

【総説】

心拍数と心筋収縮における老化性機能低下と「coupled-clock system」

筒井 健太¹、Oliver Monfredi^{1,2}、Edward G Lakatta¹

¹Laboratory of Cardiovascular Science, Biomedical Research Center, Intramural Research Program, National Institute on Aging, NIH, Baltimore, Maryland, USA. ² Institute of Cardiovascular Sciences, University of Manchester, United Kingdom

要約

心拍数は、洞房結節内部に群生する洞房結節細胞（心臓ペースメーカー細胞）から自発的に繰り返し生ずる活動電位に由来する。洞房結節細胞は、細胞膜イオンチャネル群と細胞内Ca²⁺サイクリングの協調的システム（coupled-clock system）により活動電位を生じ、「堅牢かつ柔軟」な心拍制御の基盤をなす。洞房結節細胞の活動電位発火頻度は coupled-clock system に属するタンパク質群のリン酸化の程度が反映される。自律神経系からの入力、細胞内cAMPの濃度およびcAMP-PKA依存性リン酸化の亢進・低下を介して活動電位発火頻度を修飾する。この脳・心臓間の関係性の変化は、心機能の加齢性変化を考える上で重要である。心筋細胞は到来した電氣的信号を、洞房結節のそれと類似した coupled-clock を介して収縮へと変換する（電気収縮連関）。本総説では、加齢に伴う心拍数と心筋収縮の変化に関する研究のうち、coupled-clock system に起こる変化を解説する。

キーワード：Aging, sinoatrial node, pacemaker cell, phosphorylation, coupled-clock system

人工ペースメーカー植え込み術は徐脈性不整脈の標準的治療である。毎年700,000人以上の患者がこの治療を受ける^[1]。適応患者の8割以上は60歳以上で、加齢が徐脈性不整脈発症に果たす役割はきわめて大きい。洞不全症候群は心臓の天然ペースメーカーである洞房結節の機能不全で、人工ペースメーカー治療の原因疾患として最多（約半数）を占める^[1]。米国では社会のさらなる高齢化によって洞不全症候群の新規発症数は今後50年で倍以上に増加すると予測され^[2]、そのコストはアメリカ合衆国単独で毎年240億ドル以上（2010年）^[3]に及び、周術期リスク・QOL低下・慢性期合併症（デバイス感染など）・電池消耗に伴う再手術の必要性といった課題が社会に与える負担の増大が懸念される。

一方、慢性心不全は「すべての心疾患の終末的な病態」

とされ、心臓ポンプ機能の慢性的な低下から、労作時呼吸困難・運動耐容能低下・尿量減少・易疲労性・体液貯留・肝腫大などの症状を呈し、急性増悪と寛解を繰り返す予後不良な進行性疾患である。QOLは著しく低下し、致命的不整脈を頻繁に合併し、突然死の頻度も高い^[4]。米国では40歳以上の生涯発症リスクは20%に達する^[5]。

いずれの疾患も、よりよい治療が求められているにもかかわらず、詳細な病態が未解明なことが障壁となっている。両疾患ともに加齢がその発症に重要な役割を演じる。これらを踏まえ、本総説では、心拍数と心筋収縮機能が細胞レベルでどのように規定されているか、加齢がその機能に与える影響に関する研究を紹介する。

健常人の内因性心拍数は加齢とともに減少する

心拍数を規定する主要な因子は、脳幹を起点として心臓へ到達する自律神経系由来の信号である。副交感神経からの信号は心拍数を遅くし、反対に交感神経からの信号は心拍数を速くする。交感神経刺激にはこの直接作用に加えて、血液を循環する副腎髄質由来ホルモンであるカテコラミン（例：アドレナリン）を介する経路もある。自律神経系からの影響を取り去ったあとに残る心拍数を「内因性心拍数（intrinsic heart rate, IHR）」と呼

連絡先：筒井健太 〒21224

251 Bayview Boulevard Suite 100, Room 08B133,
Baltimore, MD 21224

TEL：410-558-8480

FAX：410-558-8150

E-mail：kenta.tsutsui@nih.gov

ぶ。アトロピンとプロプラノロールの同時投与により計測され、心臓固有の心拍数、ひいては洞房結節組織の機能を反映する^[6,7]。健常者の安静時心拍数は生涯を通じて安定して推移する(図1B・実線)^[8-11]が、その一方でIHRは加齢とともにおよそ1拍/1年の割合で直線的に減少する(図1A)^[6,7]。

安静心拍数とは異なり最大心拍数は加齢とともに減少する

健常者が身体活動レベルを安静臥位から座位・立位・軽度・中等度・最大負荷運動へと段階的に増加させると、心拍数は負荷の程度に応じて上昇する。若年者と比較して高齢者ではその増分が少ない(図1B・点線)^[12]。この「運動負荷に対する心拍数応答の加齢に伴う減少」は加齢による洞房結節機能低下と考えられ、改善する方法は未だに見つかっていない。たとえば運動トレーニングは最大酸素摂取量増加や様々なモデリング効果(例:動脈コンプライアンスの増加・一回拍出量および左室駆出率の向上)^[12-16]によって運動パフォーマンスを向上させるものの、この加齢に伴う最大心拍数の低下傾向を変えられない^[11,17]。

脳と心臓間の連携は加齢とともに衰える

高齢者の運動時心拍数が若年者のようには上がらない原因は何だろうか? 健常者では、運動に伴って血中カテコラミン濃度が上昇する。高齢者では運動負荷時の血中カテコラミン濃度は加齢によって増加する(図1C)。さらに、我々の老化コホート研究である Baltimore

Longitudinal Study of Aging (BLSA) および他の研究で^[11,18]、健常人の合成カテコラミン・イソプロテレノールに対する心拍数の応答性は加齢とともに減少することが明らかになった(図1D)。これらの所見から、高齢者の運動時最大心拍数の低下の原因はカテコラミン合成能力の低下ではなく、カテコラミンに対する心臓の応答性の低下と考えられる。また、IHRと運動時最大心拍数はいずれも加齢とともに低下する(図1E)^[19]。したがって、加齢による運動時心拍数上昇能力が低下する根本的理由は、自律神経系ではなく洞房結節の機能異常(神経伝達物質への感受性低下およびIHRの低下)にあると考えられる。

心臓ペースメーカー細胞は coupled-clock system によって時を刻んでいる

洞房結節細胞は浅い膜電位(最も深くて約-60 mV)を持ち、ひとりてに緩徐に脱分極して活動電位閾値に到達し、活動電位を繰り返し放出する。これを「拡張期緩徐脱分極(Diastolic depolarization, DD)」と呼び、洞房結節細胞自動能の本質とされる(図2A)。心房筋や心室筋細胞が深くて安定した静止膜電位を持ち(約-90mV)、洞房結節・刺激伝導系由来の活動電位を待ち受けているのに対照的である(図2A)。この役割分担の背景には電気生理学的特性の違いがある。たとえば、心房筋・心室筋の深くて安定した静止膜電位を有するのは、豊富なIK₁チャンネル(電位非依存性に開口しカリウムイオンを持続的に細胞内から外へ流出させる)によって膜電位をカリウムの平衡電位である約-90mV近くに

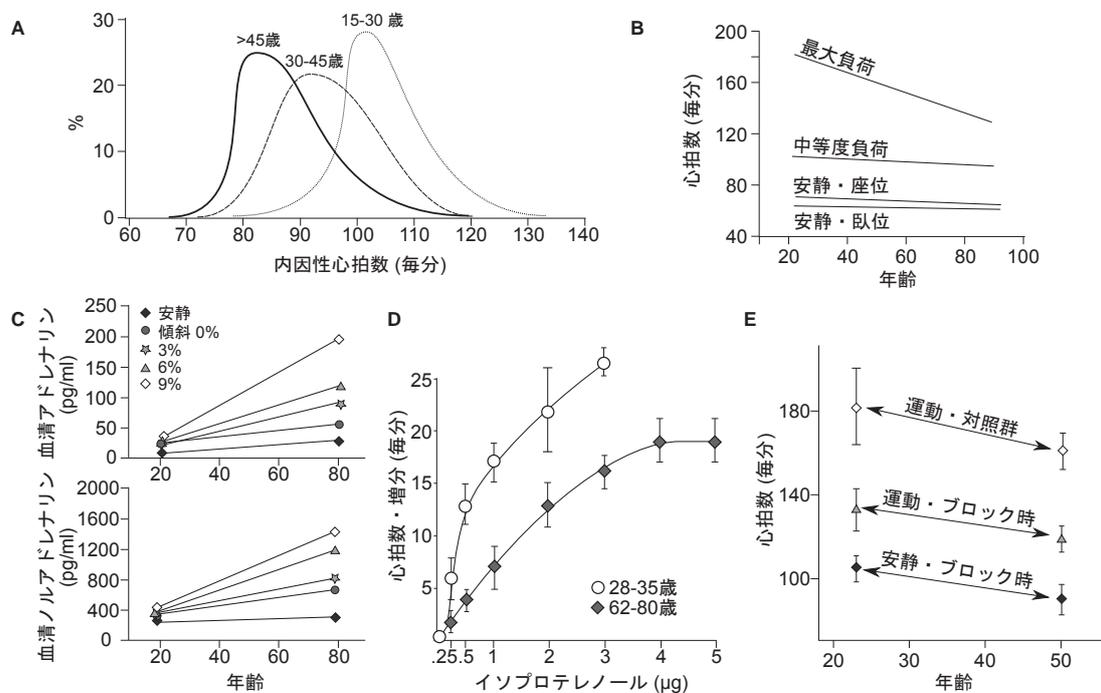


図1 健常人の心拍数における加齢性変化。(A) 内因性心拍数 (IHR) は低下^[6]する。(B) 安静時心拍数は生涯を通じて大きく変化しない(実線)^[11]一方で、運動負荷時の心拍数は著明に減少する(破線・点線)^[11]。運動負荷時の心拍数は著明に減少する(破線・点線)^[11]。(C) 運動負荷に反応して分泌される血清カテコラミンの量は加齢により増加する^[10]。(D) 合成カテコラミンであるイソプロテレノール静注に対する心拍数の上昇反応は加齢とともに低下する^[11]。(E) 運動負荷時の最大心拍数と安静時IHRは両方とも加齢によって減少する^[60]。画像は[6, 10, 11, 60]より一部改変して引用。エラーバーは標準偏差。

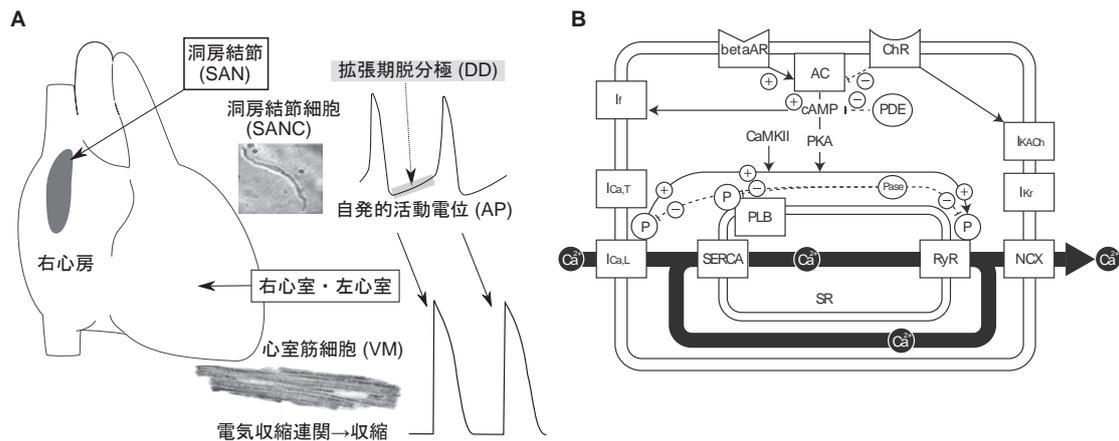


図2 (A) 洞房結節 (sinoatrial node, SAN) は右心房に存在し、内部には数多くの洞房結節細胞 (SAN cell, SANC) が群生している。洞房結節細胞は形態的にも電気生理学的にも心室筋細胞 (ventricular myocyte, VM) とは異なる。(B) 洞房結節細胞の「coupled-clock system」は、細胞膜表面に分布して起電性を有するイオンチャネル群からなる「Mクロック」と、筋小胞体を中心に細胞内 Ca^{2+} サイクルリングを起こす「 Ca^{2+} クロック」が相互依存的に接続した1つの大きなシステムである。洞房結節細胞の自発的活動電位の発生周期は、細胞質内 cAMP 濃度と、両クロックに属するタンパク質群のリン酸化の程度に左右される。同時に、脱リン酸化酵素機構は cAMP 及びリン酸化が過剰にならないよう歯止めをかけている。自律神経系からのシグナルは、いずれも cAMP-PKA 系を介して心拍数に影響を与える。beta AR: β アドレナリン受容体, ChR: コリン受容体, AC: アデニル酸シクラーゼ, PDE: ホスホジエステラーゼ, PKA: タンパク質リン酸化酵素 A, CaMKII: Ca^{2+} /カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II, Pase: タンパク質脱リン酸化酵素, RyR: リアノジン受容体, SERCA: 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase, PLB: ホスホランパン, ICa,L: L 型 Ca^{2+} チャネル, ICa,T: T 型 Ca^{2+} チャネル, If: 過分極活性化用イオンチャネル, IK,ACh: アセチルコリン感受性 K チャネル, IK,r: 休息活性化遅延整流性 K チャネル, NCX: Na^+ - Ca^{2+} -交換輸送体

