

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790726

研究課題名(和文) リアノジン受容体内ドメイン連関障害の是正による致死性不整脈治療法の開発

研究課題名(英文) Correction of the defective inter-domain interaction of cardiac ryanodine receptor prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia

研究代表者

奥田 真一 (OKUDA SHINICHI)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90530212

研究成果の概要(和文)：カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)は心臓に器質的異常を伴わない予後不良の遺伝性不整脈で、30歳までの死亡率は30-35%と予後不良である。近年CPVTに関連した心筋型リアノジン受容体(RyR2)の点突然変異が多数報告され、その致死性不整脈の原因はRyR2内のチャネル制御ドメイン連関障害による異常なCa²⁺漏出が直接誘因である。本研究では、RyR2内のドメイン連関障害を改善させることが、致死性不整脈誘発を抑制し、治療法につながりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia(CPVT) is known to be caused by single point mutation taking place in well defined regions of the cardiac ryanodine receptor (RyR2). CPVT mutation causes defective interdomain interaction of RyR2, which reduces the threshold of luminal [Ca²⁺] for channel activation, sensitizes to the protein kinase A- dependent phosphorylation, and in turn leads to CPVT. In a human CPVT-associated RyR2^{R2474S/+} knock-in (KI) mouse model, CPVT might be able to be prevented by correcting the defective inter-domain interaction of RyR2 and inhibiting Ca²⁺ leak.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科学

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：カテコラミン誘発性心室頻拍、リアノジン受容体、興奮収縮連関、カルモジュリンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

カテコラミン誘発性心室頻拍
(Catecholaminergic polymorphic

ventricular tachycardia : CPVT)は、心臓に器質的に異常を伴わない予後不良の遺伝性

不整脈であり、30歳までの死亡率は30-35%といわれている。2001年以降、CPVTに関連したリアノジン受容体(RyR2)の点突然変異が多数報告されている。突然変異 RyR2 の特徴は agonist に対する過敏性を示し、より低い Ca^{2+} 濃度で開口し leaky となる。この異常な Ca^{2+} leak が結果として細胞内 Ca^{2+} overload をきたし、それを処理するため Na^{+} - Ca^{2+} exchanger (NCX) が働き Ca^{2+} をくみ出し、 Na^{+} を流入させる。結果として膜電位は脱分極方向に傾き(delayed after depolarization)、閾値を超えると over shoot し triggered activity となって致死性不整脈を引き起こす。これまでわれわれは、上記の突然変異 RyR2 の機能異常の原因は、RyR2 内の2つの重要なチャンネル制御ドメインの連関障害(Unzipping)であり、異常な Ca^{2+} leak を引き起こすことを示してきた(Zipping-Unzipping 仮説)。また、心不全において新しいベンゾジアゼピン誘導体 K201、悪性高熱症の治療薬の Dantrolene がこの N-terminal domain と central domain の連関を修復することにより、不安定化した RyR2 を安定化することを報告した。これらのことは、RyR2 チャンネル制御ドメイン連関障害により生じる RyR2 機能異常を改善することが、心不全、致死性不整脈の治療ターゲットとなりうることを示している。一方、RyR2 チャンネル制御にはカテコラミン上昇による β 受容体を介する経路で活性化するプロテインキナーゼ A (PKA) のリン酸化のみならず、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) もそのリン酸化により RyR2 からの Ca^{2+} leak を引き起こすことが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、現有の CPVT 型 RyR2 突然変異ノックインマウス (R2474S/+; 以下 KI) を用いて、

CPVT の発症機序を解明するとともに、CaMKII (Calmodulin kinase II) の、CPVT における RyR2 のチャンネル調節異常に及ぼす影響を検討し、さらには CaMKII 阻害薬を用いて RyR2 を安定化させ、致死的不整脈の誘発抑制を目指した。

3. 研究の方法

(1) KI の作成と心機能および心筋組織所見の検討

Exon48 内の 2474(Arg) が Ser に置き換わった R2474S の RyR2 点突然変異ノックインマウス(KI)を作成し、マウス及び心臓の構造的解析を行った。また、心臓組織標本を作成し、組織学的な所見について検討した。

(2) カテコラミン負荷 (運動負荷・エピネフリン負荷) による不整脈誘発試験と RyR2 ドメイン連関障害の改善による不整脈抑制効果: イソフルレン吸入麻酔下にマウスの腹部に ECG radiotelemetry monitor (Data Science International radiotelemetry) を植え込み、回復期間後に不整脈誘発試験を行った。A) トレッドミル装置を用いた運動負荷 B) epinephrine (1mg/kg) を腹腔内注射し、A), B) で不整脈の有無を観察した。また RyR2 ドメイン連関障害を改善させる Dantrolene をあらかじめ1週間、Osmotic pump を用いて腹腔内に持続投与した後で、同様の不整脈誘発を行い不整脈誘発抑制効果の有無を検討した。

(3) 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 に単离心筋細胞をまき、 Ca^{2+} 濃度を調整した上で培養し、実験に使用した。

4) RyR2 ドメイン連関測定

RyR2 の N 末端ドメインと central ドメインの zip, unzip の状態をとらえるために分子量の大きな化学クエンチャーを作成し、そのアクセシビリティはクエンチャーと蛍光

