

令和元年6月15日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08243

研究課題名(和文) リアノジン受容体不整脈原性変異体の活性制御モデル構築と治療薬探索への応用

研究課題名(英文) Establishment of analysis method of ryanodine receptor arrhythmogenic mutations and its application to therapeutic drug screening

研究代表者

呉林 なごみ (Kurebayashi, Nagomi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：50133335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本計画では2型リアノジン受容体(RyR2)の様々な不整脈疾患変異体の性質を定量的に記述することにより疾患の発生機序を理解し、また治療薬開発の基盤を作る事を目指した。まず様々な疾患変異について、HEK細胞発現系を用いた機能解析と、培養心筋細胞を用いた検討を行い、gain-of-function型とloss-of-function型の不整脈性変異を見出し報告した。特に前者では我々の機能解析法が疾患の重症度の予測と治療法の選択に有用な事を示した。さらに上述の過程で見出した小胞体Ca<sup>2+</sup>モニタリングを利用しRyR2阻害薬のスクリーニング系を構築し、新規RyR2阻害薬を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が確立した機能解析系は疾患の重症度や治療方針の判断に有用である。不整脈治療薬に関してRyR2阻害薬が本当に抗不整脈作用を持つか未だ証明されていないため、新規のRyR2特異的な化合物の発見は不整脈の成り立ちを研究する上で学術的にも有用な発見である。またRyR2変異による不整脈疾患には現存の治療薬が効かない事が多いため、本研究により新分野の良い薬が見つければ、不整脈を有する患者さんのQOL向上に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to understand the mutant RyR2-related arrhythmogenic mechanism and to establish a screening procedure for RyR2 inhibitors as anti-arrhythmic drugs. First, functional evaluation of RyR2 mutations were carried out using HEK cell expression system and a cardiomyocyte cell line. We found gain-of-function type and loss-of-function type of arrhythmogenic mutations. In the former, our functional analysis has proved to be very useful for predicting the severity of diseases caused by the mutations. Next, we developed a screening system for specific RyR2 inhibitors utilizing the ER Ca<sup>2+</sup> monitoring, which was found to be an accurate indicator of RyR2 activity.

研究分野：薬理学

キーワード：リアノジン受容体 不整脈 心臓 カルシウム 抗不整脈薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

2型リアノジン受容体(RyR2)は心筋の興奮収縮連関において中心的な役割を果たす  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャネルである。RyR2の変異はCPVT(カテコラミン誘発性多型性心室頻拍)をはじめとした様々な心室性不整脈の原因であり、合わせて150以上のアミノ酸変異が報告され、日本においても多くの新規変異が報告されている。CPVTは組織・解剖学的な変化を伴わずに激しい運動や情動活動により心室性の不整脈を起こす疾患であり、一部は精神遅滞やてんかんを伴うとされる。その他ARVC(不整脈原性右室心筋症)、QT延長症候群、特発性心室細動といった不整脈疾患があるが、どのような違いが異なる表現型となるのか、明確な答えは未だ得られていない。また、各変異の間での重症度の違いも明らかではない。

RyR2変異による不整脈は筋小胞体からの自発的遊離によって起こる  $\text{Ca}^{2+}$  wave、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動(オシレーション)、 $\text{Ca}^{2+}$ リークなどに起因すると考えられる。従って病態発症機序の理解には、変異RyR2の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離制御についての研究が欠かせない。 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の制御機構には、RyR2分子に対し細胞質側  $\text{Ca}^{2+}$ による制御( $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release: CICR)と小胞体内腔側  $\text{Ca}^{2+}$ による制御(Store overload-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release: SOICR)の2種類が考えられている(図1A)。CICRは細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ に対しベル型の依存性を示し、3つの独立したパラメータ(活性化  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性、不活性化  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性、およびゲイン)によって記述される(図1B)。一方SOICRは小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ 過剰取込みによって  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離活性が大きく促進される現象で、サブmM濃度の  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を持つとされる(図1C)。CPVT変異では、SOICRの  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性や大きさが増大しているとされるが、異論もある。申請者は、自発的  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に対するCICRの寄与を検証するために、上述の各パラメータがCPVTなどの疾患変異によってどのように変化し、その結果どのような  $\text{Ca}^{2+}$ 動態変化をもたらすか、不整脈に至るのか明らかにすることが疾患発症機序の解明に必要なと考えた。

