受容体刺激を行った場合、心室不整脈の発症率は、ケンペロール(10 μ M)を追加すると、有意に低下した(図 9B)⁷⁾。浸透圧ポンプを用いてケンペロールを投与した HF 群にエピネフリン、カフェインを投与した場合の心室不整脈の発生率は、Vehicle を投与した HF 群と比して有意に低下していた(図 9C)⁷⁾。

7. MCU の活性化による心エコー、心電図、血行動態パラメーターの変化

MCU の活性化によって心エコーのパラメーター、心電図のパラメーター、血行動態のパラメーターはいずれも有意な差はなかった。

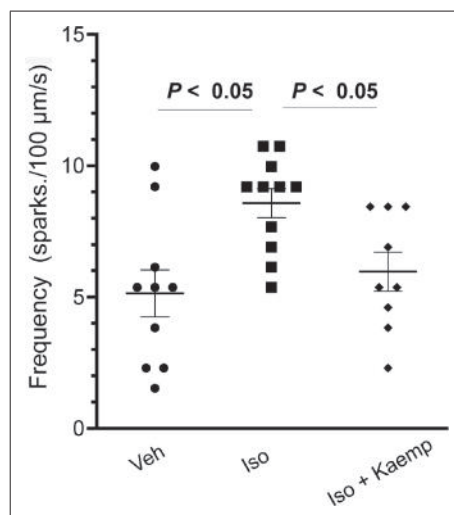


図 7 HF 群心筋細胞におけるカルシウムスパーク

対照、イソプロテレノール、イソプロテレノールとケンペロール処理後の HF 群の単離心筋細胞におけるカルシウムスパークの頻度。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。略語は図 6 と同じ。

[文献 7 より引用]

