

令和 3 年 6 月 9 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：18K08108

研究課題名(和文) リアノジン受容体内ドメイン制御による新しい不整脈、心不全治療

研究課題名(英文) Novel treatment of arrhythmia and heart failure by controlling the domain of ryanodine receptors

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はRyR2に対するCaMの結合親和性が著しく高まるアミノ酸変異を発見し、この変異を組み込んだknock-in (KI)マウス：(RyR2 V3599K KIマウス)を作成することに成功した。このマウスをR2474S CPVT型マウスと交配させることにより、カテコラミン刺激時のCaM解離は抑制され、CPVTマウスでは必発する運動誘発性心室頻拍は完全に消失した。このRyR2 V3599K KIマウスではTACによる心拡大、心肥大がほぼ完全に抑制されていた。さらに、WTマウスでは、TAC 2週間後からCaMがRyR2から解離しているのに比しKIマウスでは抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、新しい心不全、心肥大の治療法をもたらす。左心不全のみならず、肺高血圧に伴う右心不全にも応用できると考える。また、SRからのCa²⁺ leak抑制のみならず、心筋以外の組織ではERからのCa²⁺ leak抑制によりER stressを抑制できるため、アルツハイマー病、糖尿病、脂肪肝炎など様々な疾患への応用が可能となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator discovered an amino acid mutation that significantly enhances the binding affinity of CaM for RyR2, and succeeded in creating a knock-in (KI) mouse: (RyR2 V3599K KI mouse) incorporating this mutation. By mating these mice with R2474S CPVT type mice, CaM dissociation during catecholamine stimulation was suppressed, and the motor-induced ventricular tachycardia that occurs in CPVT mice completely disappeared. In this RyR2 V3599K KI mouse, cardiac enlargement and cardiac hypertrophy due to TAC were almost completely suppressed. Furthermore, in WT mice, CaM was dissociated from RyR2 after 2 weeks of TAC, whereas it was suppressed in KI mice.

研究分野：循環器内科学

キーワード：リアノジン受容体 カルモジュリン 心肥大 不整脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、不全心筋では過剰な交感神経刺激や酸化ストレスが慢性的に継続すると、RyR2 から拡張期に異常な Ca²⁺leak が生じて拡張期 Ca²⁺濃度の上昇をきたすが(Circulation 2000)、その発症の主因が、カテコラミン誘発性心室頻拍 (CPVT) でみられる点突然変異が集中した 2 か所 (N-terminal:1-600, central:2000-2500) のドメイン間の連関障害;Unzipping に見出した(Circulation 2005)。その後、ダントロレンや JTV519 はドメイン連関障害を改善させることにより心不全の進行や致死性不整脈を抑制することも報告した (Circulation 2008, J Am Coll Cardiol 2009)。さらに、この N-terminal - central (N-C) domain 連関障害は、カルモジュリン(CaM: RyR2 と結合しチャネル活性を抑制)の binding domain (CaMBD:3583-3603)と、CaM と相同性の極めて高い CaM-like domain (CaMLD: 4064-4210)との異常な連関を誘導し、CaM の RyR2 からの解離を引き起こす結果、Ca²⁺漏出を生じることを見出した(Cardiovasc Res 2010, BBRC. 2010, Cardiovasc Res 2012)。さらに最近、RyR2 からの CaM の解離は、頻拍誘発性心不全、CPVT、大動脈縮窄 (TAC) など多岐にわたる病態で認められ (BBRC 2014, Heart Rhythm 2017)、CaM の解離を抑制することが RyR2 安定化につながることから CaM は RyR2 チャネル調節のキー分子であると考えた。RyR2 内 CaM 結合部位を変異し CaM が RyR2 に結合できなくなったマウスでは著明な心拡大と肥大、収縮能の低下を呈し生後 3 週間以内に死亡したという他施設からの報告もこの考え方を支持する。