するためだが、洞房結節細胞にはこれがない^[20]。

洞房結節細胞の自動能において、複数のイオンチャネル群による連携はきわめて重要である^[21-25]。イオンチャネル群の総合的活動を一括して「Mクロック (Membrane clock)」と呼称する^[26]。「洞房結節細胞の自動能は Mクロックによって駆動される」という考え (Mクロック説) は広く受け入れられた。その中心的な根拠が、1980 年前後に発見された I_f 電流 (funny current) である^[27]。 I_f は洞房結節細胞の一般的な内向き電流を流すチャネルと異なり、過分極によって活性化する^[28]ことから、奇怪 (funny・peculiar) な電流と命名された。 I_f 電流は HCN チャネルにより担われ、神経細胞では I_h 電流とも呼ばれる。 I_f 電流は、洞房結節細胞がこれを取り囲む心室筋細胞の持つ深い静止膜電位によって過分極させられ自動能抑制に陥るのを防いでいるとされ^[29]、さらに DD を担う「the pacemaker current」である、と考えられた^[24]。しかし、(1) I_f チャネル選択的阻害薬 (例: ivabradine) を洞房結節に用いても活動電位発火頻度が低下するだけで完全に発火停止はしない (2) I_f はチャネル開口動態が遅い (3) 洞房結節の生理的な拡張期膜電位 (-60 ~ -40mV 前後) の、特に後半では reversal potential に近い、さらに (4) L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルの一種である Cav1.3 (活動電位立ち上がりで中心的な役割を果たす Cav1.2 に比べて興奮閾値が低く、緩徐脱分極中に Cav1.2 に先行して開口する) も DD に貢献する^[30]ことがわかり、DD を担う「the pacemaker current」は単一チャネルではなく、複数のメカニズムが関わり生成されると考えられるようになった^[28]。

一方、心室筋では拡張期に筋小胞体から自発的 Ca^{2+} 放出が起きていることが明らかになり、さらにその変動が収縮機能の低下や心室性不整脈と関連することが示された^[31, 32]。通常では静止状態で活動電位到来を待ち受けるのが本分である心室筋で、細胞内自発的 Ca^{2+} 放出の増加が異常自動能をまねくという知見^[33]に着想を受け、洞房結節においても細胞内自発的 Ca^{2+} 放出は生理的自動能・DD の原動力になる、とする「 Ca^{2+} クロック説」が生まれた。我々は、洞房結節細胞内でも局所的・散発的・自発的な Ca^{2+} 放出 (Spontaneous Local Ca^{2+} releases, LCR) が生じていること、LCR はたとえ実験的に M クロックの機能を除去してもおおまかな周期性を保ちながら自発的に出現を繰り返すことを示した^[34]。LCR は洞房結節内部の筋小胞体からリアノジン受容体 (RyR) を経由して細胞質へ放たれ、その後一部は筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ (SERCA) により筋小胞体へ再び回帰し、一部は Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 (NCX) によって細胞外へ直ちに放出される。この際 NCX は1つの Ca^{2+} イオンの排出と引き換えに3つの Na^+ イオンを細胞内へ送り込むため実質的な内向き電流を生じ、細胞膜を脱分極させる (内向き NCX 電流・ I_{NCX})^[35]。 I_{NCX} は電位依存性があり、主に拡張期 (分極時) に活性化して DD に貢献すると考えられる。

「洞房結節自動能を担うのは M-クロックか Ca^{2+} クロックか」という論争^[36]を経て、現代ではこの2つのメカニズムは単体ではなく、協調的な一つの大きなシステムとして働いていると考えられる (coupled-clock system 説・図 2B)^[37]。 Ca^{2+} クロック・LCRs 由来の I_{NCX} 電流は局所的に膜電位を脱分極させて M クロック

に属する電位依存性 Ca^{2+} チャネルの閾値 (-35 ~ -40 mV) に達してこれを開口させ、細胞外から Ca^{2+} を流入させる。この新たに流入した Ca^{2+} は未開口状態の近隣 RyR を開口させ (心室筋でいうところの「 Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} release, CICR」に相当する)、やがて細胞外および筋小胞体から細胞質全体に Ca^{2+} が流入する (Ca^{2+} transient)。活動電位はピークに達し、筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵は底をつき、 Ca^{2+} クロックはリセットされる。電位依存性 K チャネルによって活動電位は再分極し、M クロックは次の活動電位へ向かって DD を再開する。SERCA は空になった筋小胞体へ Ca^{2+} を取り込む。 Ca^{2+} が補充されると、筋小胞体は再び次のサイクルに向けて LCR を放出し始める。このように、M クロックと Ca^{2+} クロックは互いの影響を受けずにいられない 1 つの大きなシステムで、どちらのクロックも正常自動能に重要である^[26, 37]。

Coupled-clock system の制御機構

洞房結節細胞ではアデニル酸シクラーゼ (AC、とくに AC1 と AC8) は常時高活性を保ち、coupled-clock system で中心的な役割を果たしている (図 2B)^[38, 39]。AC は洞房結節細胞内部にて cAMP を常時産生し、タンパク質リン酸化酵素 A (PKA) を活性化して、自動能を担うタンパク質群のリン酸化の程度を常時高いレベルに保っている。また、 Ca^{2+} 活性型リン酸化酵素である CaMKII も同様にリン酸化を通じて心拍数調節に関わる^[40]。実際に、洞房結節の RyR のリン酸化比率 (リン酸化 RyR/全 RyR) は心室筋よりも高い^[41]。さらに、cAMP にはリン酸化の他にも HCN チャネルに直接結合して I_h 電流を増加させる直接作用もある^[42]。

ところで、洞房結節細胞では Ca^{2+} を介してタンパク質のリン酸化比率がさらに向上し、その結果さらに Ca^{2+} 流入が増加すると述べた。このままでは細胞内の Ca^{2+} 濃度は高くなる一方になる。それを防ぐ「ブレーキ」に相当するのが cAMP を加水分解する phosphodiesterase (PDE) と、タンパク質リン酸化酵素 protein phosphatase である^[38]。副交感神経刺激 (迷走神経刺激・アセチルコリン刺激等) は G タンパク共役型 AC の活性を抑制して前述したタンパク質群を相対的に脱リン酸化させることで機能を低下させ、さらにアセチルコリン感受性カリウムチャネルを活性化し膜電位を過分極させ活動電位発火頻度を減少させる (陰性変時作用)^[43]。反対に、 β アドレナリン受容体刺激は細胞内 cAMP 濃度を上昇させることでリン酸化レベルと Ca^{2+} サイクリング活性を向上させ陽性変時作用をもたらす^[41]。

