

未熟心筋  $\text{Ca}^{2+}$  電流の調節とその発達に伴う変化

勝部 康弘

日本医科大学武蔵小杉病院小児科

Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in Immature Cardiomyocytes and Developmental Changes

Yasuhiro Katsube

Department of Pediatrics, Musashikosugi Hospital, Nippon Medical School

## Abstract

The electrophysiology of the heart changes dramatically during development. These changes in electrical properties are caused by changes in the number (density) and types of ion channels, with resultant changes in the magnitude and kinetic properties of the various types of ionic currents. The alterations in the ion channels are responsible for the changes in the resting potential and characteristics of the action potentials. In this review, we focused on the developmental changes of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel (especially its regulation via  $\beta$ -adrenoceptor, and muscarinic acetylcholine agonist, tyrosine kinase) and the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. As mentioned in this review, the immature heart differs from the adult heart in both size and function. Therefore, we have to pay attention to the characteristics of the immature heart when we treat neonates and children.

(日本医科大学医学会雑誌 2006; 2: 96-102)

**Key words:** ion channel,  $\text{Ca}^{2+}$  channel, development, immature heart, patch-clamp

## 緒 言

各臓器の形態ならびに機能は、胎児、新生仔、成獣へと発達とともに変化する。特に、心臓は電気生理学的に劇的に変化する。

心臓の電気生理学的特性の変化は、それを規定するイオンチャネルの数、タイプの変化にもたらされるが、イオンチャネルの変化は、さらに心臓の膜電位ならびに活動電位の変化をもたらし (Fig. 1)。各種イオンチャネル (例えば、L型、T型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル<sup>1-5</sup>、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換輸送<sup>6,7</sup>、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ポンプ<sup>7</sup>、一過性外向き  $\text{K}^+$  電流<sup>8</sup>、内向き整流性  $\text{K}^+$  電流<sup>9</sup>、ATP 感受性  $\text{K}^+$  電流<sup>10-12</sup>、 $\text{Na}^+$  電流<sup>13</sup>) ならびに、その調整機構の発達に伴う変

化に関しては、これまでに数多くの論文が報告されている。最近ではヒト心筋を用いた報告もある<sup>14,15</sup>。

このように多くの研究成果があり、すべてについて述べることはできないため、本稿では、われわれの実験結果を中心に、現時点で明らかとなっている心臓における  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの調節機構の発達による違いについて述べる。

## 活動電位

未熟心筋の活動電位の特徴はその幅 (APD) が広いことである。例えば、ラット心室筋では、Fig. 2 に示すように生後1日の幅広い APD から生後3週にかけて著しく短縮し、成獣の非常に狭い APD に近づ

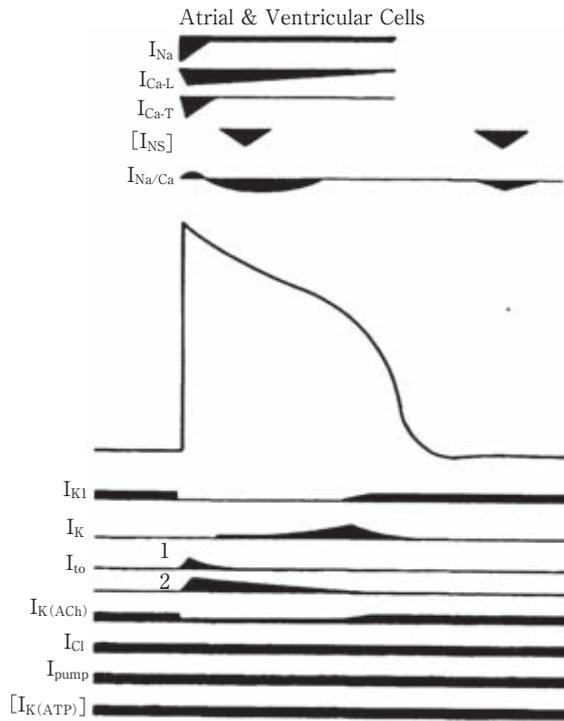


Fig. 1 Currents and channels involved in generating the resting and action potentials. The time course of a stylized action potential of atrial and ventricular cells is shown. Above and below are the various channels and pumps that contribute to the currents underlying the electrical events (Taken from Circulation 1991; 84: 1831-1851).