2. 研究の目的

チャネル開閉は RyR2 内の 3 つの制御系 (Domain switch:D, Transmitter:T, Gate manager:G) の構造連関により制御されており、上流の D 内点突然変異による N-C domain 連関障害も下流の T 内の点突然変異も共通して T 内の CaMBP-CaMLD 間の連関 CaM の解離という現象を介して G における Ca²⁺漏出が生じ、心不全・致死的不整脈の発症を誘導する。逆にドメイン連関を制御し、CaM の解離を抑制すれば心不全・致死的不整脈の発症を抑制しうるかを検討する。

3. 研究の方法

(1)CaM 高親和性 KI マウスの作成

我々はすでに CaMBD のペプチドに点突然変異を組み込んだペプチドを 28 種類作成した。作成する際には CaMBD と CaM の PDB file から 3 次元構造を描出しながら、作成した突然変異が新たな共有結合を生み出すように設計を試みた。作成した多数の CaMBD の変異ペプチドの中から CaM への結合が最も強いものをスクリーニングした。この方法で選んだ変異を組み込んだ CaM 高親和性 RyR2 変異を組み込んだ KI マウス作成が完了したところである。このマウスでは RyR2 と CaM の親和性が非常に高いことを確認している。

(2)CaM 高親和性 KI マウスの抗不整脈性の検討

(1)で作成中の CaM 高親和性 RyR2 変異マウスを我々が保有している 3 つの CPVT 型 KI マウス (R2474S, N4103K)とこの KI マウスの掛け合わせを行い、genotyping 後、ヘテロマウスが抗不整脈性を獲得しているか否かを検討する。我々の予備実験ではこのマウスはテレメトリーによる 24 時間 ECG モニタリング、及び epinephrine の投与で WT マウスに比べ強い不整脈耐性を示した。

(3)CPVT 型 N4103K KI マウス

我々は RyR2 内にある CaM like domain(CaMLD)に突然変異をもつ CPVT 型 N4103K KI マウスを作成し、RyR2 に対する CaM の結合親和性を検討した。その結果、N4103K KI マウスでは CaMLD の変異の結果、CaMLD が CaM binding domain(CaMBD)に強固に結合し (水晶振動子マイクロバランス法を用いて CaMLD peptide 内の N4103K 変異が CaMBD peptide への結合親和性を増強することを確認) CaM を kick-out することで CaM の親和性が低下しているか検討する。この CaM の (RyR2 に対する) 結合親和性の低下は、CPVT 型 R2474SKI マウスに見られるようなカテコラミン刺激時のみに認められる Domain Switch を介した CaM 親和性低下ではなく、Transmitter の直接的異常によるものであるため、ダントロレンが有効でないか検討する。

(4)CaM 高親和性 KI マウスの心不全耐性

N4103K KI マウスにおける TAC 作成後の左室機能、心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心肥大シグナル伝達、催不整脈性、生存率の解析：
CaM HA マウス、N4103K KI マウスに対して TAC 作成 4、8 週間後に心エコーにて左室径・壁厚、fractional shortening を計測した後、エピネフリン/運動負荷による不整脈誘発試験を行う。さらに、心筋細胞を単離培養し以下を計測する； Ca²⁺ transient、SR Ca²⁺ content、Ca²⁺ spark、cell shortening； anti-CaM, anti-GRK5, anti-HDAC4,5, anti-p-HDAC4,5 の抗体を用いた免疫染色による CaM, HDAC, GRK5 の核・細胞質内分布、リン酸化 HDAC の割合および心肥大遺伝子 (BNP, c-fos, c-jun) の発現； 蛍光ラベルした recombinant CaM(F-CaM)の細胞内導入による

RyR2 に対する CaM 結合能。予備実験では CaM HA マウスは TAC において非常に強い生存率の改善を見た。

4. 研究成果

研究代表者は RyR2 の CaM 結合ドメイン (CaMBD) に 1 アミノ酸変異を組み込んだ変異ペプチドを多数スクリーニングした結果 CaM の結合親和性が著しく高まるアミノ酸変異を発見した (図 1)。この知見をもとに、RyR2 上の CaM 結合ドメイン内で 1 アミノ酸のみを変異させることにより CaM の結合親和性が格段に高まる変異を組み込んだ knock-in (KI) マウス: (RyR2 V3599K KI マウス) を作成することに成功した。

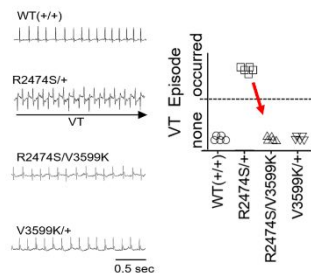


図2. トレドミル負荷による心室頻拍 (VT) 終発試験。CPVT型R2474SマウスとV3599Kマウスとの交配により作成したヘゲロマウスでは運動誘発性心室頻拍が消失した。

このマウスと CPVT 型 KI マウス (RyR2 R2474S) と交配させたところ、R2474S では、24 時間心電図記録、運動負荷試験、エピネフリン負荷試験で必発していた VT をほぼ完全に止めることに成功した (図 2)。

RyR2 V3599K マウスではカテコラミン刺激時にも RyR2 からの CaM の解離は生じていなかった。しかし suramin を用いて CaM を完全に解離させると V3599L KI マウスにおいてもチャンネルは非常に leaky になり、CaM の解離がチャンネル特性を決める非常に重要なファクターであることが分かった。 (JCI Insight. 2019)。

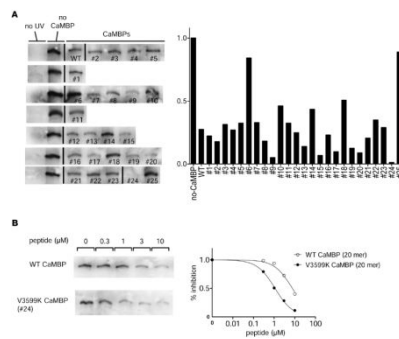


図1. CaMとの結合力が高まるCaMBP

この RyR2 V3599K KI マウスでは TAC による心拡大、心肥大がほぼ完全に抑制されていた。さらに、WT マウスでは、TAC 2 週後の早期から CaM が RyR2 から解離しているのに比し RyR2 V3599K KI マウスでは CaM 解離が抑制されていた (図 3)。興味深いことに WT マウスでは CaM 解離に伴い CaM が核内に移行していたが、RyR2 V3599K KI マウスでは抑制されていた。RyR2 から解離した CaM が核内移行し、その結果 HDAC がリン酸化され核外に出ること、さらにカルシニューリン (CaN) を介して NFATc4 の脱リン酸化をすることで各肥大遺伝子の発現が生じることを明らかにした。 (Commun Biol 2020)。

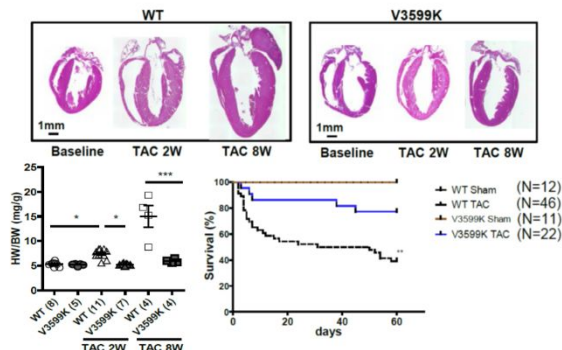


図3. V3599K変異のTAC後左室リモデリング、予後への影響。V3599KマウスではTAC後の左室肥大が抑制され、予後が改善された。

我々が開発した RyR2 から CaM が乖離しにくい RyR2 V3599K KI マウスと、西道・斉藤らが開発した次世代アルツハイマーモデルマウスを交配し double homo マウスを作成した。このマウスにおいては、認知機能が改善し、海馬における神経細胞数の減少が食い止められた。またマウス脳から単離培養した初代神経細胞において、ER stress マーカーの発現が減少した。さらに免疫染色による RyR2 と CaM の co-localization のスコアは増加を認めた。