実験動物の老化性心拍数変化は健常人フェノタイプを再現するか

先述したとおり、健常人では加齢とともに IHR が低下し、運動時最大心拍数の低下をまねく。実験動物はこの健常人での観察を再現するだろうか？

実験用マウスの標準的な寿命は約 27 ヶ月^[44]、50% 生存期間は約 24 ヶ月^[45] であるため、我々は生後 3 ヶ月

を若年マウス・生後 24 ヶ月を老齢マウスとみなして、老化が *in vivo* 心拍数、*in vivo* IHR、*ex vivo* IHR に及ぼす影響を検討した。健常人と同じように、実験マウスの *in vivo* 心拍数は老齢になっても変化しない。それに対して *in vivo* IHR は月齢 18 ごろから低下し始め、月齢 24 でさらに低下する (図 3A)^[45]。Coupled-clock system が加齢とともにどのような変化をしているかをより詳細に理解するため、心臓から外科的に単離切除した洞房結節標本の発火頻度を生後 3 ヶ月と生後 24 ヶ月マウスの間で比較した (単離洞房結節組織は自動能を保ち、ある周期で自発的興奮を繰り返す。興奮周期は中枢神経系からの影響を受けない。本稿ではこれを *ex vivo* IHR と称する)。 *ex vivo* IHR は β アドレナリン受容体刺激薬によって上昇、コリン刺激によって下降するが、それらの作用は加齢によって自律神経系からの入力に対する反応性が洞房結節組織レベルで感受性・最大効果いづれも低下する。その作用は加齢に伴って減弱する (用量反応曲線の右方シフト (半数効果濃度 EC_{50} の増加) と最大効果の低下・図 3B)^[46]。すなわち、加齢によって自律神経系からの入力に対する反応性が洞房結節組織レベルで感受性・最大効果いづれも低下する。

加齢が洞房結節細胞 coupled-clock system の機能そのものに与える影響を検証するため、PDE 阻害薬である IBMX を用いて細胞内 cAMP 濃度を上昇させ組織標本の心拍数を上げる実験を行った。PDE は本システムの「ブレーキ」役であり、自律神経レセプターの下流・細胞内で機能するため、自律神経に対する反応ではなく細胞内 system の機能を推測するための有用な標的といえる。PDE 阻害の洞房結節組織に対する陽性変時作用は前述した自律神経伝達物質と同様に加齢により低下 (図 3B) し、coupled-clock system にも加齢性機能不全が生じていることが明らかになった^[45]。

これらの所見は前述した健常人での現象と合致する。すなわち、マウスにおいても心拍数の変化は自律神経の単純なモデリングではなく、マウスでは約 500 個の細胞からなるとされる^[47] 洞房結節の機能低下が IHR 低下につながり、自律神経系による代償によって心拍レベルが維持されている^[46] と考えられる。

Ca^{2+} クロックは加齢により機能不全を起こす

洞房結節細胞の機能を担う多くのタンパク質で老化性変化が起こる。RyR2 の mRNA とタンパク質発現増加、 $\text{Na}_v1.5 \cdot \text{Na}_v \beta 1 \cdot \text{Ca}_v1.2$ の mRNA 増加、 $\text{K}_v1.5$ と HCN1 の mRNA 減少が報告されている^[48]。HCN タンパク質発現は低下し^[49]、サブタイプ組成が変化し、HCN 直接阻害薬イバブラジンに対する感受性が低下する^[49]。一方、加齢に伴って洞房結節細胞の数は減少し^[50, 51]、残存細胞のサイズや分布はより不均一になる^[52]。さらに、細胞の萎縮^[53]・細胞周囲組織の脂肪浸潤^[52]・線維化^[54]・ギャップ結合タンパク Cx43 の減少^[55] も報告されている。

