

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390226

研究課題名(和文) リアノジン受容体内シグナル伝達改善による新しい心不全・
不整脈治療法の開発研究課題名(英文) Development of new therapy for heart failure and arrhythmia by
correction of signal transduction within cardiac ryanodine receptor

研究代表者

矢野 雅文 (YANO MASAFUMI)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90294628

研究成果の概要(和文): RyR2 における N 末端ドメインとセントラルドメイン間のドメイン連関障害によって CaM の RyR2 への結合親和性の低下が引き起こされ、結果として不全心筋における異常カルシウム放出が起こっている。このような CaM の結合親和性の低下を是正することが、心不全・不整脈における異常カルシウム放出を防ぐ新たな治療戦略となる可能性がある。

研究成果の概要(英文): The defective inter-domain interaction between N-terminal and central domains within RyR2 reduces the binding affinity of CaM to RyR2, thereby causing the spontaneous Ca²⁺ release events in diseased hearts. Correction of the defective CaM binding may be a new strategy to protect against the aberrant Ca²⁺ release in heart failure and lethal arrhythmia.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：心臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：筋小胞体、カルシウム、心不全、致死的不整脈、リアノジン受容体

1. 研究開始当初の背景

筋小胞体(SR)カルシウム放出チャネルすなわち心筋リアノジン受容体(RyR2)のチャネル異常は、心不全を引き起こす主要な因子の1つである。RyR2は細胞内Ca²⁺恒常性の調節に重要

な役割を果たしており、RyR2の欠陥は不全心における拡張期Ca²⁺漏出の原因と考えられている。

我々は以前、N末端とセントラルドメイン間のドメイン連関障害が心不全の

発症に関与することを報告した。即ち、不全心において、ドメイン unzipping, 拡張期 Ca^{2+} 漏出, SR Ca^{2+} 含有量の低下と収縮機能不全が生じることを示した。また、心保護薬である K201 (JTV519) やその類似化合物によってドメイン関連障害を是正(すなわち異常な unzipping 状態から正常な zipping 状態へ是正)すると拡張期 Ca^{2+} 漏出の頻度が減少し、不全心筋細胞の機能が改善した。これらの研究から RyR2 が心不全の発症過程において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかしながら RyR2 のドメイン関連障害に起因する構造的シグナルが、どのようにしてチャネルポアへ伝達されるかについては全く不明である。

カルモジュリン (CaM) は細胞内に広範に分布する Ca^{2+} 結合蛋白で、RyR1/2 に直接結合することで Ca^{2+} チャネル機能を調節している。CaM の結合部位は、ドメインスイッチ領域と膜貫通チャネルポア領域間の中に位置しているので、我々は RyR2 に結合した CaM が、ドメインスイッチとチャネルポア間の関連を制御しチャネルを安定化する役割を担っているが、不全心では CaM による制御が破綻しチャネルが不安定化するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

この研究では、上記仮説を証明するために犬心不全モデルにおいて N 末端 (1-600) とセントラル (2000-2500) ドメイン間のドメイン関連障害が、CaM の RyR2 への結合に及ぼす影響と Ca^{2+} 放出能に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 心不全犬モデル、CPVT 型ノックイン (KI) マウスの作成

体重 10-14kg のビーグル犬 (Kitayama Labes Co, Ltd, Nagano) を用いて、250bpm の高頻度右室ペーシングを施行し、4週間で心不全犬を作成した。また、ヒト CPVT ファミリーにおいて報告されている R2474S 変異 KI マウスを作成した

(2) ペプチドのデザインと合成

ドメインペプチド (DPc10) は RyR2 内の central domain 内の CPVT の mutation 部位を含むペプチドとしてデザインし作成した。

DPc10:

²⁴⁶⁰GFCPDHKAAMVLF~~LD~~AVYGIEVQDFLLHLLLEVGFLP²⁴
95

(3) 単離心筋細胞の準備

混合ガス (95% O_2 +5% CO_2) で通気された心筋組織培養液 (MEM ;Sigma) をコラゲナーゼ処理し心筋細胞を単離精製した。

(4) RyR2 における DPc10 結合部位の部位特異的蛍光標識

SAED:sulfosuccinimidyl

2-(7-azido-4-methylcoumarin-3-asetamide)ethyl-1,3⁻-dithiopropionate を用いて、DPc10 をキャリアーとし、SR 内の RyR2 を部位特異的に蛍光ラベルした。

