

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08540

研究課題名(和文) カルモジュリン、GRK5の動態を標的とした心不全・動脈硬化に共通した治療法の探査

研究課題名(英文) Exploration of treatments common to heart failure and atherosclerosis focusing on ryanodine receptor bound calmodulin

研究代表者

小田 哲郎(Oda, Tetsuro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40569290

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)：心不全などの心臓疾患やアテローム性動脈硬化症の発症・進展に小胞体ストレスが深く関わっていると報告されている。

血管平滑筋細胞においてカルモジュリン(CaM)のリアノジン受容体(RyR)に対する結合親和性を高めることが、小胞体ストレスの軽減や動脈硬化巢に認められる形質転換した血管平滑筋細胞の発生抑制につながることを証明した。さらにCaMが核内へ移行することで、血管平滑筋細胞の形質転換を刺激するシグナル(MEF2、KLF5)の活性化につながることも証明した。また、RyR安定化薬であるダントロレンはCaMの核内移行を抑制、その結果MEF2、KLF5の活性を抑制し、形質転換を防ぐことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リアノジン受容体(RyR)に結合しているカルモジュリン(CaM)の結合親和性を高めることは、血管平滑筋細胞の小胞体ストレスを軽減させ、小胞体ストレス増加時にみられる動脈硬化促進の一端を担っている血管平滑筋細胞の形質転換を抑制することで、動脈硬化症の進展を抑制している可能性が示唆された。筆者らはRyR結合CaMの結合親和性を高めるダントロレンが心不全発症・進展を抑制することをすでに報告しており、RyR結合CaMに注目することで、心不全と動脈硬化症とを同時に治療できる新しい治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we used mouse VSMC line to assess whether CaM-RyR play a pivotal role in VSMCs phenotypic switching, which caused by ER stress and whether dantrolene (DAN), which enhances the binding affinity of CaM to RyR, affects VSMCs phenotypic switching. Tunicamycin (TM) was used to mimic ER stress. TM-induced ER stress caused CaM to dissociate from the RyR and translocate to the nucleus, which stimulates phenotypic switching through activation of MEF2 and KLF5. DAN suppressed TM-induced apoptosis, ER stress (restoring ER Ca²⁺ content), and phenotypic switching of VSMCs. Suramin, which directly delete CaM from RyR2, promoted nuclear CaM accumulation with parallel VSMCs phenotypic switching and DAN prevented these. ER stress causes CaM translocation to the nucleus and driving VSMCs phenotypic switching. Thus, restoring CaM-RyR binding affinity may be a therapeutic target for atherosclerosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：小胞体ストレス カルモジュリン リアノジン受容体 形質転換 カルシウムハンドリング

1. 研究開始当初の背景

(1) リアノジン受容体(RyR2)に結合しているカルモジュリン(CaM)の役割

近年、RyR2の安定化にRyR2に結合しているCaMが重要な役割を担っていることがわかり、心筋細胞質内のCa²⁺濃度の高低に関わらず、CaMはRyR2のクランプ部位とハンドル部位の隙間に結合することにより、RyR2チャンネルの開閉を安定化させ、不全心筋や致死的不整脈などにみられるRyR2からの異常なCa²⁺漏出を制御している重要なタンパク質であることが証明された。我々の圧負荷心不全モデル(マウス大動脈縮窄モデル:TACモデル)を用いた検討でも、CaMのRyR2に対する親和性は低下しており、容易に致死的不整脈を呈しており¹⁾、さらに、酸化ストレスやカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ(CaMKII)の活性化は、CaMのRyR2に対する親和性を低下させ、異常なCa²⁺漏出の増加に寄与することを証明した^{2),3)}。申請者ら以外でもRyR2に結合したCaMの重要性についての研究は多く、MeissnerらはRyR2の3つのアミノ酸を変異させCaMが結合しにくい変異RyR2を持った、すなわちRyR2からCaMが解離しているKI mouseは心肥大から心不全を経て著明に寿命が短くなることを示した⁴⁾。

(2) 心肥大のシグナルを活性化させるCaMの核内移行

CaMがRyR2から解離することによってチャンネルの開閉が不安定となり、致死的不整脈を誘発することは前述の通り数々証明されてきたが、RyR2から解離したCaMの動態や役割については成熟心筋細胞では解明されていなかった。近年、申請者らは、心肥大のシグナル活性を刺激するアンジオテンシンII(AngII)負荷により、RyR2からCaMが解離し、核内に移行することによりヒストン脱アセチル化酵素(HDAC5)の核外移行を促し、心肥大のシグナル(MEF2、NFATなど)が活性化することを証明した。またこのCaMの核内移行には後述するGRK5がキャリアーの役割を担っていることも証明した。さらに圧負荷心肥大モデル(TACモデル)マウスでも、RyR2に結合しているCaMが解離しており、核内のCaMの濃度がGRK5とともに上昇していること、HDACが核外へ移行していることを突き止めた⁵⁾。

