

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15849

研究課題名(和文) カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)におけるリアノジン受容体異常の機序解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cardiac ryanodine receptor (RyR2) in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)

研究代表者

内海 仁志(Uchinomi, Hitoshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80815655

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)：心筋筋小胞体のカルシウムイオン(Ca)放出チャネルである心筋型リアノジン受容体(RyR2)は、カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)の原因遺伝子の1つである。CPVTの発症機序として、カテコラミン誘発性にRyR2からカルモジュリン(CaM)が解離することにより、RyR2の構造変化を介して拡張期にRyR2から異常なCa漏出(Caリーク)を生じ、致死性不整脈を引き起こすことを報告した。RyR2点突然変異の部位ごとにCaリーク発症機序が異なる可能性があるため、N末端、中央、C末端に各々変異を有するCPVTノックインマウスを用い、Caリークの発症メカニズムの差異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)では高率に突然死する症例も少なくないため、突然死予防に植込み型除細動器が用いられており、今なお決定的に有効な薬物療法はない。CPVTの発症機序をRyR2点突然変異の部位ごとに解明することで、点突然変異部位に応じたオーダーメイド薬物治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a lethal arrhythmia mainly caused by single point mutations in cardiac ryanodine receptor (RyR2). These mutations are distributed in three hot spots (N-terminal, central and C-terminal) of RyR2. Diastolic calcium (Ca) leak via RyR2 can cause ventricular arrhythmia such as CPVT. We have already showed that reduced calmodulin (CaM)-RyR2 affinity destabilizes RyR2 channel, and causes Ca leak in a central RyR2-CPVT Knock-in (KI) mouse (R2474S/+). To further understand the pathophysiology of RyR2 mutation on CaM-RyR2 affinity in N-terminal RyR2-CPVT KI mouse (R176Q/+) and C-terminal RyR2-CPVT KI mouse (R4496C/+), Our results suggest that reduced CaM-RyR2 affinity causes Ca leak in N-terminal RyR2-CPVT mutation, but C-terminal RyR2-CPVT mutation causes Ca leak independent of CaM-RyR2 affinity.

研究分野：循環器内科

キーワード：カテコラミン誘発性心室頻拍 致死性不整脈 リアノジン受容体 カルシウムリーク カルモジュリン  
ダントロレン



ナルを伝達する transmitter の役割をしているが(図 4)、点突然変異に起因するドメイン連関障害により、RyR2 に対する CaM の親和性が著明に低下し、致死性不整脈を呈することを、R2474S-KI マウスを用いて明らかにした。RyR2 に高親和性を示す GSH-CaM(CaM の N 末端に Gly-Ser-His の 3 つのアミノ酸を付加)が、R2474S-KI マウス単離心筋細胞の Ca 動態を改善し、DAD を減少させたという事実は、CaM がチャンネル開閉の鍵分子であることを強く示唆する。

## 2. 研究の目的

3 種類の CPVT ノックイン(KI)マウス(N 末端型 : R176Q-KI, 中央ドメイン型 : R2474S-KI, C 末端型 : R4496C-KI)を使用し、点突然変異部位により Ca 漏出の発症メカニズムに差異があるかを明らかにする。また、RyR2 の点突然変異部位に応じたオーダーメイド薬物治療の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

野生型(WT)と 3 種類の CPVT KI マウス(R176Q-KI, R2474S-KI, R4496C-KI)から心筋細胞を単離する。サポニン処理単離心筋細胞において、Ca 漏出の発症メカニズム(RyR2 から FKBP12.6 の解離、N 末端-中央ドメイン間連関障害、RyR2 から CaM の解離など)を調べるため、蛍光ペプチドや蛍光タンパク間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を共焦点レーザー顕微鏡にて測定する。

具体的には、

- ・ 蛍光FKBP12.6のRyR2に対する結合親和性を評価
- ・ 蛍光DpC10(点突然変異と同様のドメイン連関障害を誘導)の結合速度を測定しドメイン連関障害を評価(ドナータンパク質 : 蛍光FKBP12.6、アクセプターペプチド : 蛍光DpC10)
- ・ 蛍光CaM(外因性CaM)のRyR2に対する結合親和性を評価(ドナータンパク質 : 蛍光FKBP12.6、アクセプタータンパク質 : 蛍光CaM)

CPVT 治療薬(RyR2 安定化薬)の候補薬のひとつであるダントロレンをサポニン処理単離心筋細胞に投与し Ca spark/wave を観察し、薬物の Ca 漏出抑制効果を検証する。

