

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09142

研究課題名(和文) ダントロレンによるリアノジン受容体を分子標的とした心不全・不整脈治療の臨床応用

研究課題名(英文) Ryanodine receptor-targeting therapy for heart failure and lethal arrhythmia

研究代表者

小林 茂樹 (KOBAYASHI, Shigeki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90397993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス横行大動脈狭窄(TAC)モデルにて、代償期圧負荷心における細胞内Ca<sup>2+</sup>ハンドリング異常を明らかにし、このモデルに対するダントロレンの効果について検討した。心エコーでは、TAC2週間で、左室肥大を認めたと、左室収縮能は正常であった。この代償期圧負荷肥大心の心筋細胞では、リアノジン受容体(RyR2)からCa<sup>2+</sup>漏出が認められており、左室弛緩障害が認められた。しかしながら、ダントロレンの慢性投与により、RyR2からのCa<sup>2+</sup>漏出は抑制され、左室肥大の抑制と弛緩障害の改善が認められた。これらの結果から、ダントロレンの慢性投与は、代償期圧負荷肥大心の新たな治療戦略になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated (1) whether transverse aortic constriction (TAC)-induced pressure overload caused Ca<sup>2+</sup> leak through cardiac ryanodine receptor (RyR2), and (2) whether chronic administration of dantrolene, a RyR2 stabilizer, inhibited the cardiomyocyte hypertrophy and dysfunction by stopping the Ca<sup>2+</sup> leak. The aberrant Ca<sup>2+</sup> leak through RyR2 was observed even in the compensated pressure-overloaded heart. Dantrolene restores the cardiomyocyte dysfunction and inhibits the cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting the aberrant Ca<sup>2+</sup> leak through RyR2. Targeting RyR2 treatment by dantrolene may be a novel strategy for pressure-overloaded hypertrophy.

研究分野：循環器科

キーワード：ryanodine receptor heart failure arrhythmia dantrolene

## 1. 研究開始当初の背景

心不全やある種の心筋型リアノジン受容体 (RyR2) の点突然変異病においては、心筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫である筋小胞体 (SR) 膜上の RyR2 からの拡張期  $\text{Ca}^{2+}$  漏出が認められる。この拡張期  $\text{Ca}^{2+}$  漏出は、心筋細胞の収縮・拡張不全および致死的不整脈の大きな原因である。一方、我々は、骨格筋型リアノジン受容体 (RyR1) の点突然変異病である悪性高熱症は、ダントロレンの RyR1 への結合により、RyR1 からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出が抑制されることを解明した。ダントロレンの RyR2 における結合部位は RyR1 と全く同じアミノ酸配列であるため、ダントロレンは心疾患に対しても有効であることが予測される。

## 2. 研究の目的

本研究は、心不全や心不全に合併した心室頻拍 (VT) の患者を対象にダントロレンによる RyR2 を分子標的とした治療法の開発と実臨床への応用を目的とするものである。

## 3. 研究の方法

(1) リアノジン受容体を分子標的としたダントロレンによる心不全・致死的不整脈の臨床応用

「慢性心不全におけるダントロレンの予後および心室性不整脈に与える効果と安全性を評価する多施設ランダム化二重盲検 (SHO-IN Trial: UMIN 28766)」

本計画は医師主導型の中国地方、四国地方を含む20施設からなる、ダントロレン、プラセボを用いた2重盲検試験である。対象は左室駆出率40%未満の慢性心不全患者で1年以内に心不全により入院歴がなければ、BNP150pg/ML以上、1年以内に入院歴があればBNP100pg/ML以上、あるいは、1年以内に持続心室頻拍を有する患者が対象となる主要評価項目は、心血管死、心不全増悪による入院、致死的不整脈による複合エンドポイントであ

る。評価期間は2年である。

(2) 圧負荷による左室弛緩障害の分子学的機序解明とダントロレンの効果

高血圧による左室収縮後期の圧負荷が、リアノジン受容体から拡張期  $\text{Ca}^{2+}$  リークを誘発し、その結果、左室弛緩障害を引き起こすこと、

拡張期の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が左室肥大を助長すること、ダントロレンによるリアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  リーク抑制が、拡張不全や左室肥大の進展を抑制し、新たな拡張不全の新たな治療になるかどうかを検証する。マウス横行大動脈狭窄 (TAC) モデルにて、代償期圧負荷心における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリング異常を明らかにし、このモデルに対するダントロレンの効果について検討した。10週齢マウスに TAC を施行し、2週間で代償性心肥大モデルを作成した。TAC マウスを慢性ダントロレン投与 (DAN) 群と非投与 (非DAN) 群、コントロール群 (Sham) に分け、3群の心機能を比較するために経時的心エコーを行った。その後、心臓から心筋細胞を単離し、拡張期  $\text{Ca}^{2+}$  spark、 $\text{Ca}^{2+}$  トランジェント (CaT) および cell shortening (CS) を測定した。