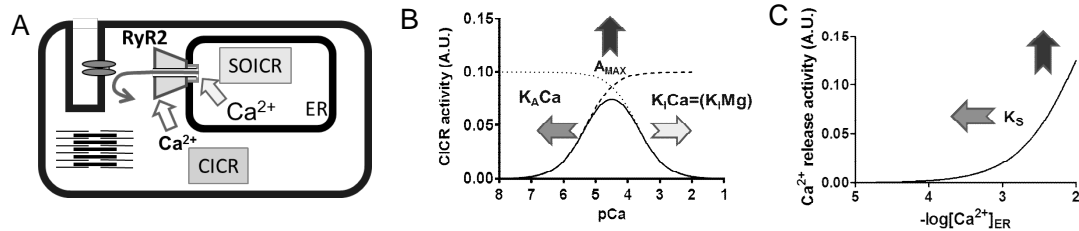


図1. A. RyR2の  $\text{Ca}^{2+}$ による2種類の制御、CICRとSOICRの模式図。B. CICRのベル型  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を構成する3つのパラメータ。疾患変異は3つのパラメータに対し、矢印の方向に変化をもたらす可能性がある。C. SOICRの  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の模式図。病態変異は矢印の方向に影響する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では2つの目的を設定した。(1) RyR2に見つかる疾患変異がCICRのパラメータにどのように影響し、その結果どのような  $\text{Ca}^{2+}$ 動態変化をもたらすか、不整脈を惹起するのか実測と数理モデルにより明らかにする。具体的な事項としては、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動を含めた  $\text{Ca}^{2+}$ ホメオスタシスの変化を野生型と種々の変異型RyR2で記録する。HEK細胞、心筋細胞で解析を行う。CICRのパラメータを定量的に記述する。それらのパラメータを用いて数理計算によりRyR2の  $\text{Ca}^{2+}$ 動態モデルを構築する。そして、これらの結果に基づき、(2) CPVTやその他の疾患変異における異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 動態を正常化する方法を確立する。どのパラメータを変えるのが  $\text{Ca}^{2+}$ 振動を抑えるのに最も効果的かをシミュレーションにより計算し、そのような薬物を探索する。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、下記(1)~(3)により不整脈の原因となる自発的  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離/ $\text{Ca}^{2+}$ 振動のモデルを構築し、それを基に治療薬探索に向けた基盤の確立を目指した。

- (1) HEK293細胞のRyR2発現系を確立し、細胞内および小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$ インジケータ蛋白を用いて定量的・経時的に測定する。
- (2)  $[^3\text{H}]$ リアノジン結合アッセイによりRyR2のCICRのパラメータを得る。
- (3) (2)のパラメータを用い(1)の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を再現できるような数理モデルを構築する。
- (4) (1)-(3)を基にして、CICRパラメータに作用する薬物やアミノ酸変異を探索する。
- (5) (4)で見出した薬物の効果を心筋細胞の環境下で検証する。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内および小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ホメオスタシス)測定と  $[^3\text{H}]$ リアノジン結合アッセイによる疾患変異RyR2の解析

RyR2を発現したHEK293細胞を用い、細胞質および小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ のモニタリング(図2)と  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $[^3\text{H}]$ リアノジン結合から求めた生理的な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度付近の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離活性(CICR)の関係を、様々な疾患変異について調べた。

Uehara et al. (2017)では、非常に重篤なカテコラミン誘発性多型性心室頻拍(CPVT)と心

房細動を併発する変異 K4750Q (または K4752Q) について報告した。K4750Q を発現した HEK293 細胞では  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション頻度の著しい上昇と小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの著名な低下 (図 2)  $[\text{^3H}]$  リアノジン結合のピークの上昇と高濃度の抑制性  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  感受性の低下がみられた。さらに心筋由来の株化細胞である HL-1 細胞にバキュロウイルス発現系を用いて K4750Q を発現させると、正常な活動電位によって起こる  $\text{Ca}^{2+}$  トランジエントの合い間に頻回の  $\text{Ca}^{2+}$  wave が起こり (図 3) 実際の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の亢進を証明できた。