これらの多彩な変化に加えて、 Ca^{2+} クロックも加齢とともに機能不全を起こす。単離された洞房結節細胞の自

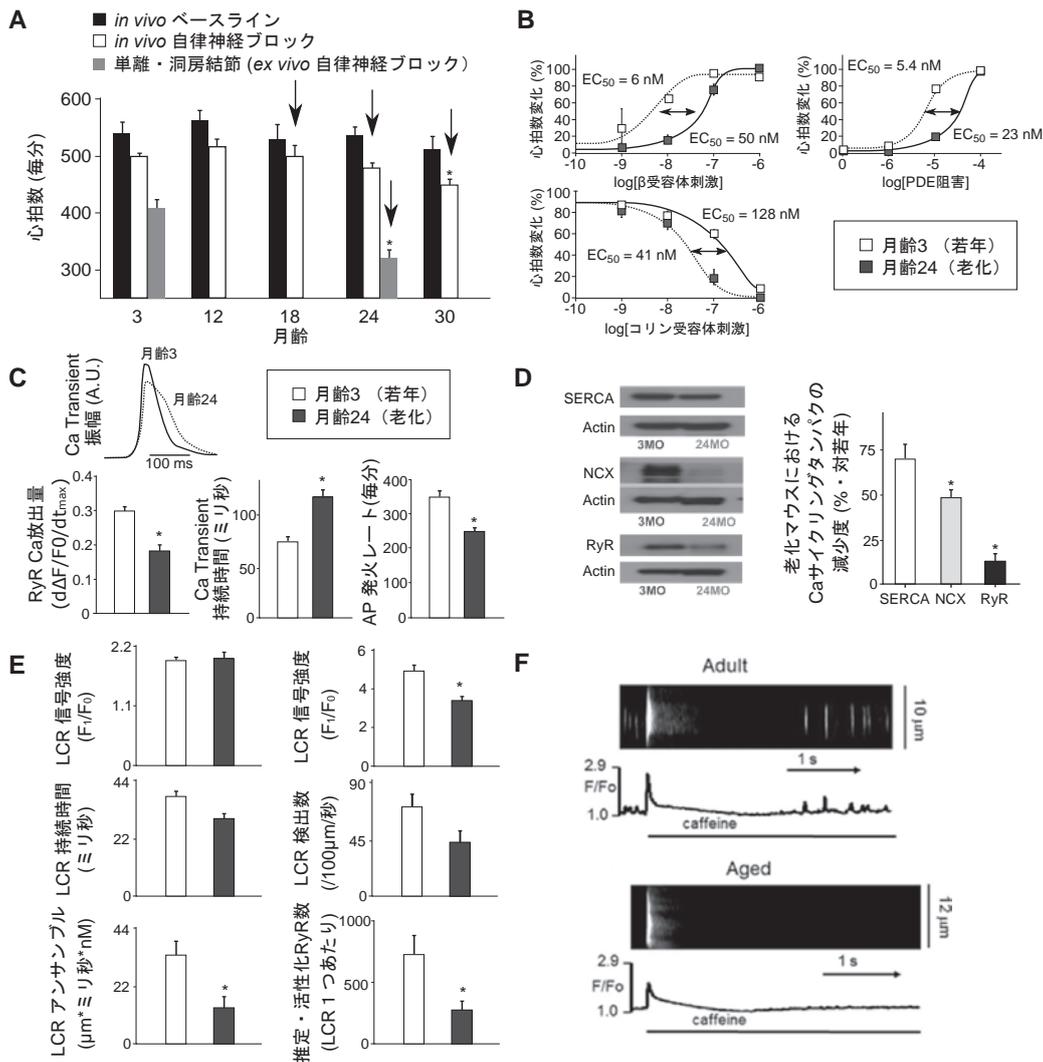


図3 マウスにおける洞房結節・洞房結節細胞の老化性変化。(A) 健康人と同じく、安静時心拍数は生涯を通じて安定している^[45]。* $p < 0.05$ 対月齢3。(B) 交感神経系(左上)・副交感神経系(左下)伝達物質に対する単離洞房結節組織の用量反応曲線は右方シフトする。伝達物質に対する受容体の感受性低下およびより下流でのcAMP-PKA経路(図2参照)における異常が示唆される^[61]。(C) 加齢は細胞内 Ca^{2+} transientの特性を変化させる。(D) SERCA, RyR, NCXのmRNAおよびタンパク発現の変化^[46]。(E) LCR特性および(F)筋小胞体 Ca^{2+} 含有量の変化^[46]。* $p < 0.05$ 対若年マウス。エラーバーはいずれも標準偏差。画像は[45, 46, 61]より一部改変して引用。

発的興奮頻度は加齢とともに低下する一方で Ca^{2+} transientの立ち上がり速度(RyRによるSRからの Ca^{2+} 放出機能の指標)は遅くなり、同・持続時間は延長する(図3C)^[46]。それを裏付けるようにSERCA・RyR2・NCXといった Ca^{2+} サイクリング関連タンパクの発現が減少する(図3D)^[46]。

Ca^{2+} クロックの機能をcoupled-clock systemから切り離して検討するためにはMクロックの機能を何らかの方法で停止させる必要がある。そのための一手法がサポニンなどの化学物質を用いて細胞膜の構造・機能を破壊させるcell permeabilizationである。この方法はMクロックを停止させるのみならず、灌流液の Ca^{2+} 濃度を変化させることで細胞内 Ca^{2+} 濃度をもコントロールできるため、 Ca^{2+} クロックの機能評価に適している。 Ca^{2+} クロックの「おおまかな周期性」自体は若年マウス由来細胞と同様に老化マウス由来細胞でも観察されるが、LCRのサイズ・数や推定活性化RyR数は加

齢に伴い減少する(図3E)。さらに、 Ca^{2+} シグナルの総量・SRの Ca^{2+} 貯蔵量は老化マウスで減少する(図3E・3F)^[46]。以上より、coupled-clock systemの一部をなす Ca^{2+} クロックは、Mクロックや他のメカニズムとともに、加齢により機能不全を生ずるといえる。

Coupled-clock systemの加齢性変化は、心筋収縮力にも老化性変化を引き起こす

心室筋は、洞房結節細胞というcoupled-clock systemを独自の形で備えていると考えられる(図4)。ひとたび電気信号が到来すると、「心室筋版・coupled-clock system」は電気刺激を、電位依存性Na電流・電位依存性 Ca^{2+} 電流・CICR・トロポニンの構造変化・・・といった連鎖反応を経て機械的収縮に変換する(興奮収縮連関・EC coupling・図4下)^[56]。洞房結節のcoupled-clock systemが心拍リズムを作るために高いリン酸化レベルを保っているのに対し、心室筋のcoupled-clock system

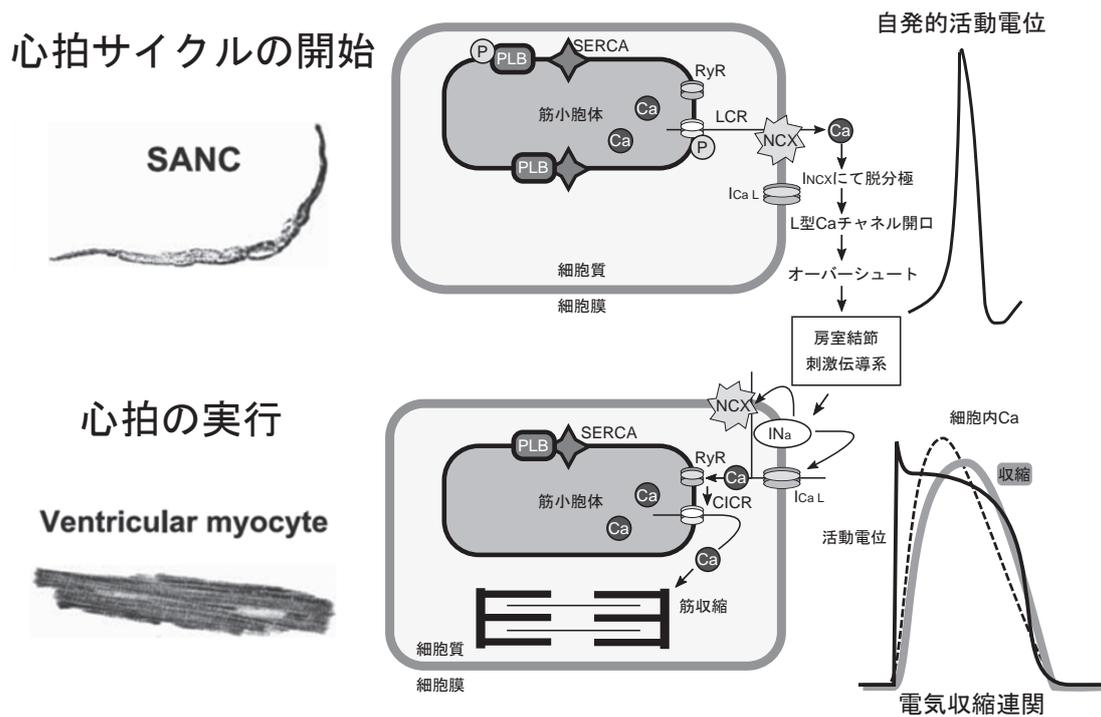


図4 心筋細胞の「一般理論」(general theory)。洞房結節と心室筋細胞では、それぞれの機能(心拍サイクルの開始と心拍の実行)を果たすためのタンパク質は共通している。洞房結節細胞の coupled-clock system が自発的活動電位を生じ、房室結節および刺激伝導系に乗って伝播した活動電位が心室筋細胞に届くと、今度は心室筋細胞の coupled-clock system が電気信号を機械的収縮に変換する(電気収縮連関)。画像は^[62]より一部改変して引用。INa: Voltage-gated cardiac Na channel, CICR: Ca²⁺-induced-Ca²⁺-release

