

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K08054

研究課題名（和文）カルモジュリンの核内移行制御による新しい心不全・心肥大の治療

研究課題名（英文）A new treatment for heart failure and cardiac hypertrophy by controlling calmodulin translocation into the nucleus

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）：本研究は、心筋のリアノジン受容体(RyR2)結合カルモジュリン(CaM)が、心不全、心肥大の進行に関するkey分子となることを証明し、心不全、心肥大に対する、これまでに無い治療法を確立することである。我々はMIモデルマウス、LAD結紮によるMIモデルマウス、片腎摘出+ミネラルコルチコイドタブレット植え込み+食塩負荷ラットにおいて、遺伝的に、あるいはダントロレンを用いて薬理的にRyR2に対するカルモジュリンの親和性を高めることが、心肥大心不全を抑制することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RyR2からのCaMの解離は、CPVTや頻脈誘発性心不全のみならず慢性左室圧負荷などの後天的な病態でも共通して認められる。我々はCaMはRyR2チャネル調節のkey分子であることを突き止めた。本研究ではCaM解離を遺伝的または薬理的に防ぎRyR2からのCa²⁺漏出を抑制することで、心肥大・心不全の発症の阻止を図るという極めて斬新かつ独創的な治療戦略となった。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that calmodulin (CaM) bound to myocardial ryanodine receptor (RyR2) is a key molecule in the progression of heart failure and cardiac hypertrophy, and aims to establish a novel treatment for heart failure and cardiac hypertrophy. We demonstrated that increasing the affinity of calmodulin for RyR2 genetically or pharmacologically with dantrolene suppresses cardiac hypertrophy and heart failure in MI model mice, MI model mice with LAD ligation, and unilateral nephrectomy + mineralocorticoid tablet implantation + salt-loaded rats.

研究分野：循環器内科学

キーワード：カルモジュリン リアノジン受容体 心不全 心肥大

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、Ikemoto と RyR2 のドメイン連関仮説を 2000 年にはじめて提唱した 1)。その後、点突然変異・交感神経系の過緊張・酸化ストレスなどの先天的・後天的因子に起因し、RyR2 内の N-terminal (1-600a.a) と central (2000-2500 a.a.) 間のドメイン連関障害 (zipping unzipping) が生じ、その結果 RyR2 から CaM が解離し、Ca²⁺ が漏出するという一連の現象が生じ、心不全やカテコラミン誘発性心室頻拍 (CPVT) が誘導されること、またダントロレンや JTV519 が、CaM の解離を抑制し、RyR2 内の domain 連関障害を

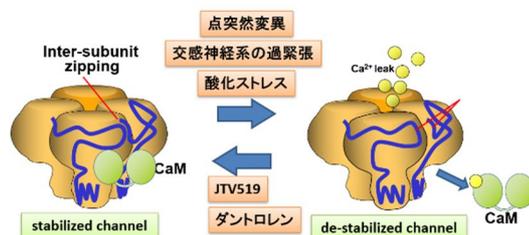


図1. 心不全・致死的不整脈の発症要因としてのリアノジン受容体機能異常点突然変異または交感神経系の過緊張・収縮期圧負荷に起因してRyR2からCaMが解離し、心不全や致死的不整脈を誘導する。

是正し、Ca²⁺漏出を阻止し、心不全・CPVT を抑制することを報告してきた 2-5) (図 1)。さらに RyR2 からの CaM 解離を選択的に抑制することで Ca²⁺漏出を阻止できたことから 6,7)、「CaM は RyR2 チャネル調節の key 分子である」と考えた。最近の 3D cryo 電子顕微鏡による解析は、我々の仮説通り N-terminal と central ドメインが近接し、サブユニット間の結合の zipping core なり、それを CaM がささえている構造が示された(図 2)。

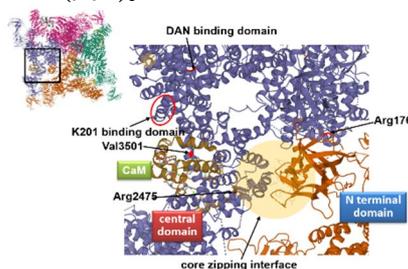


図2. 3D cryo-EMによるRyR2 N-terminal domainとcentral domain、そしてCaM binding siteが非常に近接している