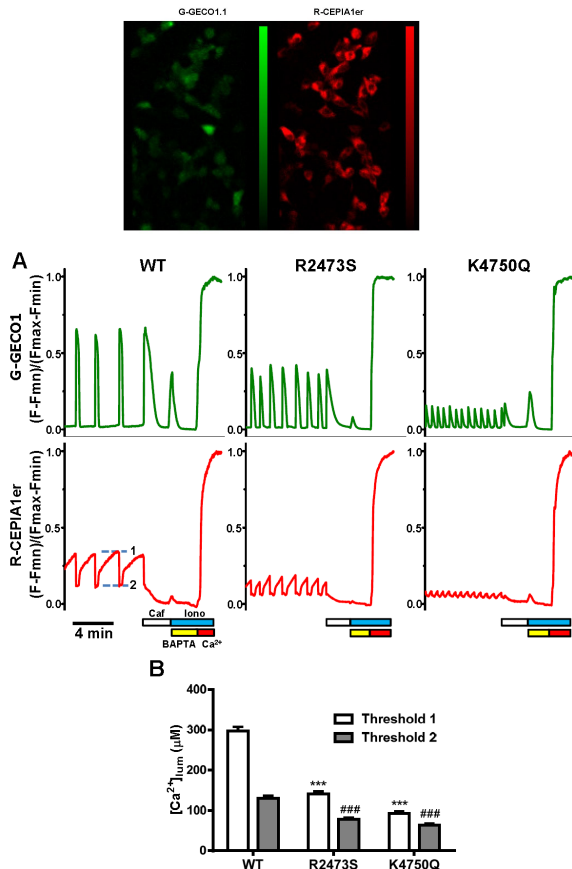


図 2 RyR2 発現 HEK293 細胞を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  動態解析。細胞質と小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  をそれぞれ G-GECO1.1 と R-CEPIA1er を用いて同時測定した。測定の最後にイオノマイシンおよび BAPTA と高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  で Fmin, Fmax を求めることにより、定量的に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を比較する事ができた。(Uehara et al., 2017 より抜粋)

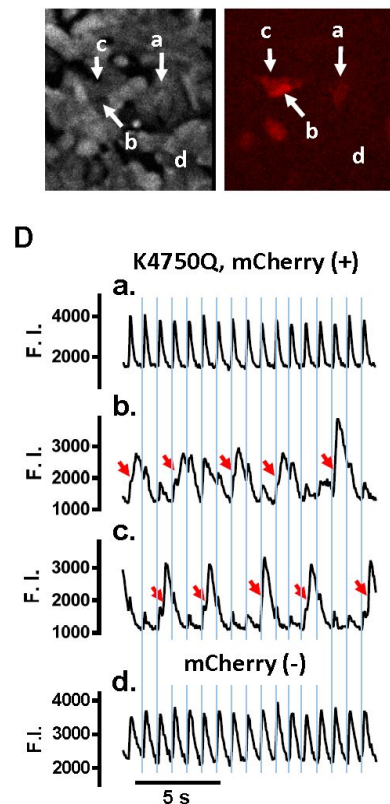


図 3 心筋細胞環境下における変異 RyR2 の効果の解析。RyR2 発現 HL1 細胞とバキュロウイルス発現系により心筋細胞環境下に変異 RyR2 を発現させ、その影響を観測した。(Uehara et al., 2017 より抜粋)

Fujii et al., (2017) は滋賀医大の循環器内科のグループとの共同で行った研究で、短連結性トルサードポアン (ScTdP) と関連付けられる複数の RyR2 変異を機能解析した。そのうちのひとつ (S4938F) は Loss-of-function 変異で或る事が判明した。すなわち HEK 細胞に発現しても  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは全く起こらず ER  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇がみられると共に、著しい CICR 活性の低下がみられた (図 4)。

