

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08076

研究課題名(和文)肥大型心筋症におけるリアノジン受容体安定化による新しい分子標的療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel molecular targeted therapy by stabilizing cardiac ryanodine receptors in hypertrophic cardiomyopathy

研究代表者

奥田 真一 (OKUDA, Shinichi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90530212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肥大型心筋症(HCM)では、著明な心肥大と致死性不整脈による突然死を来すハイリスク群が存在するが、現時点で疾患特異的な薬物療法は存在しない。本研究では致死性不整脈に深く関わる拡張期の心筋細胞内Ca²⁺濃度上昇に着目した。その結果、リアノジン受容体(RyR2)のCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIリン酸化とそれに伴うカルモジュリンのRyR2からの解離を介した異常なCa²⁺漏出による拡張期のCa²⁺濃度上昇がみられること、RyR2安定化によるCa²⁺漏出の抑制を介した心筋筋小胞体機能の改善により拡張期のCa²⁺濃度上昇を防ぐことで、致死性不整脈誘発を抑制し得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥大型心筋症(HCM)では著明な心肥大とともに致死性不整脈による突然死を来すハイリスク群が存在する。現在、不整脈発生時には植え込み型除細動器による電氣的除細動や一般的な心室性不整脈に対する薬物療法が行われるが、疾患特異的な薬物療法は存在しない。本研究では、HCMでの致死性不整脈に深く関わる心筋細胞内カルシウム動態異常に着目した。その結果、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII活性化を介したリアノジン受容体(RyR2)からの異常なカルシウム放出が病態の一因で、RyR2安定化により病態を改善し得る可能性がある事が判明した。この知見は、将来の治療法につながる重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：In hypertrophic cardiomyopathy (HCM), there is a high-risk group that causes sudden death due to lethal arrhythmia along with cardiac hypertrophy; however, no disease-specific drug therapy was currently presented. This study focused on the increase in intramyocardial Ca²⁺ concentration during diastole, which is closely related to lethal arrhythmias in HCM. The results showed that Ca²⁺ concentration increases during diastole due to abnormal Ca²⁺ leakage via Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor (RyR2) and subsequent dissociation of calmodulin from RyR2 and that RyR2 stabilization suppresses Ca²⁺ leakage. These results suggest that RyR2 stabilization may prevent the increase in diastolic Ca²⁺ concentration by improving myocardial sarcoplasmic reticulum function, thereby preventing the induction of lethal arrhythmias.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥大型心筋症 リアノジン受容体 カルシウム依存性カルモジュリンキナーゼ カルモジュリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症(HCM)では、著明な心肥大とともに致死性不整脈により突然死するハイリスク群が存在する。HCMにおいて、心筋収縮蛋白が遺伝子変異によりカルシウム(Ca^{2+})感受性を増強することで拡張能が低下することは報告されているが、不整脈や心肥大の発症機序に関しては未だ不明である。これまでわれわれは、不全心筋やカテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)では、心筋型リアノジン受容体(RyR2)内のN末端とcentralの2ヶ所の重要なドメイン間に生じる連関障害(Unzipping)と連動してRyR2からカルモジュリン(CaM)が解離し、チャネルが不安定化することにより、心筋筋小胞体からの異常な Ca^{2+} leakが生じて、心不全や不整脈につながることを報告してきた。さらに、骨格筋型RyR1の1アミノ酸変異病である悪性高熱症の治療薬であるダントロレン(DAN)は、ドメイン連関障害を是正して Ca^{2+} leakを抑制すると共に、心不全の進行や致死性不整脈をも抑制することも見出した。一方、この Ca^{2+} leakは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII(CaMKII)によるRyR2のリン酸化によっても生じるが、そのCaMKIIのリン酸化部位(Ser2815)は、三次元的にちょうど前述のドメイン連関の中央に位置しており、CaMKIIによるSer2815のリン酸化は直接ドメイン連関障害をきたしている可能性が高いと考えられてきたが、その詳細な関連性は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、HCMモデルマウスおよびCaMKIIトランスジェニックマウスを用いて、Myofilamentの Ca^{2+} 感受性の増強による Ca^{2+} バッファー効果の増大、拡張期 Ca^{2+} 濃度の上昇、CaMKII活性化、心筋筋小胞体(SR)のRyR2からの Ca^{2+} leak発生、という一連の Ca^{2+} ハンドリング異常が催不整脈性や心肥大を生じる重要な機序であるとの仮説を検証し、RyR2の安定化により Ca^{2+} leakを抑制するというHCMの新たな治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1)使用した3つのマウスモデルと薬物投与；本研究では3つのマウスモデルを使用した。つまり、a)既に報告のあるTnT2の160欠損型のHCM型TnTトランスジェニックマウス(HCM-TG)、b)新規に作成したCaMKII cの過剰発現マウス(CaMKII-TG)；マウス及び心臓の構造的解析を行った。c)新規に作成した、RyR2の点変異によりRyR2へのCaM結合能を増加させたRyR2^{V3599K+/-}ノックインマウス(CaM-HA)。なお、DANの慢性投与は、20mg/日の腹腔内投与または100mg/体重/日の経口投与で投与した。この量のDAN慢性投与は、腹腔内・経口投与いずれもカテコラミン誘発性心室頻拍モデルマウスにおいて運動誘発性の持続性心室頻拍の頻度を有意に抑制した。
- (2)心筋細胞の単離；全身麻酔下でマウス心筋細胞を単離した。単離前にコーティングしたdishに単離心筋細胞をまき、 Ca^{2+} 濃度を調整した上で培養し、実験に使用した。コントロール、低用量イソプロテレノール(強心薬)負荷において検討を行った。
- (3)心筋細胞を用いたCell shorteningと Ca^{2+} イメージング測定；心筋細胞のCell shortening(CS)は、2Hzでペーシング刺激して記録した。蛍光指示薬Fluo-4 AMを使用し、以下の Ca^{2+} イメージング測定を行った。a) Ca^{2+} spark測定；共焦点顕微鏡を使用して Ca^{2+} sparkを測定し、データ解析には自動解析プログラムのSparkMasterを使用、b) Spontaneous Ca^{2+} transient(sCaT)；心筋細胞を1~5Hz、20拍ずつペーシングした後の10秒間に生じるペーシングによらない自発的な Ca^{2+} トランジエントをSpontaneous Ca^{2+} transientと定義し、その発生頻度を計測。
- (4)ウェスタンブロットティング；心筋懸濁液(Cardiac homogenate)または筋小胞体(SR)を用いて