さらに最近の我々の研究で、RyR2 から解離した CaM は CaMKII やカルシニューリン(CaN)を介して心肥大の転写因子の調節に重要な役割を果たすことがわかってきた。分担者の研究では心筋 Z-line 上の CaM の 90%以上は RyR2 結合型 CaM であり(Circ Res. 2014)、RyR2 は転写因子に対する重要な CaM の供給源となっている。我々の研究で、AngII 負荷時に核内に移行している CaM は RyR2 から解離したものであること 8)、TAC 手術により、心筋細胞の RyR2 から CaM が解離し、核へ移行することが明らかになっている 9)。

2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した RyR2 からの CaM の解離を遺伝的に抑制した KI マウス(RyR2 V3599K KI マウス)を用いて 10)、「RyR2 からの CaM 解離」を選択的に抑制することが、心不全・心肥大の是正につながるか、を実験的に厳格に検証する。

3. 研究の方法

(1) 後天的要因(圧負荷、心筋梗塞、高血圧性心肥大)に伴う心不全、心肥大、致死的不整脈の発症を RyR2 からの CaM 解離抑制により阻止しうるかの検証
胸部大動脈狭窄 (TAC) による慢性圧負荷あるいは LAD 結紮による心筋梗塞 (MI) 負荷をマウスに、片腎摘出+ミネラルコルチコイドタブレット植え込み+食塩負荷ラットに適用し、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、生存率を解析する。その際、(RyR2 V3599K KI による) 遺伝的および(ダントロレンによる) 薬理的な CaM 解離抑制の、心機能・催不整脈性・予後に及ぼす効果を検討する。

(2) RNAseq 解析による肥大抑制遺伝子の探査

本研究では、RyR2 の 1 アミノ酸のみを変異させた大変 pure なモデルを使用できる。我々は、TAC 後 3 日目の WT, RyR2V3599K マウス各 3 匹で左室心筋の RNAseq を行った。その結果心肥大遺伝子ばかりでなく、ER stress 関連遺伝子において RyR2V3599K マウスでは TAC においても発現が抑えられていることがわかった。

4. 研究成果

(1) MI マウスモデル実験では、WT マウスに対するダントロレン慢性投与群(MI-WT+DAN)、RyR2 V3599K 群 (MI-V3599K) とともに、MI 作成後にみられるカテコラミン負荷誘発性の心室頻拍は生じず、左室リモデリング、心筋細胞肥大も抑制され、予後は著明に改善した (図 3)。

TAC マウスモデル実験において、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

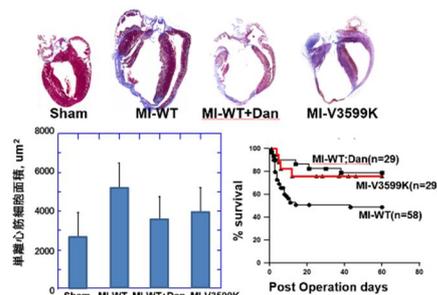


図3. ダントロレン慢性投与およびV3599K変異の心筋梗塞後左室リモデリング・心筋細胞肥大への影響

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。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 (図 4)。

片腎摘出+ミネラルコルチコイドタブレット植え込み拡張障害ラットモデルを作成したが、このモデルにおいて、ダントロレンの経口投与は左室心筋細胞の肥大を抑制するのみならず、明らかに左室の線維化を抑制し、static compliance を改善することを示した (図 5)。

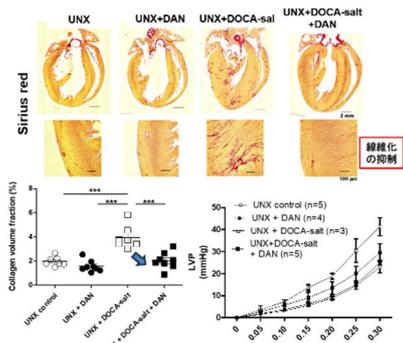


図5. UNX+DOCA=salt高血圧拡張不全ラットモデルへのダントロレンの効果 心筋の線維化の抑制とstatic complianceの改善を認めた。

KI マウスで Herpud1 蛋白が有意に多く発現しており、H9C2 細胞の Herpud1 遺伝子 knock down 実験において H9C2 細胞の有意な肥大の増悪を認め、逆に過剰発現により肥大が抑制された (図 7)。