く<sup>16</sup>. その変化には、例えば、外向き  $K^+$ 電流の増加が関与し、心筋細胞を過分極し、APDを短縮すると考えられる。早期胎仔期の心室筋の静止膜電位は浅く(-40 mV~-50 mV)、その後発達とともに深くなり、成獣の値(-75 mV~-80 mV)となる。早期胎仔期の心室筋の浅い膜電位は安定性に欠け、自動的脱分極、ペースメーカー電位(第4相拡張期脱分極)を示すが、胎生期に進行的に減少し消失する。このように心室筋の自動能は胎生中期に消失する。自動能消失の一つの要素として、静止膜電位が発達とともに深くなることが考えられる。また、別の理由として、未熟心筋では過分極誘発内向き電流( $I_i$ )が存在するが、成熟心筋ではこの電流が消失することが挙げられる。

### Ca<sup>2+</sup>チャンネル電流

心筋細胞に発現しているのは、L型高閾値  $Ca^{2+}$ チャンネルと、T型低閾値  $Ca^{2+}$ チャンネルの2タイプである。L型  $Ca^{2+}$ チャンネルは、ジヒドロピリジン(DHP)により特異的に阻害されることから、DHP感受性型ともいわれ、心拍数の調節や心収縮に主要な役割を果たしている。一方、T型  $Ca^{2+}$ チャンネルは洞房結節の自動能に関与すると考えられている。

### L型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル

L型  $Ca^{2+}$ 電流(以下  $Ca^{2+}$ 電流)は、心筋の収縮力を決定する上で非常に重要であるが、ラット心筋で

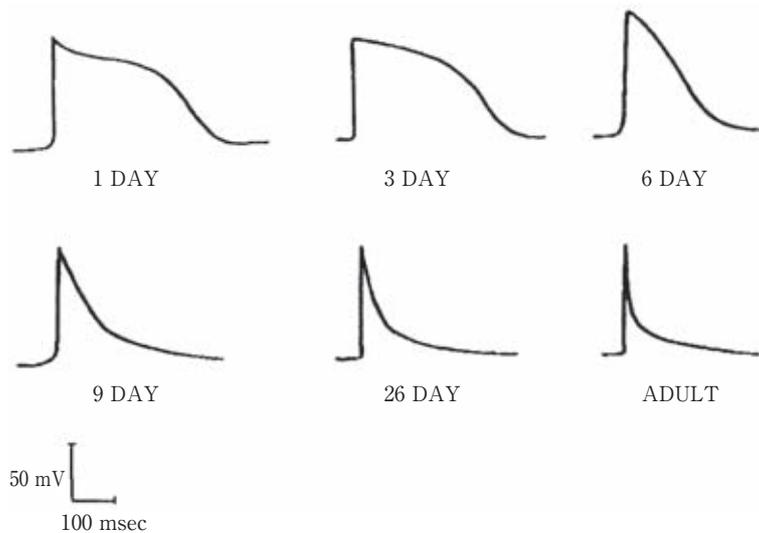


Fig. 2 Postnatal changes in the action potential configuration of the rat ventricle from the first postnatal day to adulthood. Note that the progressive shortening of the action potential is attributable to abbreviation of the plateau (Taken from ref. 16).

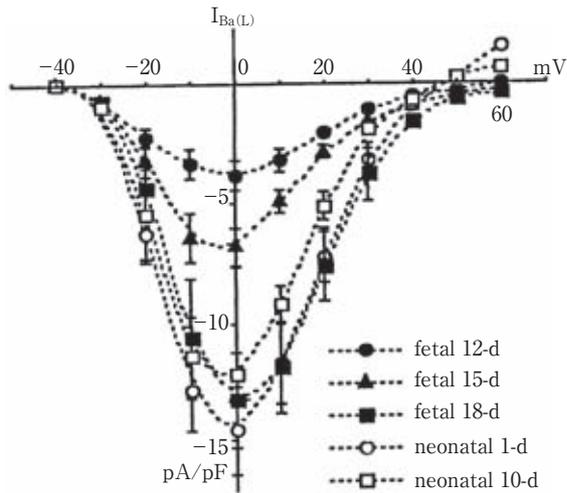


Fig. 3 Developmental changes of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in fetal and neonatal rats. The L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents were elicited by depolarizing steps, from a holding potential of  $-40$  mV. Current/voltage relationships (normalized as current density [mean  $\pm$  SEM]) and shown for the different developmental stages (from day 12 fetal to day 10 neonate). Note that the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current increased during development (Modified from ref. 2).

は、胎仔より新生仔にかけて急速に増加し (Fig. 3)<sup>2</sup>, 新生仔から成獣にかけて著しい増加は見られない (Fig. 4)<sup>5</sup>. ラット心房筋と心室筋における細胞膜容量, ピーク電流値, 電流密度の発達に伴う変化を Table 1 に示す.

発達による違いには, 上述のような電流密度の差の他に, チャネル特性の違いがあり, 未熟心筋ほど  $\text{Ca}^{2+}$  電流の不活性化が, 成熟心筋と比較して遅い. この特性の説明として, 未熟心筋で観察される single-channel 記録上の long-openings が関与しており, 未熟心筋ほど single-channel 上の平均開口時間, 開口確率が大きく, このことにより未熟心筋ほど不活性化が遅いというのである<sup>4</sup>. 別の説明として, リアノジン (筋小胞体のブロッカー) を用いた実験により, 未熟心筋のゆっくりとした不活性化は, 筋小胞体の未熟性によることが示唆されている<sup>17</sup>.

#### 自律神経による $\text{Ca}^{2+}$ 電流の調節

神経末端から分泌される神経伝達物質は, 交感神経節からノルエピネフリンが, 副交感神経節からアセチルコリンが分泌され, それぞれの受容体を調節するが,  $\text{Ca}^{2+}$  電流はこれら交感神経ならびに副交感神経に

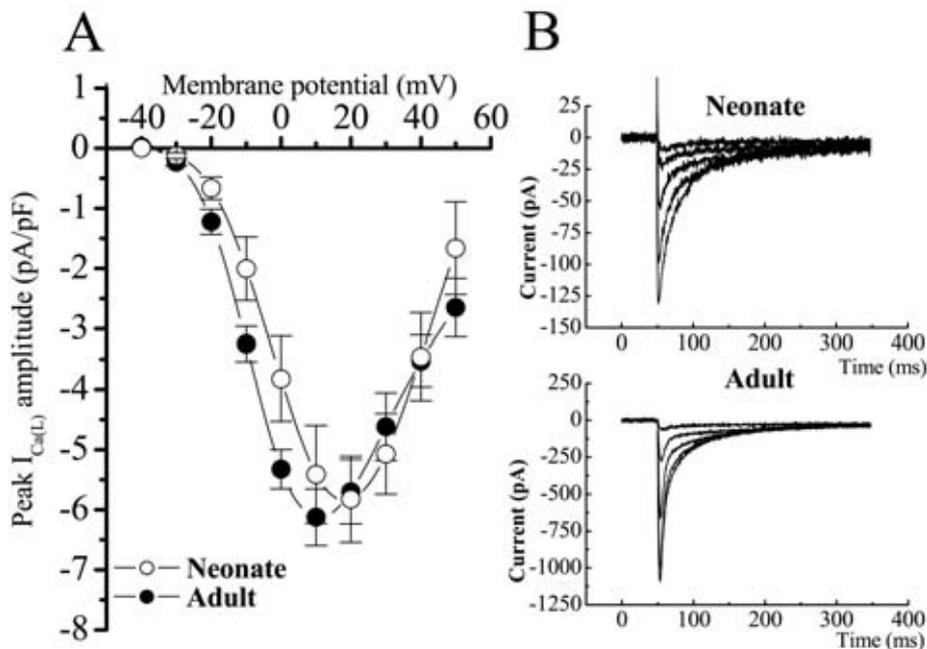


Fig. 4 Current/voltage relationships and representative current traces in neonatal and adult rat ventricular myocytes. A: The L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is already well developed during the neonatal period (days 1–7; about 85% of the adult value). B: Representative L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current traces of neonatal and adult rats are shown. Note that the inactivation of the current is slower in neonatal myocytes than in adult myocytes (Taken from ref. 5).