(5) DPc10 結合部位に付着した methylcoumarin-3-asetamide (MCA) の蛍光消退実験

RyR2 内の制御ドメインの zipping/unzipping 状態を評価するために、RyR2 内 DPc10 結合部位を MCA ラベルした SR を用いて分子量の大きな蛍光 quencher

(BSA-QSY) による蛍光消退実験を行い、QSY-BSA の濃度と蛍光強度を測定し、Stern-Volmer plot 法を用いて quencher の accessibility を算出した。Stern-Volmer plot の傾きが quencher の accessibility を示す (傾きの増: accessibility 上昇, 傾きの減: accessibility 低下)。

(6) 単離心筋細胞における Ca^{2+} スパークの計測

サポニン処理心筋細胞の Ca^{2+} スパークは、アルゴンレーザーを備えた倒立顕微鏡 (Axiovert 100, Carl Zeiss) であるレーザー共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を用いて、Zeiss x40 油浸 Plan-Neofluor 対物レンズ (開口数 1.3; 励起波長 488 nm; 蛍光波長 > 505 nm) の設定で計測した。データは迅速で信頼性の高い自動解析ソフトである SparkMaster を用いて解析を行った。

(7) RyR2 に対する CaM 結合実験

光感受性クロスリンカーである sulfosuccinimidyl-6-[4'-azido-2'-nitrophenylamino]hexanoate (Sulfo-SANPAH, PIERCE) を用いて RyR2 に対する CaM の結合を評価し、さらに、免疫プロットにより RyR2 結合 CaM を検出した。

(8) サポニン処理心筋細胞における RyR2 に結合した外因性 CaM の定量

Alexa Fluor488 (Molecular Probes, OR) で標識された外因性 CaM を、サポニン処理した心筋細胞に加え、細胞内の局所に分布した CaM を、CaM-Alexa 蛍光強度の濃度測定した

(9) 未処置の心筋細胞における RyR2 に結合

した内因性 CaM の定量

未処置の単離心筋細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、抗 CaM 抗体 (Alexa633 ; 赤色) と抗 RyR 抗体 (Alexa488 ; 緑色) で蛍光免疫染色し RyR2 と共局在する内因性 CaM を免疫染色法によって検出した。

(10) 統計処理

異なる 2 群間の差の検定には、Unpaired t-test で行い、データは平均±標準偏差で示し、p 値が 0.05 以下を統計学的な有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 正常心筋 SR と不全心筋 SR における RyR2 に対する CaM-SANPAH の架橋

CaM に対する抗体は SR 中に含まれる他の多くのタンパクの中で RyR2 のみを検出した。すなわち、RyR2 に対する CaM の結合は非常に特異的であることが示された。また不全心筋 SR では CaM 結合の CaM 濃度依存曲線が著明に右方移動していたことから、RyR2 に対する CaM の結合親和性は、正常心筋 SR に比し不全心筋 SR で著明に低下していることが示唆された。

(2) サポニン透過処理心筋細胞における RyR2 に対する CaM-Alexa Fluor 488 の結合

CaM-Alexa の蛍光は抗 RyR2 抗体による免疫染色と共局在化していた。つまり、外的に導入された CaM は RyR2 に結合することが示唆された。またサルコメア沿いの Alexa の蛍光強度を外因性 CaM-Alexa の濃度の関数としてプロットすると、CaM 結合の濃度依存曲線は不全心筋細胞において正常心筋細胞よりも高濃度側にシフトしていた。

このデータは CaM-SANPAH の SR への結合のデータと一致するものである。一方、RyR2 における N 末端とセントラルドメイン間のドメイン連関障害を是正することで不全心筋における異常 Ca^{2+} 漏出を抑制するダントロレンを投与したところ、不全心筋 SR の RyR2 に対する CaM の結合が正常に回復した。これらのデータはドメイン連関障害（ドメイン unzipping）が RyR2 に対する CaM の結合親和性を低下させることを示唆する。

また、内因性 CaM はサルコメア沿いに検出され、RyR2 と良好な共局在化を示した。不全心筋細胞では、CaM の染色強度は FK506 非存在下であっても低下していたが、ダントロレンの添加により正常化した。

(3) 正常心筋細胞と不全心筋細胞において

RyR2 結合 CaM が Ca^{2+} スパークを制御する

不全心筋細胞において Ca^{2+} スパークは著明に増加していたが、高濃度の CaM ($1 \mu\text{mol/L}$) またはダントロレン ($1 \mu\text{mol/L}$) を投与すると、いずれの心筋細胞においても Ca^{2+} スパークは著明に抑制された。

(4) 飽和濃度の CaM はドメイン連関障害に対

して影響を及ぼさない

ドメイン unzipping の程度の目安となる Stern-Volmer plot の傾き (K_q) は不全心筋 SR において増加した。CaM ($1 \mu\text{mol/L}$) は、不全心筋 SR において K_q に何の影響も与えなかった。それに対して、ダントロレンは不全心筋 SR におけるドメイン unzipping を抑制した。これらの結果から示唆されることは、飽和濃度の CaM は、(ダントロレンと異なり) ドメイン連関を是正せずに Ca^{2+} 漏出を抑制するということである。

(考察)

本研究における最も重要な所見は、不全心では N 末端とセントラルドメイン間のドメイン unzipping により RyR2 から CaM が解離し Ca^{2+} 漏出を生じるが、ドメイン unzipping を是正し不全心筋 RyR2 へ CaM を再結合させることによって Ca^{2+} 漏出が抑制されたということである。すなわち、不全心筋 SR や不全心筋細胞のいずれにおいても、ドメイン unzipping はすでに生じており、CaM 結合親和性は低下し、 Ca^{2+} スパーク頻度は増加していた。しかしながら、ダントロレン添加によりドメイン連関障害は是正され（ドメイン unzipping → zipping）、CaM の RyR2 への結合は増大し、 Ca^{2+} スパーク頻度は減少した。興味深いことに、不全心筋細胞において飽和濃度の CaM ($1 \mu\text{mol/L}$) を加えて CaMBD における CaM 結合領域を飽和させることによっても、ドメインスイッチの状態に影響を与えることなく（つまりドメイン unzipping のまま） Ca^{2+} スパーク頻度を減少させることができた。これらの結果から、ドメイン連関障害により誘発された病的な立体構造シグナルが CaM 結合領域に伝達され、RyR2 から CaM が解離し、 Ca^{2+} 漏出を引き起こすことが示唆される。

、R2474S/+ KI マウスにおいても同様に上述のカテコラミン依存性ドメイン連関障害に起因して CaM が RyR2 より解離することを確認した。

以上の知見は心不全・致死的不整脈の共通の要因として、ドメイン連関障害に連動して CaM の結合親和性の低下 → CaM 解離 → Ca^{2+} 漏出という機序が存在することを示唆する。CaM の結合部位を変異させて RyR2 に結合出来なくした knock-in マウスが肥大型心筋症の拡張相の phenotype を示し 1 ヶ月以内に死亡する、という事実はこの機序の正当性を強く示唆する。

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9件)

- ① Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Doi M, Nao T, Yoshiga Y, Yamada J, Okamura T, Ueyama T, Kawamura S, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:29-36..
- ② Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, Suetomi T, Susa T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Yamamoto T, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2^{R2474S/+} knock-in mouse model. *Circ J.* 2010;74:2579-84. 査読有
- ③ Ono M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca²⁺ release in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010;87(4):609-17 査読有
- ④ Xu X, Yano M, Uchinoumi H, Hino A, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:660-6. 査読有
- ⑤ Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res.* 2010;106:1413-24. 査読有
- ⑥ Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1993-2005. 査読有
- ⑦ Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Matsuzaki M. Role of ryanodine receptor as a Ca(2+) regulatory center in normal and failing hearts. *J Cardiol.* 2009;53:1-7. Review.
- ⑧ Tateishi H, Yano M, Mochizuki M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Uchinoumi H,

Okuda S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective domain-domain interactions within the ryanodine receptor as a critical cause of diastolic Ca²⁺ leak in failing hearts. *Cardiovasc Res.* 2009;81:536-45. 査読有

- ⑨ Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Ikeda Y, Matsuzaki M. Defective Ca²⁺ cycling as a key pathogenic mechanism of heart failure. *Circ J.* 2008;72 Suppl A:A22-30. Review.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yano M. A genetically modified mouse model to better understand catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. (symposium) *ESC congress.* 2009.8 , Barcelona, Spain.
- ② Yano M. Ryanodine Receptor Defects in Heart Failure and Lethal Arrhythmia *Basic Cardiovascular Sciences Conference* (American Heart Association) 2009.7 , Las Vegas, Nevada, USA
- ③ Yano M. Abnormal Ryanodine Receptor Function in Heart Failure. *Basic Cardiovascular Sciences Conference* (American Heart Association) 2008.7.30 , Keystone, Co, USA

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 雅文 (YANO MASAFUMI)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90294628

(2) 研究分担者

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00260349

小林 茂樹 (KOBAYASHI SHIGEKI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90397993

(3) 連携研究者

なし