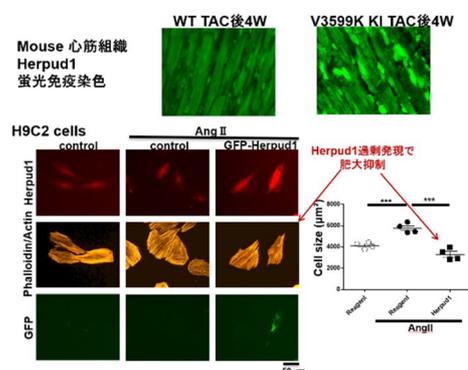


図7. TACモデルにおいてはV3599K KIマウスでHerpud1が有意に多く発現し、H9C2細胞のHerpud1遺伝子過剰発現によりAngII誘発の肥大の抑制ができた。

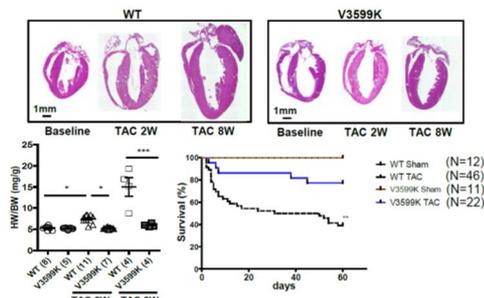


図4. V3599K変異のTAC後左室リモデリング、予後への影響 V3599KマウスではTAC後の左室肥大が抑制され、予後が改善された

(2) 我々は、WT の TAC では LV での発現が sham と同等で、RyR2V3599K マウスの TAC においてでは sham よりも LV での発現が 4 倍を超え、かつ TPM が 8 以上ある遺伝子を 32 個 pick up した (図 6)。我々は、このうち Herpud1 遺伝子に着目した。TAC モデル左室心筋においては V3599K

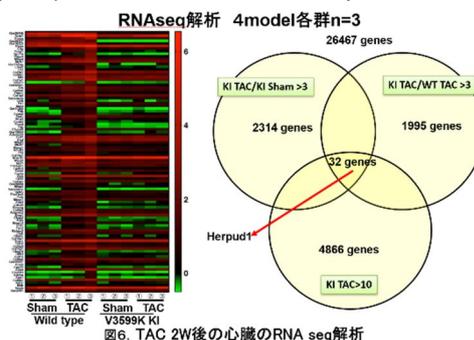


図6. TAC 2W後の心臓のRNA seq解析

引用文献

- Ikemoto N, Yamamoto T. Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2000 Oct;10(7):310-6.
- Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, Ohkusa T, Ikeda Y, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation.* 2005 Jun 28;111(25):3400-10.
- Hino A, Yano M, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Murakami W, Susa T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res.* 2012 Dec 1;96(3):433-43.
- Yano M, Okuda S, Oda T, Tokuhisa T, Tateishi H, Mochizuki M, Noma T, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation.* 2005 Dec 6;112(23):3633-43.
- Mochizuki M, Yano M, Oda T, Tateishi H, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca2+ leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Apr 24;49(16):1722-32.
- Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 May 23;448(1):1-7.
- Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Sufu Y, Hamada Y, Maeda T, Nishimura S, Ishiguchi H, Murakami W, Fukuda M, Xu X, Hino A, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Correction of impaired calmodulin binding

to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm*. 2017 Jan;14(1):120-127.

8. Oda T, Yamamoto T, Kato T, Uchinoumi H, Fukui G, Hamada Y, Nanno T, Ishiguchi H, Nakamura Y, Okamoto Y, Kono M, Okuda S, Kobayashi S, Bers DM, Yano M. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 Dec;125:87-97.

9. Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T, Yoshitomi R, Kajii T, Fujii S, Nakamura Y, Kato T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Watanabe K, Mizukami Y, Yano M. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol*. 2020 Nov 26;3(1):714.

10. Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, Tamitani M, Hamada Y, Fukui G, Xu X, Nishimura S, Kato T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Yano M. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight*. 2019 Jun 6;4(11):e126112.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujii Shohei, Kobayashi Shigeki, Chang Yaowei, Nawata Junya, Yoshitomi Ryosuke, Tanaka Shinji, Kohno Michiaki, Nakamura Yoshihide, Ishiguchi Hironori, Suetomi Takeshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Okamura Takayuki, Yamamoto Takeshi, Yano Masafumi	4. 巻 178
2. 論文標題 RyR2-targeting therapy prevents left ventricular remodeling and ventricular tachycardia in post-infarction heart failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 36 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2023.03.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nawata Junya, Yamamoto Takeshi, Tanaka Shinji, Yano Yasutake, Uchida Tomoyuki, Fujii Shohei, Nakamura Yoshihide, Suetomi Takeshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Dantrolene improves left ventricular diastolic property in mineralcorticoid-salt-induced hypertensive rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101449 ~ 101449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2023.101449	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 Fujioka Riko, Yamamoto Takeshi, Maruta Akihiro, Nakamura Yoshihide, Tominaga Naomi, Inamitsu Masako, Oda Tetsuro, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 652
2. 論文標題 Herpud1 modulates hypertrophic signals independently of calmodulin nuclear translocation in rat myocardium-derived H9C2 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 61 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yano Yasutake, Kobayashi Shigeki, Uchida Tomoyuki, Chang Yaowei, Nawata Junya, Fujii Shohei, Nakamura Yoshihide, Suetomi Takeshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Yamamoto Takeshi, Yano Masafumi	4. 巻 642
2. 論文標題 Stabilizing cardiac ryanodine receptor with dantrolene treatment prevents left ventricular remodeling in pressure-overloaded heart failure mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 175 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Shigeki, Yamamoto Takeshi, Yoshiga Yasuhiro, Okamura Takayuki, Kawano Reo, Yano Masafumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Stabilizing Tetrameric Structure of Ryanodine Receptor Cures Lethal Arrhythmia in Heart Failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 e011220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCEP.122.011220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Tomoyuki, Oda Tetsuro, Yamamoto Takeshi, Inamitsu Masako, Sakai Chihiro, Uchinoumi Hitoshi, Suetomi Takeshi, Nakamura Yoshihide, Okamoto Yoko, Tateda Satomi, Fujii Shohei, Tanaka Shinji, Nawata Junya, Okamura Takayuki, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 628
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress promotes nuclear translocation of calmodulin, which activates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 155 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nawata Takashi, Sakai Hiroki, Honda Takeshi, Otsuka Marina, Fujita Hina, Uchinoumi Hitoshi, Kobayashi Shigeki, Yamamoto Takeshi, Asagiri Masataka, Yano Masafumi	4. 巻 624
2. 論文標題 Dantrolene, a stabilizer of the ryanodine receptor, prevents collagen-induced arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 141 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.07.111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Chihiro, Mikawa Mei, Yamamoto Takeshi, Uchida Tomoyuki, Nakamura Yoshihide, Akase Hideaki, Suetomi Takeshi, Tominaga Naomi, Inamitsu Masako, Oda Tetsuro, Okamura Takayuki, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 623
2. 論文標題 Dantrolene reduces platelet-derived growth factor (PDGF)-induced vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation following vascular injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 51 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.07.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikawa M, Sakai C, Yamamoto T, Nakamura Y, Tanaka S, Tominaga N, Inamitsu M, Oda T, Kobayashi S, Yano M	4. 巻 30
2. 論文標題 Herpud1 suppress angiotensin II induced hypertrophy in cardiomyocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 101248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka S, Yamamoto T, Mikawa M, Nawata J, Fujii S, Nakamura Y, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Uchinomi H, Oda T, Okuda S, Okamura T, Kobayashi S, Yano M	4. 巻 S1547
2. 論文標題 Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, reduces the development of ventricular arrhythmias, and improves prognosis in pulmonary hypertension.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2022.02.003	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 Maruta A, Sakai C, Mikawa M, Akita H, Inamitsu M, Fujioka R, Saiki Y, Yamamoto T	4. 巻 68
2. 論文標題 Low-cost and High-Precision Stepping Motor Controlled Multi-Point Automatic Time-Lapse Microscope.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 the Bulletin of the Yamaguchi Medical School	6. 最初と最後の頁 41-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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, Xu X, Kobayashi S, Tanaka S, Tamitani M, Saito T, Saido TC, Yano M	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 Sci Rep.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shinji Tanaka, Takeshi Yamamoto, Junya Nawata, Shohei Fujii, Yoshihide Nakamura, Michiaki Kohno, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano
2. 発表標題 Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, and improves prognosis in pulmonary hypertension
3. 学会等名 第38回国際心臓研究学会日本部会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mei Mikawa, Takeshi Yamamoto, Chizuru Sakai, Riko Fujioka, Akihiro Maruta, Yoshihide Nakamura, Masako Inamitsu, Naomi Tominaga, Masahumi Yano
2. 発表標題 The role of Herpud1 as a anti-hypertrophic gene in cardiomyocytes
3. 学会等名 第38回国際心臓研究学会日本部会総会
4. 発表年 2021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・講師 (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
---------	---------