Table 1 Cell capacitance, peak current, and current density of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in neonatal and adult rat atrial and ventricular cells

		cell capacitance (pF)	peak current (pA)	current density (pA/pF)
neonate	atrium	24 ± 0.8	92 ± 7	3.9 ± 0.3
	ventricle	27 ± 1.3	200 ± 13	7.6 ± 0.4
adult	atrium	46 ± 3	300 ± 35	6.4 ± 0.6
	ventricle	155 ± 10	1239 ± 115	8.1 ± 0.6

Mean ± SEM  
(Taken from ref. 21)

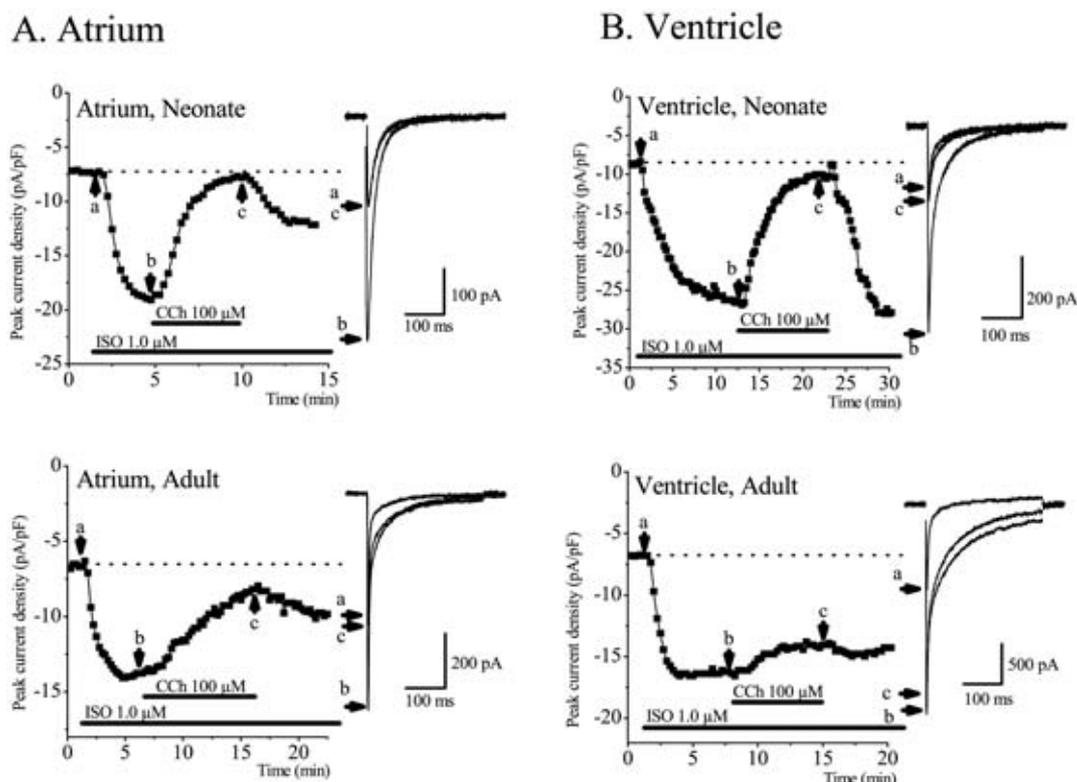


Fig. 5 The effects of carbachol on the isoproterenol-stimulated L-type Ca<sup>2+</sup> current in neonatal and adult rat atrial and ventricular myocytes. A: In atrial myocytes, carbachol inhibited the isoproterenol-stimulated L-type Ca<sup>2+</sup> currents in neonatal and adult myocytes. B: In contrast, in ventricular myocytes, carbachol inhibited the isoproterenol-stimulated L-type Ca<sup>2+</sup> current by 93% in neonatal cells but by only 25% in the adult cells (Modified from ref. 21).

より調節されている。

### β 受容体作動薬による調節

細胞膜上のβ受容体の数(密度)は、胎生期より増加し新生仔期あるいは若年期にピークとなり、その後徐々に減少すると報告されている<sup>18</sup>。β受容体作動薬によるCa<sup>2+</sup>電流の増加は、受容体の数のみで規定されるのではなく、細胞内の種々の調節因子により決定されている。作動薬がβ受容体に結合すると、促進性 guanosine triphosphate (GTP) 結合蛋白 (Gs) を

介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、adenosine triphosphate (ATP) から cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を合成する。さらに cAMP-dependent protein kinase (PKA) を活性化し、チャネルに結合している調節蛋白をリン酸化することによりCa<sup>2+</sup>チャネルを開く (slow pathway)。別に、Gs蛋白は直接Ca<sup>2+</sup>チャネルを開くとも報告されている (fast pathway) (Fig. 5)<sup>19</sup>。

われわれの研究<sup>20</sup>では、β受容体作動薬であるイソプロテレノールによるCa<sup>2+</sup>電流の増加率は、新生仔の方が成獣より大きかった。アデニル酸シクラーゼを

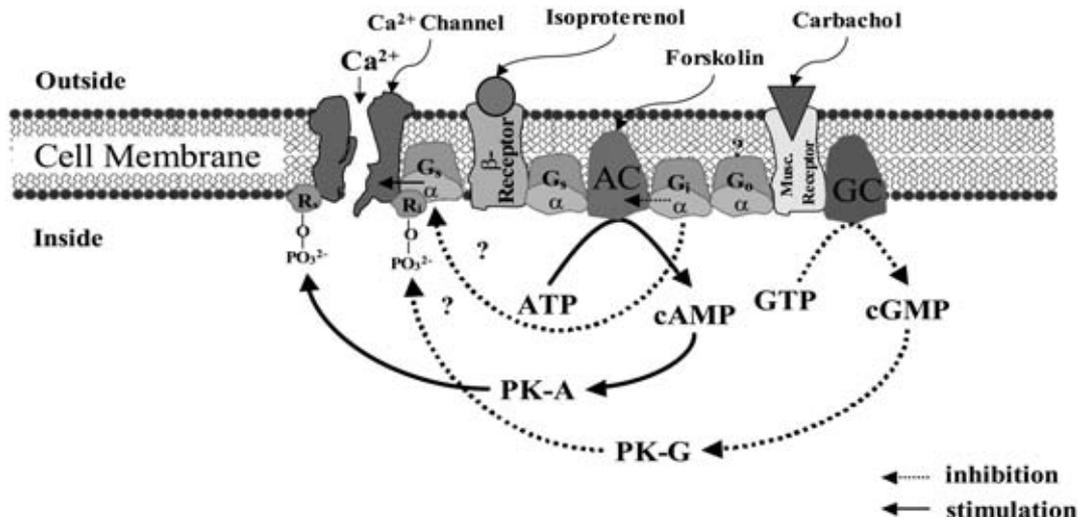


Fig. 6 The schematic model of the mechanisms of adrenergic and cholinergic regulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Binding of an antagonist (isoproterenol) to a  $\beta$ -adrenoceptor activates a guanine nucleotide binding protein (Gs protein). This protein stimulates adenylate cyclase (AC) and increases the level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). This process is followed by the phosphorylation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel via cAMP-dependent protein kinase (PK-A), leading to an increase in channel open probability, mean open time, and channel availability. According to our experiments, in neonatal ventricular myocytes, Gs protein stimulated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels directly. Muscarinic acetylcholine activation antagonizes the  $\beta$ -adrenergic stimulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel through inhibition of AC, which is mediated via the Gi protein.