RyR2, RyR2のCaMK リン酸化部位であるSerine2814、RyR2のPKA(Protein kinase A)リン酸化部位であるSerine2808、CaMK、CaMK のリン酸化部位であるThr287、GAPDHに対してウェスタンブロットングを行った。

(5)RyR2 に対する内因性および外因性 CaM の結合能についての免疫細胞化学的解析；内因性 CaM 結合性は単離した心筋細胞を固定し Anti-CaM 抗体および anti-RyR 抗体を用いて免疫細胞化学的に、外因性 CaM 結合能は蛍光標識した CaM を加えることにより共焦点顕微鏡で評価した。

4 . 研究成果

(1) HCM-TG における細胞内 Ca^{2+} 動態異常と CaMKII 阻害薬、RyR2 安定化薬(ダントロレン：DAN)の効果：家族性肥大型心筋症で見られる点変異を模し、既にヒトの HCM 患者で見られる錯綜配列を有することが判明している HCM-TG の単離心筋細胞では、細胞内 Ca^{2+} 動態異常を反映した Ca^{2+} transient の異常、RyR2 機能異常により生じる Ca^{2+} spark 頻度の増加、催不整脈性を示す sCaT の増加傾向がみられ、強心薬負荷でその傾向はさらに顕在化した。また、DAN の投与ではそれらの異常が著明に改善した。また、HCM-TG では、RyR2 での CaMKII のリン酸化が増加し、チャネル機能異常に寄与していた。CaMKII 阻害薬と DAN の投与では、 Ca^{2+} transient の異常と Ca^{2+} spark 頻度は改善した。

(2) CaMKII 過剰発現マウス(CaMKII-TG)における RyR2 機能の異常とその機序および DAN の効果： CaMKII-TG では、ウェスタンブロットで RyR2 での CaMKII リン酸化が著明に増加し、RyR2-CaM 結合能評価の結果から RyR2 からカルモジュリン(CaM)が解離すること、その結果、左室駆出率が低下することがわかった。単離心筋細胞では、心筋細胞短縮率の低下と細胞内 Ca^{2+} 動態異常がみられた。DAN の 1 ヶ月間の慢性投与では RyR2 の CaM 結合能の改善とともに低下した心機能が改善した。DAN の急性投与で細胞内 Ca^{2+} 動態の改善がみられたことから、RyR2 安定化を介して慢性期に心機能改善をもたらすことが示唆された。なお、CaMKII リン酸化の程度は変化しなかったことから、DAN による RyR2 安定化は CaMKII のリン酸化を介したのではないことが判明した。つまり、RyR2 機能異常には CaMKII リン酸化が深く関わっているが、その改善には構造的に RyR2 のより下流に結合部位がある CaM の結合能の増加によりもたらされることがわかった。

(3)肥大心における心肥大、不整脈への RyR2 安定化による治療介入

HCM では心肥大がみられるが、RyR2 の点変異により RyR2 への CaM 結合能を増加させたノックインマウス(CaM-HA)を用いて作成した圧負荷心肥大-心不全(TAC)モデルでは、圧負荷に対して肥大シグナルの活性化の抑制を介した心肥大および心不全発症の抑制がみられた。一方、コントロールマウスを使用した TAC モデルにおける DAN 慢性投与でも RyR2 への CaM 結合能を増加させ、圧負荷で見られる肥大シグナルの活性化を抑制して心肥大/心不全の進行が抑制されることがわかった。また、コントロールマウスを使用した TAC モデルでは、エピネフリン誘発による心室頻拍(VT)頻度が増加するが、DAN の投与により、RyR2 安定化を介して VT 誘発頻度は有意に抑制された。