は洞房結節由来の電氣的興奮を休眠状態待ち受けており、タンパク質のリン酸化レベルは低い。心室筋細胞の構成タンパク質のリン酸化レベルを実験的に上昇させると、自動能を「目覚めさせる」ことができる [57]。以上のように、coupled-clock system は洞房結節細胞と心室筋細胞の両方において、その機能において中心的な役割を果たす(「心筋細胞の一般理論」general theory^[56])。

この「一般理論」を裏付けるように、心室筋でも洞房結節と似たパターンの老化性機能性変化が見られる。健康人では安静臥位での左室収縮機能(左室収縮末期用量係数)は生涯を通じて安定して推移するが、座位・中等度運動時・最大運動時の収縮予備能は加齢とともに著明に減少する(図5A)。実験動物の左室単離標本や単離心室筋細胞を用いた研究では、活動電位の振幅および立ち上がり速度・筋収縮力・細胞質Ca²⁺濃度といった項目は加齢によって変化しなかった(図5B)。その反面、老化左室標本では活動電位持続時間が著明に延長し、興奮周期を終えるために要する時間が延長した(図5B左上)^[11]。この観察を支持するように、L型Ca²⁺チャネルの非活性化時間は延長し、一過性外向きK電流(I_{to})は減少し、Ca²⁺ transient 持続時間は延長、それにもないI_{NCX}電流が増加する^[11]。また、心室筋の筋小胞体は細胞質のCa²⁺濃度上昇時のCa²⁺取り込む能力が低下する。この細胞質Ca²⁺取り込み速度の低下を支持するようにSERCA・RyR・PLBのmRNA・タンパク発現レベルは加齢によって低下する^[11, 12]。単離した高齢心筋細胞に若い細胞の活動電位と同じ波形を与える(AP

クランプ)と、その結果生じるCa²⁺ transientは若い細胞と比較して振幅が大きく低下し持続時間は延長する(図5C)。こうした所見から高齢心筋細胞の活動電位持続時間の延長はCa²⁺サイクリングタンパクの機能低下に対する代償ではないかと考えられる^[58, 59]。

高齢心筋細胞の機能低下は高頻度刺激によってより顕著になる。APクランプを短い周期で繰り返す(APCL-S)と、長い周期のとき(APCL-L)と比べて筋小胞体Ca²⁺貯蔵量は有意に低下する^[59]。また、二連刺激(2つの電気刺激を連結期を徐々に変化させながら投与する)ではL型Ca²⁺チャネル電流の興奮からの回復期の挙動にphase-dependentな変化が見られる。さらに、steady state pacing下で心室筋の機械的収縮・弛緩の速度を観察すると、高齢心筋細胞は若年心筋細胞と対照的に刺激頻度の増加への追従性が低下する(図5D)^[58]。このように、加齢によって心室筋の電気収縮連関が素早い反復興奮に追従できなくなる。この現象は洞房結節が心拍数を上昇できなくなることと機能的に符合する。心室筋が次の興奮に対する準備ができる前に(相対不応期を脱する前に)次の電気刺激が洞房結節から到来すると不整脈をまねくためである。

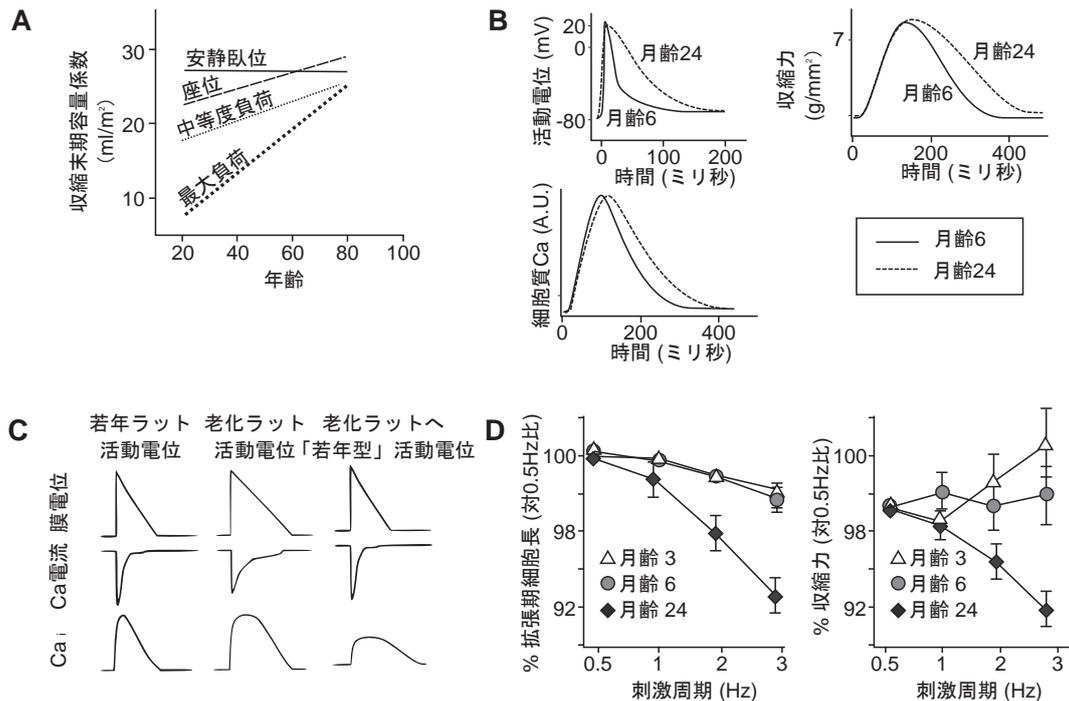


図5 BLSAに参加した健常人 (A) および実験ラット (B-D) における心室筋の加齢性変化。(A) 左室収縮末期容量係数は、安静時では生涯を通じて安定して推移するが、運動負荷時には高齢者での機能低下が著明になる^[11]。(B) 活動電位持続時間は加齢により延長し、収縮力と細胞質 Ca²⁺ transientの持続時間もあわせて遅延する。いずれもピーク値は大きく変化しない^[58]。(C) 老化ラットから単離した心室筋細胞に若いラットの持つ活動電位を外挿する (AP クランプ) と、Ca²⁺ transientのピークは低下し、持続時間は延長する^[58]。(D) ペーシングの頻度を増加させると、老化心室筋細胞では拡張能・収縮能いずれも著明に低下する^[58]。画像は [11, 58] より一部改変して引用。エラーバーは標準誤差。