## 4. 研究成果

(1) まず、野生型マウスの心臓から心筋細胞を単離し、サポニン処理した心筋細胞を用い、cAMP による PKA の活性化が CaM-RyR2 結合親和性、FKBP12.6-RyR2 結合親和性に及ぼす影響を評価した。PKA の活性化では、CaM-RyR2 結合親和性は変化しなかった(図 5A, 5B)。また、FKBP12.6-RyR2 結合親和性も変化しなかった(図 5C)。以上の結果より、野生型マウスの心筋細胞では、PKA の活性化により CaM-RyR2 結合親和性、FKBP12.6-RyR2 結合親和性は変化しなかった。

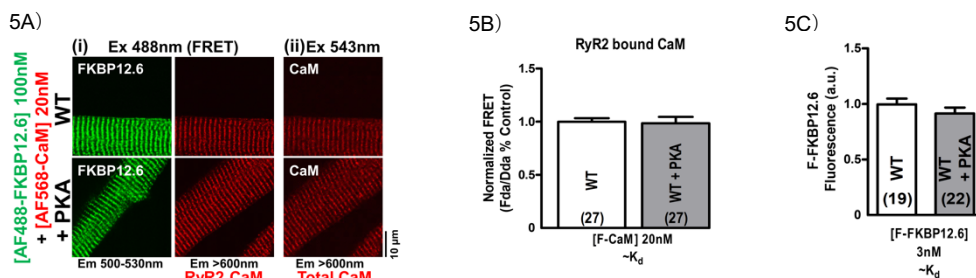
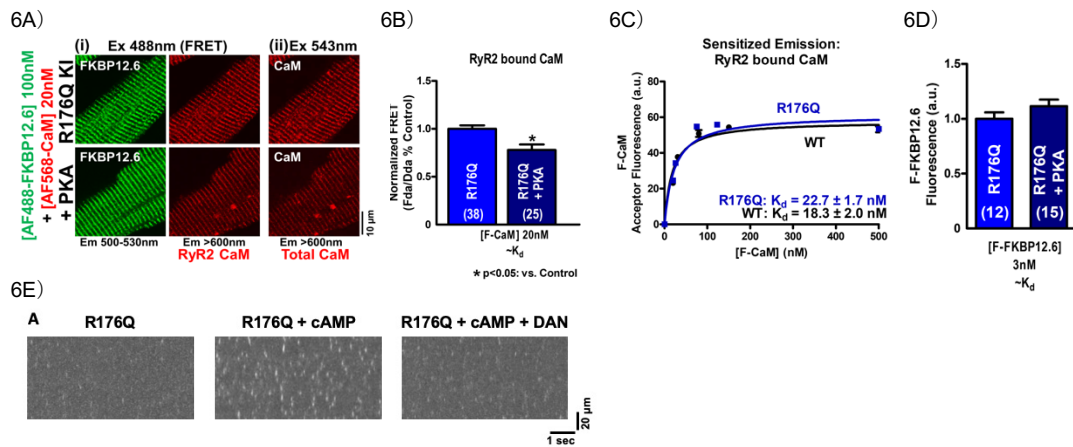


図 5. WT サポニン処理マウス単離心筋細胞において PKA の活性化が CaM-RyR2・FKBP12.6-RyR2 結合親和性に及ぼす影響

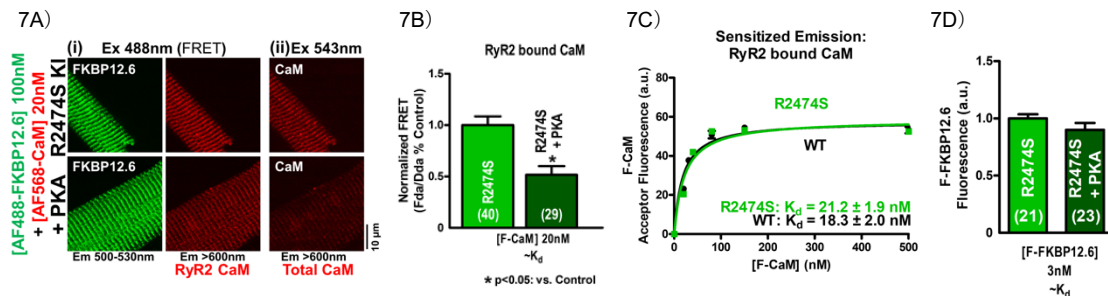
(2) 次に、N 末端型 CPVT : R176Q-KI の心臓から心筋細胞を単離した。サポニン処理した R176Q-KI の心筋細胞において、安静時に CaM-RyR2 結合親和性は低下しておらず(図 6C)、cAMP により