以上のことから、HCM では CaMKII リン酸化による RyR2 機能異常がその病態に深く関わっていること、また HCM および肥大心では、DAN および遺伝子改変による RyR2-CaM 結合能の増加による RyR2 安定化を介した細胞内 Ca^{2+} 動態の改善が、心肥大、心不全および致死性不整脈の誘発の抑制を来たしうる可能性が示唆された。本研究で得られた知見は、HCM および肥大心において、今後の治療法につながる重要な成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tमितani Masaki, Yamamoto Takeshi, Yamamoto Naoki, Fujisawa Koichi, Tanaka Shinji, Nakamura Yoshihide, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Takami Taro, Kobayashi Shigeki, Sakaida Isao, Yano Masafumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Dantrolene prevents hepatic steatosis by reducing cytoplasmic Ca ²⁺ level and ER stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100787 ~ 100787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Yoshihide, Yamamoto Takeshi, Kobayashi Shigeki, Tamitani Masaki, Hamada Yoriomi, Fukui Go, Xu Xiaojuan, Nishimura Shigehiko, Kato Takayoshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Yano Masafumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e126112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.126112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kohno Michiaki, Kobayashi Shigeki, Yamamoto Takeshi, Yoshitomi Ryosuke, Kajii Toshiro, Fujii Shohei, Nakamura Yoshihide, Kato Takayoshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Yano Masafumi	4. 巻 3
2. 論文標題 Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01443-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nawata Takashi, Ariyoshi Toru, Okuda Shinichi, Wada Yasuaki, Kubo Makoto, Yano Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Images in Vascular Medicine: Usefulness of carotid ultrasonography for diagnosis and management of polymyalgia rheumatica-associated large-vessel vasculitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vascular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1358863X21995582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sufu-Shimizu Yoko, Okuda Shinichi, Kato Takayoshi, Nishimura Shigehiko, Uchinoumi Hitoshi, Oda Tetsuro, Kobayashi Shigeki, Yamamoto Takeshi, Yano Masafumi	4. 巻 524
2. 論文標題 Stabilizing cardiac ryanodine receptor prevents the development of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia in Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II c transgenic mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 431 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada Yoriomi, Yamamoto Takeshi, Nakamura Yoshihide, Sufu-Shimizu Yoko, Nanno Takuma, Fukuda Masakazu, Ono Makoto, Oda Tesuro, Okuda Shinichi, Ueyama Takeshi, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 21
2. 論文標題 G790del mutation in DSC2 alone is insufficient to develop the pathogenesis of ARVC in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100711 ~ 100711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajii Toshiro, Kobayashi Shigeki, Shiba Sho, Fujii Shohei, Tamitani Masaki, Kohno Michiaki, Nakamura Yoshihide, Nanno Takuma, Kato Takayoshi, Okuda Shinichi, Uchinoumi Hitoshi, Oda Tetsuro, Yamamoto Takeshi, Yano Masafumi	4. 巻 521
2. 論文標題 Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 57 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanno Takuma, Kobayashi Shigeki, Yoshitomi Ryosuke, Fujii Shohei, Kajii Toshiro, Kohno Michiaki, Ishiguchi Hironori, Okuda Shinichi, Okada Munemasa, Suga Kazuyoshi, Yano Masafumi	4. 巻 83
2. 論文標題 Detection of Active Inflammation Status Around Ventricular Aneurysms in Patients With Cardiac Sarcoidosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2494 ~ 2504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Shigeki, Myoren Takeki, Kajii Toshiro, Kohno Michiaki, Nanno Takuma, Ishiguchi Hironori, Nishimura Shigehiko, Fukuda Masakazu, Hino Akihiro, Fujimura Tatsuhiko, Ono Makoto, Uchinoumi Hitoshi, Tateishi Hiroki, Mochizuki Mamoru, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Yoshiga Yasuhiro, Kawano Reo, Yano Masafumi	4. 巻 142
2. 論文標題 Addition of a 1-Blocker to Milrinone Treatment Improves Cardiac Function in Patients with Acute Heart Failure and Rapid Atrial Fibrillation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiology	6. 最初と最後の頁 195 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000499400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 15
2. 論文標題 Mutation-linked excessively tight interaction between the calmodulin-binding domain and c-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 905-914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2018.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda T, Yamamoto T, Kato T, Uchinoumi H, Fukui G, Hamada Y, Nanno T, Ishiguchi H, Nakamura Y, Okamoto Y, Kono M, Okuda S, Kobayashi S, Bers DM, Yano M	4. 巻 125
2. 論文標題 Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol	6. 最初と最後の頁 87-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2018.10.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoko Sufu-Shimizu, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Takayoshi Kato, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
2. 発表標題 Stabilization of CaMKII-phosphorylated RyR2 By Dantrolene Prevents the Development of Age-related Cardiomyopathy in CaMKIIc Transgenic Mice
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Sufu-Shimizu , Shinichi Okuda , Yoko Okamoto , Takayoshi Kato , Hitoshi Uchinoumi , Tetsuro Oda , Shigeki Kobayashi , Takeshi Yamamoto , Masafumi Yano
2. 発表標題 Stabilization of CaMKII-phosphorylated RyR2 By Dantrolene Prevents the Development of Age-related Cardiomyopathy in CaMKII c Transgenic Mice
3. 学会等名 Journal of Heart Failure Scientific Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Sufu-Shimizu , Shinichi Okuda , Yoko Okamoto , Takayoshi Kato , Hitoshi Uchinoumi , Tetsuro Oda , Shigeki Kobayashi , Takeshi Yamamoto , Masafumi Yano
2. 発表標題 Stabilization of CaMKII-phosphorylated RyR2 Mediated through P harmacological Enhancement of Calmodulin Binding to RyR2 Prevents the Development of Cardiac Dysfunction
3. 学会等名 Journal of Circulation Society Scientific Meeting 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Sufu-Shimizu, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Kato, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, and Masafumi Yano
2. 発表標題 Dantrolene Prevents the Development of Age-Related Cardiomyopathy by Stabilization of CaMKII-Phosphorylated RyR2 in CaMKII C Transgenic Mice
3. 学会等名 American Heart Association Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Sufu-Shimizu, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Kato, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, and Masafumi Yano
2. 発表標題 Stabilization of CaMKII-phosphorylated RyR2 prevents the development of age-related cardiomyopathy caused by transgenic CaMKII c overexpression
3. 学会等名 International Society for Heart Research 2018 Japanese Section
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Sufu-Shimizu, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
2. 発表標題 Stabilization of CaMKII-phosphorylated RyR2 by dantrolene prevents the development of age-related cardiomyopathy in CaMKIIc transgenic mice
3. 学会等名 Japanese Society of Cardiology 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------