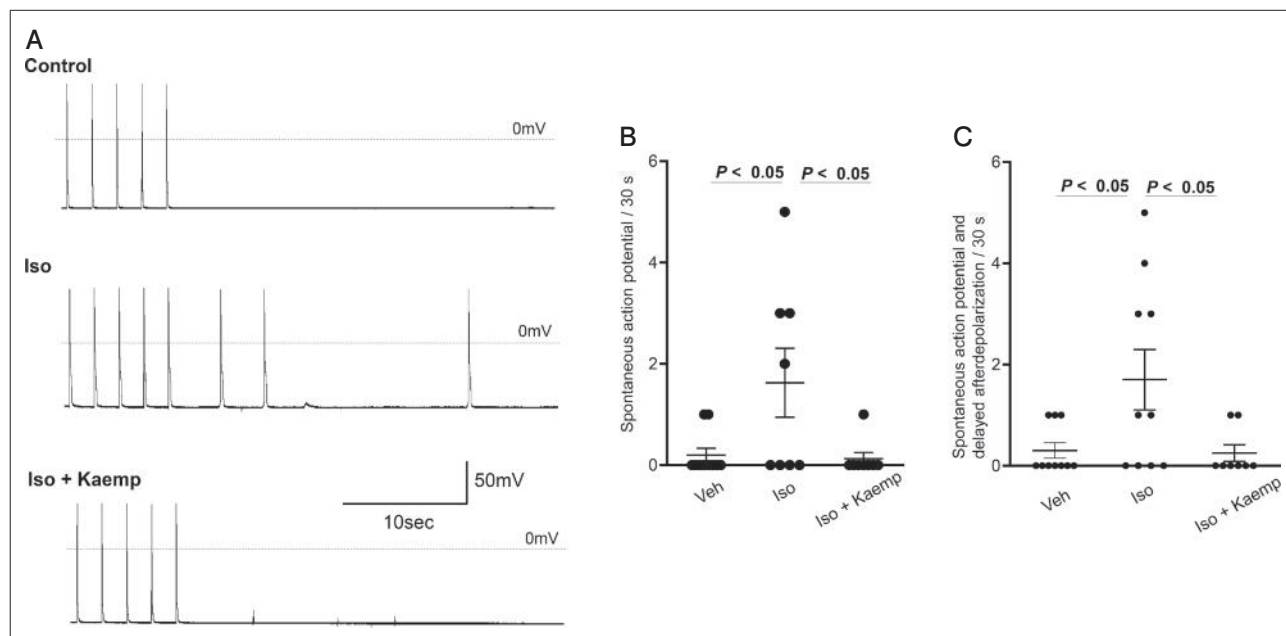


図 8 穿孔パッチクランプ法による HF 群心筋細胞の膜電位記録

対照、イソプロテレノール、イソプロテレノールとケンペロール処理後の代表的な膜電位記録(A)。30秒間に1細胞あたりで認められる自発的な活動電位の回数(B)、自発的な活動電位とDADの合計(C)。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。略語は図 6 と同じ。

[文献 7 より引用]