## 4. 研究成果

(1) リアノジン受容体を分子標的としたダントロレンによる心不全・致死的不整脈の臨床応用

SHO-IN TRIAL に関しては、プロトコールの作成・改定、2重盲検用の試験薬の発注 (実薬、偽薬の区別がつかないようにカプセル化、包装)、中国地方、四国地方を含む20施設への説明、各施設での IRB 承認等を含めて、2年以上の準備を要した。2017年11月から、臨床試験を開始し、現在症例登録中である。登録期間は、予定通りであれば2年である。

(2) 圧負荷による左室弛緩障害の分子学的機序解明とダントロレンの効果

心エコーでは、TAC2 週モデルにおいて、3 群間で Fractional shortening の差は認められなかった。ミラーカテーテルで左室圧波形を測定したところ、非 DAN 群では、sham 群に比較し、有意に拡張能の心機能指標であるが延長したが、DAN 群ではほぼ正常化した。単離心筋細胞においては、非 DAN 群では、心筋細胞肥大やリアノジン受容体 (RyR2) から  $Ca^{2+}$  漏出が観察されたが、DAN 群では、心筋細胞肥大や  $Ca^{2+}$  漏出は抑制された。CS において、弛緩能の指標としてのピークからベースライン 70% までの時間を測定したが、その時間は非 DAN 群よりも DAN 群で有意に短く、慢性ダントロレン投与により、心筋細胞の弛緩障害は改善した。以上より、代償期圧負荷 CS 肥大心の心筋細胞では、早期から RyR2 から  $Ca^{2+}$  漏出が認められており、ダントロレンによる  $Ca^{2+}$  漏出の抑制は、圧負荷肥大心の新たな治療戦略になることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1 . Nishimura S, Yamamoto T, Nakamura Y, Kohno M, Hamada Y, Sufu Y, Fukui G, Nanno T, Ishiguchi H, Kato T, Xu X, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Mutation-linked, excessively tight interaction between the calmodulin binding domain and the C-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Heart Rhythm. (査読あり) 2018 Jun;15(6):905-914. doi: 10.1016/j.hrthm.2018.02.006.
- 2 . Okuda S, Sufu-Shimizu Y, Kato T, Fukuda M, Nishimura S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Morimoto S, Yano M. CaMKII-mediated phosphorylation of RyR2 plays a crucial role in aberrant  $Ca^{2+}$  release as an arrhythmogenic substrate in cardiac troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun. (査読あり) 2018 Feb 19;496(4):1250-1256. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.181.
- 3 . Ishiguchi H, Kobayashi S, Myoren T, Kohno M, Nanno T, Murakami W, Oda S, Oishi K, Okuda S, Okada M, Suga K, Yano M. Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine as a Myocardial Oxidative Stress Marker Is Associated With Ventricular Tachycardia in Patients With Active Cardiac Sarcoidosis. Circ Cardiovasc Imaging. (査読あり) 2017 Dec;10(12). pii: e006764. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.117.006764.
- 4 . Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Sufu Y, Hamada Y, Maeda T, Nishimura S, Ishiguchi H, Murakami W, Fukuda M, Xu X, Hino A, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. Heart Rhythm. (査読あり) 2017 Jan;14(1):120-127. doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.019.
- 5 . Murakami W, Kobayashi S, Susa T, Nanno T, Ishiguchi H, Myoren T, Nishimura S, Kato T, Hino A, Oda T, Okuda S, Yamamoto T, Yano M. Recombinant Atrial Natriuretic Peptide Prevents Aberrant  $Ca^{2+}$  Leakage through the Ryanodine Receptor by Suppressing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Induced by Isoproterenol in Failing Cardiomyocytes. PLoS One. (査読あり) 2016 Sep 22;11(9):e0163250.

doi: 10.1371/journal.pone.0163250.

〔学会発表〕(計 3件)

1. Yoshihide Nakamura, Takeshi Yamamoto, Michiaki Kono, Yoriomi Hamada, Go Fukui, Yoko Sufu, Takuma Nanno, Hironori Ishiguchi, Shigehiko Nishimura, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano. Dantrolene Prevents Right Ventricular Hypertrophy Without Reducing Pulmonary Arterial Pressure In Monocrotaline-induced PAH In Mice. 90th Scientific Session of American Heart Association. 2017年, Anaheim
2. Yoko S Shimizu, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Kato, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano. Stabilization of Camkii-Phosphorylated Ryr2 by Dantrolene Prevents the Development of Age-Related Cardiomyopathy Caused by Camkii C Overexpression. 90th Scientific Session of American Heart Association. 2017年, Anaheim
3. Go Fukui, Takeshi Yamamoto, Michiaki Kono, Yoshihide Nakamura, Takuma Nanno, Yoriomi Hamada, Yoko Sufu, Hironori Ishiguchi, Shigehiko Nishimura, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano. Effect of Site Dependent RyR Stabilizers; a Clue to Trace a Signal Transmission Pathway Inside the RyR Molecule. 90th Scientific Session of American Heart Association. 2017年, Anaheim

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 茂樹 (KOBAYASHI, Shigeki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90397993

### (2)研究分担者

山本 健 (YAMAMOTO, Takeshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50363122

矢野 雅文 (YANO, Masafumi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90294628

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし