

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19409

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧患者の右心不全を予防することで予後を改善させる新しい治療法の開発

研究課題名(英文) The novel therapy of pulmonary hypertension by preventing right heart failure

研究代表者

大野 誠 (ONO, Makoto)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：50650321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：PAHマウスおよびShamマウスにCaリーク抑制薬ダントロレンを経口投与し、右室圧を測定、心筋細胞のサイズ測定、Caトランジェント観察、固定してanti-CaM, anti-GRK5, anti-HDAC4,5, anti-p-HDAC4,5の抗体にて免疫染色を行った。その結果ダントロレンの経口投与は肺動脈圧に影響を与えなかった。ダントロレンの経口投与群では心筋細胞サイズの縮小を認め、肥大が抑制されていた。さらにRyR結合CaMの減少も抑制されていた。このことからダントロレンがRyRからのCaMの解離を抑制することで、肥大を抑制した可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：PAH mice and Sham mice were orally administered the Ca leak inhibitor dantrolene, and the right ventricular pressure was measured, the cardiomyocyte size was measured, Ca transient observation, fixed and anti-CaM, anti-GRK 5, anti-HDAC 4, 5, anti Immunostaining was performed with antibodies of -p-HDAC 4, 5. As a result, oral administration of dantrolene did not affect pulmonary artery pressure. In the oral administration group of dantrolene, myocardial cell size was reduced and the hypertrophy was suppressed. Furthermore, reduction of RyR bound CaM was suppressed. From this, it was suggested that dantrolene inhibited the dissociation of CaM from RyR, thus suppressing hypertrophy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：カルモジュリン リアノジン受容体 肺高血圧

### 1. 研究開始当初の背景

PAH は予後不良な疾患であり、患者数は増加している。近年、PDE5 阻害薬、エンドセリン拮抗薬、プロスタグランジン (PG) などを用いた多剤併用療法により予後は著しく改善したとはいえ、右心不全が進行した患者の予後は依然不良である。肺血管抵抗を下げることは右心不全を改善できない、との考え方が通説である。しかしながら後述のように、大動脈縮窄 (TAC) モデルにおいて G protein-coupled receptor kinase-5 (GRK5) の欠失マウスでは、慢性の左室圧負荷が持続しているにも関わらず (代償性) 心肥大すら生じず、かといって心機能は悪化するどころかむしろ改善し心不全の発症が抑制された。この事実は、心肥大そのものが予後悪化因子であり、心肥大を細胞レベルで抑制すれば、降圧だけに頼らなくても予後改善が図れる可能性を示すものである。

### 2. 研究の目的

申請者は、心不全の発症機序としての心筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>/ハンドリングに関する研究を継続して行い、以下の一連の知見を得た; 過剰な交感神経刺激や酸化ストレス RyR2 内のチャネル開閉を調節する重要なドメイン間の連関障害 拡張期に異常な Ca<sup>2+</sup> leak 心不全・不整脈を発症。ダントロレンや JTV519 によりドメイン連関障害を改善すれば心不全の進行や致死性不整脈が抑制される (Cardiovasc Res 2009, J Am Coll Cardiol 2009, Cir Res 2010)。その後、申請者は不全心筋ではドメイン連関障害により RyR2 から CaM が解離することが、チャネルが leaky となる最も critical な現象であることを報告した (Cardiovasc Res 2010, 2012, BBRC 2014)。さらにごく最近 TAC モデルでは Z-line 上の CaM が減少しているのとは対照的に核内 CaM は増加しているという予備データを得た。Yang らによると心筋 Z-line 上の CaM の 90% 以上が RyR bound CaM であるため (Yang Y et al. Circ Res 2014; 114)、圧負荷により核内に移動した CaM の多くはドメイン連関障害に伴って RyR2 から解離した CaM であると考えられる。以上の知見に後述の文献的考察を交えた結果、肺高血圧 RyR2 内ドメイン連関障害 CaM の解離 解離した CaM が核内に translocation 心肥大のシグナル活性化 右室肥大 右心不全に至る、との仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証し、右室肥大を抑制、退縮させ右室機能を改善することによる全く新しい PAH の治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