(3) 心不全および動脈硬化症の進展に関与する小胞体ストレス応答

近年、循環器疾患、糖尿病、肥満などに小胞体ストレスが重要な役割を果たすことがわかってきており、圧負荷心不全モデルを用いた研究でも小胞体ストレスセンサーであるPERK、ATF6、IRE1などが活性化していると報告されている。小胞体内のCa²⁺濃度の減少が小胞体ストレスを惹起すると言われており、RyR2の安定化は小胞体内のCa²⁺濃度保持に貢献しており、言い換えれば、RyR2の機能が不安定となることで、異常なCa²⁺漏出が起こり、小胞体内のCa²⁺濃度が低下することで、小胞体ストレスを惹起していることが示唆される。さらにアテローム性動脈硬化症の進展および血管リモデリングにも小胞体ストレスは深く関与しているとされており、いかに小胞体ストレスを軽減できるかが心不全および動脈硬化症の発症・進展抑制に繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

細胞内Ca²⁺動態の中心を担う血管平滑筋細胞にも存在するRyR2の安定化が、血管平滑筋細胞内の小胞体ストレス応答に与える影響および血管平滑筋細胞の形質転換に与える影響についての研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マウスの培養血管平滑筋細胞を用いて、研究を行なった。

(2) 小胞体ストレス誘導剤としてツニカマイシンを、またRyR2安定化薬としてダントロレンを

使用した。培養平滑筋細胞にツニカマイシン、またはツニカマイシン+ダントロレンを添加し、細胞生存率やアポトーシスの割合、小胞体ストレスの程度などを測定した。また、平滑筋細胞の形質転換の割合、CaMの細胞内動態、形質転換を制御しているMEF2やKLF5の活性化を細胞免疫染色法にて評価した。

4. 研究成果

(1) ツニカマイシンは平滑筋細胞のアポトーシスを促進するが、ダントロレンはツニカマイシンによるアポトーシスを抑制した。

培養血管平滑筋細胞にツニカマイシンを24時間付加したところ、ツニカマイシンの濃度依存的に細胞死が認められた。またアポトーシスのマーカーである、TUNELやcaspase3陽性細胞が増加していることより、この細胞死はアポトーシスによるものであることが示唆された。さらにダントロレン付加によりツニカマイシンによるアポトーシスは抑制された(図1)。

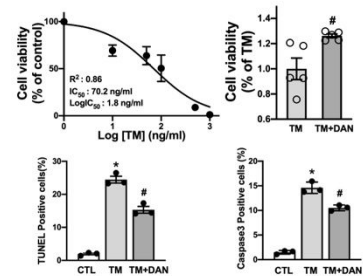


図1. ツニカマイシンによる平滑筋細胞のアポトーシスをダントロレンは抑制する
CTL: コントロール, TM: ツニカマイシン, DAN: ダントロレン

(2) ダントロレンは小胞体内のカルシウム濃度を保つことで、ツニカマイシン付加による小胞体ストレスを軽減した。

ツニカマイシンを添加した平滑筋細胞で認められた小胞体ストレスマーカーであるGRP78の上昇は、ダントロレンを添加することで抑制された。その理由として、ダントロレンはCaMのRyRに対する結合親和性を高めRyRを安定化されることで、異常なカルシウムの漏出を防ぎ、小胞体内のカルシウム濃度を保持するとされることが考えられた。よ

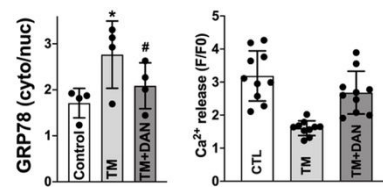


図2. ツニカマイシンによる平滑筋細胞の小胞体ストレスの増加をダントロレンは小胞体内のCa²⁺濃度を保持することで抑制する
CTL: コントロール, TM: ツニカマイシン, DAN: ダントロレン

って、小胞体内のCa²⁺濃度を測定したところ、ツニカマイシンではCa²⁺貯蔵量の減少がみられたが、ダントロレン付加によりRyR2を安定化させた結果、小胞体内のCa²⁺貯蔵量は保持されていた(図2)。

(3) ダントロレンは、ツニカマイシン付加によって引き起こされた平滑筋細胞の形質転換を抑制した。

小胞体ストレスの増加は動脈硬化巣で見られる平滑筋細胞の形質転換(分化型 脱分化型)を促進するとされている。そこで、分化型の平滑筋細胞のマーカーであるSM22やcalponin、脱分化型のマーカーであるSMembの測定を細胞免疫染色法にて評価した。その結果、ツニカマイシンを添加した細胞では、SMembの発現が上昇しており、SM22やcalponinの発現は低下していた。一方、ダントロレン+ツニカマイシン添加平滑筋細胞では、SM22やcalponinの発現が保持されており、SMembの発現は抑制されていた。このことより、ダントロレンは、小胞体ストレス増加による平滑筋細胞の形質転換を抑制することが証明された(図3)。

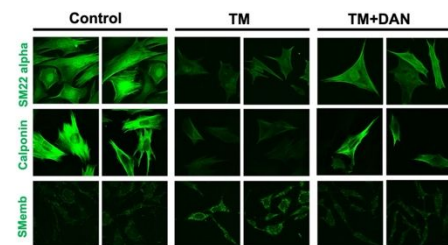


図3. ツニカマイシンによる平滑筋細胞の形質転換をダントロレンは抑制する
CTL: コントロール, TM: ツニカマイシン, DAN: ダントロレン

(4) ダントロレンはCaMの核内移行を抑制することで、MEF2-KLF5のシグナル活性を抑制し、平滑筋細胞の形質転換を抑制した。

次に、ダントロレンがなぜ小胞体ストレスによる平滑筋細胞の形質転換を抑制することができるのかという疑問を検証することとした。前述したように、ダントロレンはCaMのRyRに対する結合親和性を高めるとされる。よって、ツニカマイシンを添加した平滑筋細胞を用いて、CaMの細胞内動態を評価した。その結果、ツニカマイシンはCaMの核内移行を促進することが判明した。またこの核内へ移行したCaMがMEF2-KLF5のシグナル経路を活性化しており、ダントロレンはCaMの核内移行を抑制することで、MEF2-KLF5のシグナル活性を抑制しており、その結果、平滑筋細胞の形質転換を抑制できることが証明された(図4)。さらに、RyR2に結合しているCaMの細胞内動態と血管平滑筋細胞の形質転換が直接関与しているかを調べ

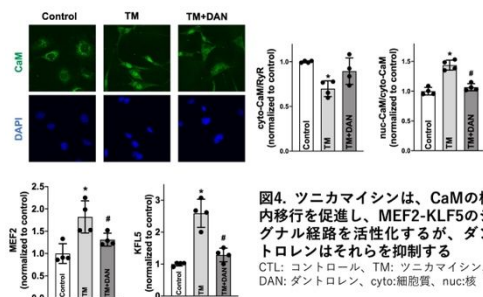


図4. ツニカマイシンは、CaMの核内移行を促進し、MEF2-KLF5のシグナル経路を活性化するが、ダントロレンはそれらを抑制する
CTL: コントロール, TM: ツニカマイシン, DAN: ダントロレン, cyto:細胞質, nuc:核

るため、RyR2からCaMの解離を促進するとされるスラミンを付加することで、血管平滑筋の形質転換が促進されるかどうかを評価した。その結果、スラミン付加により、確かにCaMは核内へ移行し、血管平滑筋は形質転換を起こしていることがわかった。さらにダントロレンはこのスラミン付加による血管平滑筋細胞の形質転換を抑制したことも証明した(図5)。

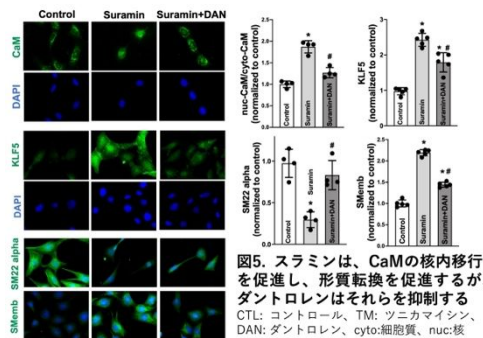


図5. スラミンは、CaMの核内移行を促進し、形質転換を促進するが、ダントロレンはそれらを抑制する
CTL: コントロール, TM: ツニカマイシン, DAN: ダントロレン, cyto:細胞質, nuc:核

RyR2結合CaMの結合親和性を高めることは、小胞体内のCa²⁺濃度を保つことで血管平滑筋細胞の小胞体ストレスを軽減させ、小胞体ストレス増加時にみられる血管平滑筋細胞の形質転換を抑制することで、動脈硬化症の進展を抑制している可能性が示唆された。筆者らはRyR2結合CaMの結合親和性を高めるダントロレンは心不全発症・進展を抑制することをすでに報告しており、RyR2結合CaMに注目することで、心不全と動脈硬化症とを同時に治療できる新しい治療法の開発が期待される。

<引用文献>

1. Kato T., Yamamoto T., Yano M., et al.: Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm*. 2017;14:120-127.
2. Oda T., Yang Y., Bers DM., et al.: Oxidation of ryanodine (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:240-248.
3. Uchinoumi H., Oda T., Bers DM., et al.: CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;98:62-72.
4. Yamaguchi N., Takahashi N., Meissner G., et al: Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel. 2007;117:1344-1353.
5. Oda T., Yamamoto T., Yano M., et al: Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. 2018;125:87-97.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小田 哲郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Medical Science Digest	5. 総ページ数 56
3. 書名 心不全治療のニューパラダイム	

〔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
---------	---------