直接刺激する薬であるフォルスコリンを用いた実験では、新生仔と成獣間には明らかな差はなかったことから、新生仔では、Gs 蛋白によるチャンネルを直接刺激する経路 (fast pathway) が存在し、その経路は新生仔の方が大きいことが考えられた (Fig. 5)。

#### ムスカリン受容体作動薬による調節

アセチルコリンの最も大きな効果は心房筋、洞房結節、房室結節におけるアセチルコリン感受性  $\text{K}^+$  チャンネル ( $\text{K}_{\text{Ach}}$ ) の開口である。このチャンネルの開口により著明な活動電位の短縮ならびに心臓の徐脈を生じる。  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルへの直接作用ではなく、その作用は交感神経  $\beta$  刺激に対して拮抗的に作用することによる。これはアデニル酸シクラーゼに対する G 蛋白の二重制御によるものである。二重制御とは、アデニル酸シクラーゼが促進性 G 蛋白 (Gs) と抑制性 G 蛋白 (Gi) によって、プラスとマイナスの調節を受けていることをいう。すなわち、心筋細胞では、 $\beta$  受容体が Gs 蛋白と共役し、ムスカリン受容体が Gi 蛋白と共役しており、 $\beta$  刺激により上昇した細胞内 cAMP を、アセチルコリンが  $\beta$  刺激以前のレベルまで戻すことになる。このように、アセチルコリンは  $\beta$  受容体の効果に拮抗する。このアデニル酸シクラーゼ調節系

は、すべての部分の心筋細胞に存在するが、特に心室筋細胞でのアセチルコリン作用に重要である。

Fig. 6 はわれわれの実験結果を示したものである<sup>21</sup>。安定性アセチルコリンであるカルバコールは、イソプロテレノールで増加した  $\text{Ca}^{2+}$  電流を心房筋では、新生仔、成獣ともほぼ 100% 抑制した。一方、心室筋において、新生仔では、心房筋同様にほぼ 100% 抑制したのに、成獣では、極めてその抑制効果が悪かった。成獣心室筋細胞内に Gi 蛋白を入れると、カルバコールにより、成獣心室筋の  $\text{Ca}^{2+}$  電流も新生仔心室筋細胞同様著しく抑制された。このことより、心室筋において新生仔は、成獣と違い副交感神経により交換神経がより強く抑制されることが分かった。機序としては、成獣では Gi 蛋白の減少により、副交感神経による抑制が弱い可能性が示唆された。

#### タイロキナーゼによる調節

タイロキナーゼは、細胞の成長 (周期) の調節に関係していることが報告されている<sup>22</sup>。冠動脈形成術後の再狭窄は、血管平滑筋細胞の増殖ならびに肥大によりおこるが、これらは各種成長因子により調節されており、これら成長因子とタイロキナーゼの関係もすでに報告されている。タイロキナーゼの