PKA を活性化すると、**図 6A, 6B** に示すように CaM-RyR2 結合親和性は低下した。なお、PKA の活性化により FKBP12.6-RyR2 結合親和性は変化しなかった (**図 6D**)。R176Q-KI のサポニン処理心筋細胞では、cAMP により PKA を活性化すると Ca spark の頻度は著明に増加し、ダントロレンは Ca 漏出を抑制した (**図 6E**)。



**図 6. N 末端型 CPVT: R176Q-KI サポニン処理マウス単離心筋細胞において PKA の活性化が CaM-RyR2・FKBP12.6-RyR2 結合親和性と Ca spark に及ぼす影響**

(3) さらに、中央ドメイン型 CPVT: R2474S-KI の心臓から心筋細胞を単離した。サポニン処理した R2474S-KI の心筋細胞において、安静時に CaM-RyR2 結合親和性は低下しておらず (**図 7C**)、cAMP により PKA を活性化すると、**図 7A, 7B** に示すように CaM-RyR2 結合親和性は低下した。なお、PKA の活性化により FKBP12.6-RyR2 結合親和性は変化しなかった (**図 7D**)。R2474S-KI において、ダントロレンは Ca 漏出を抑制することはすでに報告している。



**図 7. 中央ドメイン型 CPVT: R2474S-KI サポニン処理マウス単離心筋細胞において PKA の活性化が CaM-RyR2・FKBP12.6-RyR2 結合親和性に及ぼす影響**

(4) 最後に、C 末端型 CPVT: R4496C-KI の心臓から心筋細胞を単離した。サポニン処理した R4496C-KI の心筋細胞において、安静時に CaM-RyR2 結合親和性は低下しておらず (**図 8C**)、cAMP により PKA を活性化しても、**図 8A, 8B** に示すように CaM-RyR2 結合親和性は低下しなかった。また、PKA の活性化により FKBP12.6-RyR2 結合親和性は変化しなかった (**図 8D**)。また、サポニン処理単離細胞で Ca spark/wave を観察したところ、R4496C-KI は野生型と比較して、安静時でも Ca spark の頻度はやや増加しており、cAMP により PKA を活性化すると Ca wave の頻度は著明に増加した (**図 8E**)。蛍光 DPc10 の結合速度を測定しドメイン連関障害を評価すると、R4496C-KI の心筋細胞において、cAMP により PKA を活性化しても、ドメイン連関障害は生じないことが、明らかになった (**図 8F, 8G**)。

RyR2 を安定化させる CPVT 治療薬の候補として、ダントロレン、K201、CaM の結合親和性を強め

る化合物、マグネシウムなどが考えられる。本研究では、RyR2 の N 末端アミノ酸 (AA) 601-620 に結合するダントロレンは、RyR2 のドメイン連関障害を是正し、CaM-RyR2 結合親和性を強めるため、N 末端型 (R176Q) もしくは中央ドメイン型 CPVT (R2474S) には有効であるが、C 末端型 CPVT の R4496C には無効である可能性が示唆された。その機序として、CaM の RyR2 結合部位は AA:3583-3603 であり、R4496C-KI の点突然変異部位は、CaM の結合部位より下流である。すなわち、N 末端・中央ドメイン型 CPVT の発症機序と異なり、C 末端型 CPVT の R4496C-KI では、カテコラミン誘発性に RyR2 から CaM が解離せず、RyR2 の構造変化を介さず Ca 漏出を生じていると考えられる。今後は、C 末端型 CPVT の発症機序を解明し、C 末端型 CPVT に最適な治療薬を見いだせる研究を進めていく必要がある。