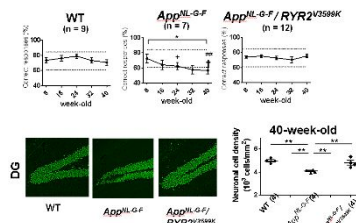


図4. V3599K変異のアルツハイマーマウスへの影響。AppNL-G-Fマウスにおける認知機能の低下はV3599Kマウスとの交配で完全に抑制できた (上段)。AppNL-G-Fマウスにおける海馬の神経細胞数減少もV3599Kマウスとの交配で完全に抑制できた (下段)。

CPVT 型 N4103K KI マウス

我々は RyR2 内にある CaM like domain (CaMLD) に突然変異をもつ CPVT 型 N4103K KI マウスを作成し、RyR2 に対する CaM の結合親和性を検討した。その結果、N4103K KI マウスでは CaMLD の変異の結果、CaMLD が CaM binding domain (CaMBD) に強固に結合し (水晶振動子マイクロバランス法を用いて CaMLD peptide 内の N4103K 変異が CaMBD peptide への結合親和性を増強することを確認) CaM を kick-out することで CaM の親和性が低下していることが判明した。この CaM の (RyR2 に対する) 結合親和性の低下は、CPVT 型 R2474SKI マウスに見られるようなカテコラミン刺激時のみに認められる Domain Switch を介した CaM 親和性低下ではなく、Transmitter の直接的異常によるものであるため、予想通り (Domain Switch に結合して Domain 関連障害を改善する) ダントロレンは無効であることがわかり Heart Rhythm に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sufu-Shimizu Y, Okuda S, Kato T, Nishimura S, Uchinoumi H, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Yano M.	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 Biochem Biophys Res Commun	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Y, Yamamoto T, Nakamura Y, Sufu-Shimizu Y, Nanno T, Fukuda M, Ono M, Oda T, Okuda S, Ueyama T, Kobayashi S, Yano M.	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 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tadaki S, Sakata Y, Miura Y, Nochioka K, Miura M, Miyata S, Asakura M, Shimada K, Yamamoto T, Fukumoto Y, Kadokami T, Yasuda S, Miura T, Ando SI, Yano M, Kitakaze M, Daida H, Shimokawa H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Factors limiting habitual exercise in patients with chronic heart failure: a multicenter prospective cohort study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 655-664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-019-01529-4	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 Kajii T, Kobayashi S, Shiba S, Fujii S, Tamitani M, Kohno M, Nakamura Y, Nanno T, Kato T, Okuda S, Uchinoumi H, Oda T, Yamamoto T, Yano M.	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 Biochem Biophys Res Commun	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, Tamitani M, Hamada Y, Fukui G, Xu X, Nishimura S, Kato T, Uchinomi H, Oda T, Okuda S, Yano M.	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 126112
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 Tamitani 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 714
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 Nakamura Yoshihide, Yamamoto Takeshi, Xu Xiaojuan, Kobayashi Shigeki, Tanaka Shinji, Tamitani Masaki, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Yano Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhancing calmodulin binding to ryanodine receptor is crucial to limit neuronal cell loss in Alzheimer disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86822-x	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3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 AHA Scientific Sessions 2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitoshi Uchinoumi, Xiaoqiong Dong, Ivanita Stefanon, Mena Said, Rogerio Faustino, Razvan L Cornea, Univ of Minnesota, Xander H.t. Wehrens, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Donald M Bers
2. 発表標題 The Difference of Calmodulin-Ryanodine Receptor Affinity Between N-terminal, Central and C-terminal RyR2-CPVT Knock-in Mice
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihide Nakamura, Takeshi Yamamoto, Shigeki Kobayashi, Masaki Tamitani, Yoriomi Hamada, Go Fukui, Xiaojuan Xu, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Kato, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Masafumi Yano
2. 発表標題 Critical Role of Ryanodine Receptor Bound Calmodulin to Prevent Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia
3. 学会等名 AHA BCVS 2019 (国際学会)
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
研究分担者	小田 哲郎 (Oda Tetsuro) (40569290)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	小林 茂樹 (Kobayashi Shigeki) (90397993)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授 (15501)	

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