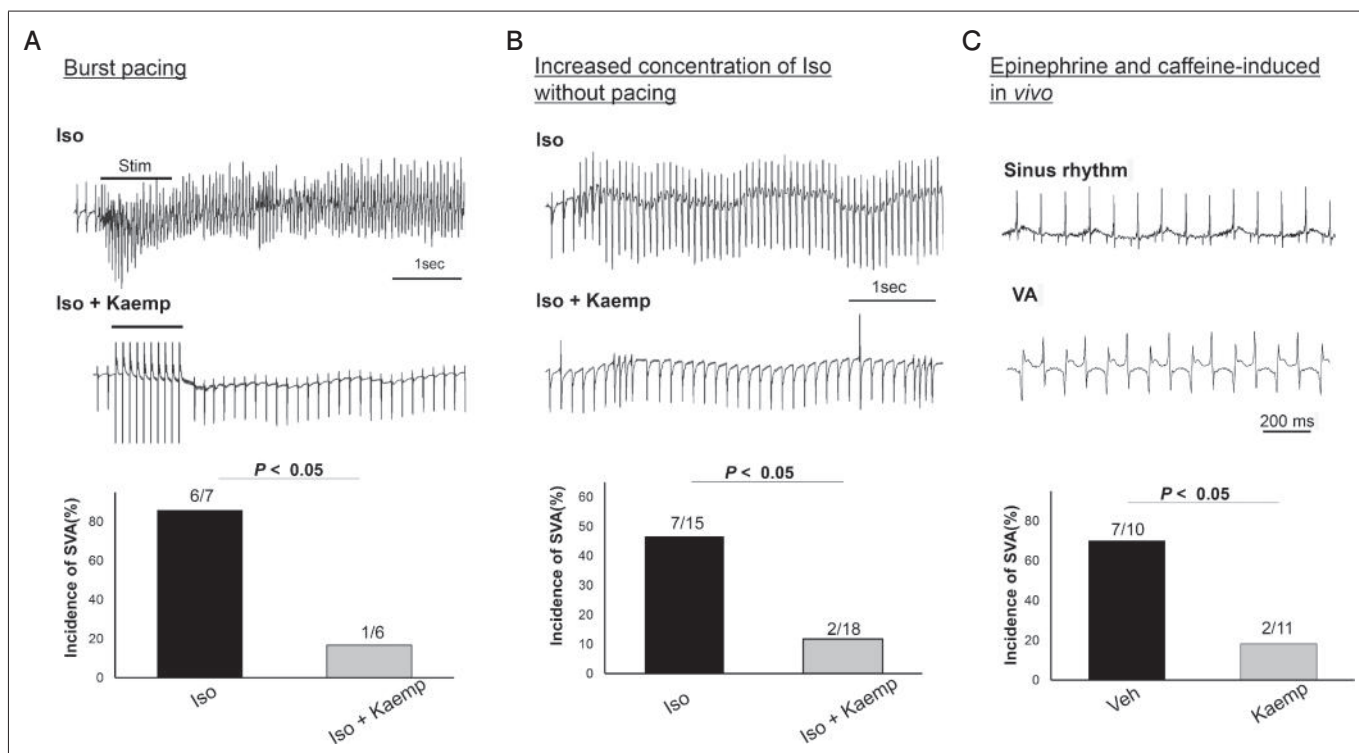


図9 心室不整脈の誘発性

連続ペースング刺激下における代表的な心電図と、心室性不整脈の発症率(A)。高濃度イソプロテレンール存在下での代表的な心電図と、心室不整脈の発症率(B)。浸透圧ポンプを用いてケンペロールを投与し、エピネフリン、カフェインで誘発した代表的な心電図と、心室不整脈の発症率(C)。VA：心室不整脈、その他の略語は図6と同じ。

〔文献7より引用〕

IV. 考 察

以下に今回の研究結果をまとめる。

- ① HF群と sham群の左室心筋において、MCUのタンパク質発現量に差はなかった。
- ② ケンペロールはミトコンドリアへのカルシウムの取り込みを促進した。
- ③ 不全心においてケンペロールが拡張期のカルシウムウェーブ、カルシウムスパークの形成を抑制し、拡張期の活動電位の形成を抑制した。
- ④ ケンペロールは、ランゲンドルフ灌流心における β -アドレナリン受容体刺激下の心室性不整脈の発生を抑制し、浸透圧ポンプによる投与でエピネフリンとカフェインによる心室不整脈の発生を抑制した。

- ⑤ ケンペロールによるカルシウムハンドリングの変化は、心エコー、心電図、血行動態指標に影響しなかった。

ミトコンドリアは、心筋細胞の体積のうち約3割を占める^{8),9)}。酸化的リン酸化によるATP産生や、アポトーシスにおける役割の研究は進んでいるが、心拍によりカルシウムは急速に変化し続けるため、心筋のカルシウムハンドリングにおけるミトコンドリアの役割はまだ明らかになっていない。

不全心と同様に、RyR2の機能障害によるカルシウムリークに起因する心室不整脈が主原因であるカテコラミン誘発多形性心室頻拍モデルマウスにおいて、ミトコンドリアへのカルシウム取り込み能亢進により、カルシウムウェーブの減少が報告され、さらに3日間の浸透圧ポンプによるケンペロール投与

が、エピネフリンとカフェインの急速投与による心室不整脈を抑制したと報告された¹⁾。RyR2からのカルシウムリークに対して、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが代償的に働くという点で、本研究と矛盾しない。ケンペロールは、MCU選択的活性化薬ではないが、MCU阻害薬をケンペロールの存在下に追加投与すると、カルシウムウェーブが抑制できなかったことから、ケンペロールによるカルシウムウェーブの抑制は、MCUの活性化が主な機序と考えられた。

V. 結 語

不全心において、ケンペロールによるミトコンドリアへのCa取り込みは、小胞体からのCaリークを代償し、致死性心室不整脈を抑制する可能性が示唆された。従来の抗不整脈薬は心不全患者に対する使用が制限されるが、ミトコンドリアへのCa取り込み能を促進させる治療戦略は心不全における心室不整脈治療への新たな選択肢になることが期待される。

付記

本稿は第67回日本不整脈心電学会学術奨励賞最優秀賞を受賞した論文をもとに、総説としてまとめたものである。なお、図表(表, 図3~9)については、受賞論文より引用させていただいた。

受賞論文

Hagiwara H, Watanabe M, Fujioka Y, Kadosaka T, Koizumi T, Koya T, Nakao M, Kamada R, Temma T, Okada K, Antonio MJ, Kwon O, Sabe H, Ohba Y, Anzai T : Stimulation of the mitochondrial calcium uniporter mitigates chronic heart failure-associated ventricular arrhythmia in mice. *Heart Rhythm*, 2022 ; 19 : 1725-1735

利益相反・研究財源

本研究は、「the Japan Society for the Promotion

of Science KAKENHI (Grant Numbers 18K08058 to Dr Watanabe ; 18K15874 to Dr Temma ; and 19K17584 to Dr Kamada) ; and the U.S. National Institutes of Health (Grant Number R01GM071779 to Dr Kwon).」の研究費により実施された。

【文 献】

- 1) Schweitzer MK, Wilting F, Sedej S, et al. : Suppression of Arrhythmia by Enhancing Mitochondrial Ca^{2+} Uptake in Catecholaminergic Ventricular Tachycardia Models. *JACC Basic Transl Sci*, 2017 ; 2 : 737-747
- 2) Okura Y, Ramadan MM, Ohno Y, et al. : Impending epidemic : future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J*, 2008 ; 72, 489-491
- 3) Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, et al. : Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med*, 1991 ; 324 : 781-788
- 4) Yano M, Ono K, Ohkusa T, et al. : Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*, 2000 ; 102 : 2131-2136
- 5) Fonteriz RI, De La Fuente S, Moreno A, et al. : Monitoring mitochondrial Ca^{2+} dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium*, 2010 ; 48 : 61-69
- 6) Zhao Z, Gordan R, Wen H, et al. : Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca^{2+} flux in mouse cardiomyocytes. *PLoS One*, 2013 ; 8 : e80574
- 7) Hagiwara H, Watanabe M, Fujioka Y, et al. : Stimulation of the mitochondrial calcium uniporter mitigates chronic heart failure-associated ventricular arrhythmia in mice. *Heart Rhythm*, 2022 ; 19 : 1725-1735
- 8) Barth E, Stammeler G, Speiser B, et al. : Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol*, 1992 ; 24 : 669-681
- 9) Kim HD, Kim CH, Rah BJ, et al. : Quantitative study on the relation between structural and functional properties of the hearts from three different mammals. *Anat Rec*, 1994 ; 238 : 199-206

Enhanced Calcium Uptake into Mitochondria Mitigates Ventricular Arrhythmia in Heart Failure

Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Toshihisa Anzai

Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University

An aberrant increase in diastolic calcium (Ca^{2+}) level is a hallmark of heart failure (HF) and the cause of delayed afterdepolarization and ventricular arrhythmia (VA). Although mitochondria play a crucial role in Ca^{2+} regulation, their ability to counteract or compensate for aberrant increases in cytosolic Ca^{2+} levels, which frequently occur in HF, remains unclear. Therefore, we investigated whether enhanced Ca^{2+} uptake of mitochondria may compensate for abnormal increases in the Ca^{2+} of ventricular myocytes in HF to effectively mitigate VA. We used a HF mouse model in which myocardial infarction was induced by permanent left anterior descending coronary artery ligation. The mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) was stimulated by kaempferol. Ca^{2+} dynamics and membrane potential were measured using an epifluorescence microscope, a confocal microscope, and the perforated patch-clamp technique. We analyzed the inducibility of VA in Langendorff-perfused hearts and in mice administered kaempferol using an implantable osmotic minipump. Hemodynamic parameters were measured using a microtip transducer catheter. Protein expression of MCU did not change between HF and sham mice. Treatment of cardiomyocytes with kaempferol, isolated from HF mice at 28 days after coronary ligation, reduced the appearance of aberrant diastolic Ca^{2+} waves and sparks and spontaneous action potentials. Kaempferol effectively reduced the inducibility of VA. Intravenous administration of kaempferol did not markedly affect left ventricular hemodynamic parameters. The effects of kaempferol in HF of mice implied that mitochondria may have the potential to compensate for abnormal Ca^{2+} . Mechanisms involved in mitochondrial Ca^{2+} uptake may provide novel targets to treat HF-associated VA.

Keywords : Heart failure, Ventricular arrhythmia, Calcium handling, Mitochondria