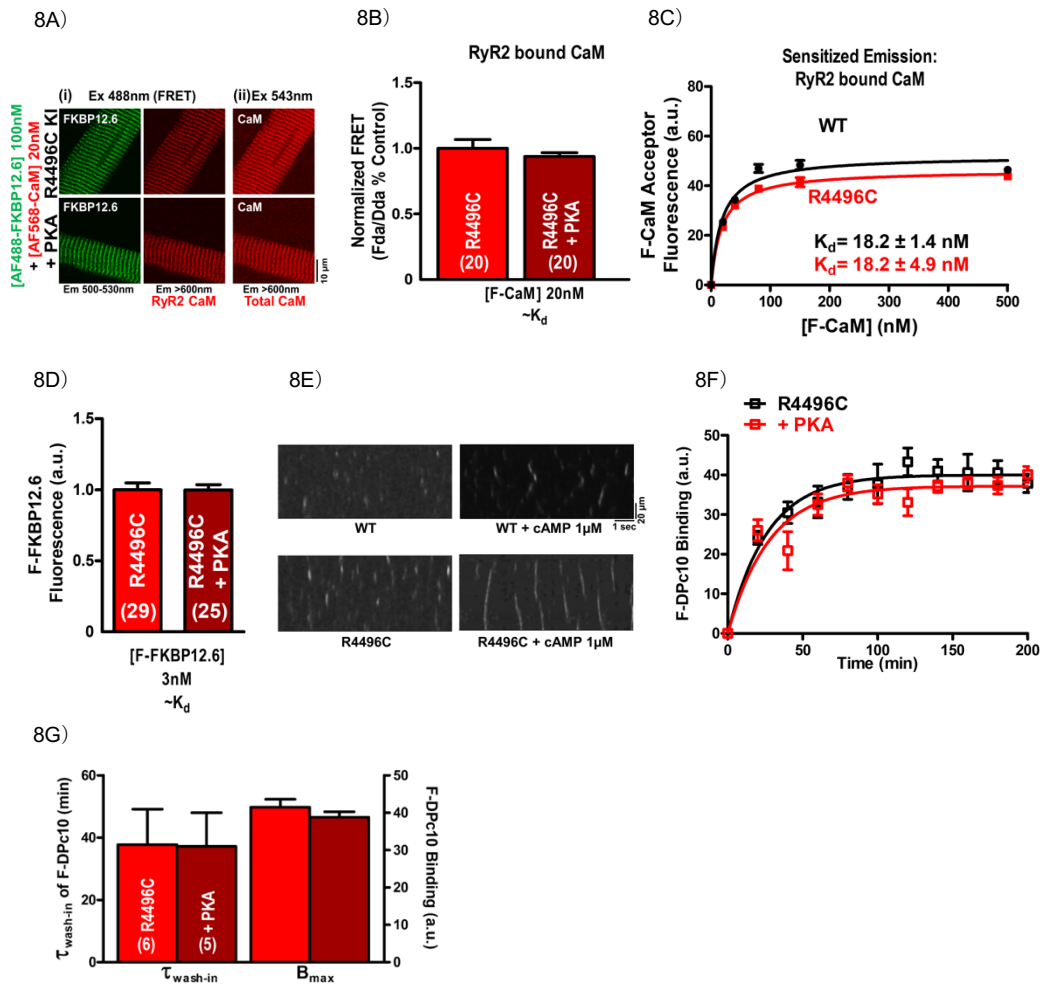


図 8. C 末端型 CPVT: R4496C-KI サボニン処理マウス単離心筋細胞において PKA の活性化が CaM-RyR2・FKBP12.6-RyR2・F-DPc10-RyR2 結合親和性と Ca spark に及ぼす影響



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1 . 発表者名 Hitoshi Uchinoumi, Xiaoqiong Dong, Ivanita Stefanon, Mena Said, Rogerio Faustino, Razvan L. Cornea, 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 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (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, Xander H.T. Wehrens, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Donald M. Bers.
2 . 発表標題 Calmodulin-RyR2 Affinity in N-terminal, Central, and C-terminal CPVT Knock-in Mice
3 . 学会等名 The 9th Asian Pacific Congress of Heart Failure (APCHF 2018) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hitoshi Uchinoumi, Xiaoqiong Dong, Ivanita Stefanon, Mena Said, Rogerio Faustino, Razvan L. Cornea, Xander H.T. Wehrens, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Donald M. Bers
2 . 発表標題 RyR2 R4496C CPVT Mutation Causes Calcium Leak Independent Of Calmodulin-RyR2 Affinity In R4496C/+ Knock-in Mouse
3 . 学会等名 The 22nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hitoshi Uchinoumi, Xiaoqiong Dong, Ivanita Stefanon, Yi Yang, Mena Said, Rogerio Faustino, Razvan L. Cornea, Xander H.T. Wehrens, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Donald M. Bers
2 . 発表標題 RyR2-R4496C C-Terminal CPVT Mutation Causes Calcium Leak Independent of Calmodulin-RyR2 Affinity
3 . 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在、論文投稿準備中。

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
---------	---------