結語

洞房結節細胞を駆動する coupled-clock system は、細胞膜上の M クロックと細胞質内の Ca²⁺ クロックが共同して活動電位を生み、堅牢かつ柔軟な心臓自動能を実現する。洞房結節の IHR と自律神経刺激に対する応答は加齢とともに鈍化する。心拍数が生涯安定して推移するように見えるのは、低下し続ける IHR を交感神経系が代償しているためである。IHR と並行して、運動時最大心拍数も加齢に伴い減少する。coupled-clock system は洞房結節細胞と作業心筋細胞のいずれにも存在し、洞房結節では心拍数を、作業心筋細胞では収縮・弛緩を制御することで、心臓ポンプ機能の実現に中心的役割を果たす。それぞれの coupled-clock には類似した加齢性機能変化が観察され、心臓の生理機能だけでなく加齢性変化を考える際にも有用な観点と考えられる。

謝辞

本研究は米国国立衛生研究所・国立加齢研究所の Intramural Research Program および日本学術振興会の研究助成 (JSPS Research Fellowship for Japanese Biomedical and Behavioral Researchers at NIH) を受けたものである。

References

- [1] Mond HG and Proclemer A. The 11th World Survey of Cardiac Pacing and Implantable Cardioverter-Defibrillators: Calendar Year 2009-A World Society of Arrhythmia's Project. Pacing and Clinical Electrophysiology. 2011.
- [2] Jensen PN, Gronroos NN, Chen LY, *et al.* Incidence of and risk factors for sick sinus syndrome in the general population. J Am Coll Cardiol. 2014;64:531-8.
- [3] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2014;129:e28-e292.
- [4] 松崎益徳 (班長). 慢性心不全治療ガイドライン (2010年改訂版). 日本循環器学会ガイドラインシリーズ. 2010.
- [5] Yancy CW, M. J. Bozkurt B, *et al.* 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation. 2013;128:240-327.
- [6] Jose AD and Collison D. The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man.

- Cardiovasc Res. 1970;4:160-7.
- [7] Opthof T. The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res.* 2000;45:177-84.
- [8] Erikssen J and Rodahl K. Resting heart rate in apparently healthy middle-aged men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1979;42:61-9.
- [9] Kostis JB, Moreyra AE, Amendo MT, *et al.* The effect of age on heart rate in subjects free of heart disease. Studies by ambulatory electrocardiography and maximal exercise stress test. *Circulation.* 1982;65:141-5.
- [10] Fleg JL, Tzankoff SP and Lakatta EG. Age-related augmentation of plasma catecholamines during dynamic exercise in healthy males. *J Appl Physiol (1985).* 1985;59:1033-9.
- [11] Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev.* 1993;73:413-67.
- [12] Vaitkevicius PV, Fleg JL, Engel JH, *et al.* Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation.* 1993;88:1456-62.
- [13] Arbab-Zadeh A, Perhonen M, Howden E, *et al.* Cardiac remodeling in response to 1 year of intensive endurance training. *Circulation.* 2014;130:2152-61.
- [14] De Luca A, Stefani L, Pedrizzetti G, *et al.* The effect of exercise training on left ventricular function in young elite athletes. *Cardiovasc Ultrasound.* 2011;9:27.
- [15] Stickland MK, Welsh RC, Petersen SR, *et al.* Does fitness level modulate the cardiovascular hemodynamic response to exercise? *J Appl Phys.* 2006;100:1895-1.
- [16] Rodeheffer RJ, Gerstenblith G, Becker LC, *et al.* Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation.* 1984;69:203-13.
- [17] Katznel LI, Sorkin JD and Fleg JL. A comparison of longitudinal changes in aerobic fitness in older endurance athletes and sedentary men. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49:1657-64.
- [18] Vestal RE, Wood AJ and Shand DG. Reduced beta-adrenoceptor sensitivity in the elderly. *Clin Pharmacol Ther.* 1979;26:181-6.
- [19] Christou DD and Seals DR. Decreased maximal heart rate with aging is related to reduced β -adrenergic responsiveness but is largely explained by a reduction in intrinsic heart rate. *J Appl Physiol (1985).* 2008;105:24-9.
- [20] Satoh H. Sino-atrial nodal cells of mammalian hearts: ionic currents and gene expression of pacemaker ionic channels. *J Smooth Muscle Res.* 2003;39:175-93.
- [21] Maltsev VA, Yaniv Y, Maltsev AV, *et al.* Modern Perspectives on Numerical Modeling of Cardiac Pacemaker Cell. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2014;125:6-38.
- [22] Noble D. Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations. *Nature.* 1960;188:495-7.
- [23] Noma A. Ionic mechanisms of the cardiac pacemaker potential. *Jpn Heart J.* 1996;37:673-82.
- [24] Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol.* 1984;353:1-50.
- [25] DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annual review of physiology.* 1992;55:455-72.
- [26] Lakatta EG, Maltsev VA and Vinogradova TM. A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res.* 2010;106:659-73.
- [27] DiFrancesco D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol.* 1981;314:359-76.
- [28] Mangoni ME and Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 2008;88:919-82.
- [29] Torrente AG, Mesirca P, Neco P, *et al.* L-type $Ca_v1.3$ channels regulate ryanodine receptor-dependent Ca^{2+} release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovasc Res.* 2016;109:451-61.
- [30] Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, *et al.* Functional role of L-type $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5543-8.
- [31] Strait JB and Lakatta EG. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin.* 2012;8:143-64.
- [32] Lakatta EG. Functional implications of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in the heart. *Cardiovasc Res.* 1992;26:193-214.
- [33] Sirenko S, Maltsev VA, Yaniv Y, *et al.* Electrochemical Na^{+} and Ca^{2+} Gradients Drive Coupled-Clock Regulation of Automaticity of Isolated Rabbit Sinoatrial Nodal Pacemaker Cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;ajpheart 00667 2015.
- [34] Vinogradova TM, Zhou Y-YY, Maltsev V, *et al.* Rhythmic ryanodine receptor Ca^{2+}

- releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circulation research*. 2004;94:802-9.
- [35] Bogdanov KY, Vinogradova TM and Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na⁺-Ca²⁺ exchanger - Molecular partners in pacemaker regulation. *Circulation Research*. 2001;88:1254-8.
- [36] Lakatta EG and DiFrancesco D. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009;47:157-70.
- [37] Lakatta EG, Yaniv Y and Maltsev VA. Cardiac Impulse Is Initiated by a Coupled System of Membrane Ion Channels and Ca²⁺ Cycling Proteins. In: Zipes DP, editor. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* (Sixth edition) 2015.
- [38] Younes A, Lukyanenko Y, Lyashkov A, *et al*. Phosphodiesterase Expression Pattern and Activity Partitioning in Lipid Raft and in Non-Lipid-Raft Microenvironment in Cardiac Sinoatrial Nodal Cells. *Biophys J*. 2014;106:111A.
- [39] Mattick P, Parrington J, Odia E, *et al*. Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclase isoform AC1 is preferentially expressed in guinea-pig sino-atrial node cells and modulates the I_f pacemaker current. *J Physiol*. 2007;582:1195-203.
- [40] Wu YJ, Gao Z, Chen BY, *et al*. Calmodulin kinase II is required for fight or flight sinoatrial node physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:5972-7.
- [41] Vinogradova TM, Sirenko S, Lyashkov AE, *et al*. Constitutive phosphodiesterase activity restricts spontaneous beating rate of cardiac pacemaker cells by suppressing local Ca²⁺ releases. *Circ Res*. 2008;102:761-9.
- [42] DiFrancesco D and Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 1991;351:145-7.
- [43] Lyashkov AE, Vinogradova TM, Zahanich I, *et al*. Cholinergic receptor signaling modulates spontaneous firing of sinoatrial nodal cells via integrated effects on PKA-dependent Ca²⁺ cycling and I_f (K_{ACh}). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H949-59.
- [44] Miller RA, Harper JM, Dysko RC, *et al*. Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 2002;227:500-8.
- [45] Yaniv Y, Ahmet I, Tsutsui K, *et al*. Deterioration of autonomic neuronal receptor signaling and mechanisms intrinsic to heart pacemaker cells contribute to age-associated alterations in heart rate variability in vivo. *Aging Cell*. 2016;15:716-24.
- [46] Liu J, Sirenko S, Juhaszova M, *et al*. Age-associated abnormalities of intrinsic automaticity of sinoatrial nodal cells are linked to deficient cAMP-PKA-Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306:H1385-97.
- [47] Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, *et al*. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res*. 2001;52:40-50.
- [48] Tellez JO, McZewski M, Yanni J, *et al*. Ageing-dependent remodelling of ion channel and Ca²⁺ clock genes underlying sino-atrial node pacemaking. *Exp Physiol*. 2011;96:1163-78.
- [49] Huang X, Yang P, Yang Z, *et al*. Age-associated expression of HCN channel isoforms in rat sinoatrial node. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015.
- [50] Fujino M, Okada R and Arakawa K. The relationship of aging to histological changes in the conduction system of the normal human heart. *Jpn Heart J*. 1983;24:13-20.
- [51] Davies MJ and Pomerance A. Quantitative study of ageing changes in the human sinoatrial node and internodal tracts. *Br Heart J*. 1972;34:150-2.
- [52] Lev M. Aging changes in the human sinoatrial node. *J Gerontol*. 1954;9:1-9.
- [53] Shiraiishi I, Takamatsu T, Minamikawa T, *et al*. Quantitative histological analysis of the human sinoatrial node during growth and aging. *Circulation*. 1992;85:2176-84.
- [54] Csepe TA, Zhao J, Hansen BJ, *et al*. Human sinoatrial node structure: 3D microanatomy of sinoatrial conduction pathways. *Prog Biophys Mol Biol*. 2016;120:164-78.
- [55] Jones SA, Lancaster MK and Boyett MR. Ageing-related changes of connexins and conduction within the sinoatrial node. *J Physiol*. 2004;560:429-37.
- [56] Maltsev VA, Vinogradova TM and Lakatta EG. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J Pharmacol Sci*. 2006;100:338-69.
- [57] Sirenko S, Maltsev VA, Maltseva LA, *et al*. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling protein phosphorylation in a physiologic Ca²⁺ milieu unleashes a high-power, rhythmic Ca²⁺ clock in ventricular myocytes: relevance to arrhythmias

- and bio-pacemaker design. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;66:106-15.
- [58] Janczewski AM and Lakatta EG. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca (2+) cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.* 2010;15:431-45.
- [59] Janczewski AM, Spurgeon HA and Lakatta EG. Action potential prolongation in cardiac myocytes of old rats is an adaptation to sustain youthful intracellular Ca²⁺ regulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:641-8.
- [60] Jose AD, Stitt F and Collison D. The effects of exercise and changes in body temperature on the intrinsic heart rate in man. *Am Heart J.* 1970;79:488-98.
- [61] Liu J, Sirenko S, Juhaszova M, *et al.* A full range of mouse sinoatrial node AP firing rates requires protein kinase A-dependent calcium signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2011;51:730-9.
- [62] Monfredi O, Maltsev VA and Lakatta EG. Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda).* 2013;28:74-92.

Deterioration in coupled-clock system underlies age-associated functional decline in heart rhythm and contractility

Kenta Tsutsui¹ Oliver Monfredi^{1,2} Edward G Lakatta¹

¹Laboratory of Cardiovascular Science, Biomedical Research Center, Intramural Research Program, National Institute on Aging, NIH, Baltimore, Maryland, USA. ² Institute of Cardiovascular Sciences, University of Manchester, United Kingdom

Abstract

Sinus node dysfunction and chronic heart failure are major health issues in our unprecedentedly aging society. The heartbeat originates from spontaneously firing sinoatrial nodal (SAN) pacemaker cells. A coupled-clock system underlies the robust and flexible automaticity in these cells. The basal action potential (AP) firing rate of SAN cells is largely determined by the degree of phosphorylation of critical proteins in the coupled-clock system. Autonomic neuronal signaling from the brain effects changes in AP firing rate via modulation of cAMP and cAMP-mediated PKA-dependent phosphorylation. Age-associated alterations in intrinsic SAN cell behavior and associated changes in brain-heart communication play central roles in the development of SAN cell pacemaker failure. This mini-review provides integrated insights into the molecular mechanisms underlying the effects of aging on deterioration in beating rate and contractility of the heart in animal models and in apparently healthy humans.

Keywords : Aging, sinoatrial node, pacemaker cell, phosphorylation, coupled-clock system