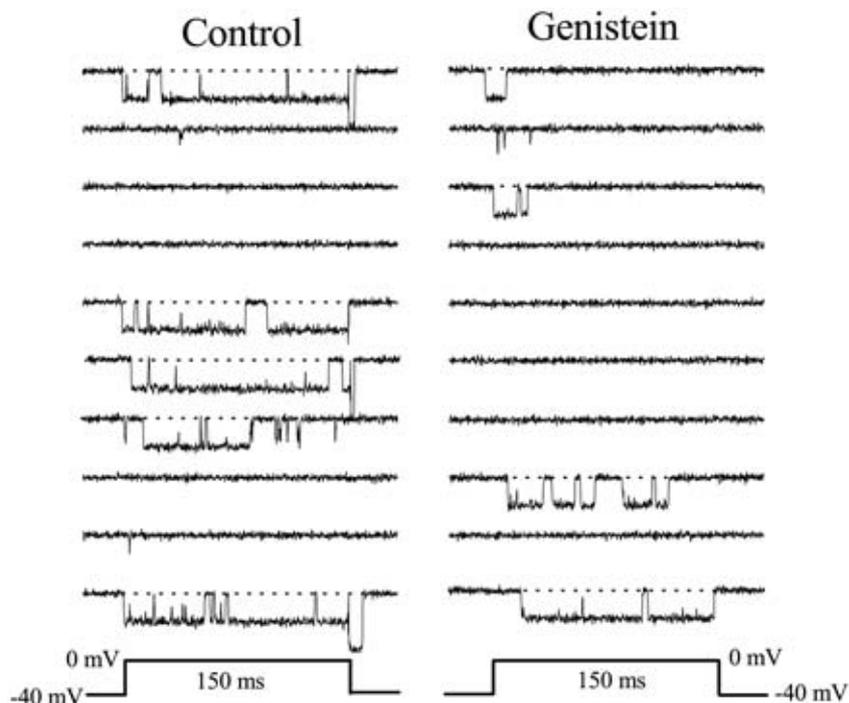


Fig. 7 The effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on single-channel recordings of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel. Genistein inhibited channel opening (Taken from ref. 21).

Table 2 Summary of the effects of genistein on the properties of single Ca<sup>2+</sup> channels in neonatal rat ventricular myocytes

	Slope Conductance (pS)	P <sub>o</sub> (%)	m <sub>o</sub> (ms)	m <sub>c</sub> (ms)
Control	24 ± 0.75	24 ± 3.8	10 ± 2.3	5.2 ± 0.71
Genistein	24 ± 0.27	7.9 ± 0.025*	13 ± 0.44	5.9 ± 0.32

Mean ± S.E.M.

P<sub>o</sub>: open probability; m<sub>o</sub>: mean open time; m<sub>c</sub>: mean closed time

\*: P < 0.05 compared with control

(Taken from ref. 24)

イオンチャネルの調節は、平滑筋のみならず心室筋においても各種イオンチャネルを調節しているとの報告がある<sup>23</sup>。そこで成長途上にある未熟心筋は、タイロキナーゼにより著しく調節されているのではないかと、この仮説のもとCa<sup>2+</sup>電流のタイロキナーゼによる調節について実験をおこなった。

タイロキナーゼ抑制剤であるジェニスタインによりCa<sup>2+</sup>電流は抑制され、その抑制率は新生仔が成獣に比較し大きく、未熟心筋ほどタイロキナーゼにより強く調節を受けていた (Fig. 7)。タイロキナーゼのCa<sup>2+</sup>チャネルへの作用機序としては、Single-channel 記録による解析により、チャネルの平均開口・閉鎖時間、コンダクタンスには影響せず、チャネルの開口確率の増加することが分かった (Table 2)<sup>24</sup>。

### T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル電流

鶏の胎生早期から後期にかけて、T 型 Ca<sup>2+</sup>電流は発達に伴って大きく減少する<sup>6</sup>。また、ラット心室筋でも新生仔には、T 型 Ca<sup>2+</sup>電流は観察されるが、成獣では観察されない。心室筋における T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの機能的役割に関しては、未熟心筋においてもまだ不明な点が多いが、ペースメーカー電位への貢献が考えられている。すなわち、未熟な心室筋が自動能を発揮するには、この T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの役割によるところが大きいと考えられる。

### まとめ

本稿では、電気生理学的側面より、主に心室筋 Ca<sup>2+</sup>

電流の胎児から新生仔, 成獣へと発達に伴う変化について述べたが, これら電流の違いには, 当然チャネルを構成するサブユニットの違いのみならず, 細胞内器官, 代謝系の違い等各種の要素が関連している。

われわれの研究からも明らかなように, われわれが日々診療する新生児, 乳児, 小児は成人と比較し, その大きさが小さいというのではなく, 各臓器の性質・特性が大きく成人と異なる点をもう一度記憶に留めておく必要があると考える。臨床に携わるものとして, これら基礎医学で得られた知識を臨床に還元できるように今後も努力したい。

### 文 献

1. Sperelakis N, Katsube Y, Sada H, Masuda H: Developing changes in ionic currents of the heart. In *The Developing Heart* (Ostadal, Nagano, Takeda, Dhalla, eds), Chapter 13, 1997; pp 14-171, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
2. Masuda H, Sumii K, Sperelakis N: Long openings of calcium channels in fetal rat ventricular cardiomyocytes. *Pflügers Arch* 1995; 429: 595-597.
3. Huynh TV, Chen F, Wetzel GT, Friedman WF, Klitzner TS: Developmental changes in membrane  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  currents in fetal, neonatal, and adult rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1992; 70: 508-515.
4. Tohse N, Mészáros J, Sperelakis N: Developmental changes in long-opening behavior of L-type  $Ca^{2+}$  channels in embryonic chick heart cells. *Circ Res* 1992; 71: 376-384.
5. Katsube Y, Yokoshiki H, Nguyen L, Yamamoto M, Sperelakis N: L-type  $Ca^{2+}$  currents in ventricular myocytes from neonatal and adult rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 873-881.
6. Creazzo TL, Burch J: Calcium current development in the embryonic chick heart. *Biphas J* 1994; 66: A423 (abst).
7. Wetzel GT, Chen F, Klitzner TS:  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchange and cell contraction in isolated neonatal and adult rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1995; 268: H1723-H1733.
8. Hanson GL, Schilling WP, Michael LH: Sodium-potassium pump and sodium-calcium exchange in adult and neonatal canine cardiac sarcolemma. *Am J Physiol* 1993; 264: H320-H326.
9. Wahler GM, Dollinger SJ, Smith JM, Flemal KL: Time course of postnatal changes in rat heart action potential and in transient outward current is different. *Am J Physiol* 1994; 267: H1157-H1166.
10. Masuda H, Sperelakis N: Inwardly-rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1993; 265: H1107-H1111.
11. Xie LH, Takano M, Noma A: Developmental of inwardly rectifying  $K^{+}$  channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997; 272: H1741-H1750.
12. Hajikano M, Katsube Y, Watanabe M, Ikegami E, Uchikoba Y, Kamisago M, Fukazawa R, Ogawa S: Diazoxide increases ATP-sensitive  $K^{+}$  current of neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: A31 (abst).
13. Conforti L, Tohse N, Sperelakis N: Tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat fetal ventricular myocytes: contribution to the plateau phase of action potential. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 159-173.
14. Crumb WJ, Pigott JD, Clarkson CW: Comparison of Ito in young and adult human atrial myocytes: evidence for developmental changes. *Am J Physiol* 1995; 268: H1335-H1342.
15. Qu Y, Boutjdir M: Gene expression of SERCA 2a and L- and T-type Ca channels during human heart development. *Pediatr Res* 2001; 50: 569-574.
16. Langer GA, Brady AJ, Tan ST, Serena SD: Correlation of the glycoside response, the force staircase and the action potential configuration in the neonatal rat heart. *Circ Res* 1975; 36: 744-752.
17. Nakanishi T, Seguchi M, Takao A: Development of the myocardial contractile system. *Experientia* 1988; 44: 936-944.
18. Kojima M, Ishima T, Taniguchi N, Kimura K, Sada H, Sperelakis N: Developmental changes in  $\beta$ -adrenoceptors, muscarinic cholinergic receptors and  $Ca^{2+}$  channels in rat ventricular muscles. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 334-339.
19. Yatani A, Codina J, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM: A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science* 1987; 238: 1288-1292.
20. Katsube Y, Yokoshiki H, Nguyen L, Sperelakis N: Differences in isoproterenol stimulation of  $Ca^{2+}$  current of rat ventricular myocytes in neonatal compared to adult. *Eur J Pharmacol* 1996; 317: 391-400.
21. Katsube Y, Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Yamamoto M, Sperelakis N: Carbachol inhibition of  $Ca^{2+}$  currents in ventricular cells obtained from neonatal and adult rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 358: 269-275.
22. Maher PA: Tissue-dependent regulation of protein tyrosine kinase activity during embryonic development. *J Cell Biol* 1991; 112: 955-963.
23. Yokoshiki H, Sumii K, Sperelakis N: Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog, daidzein. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 807-814.
24. Katsube Y, Yokoshiki H, Nguyen L, Yamamoto M, Sperelakis N: Inhibition of  $Ca^{2+}$  current in neonatal and adult rat ventricular myocytes by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. *Eur J Pharmacol* 1998; 345: 309-314.

(受付: 2005年10月4日)

(受理: 2005年11月29日)