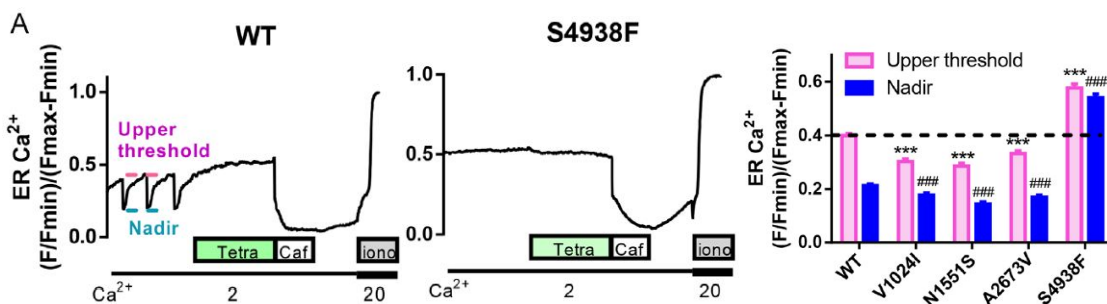


図 4 ScTdP に関連付けられる変異 RyR2 (S4938F) を発現した HEK293 の  $\text{Ca}^{2+}$  動態解析。S4938F を発現した細胞は全く  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを示さず、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  高レベルを保っていた。 $[\text{^3H}]$  リアノジン結合測定とあわせ、この変異は Loss-of-function 変異であることが判明した。(Fujii et al., (2017)より抜粋)

これらの変異の他にも、国内の循環器グループと共同研究で複数の興味深い変異 RyR2 の解析を行い、それらのうち 3 報を投稿中である。

## (2) RyR2 疾患変異体の CICR パラメータの変化の分析と数理計算によるモデリング

RyR2 を発現した HEK 細胞の小胞体  $Ca^{2+}$  レベルの決定機構における CICR の寄与を検討する為、CPVT やその他の疾患変異、人工的 RyR2 変異を作製し、CICR 活性と小胞体  $Ca^{2+}$  レベルを定量的に測定し、相関関係を検討した。変異 RyR2 を発現した HEK 細胞の小胞体  $Ca^{2+}$  レベルはその CICR 活性と非常に良い逆相関を示したことから、これまで luminal  $Ca^{2+}$  による制御 (SOICR) と考えられてきた小胞体の自発的  $Ca^{2+}$  遊離の閾値は、実は細胞質側の制御で良く説明できるという結果が得られた。数理計算モデルもこれを支持した。また、我々の方法による RyR2 疾患変異体の機能解析は、疾患の重症度を予測するのに役立つことが分かった。これらの結果について国際シンポジウムや国内学会で発表し、論文は近々、投稿予定である。

## 3) 大規模スクリーニングによる RyR2 阻害薬の探索方法の確立、応用と効果の検証

HEK293 細胞を用いた ER  $Ca^{2+}$  モニタリングの実験から、ER  $Ca^{2+}$  が RyR2 活性の良い指標となることが分かり、これを利用して RyR の各サブタイプの阻害薬探索法を確立した (Murayama et al., 2018)。RyR2 に関しては約 1600 種類の機能既知化合物ライブラリから、3 種類の抑制薬を見出し (図 5) 可逆性や心筋に対する作用を調べた。その内の 2 つは、不整脈モデルマウス心筋細胞の  $Ca^{2+}$  wave や  $Ca^{2+}$  spark を可逆的に抑制した。さらに BINDS の支援を受け東京大学創薬機構の 9600 種類の化合物を含むコアライブラリ探索から約 15 種類のヒット化合物を見出した (図 5)。現在それらの性質を検討中である。これらの結果は、学会で発表し、論文作成中である。

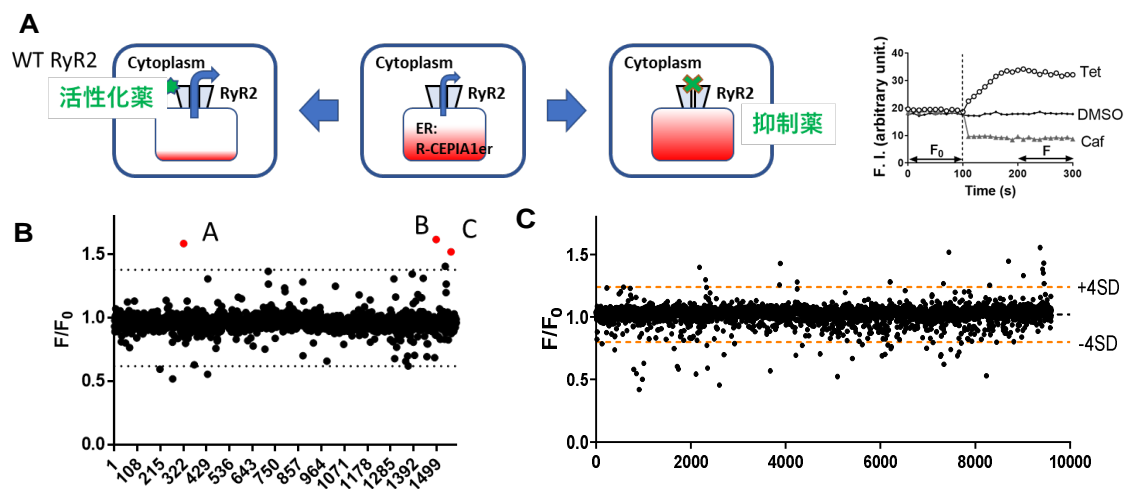


図 5 小胞体  $Ca^{2+}$  インジケータ R-CEPIA1er を用いた高精度スクリーニング法の原理(上左)、R-CEPIA1er シグナル測定例(上右)と大規模スクリーニングの結果(下)。RyR2 を発現するとリークにより小胞体  $Ca^{2+}$  レベルが減少した状態になるが、RyR2 阻害薬を投与するとリークが止まり小胞体レベルが増加する。下: 既知化合物ライブラリ (すべて 10 $\mu$ M) のスクリーニング結果。+4SD を超えた化合物 a-c をヒットとみなした。B. 東大創薬機構コアライブラリ (すべて 5 $\mu$ M) の結果。点線より上が阻害薬のヒット化合物である。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 13 件)

Uehara A, Murayama T, Yasukochi M, Fill M, Horie M, Okamoto T, Matsuura Y, Uehara K, Fujimoto T, Sakurai T & Kurebayashi N. (2017). Extensive  $Ca^{2+}$  leak through K4750Q cardiac ryanodine receptors caused by cytosolic and luminal  $Ca^{2+}$  hypersensitivity. *J Gen Physiol* 149, 199-218. Doi: 10.1085/jgp.201611624

Fujii Y, Itoh H, Ohno S, Murayama T, Kurebayashi N, Aoki H, Blancard M, Nakagawa Y, Yamamoto S, Matsui Y, Ichikawa M, Sonoda K, Ozawa T, Ohkubo K, Watanabe I, Guicheney P & Horie M. (2017). A type 2 ryanodine receptor variant associated with reduced  $Ca^{2+}$  release and short-coupled torsades de pointes ventricular arrhythmia. *Heart Rhythm* 14, 98-107. Doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.015

Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H & Sakurai T. (2018). Efficient High-Throughput Screening by Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$

Measurement to Identify Inhibitors of Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup>-Release Channels. Mol Pharmacol 94, 722-730. Doi: 10.1124/mol.117.111468

Murayama T, Kurebayashi N, Ogawa H, Yamazawa T, Oyamada H, Suzuki J, Kanemaru K, Oguchi K, Iino M & Sakurai T. (2016). Genotype-Phenotype Correlations of Malignant Hyperthermia and Central Core Disease Mutations in the Central Region of the RYR1 Channel. Hum Mutat 37, 1231-1241. Doi: 10.1002/humu.23072

〔学会発表〕(計 25 件)

Kurebayashi N. Mechanism and therapeutic strategies for arrhythmogenic diseases caused by RyR2 mutations. (2019). 9th FAOPS Congress, Symposium 25, Calcium signaling in heart disease. Kobe, Japan.

呉林なごみ Ca<sup>2+</sup>動態異常による不整脈とその治療戦略.(2019) 第 92 回日本薬理学会年会 シンポジウム 4 筋のホメオスタシスとその異常による疾患. 大坂.

呉林なごみ. Divergent effects of disease-linked mutations in RyR2 on Ca<sup>2+</sup> dynamics in cardiac and non-cardiac cells. (2018) 第 95 回日本生理学会大会 日豪合同シンポジウム. 高松

呉林なごみ. Ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels and cardiac arrhythmia. (2018). 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). Kyoto.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：リアノジン受容体阻害薬

発明者：村山尚、国広なごみ、影近弘之、森修一、湯浅磨里

権利者：同上

種類：特許

番号：特願/2017-205935

出願年：2017

国内外の別：国内

名称：リアノジン受容体阻害薬

発明者：影近弘之、国広なごみ、村山尚、森修一、湯浅磨里

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2018/039542

出願年：2018

国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://pharmacology.sakura.ne.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：村山 尚

ローマ字氏名：MURAYAMA, takashi

研究協力者氏名：山下 富義

ローマ字氏名：YAMASHITA, fumiyoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。