文献的考察に加えて試行錯誤の結果、MCT を 20 日毎に WT マウスに腹腔内投与し安定した PAH モデルマウスの作成が可能となった。このマウスでは肺動脈周囲の炎症に加えて右室肥大を認めた。予備実験では心体重比は有意に増加し、Millar<sup>®</sup>カテーテルにて測定

した右室圧は有意に高値であった。

(1) PAH (WT) マウスの CaM の動態、肥大シグナルの検討:

PAH マウスおよび Sham マウスの LV, RV から心筋細胞を単離し、固定して anti-CaM, anti-GRK5, anti-HDAC4,5, anti-p-HDAC4,5 の抗体にて免疫染色を行う。また Sham マウスにおいては ET-1 による刺激後、経時的に固定し同様の免疫染色を行う。蛍光ラベルした recombinant CaM (F-CaM) を導入し、RyR に対する CaM の親和性を計測する。Ca<sup>2+</sup> spark, SR Ca<sup>2+</sup> content, field stimulation 時の spontaneous Ca<sup>2+</sup> transient を計測する。負荷のかかった RV とかかっていない LV を比較できる点が興味深い。

(2) PAH (CaM HA) マウスの CaM の動態、肥大シグナルの検討:

PAH (WT) マウスと同様に CaM の動態、肥大シグナルを検討する。申請者自身、Ca<sup>2+</sup>/ハンドリングの研究に長年携わり、RyR2 からの Ca<sup>2+</sup> のリークは RyR2 からの CaM の解離が主因であることを報告した (Ono M et al Cardiovasc Res 2010)。

### 4. 研究成果

(1) PAH モデルマウスの作成:

文献的考察に加えて試行錯誤の結果、MCT を 20 日毎に WT マウスに腹腔内投与し安定した PAH モデルマウスの作成が可能となった。このマウスでは肺動脈周囲の炎症に加えて右室肥大を認めた。実験では心体重比は有意に増加し、Millar カテーテルにて測定した右室圧は有意に高値であった。

(2) PAH (WT) マウスの CaM の動態、肥大シグナルの検討:

PAH マウスおよび Sham マウスの LV, RV から心筋細胞を単離し、固定して anti-CaM, anti-GRK5, anti-HDAC4,5, anti-p-HDAC4,5 の抗体にて免疫染色を行う。また Sham マウスにおいては ET-1 による刺激後、経時的に固定し同様の免疫染色を行う。蛍光ラベルした recombinant CaM (F-CaM) を導入し、RyR に対する CaM の親和性を計測する。Ca<sup>2+</sup> spark, SR Ca<sup>2+</sup> content, field stimulation 時の spontaneous Ca<sup>2+</sup> transient を計測した。

(3) PAH (WT) マウスへの Ca リーク抑制薬による介入:

PAH マウスおよび Sham マウスに Ca リーク抑制薬ダントロレンを経口投与し、Millar カテーテルを用いて右室圧を測定、心エコーでの右室径、右室機能計測、組織学的検索を行う。さらに心筋細胞を単離し、心筋細胞のサイズ測定、Ca トランジェント観察、固定して anti-CaM, anti-GRK5, anti-HDAC4,5, anti-p-HDAC4,5 の抗体にて免疫染色を行った。その結果ダントロレンの経口投与は肺動脈圧に影響を与えなかった。にもかかわらず、ダントロレンの経口投与群では心筋細胞サイズの縮小を認め、肥大が抑制されていた。

さらに RyR 結合 CaM の減少も抑制されていた。このことからダントロレンが RYR からの CaM の解離を抑制することで、肥大を抑制した可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Strict sequential catheter ablation strategy targeting the pulmonary veins and superior vena cava for persistent atrial fibrillation.

Yoshiga Y, Shimizu A, Ueyama T, Ono M, Fukuda M, Fumimoto T, Ishiguchi H, Omuro T, Kobayashi S, Yano M.

J Cardiol. 2018 Feb 13. pii: S0914-5087(18)30016-9.

doi: 10.1016/j.jjcc.2018.01.004 査読有

2. 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.

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.

Heart Rhythm. 2018;15(6):905-914.

doi: 10.1016/j.hrthm.2018.02.006 査読有

3. Inferior J waves in patients with vasospastic angina might be a risk factor for ventricular fibrillation.

Fumimoto T, Ueyama T, Shimizu A, Yoshiga Y, Ono M, Kato T, Ishiguchi H, Okamura T, Yamada J, Yano M.

J Cardiol. 2017 Sep;70(3):271-277.

doi: 10.1016/j.jjcc.2016.12.003 査読有

4. Macroreentrant form of an adenosine 5'-triphosphate-sensitive atrial tachycardia arising from the vicinity of the atrioventricular node involving the tricuspid and mitral annuli as its reentrant circuit.

Ueyama T, Shimizu A, Yoshiga Y, Ono M, Fumimoto T, Yano M.

Heart Rhythm Case Rep. 2017 Mar 23;3(6):289-293.

doi: 10.1016/j.hrcr.2017.03.001 査読有

5. Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure.

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.

Heart Rhythm. 2017 Jan;14(1):120-127. doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.019 査読有

6. Successful cryoballoon pulmonary vein isolation in a patient with situs inversus and dextrocardia.

Yoshiga Y, Shimizu A, Ueyama T, Ono M, Fumimoto T, Ishiguchi H, Yano M.

J Arrhythm. 2016 Dec;32(6):493-495.

doi: 10.1016/j.joa.2016.03.005 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. Hironori Ishiguchi, Shigeki Kobayashi, Michiaki Kono, Takuma Nanno, Tatsuhiro Fujimura, Makoto Ono, Hitoshi Uchinomi, Hiroki Tateishi, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Masafumi Yano

Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine Predicts Occurrence of Sustained Ventricular Tachycardia after Steroid Therapy in Active Cardiac Sarcoidosis Patients

The 82th Annual Scientific Meeting of the the Japanese Circulation Society 大阪 2018.3

2. Takuya Omuro, Yasuhiro Yoshiga, Akihiko Shimizu, Makoto Ono, Masakazu Fukuda, Hironori Ishiguchi, Masafumi Yano

The Correlation between Left Atrial Low Voltage Zone and Left Atrial Appendage Flow Velocity in Patients with Atrial Fibrillation

The 82th Annual Scientific Meeting of the the Japanese Circulation Society 大阪 2018.3

3. 大野 誠, 吉賀康裕, 福田昌和, 石口博智, 清水昭彦, 矢野雅文

心臓再同期療法導入以前にきたした心不全入院回数が生命予後に及ぼす影響について

第65回日本心臓病学会学術集会 大阪 2017.10

4. Yasuhiro Yoshiga, Akihiko Shimizu, Takeshi Ueyama, Makoto Ono, Tomoko Fumimoto, Hironori Ishiguchi, Masafumi Yano

Strict sequential catheter ablation strategy targeting pulmonary vein and superior vena cava for persistent atrial fibrillation

9th Asia-Pacific Heart Rhythm Scienti

5.Hironori Ishiguchi , Yasuhiro Yoshiga ,  
Takeshi Ueyama , Makoto Ono , Tomoko  
Fumimoto ,Akihiko Shimizu ,Masafumi Yano  
An impact of additional cavotricuspid  
isthmus ablation to pulmonary vein  
isolation for paroxysmal atrial  
fibrillation

第63回日本不整脈心電学会学術集会 札幌  
2016.7

6.Yasuhiro Yoshiga , Akihiko Shimizu ,  
Takeshi Ueyama , Makoto Ono , Tomoko  
Fumimoto ,Hironori Ishiguchi ,Masafumi  
Yano

Appropriate patients and timing of  
substrate modification for persistent  
atrial fibrillation: Lesson from strict  
trigger-based sequential ablation  
strategy targeting pulmonary vein and  
superior vena cava

第63回日本不整脈心電学会学術集会 札幌  
2016.7

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大野 誠 (ONO, Makoto)

山口大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：50650321

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

なし