強度を Stern volmer plot した際の傾きとして計算して RyR2 ドメイン連関測定を行った。

5) Ca²⁺ spark 測定

単離したマウスの心筋細胞に蛍光指示薬 Fluo-4 AM を用い共焦点顕微鏡を使用して Ca²⁺ spark を測定した。データ解析には自動解析プログラムの SparkMaster を用いた。

4. 研究成果

KI では運動負荷やエピネフリン負荷で心室頻拍が誘発され、その際には RyR2 はリン酸化していた。また、RyR2 内のドメイン連関は KI マウスの SR で partial な N-C ドメイン連関障害が生じており、cAMP 投与時には full unzipping となった。また、単离心筋細胞での Ca²⁺ 放出能の評価を行い、RyR2 からの局所的 Ca²⁺ 放出である Ca²⁺ spark を測定したところ、cAMP またはイソプロテレノール負荷時の KI の心筋細胞では WT に比べ、Ca²⁺ spark 頻度は著明に増加していた。一方、CaMKII 阻害薬を投与したところ、Ca²⁺ spark 頻度は減少傾向であった。イソプロテレノール投与は、Protein kinase A (PKA) のみならず CaMKII のリン酸化も増加させることから、CaMKII 阻害薬は CaMKII による RyR2 リン酸化により生じたドメイン連関障害により引き起こされた Ca²⁺ leak を抑制させる可能性が考えられた。

以上の結果から、CPVT 型 RyR2 突然変異マウスにおいて CaMKII のリン酸化による RyR2 ドメイン連関障害は致死性不整脈の誘因となりうること、CaMKII 阻害薬による RyR2 のリン酸化を抑制することで、RyR2 の安定化を介して不整脈誘発の抑制を起こしうる可能性が示唆された。

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 5 件)

- ① 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. 査読有り
- ② 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. 査読有り
- ③ 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. *Cir Res.* 2010; 106:1413-24. 査読有り
- ④ 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; 87:609-17. 査読有り
- ⑤ 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. 査読有り

[学会発表] (計8件)

- ①Hino A, Yano M, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Uchinoumi H, Susa T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. Increased Affinity of Calmodulin Binding to Cardiac Ryanodine Receptor Corrects the Defective Channel Gating in Failing Hearts
Circulation, 23 November 2010; 122: A16376. シカゴ アメリカ合衆国
- ②Fukuda M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Ono M, Uchinoumi H, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. Correction of Defective Calmodulin Binding to Cardiac Ryanodine Receptor Inhibits Aberrant Ca²⁺ Release in CPVT-associated Mutation
Circulation, 23 November 2010; 122: A14364. シカゴ アメリカ合衆国
- ③Suetomi T, Yano M, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mutation-linked Defective Domain Interaction within the Ryanodine Receptor Causes Ca²⁺ Leak Leading to Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia
Circulation, 23 November 2010; 122: A13314. シカゴ アメリカ合衆国
- ④Yamamoto T, Yano M, Fukuda M, Hino A, Suetomi T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Matsuzaki M. Interruption of Novel Inter-domain Interaction Within RyR2 as a Common Therapeutic Target by Channel Stabilization in Heart Failure and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)
Circulation, 23 November 2010; 122: A13909. シカゴ アメリカ合衆国
- ⑤Uchinoumi H, Yano M, Hino A, Suetomi T, Ono M, Xu X, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Correction of Defective Inter-domain Interaction Within the Cardiac Ryanodine Receptor as a New Therapeutic Strategy Against Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)
Circulation, 2009.11.16-18; 120: S701. オーランド アメリカ合衆国
- ⑥Kobayashi S, Tanaka T, Susa T, Ono M, Uchinoumi H, Okuda S, Doi M, Kawamura S, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Low-dose of β Blocker Improves Cardiac Function in Patients With Acute Heart Failure Partly by Inhibiting Ca²⁺ Leak Through the Ryanodine Receptor
Circulation, 2009.11.16-18; 120: S541. オーランド アメリカ合衆国.
- ⑦Xu X, Yano M, Hino A, Suetomi T, Ono M, Uchinoumi H, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ohkusa T, Matsuzaki M. Decreased Affinity of Calmodulin to RyR2 May Be a Saucer Mechanism of Leaky Channel in CPVT-associated Mutation
Circulation, 2009.11.16-18; 120: S663. オーランド アメリカ合衆国
- ⑧Suetomi T, Yano M, Hino A, Ono M, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M. Mutation-linked Channel Disorder in

Catecholaminergic Polymorphic
Ventricular Tachycardia (CPVT) is
Caused by Abnormally Tight
Domain-Domain Interaction in RyR2
Circulation, 2009.11.16-18; 120: S687.
オランダ アメリカ合衆国

[図書] (計3件)

- ①奥田真一、矢野雅文；シグナル伝達系からみた心不全の機序と治療戦略
Cardiology Frontier 2011 p129-137.
- ②奥田真一、矢野雅文；慢性心不全の治療
Medicament News 2011年
- ③奥田真一、矢野雅文；不全心筋における逆リモデリングの分子生物学的機序呼吸と循環
医学書院 2010年7月号
p657-666.

[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

奥田 真一 (OKUDA SHINICHI)
山口大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：90530212

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし