

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15686

研究課題名（和文）カルモジュリン制御による新しい肺高血圧治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for pulmonary hypertension by controlling calmodulin

研究代表者

中村 吉秀（Nakamura, Yoshihide）

山口大学・医学部・助教（特命）

研究者番号：80933481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はCaMのRyR2への結合を強固にすることにより、圧負荷がかかる状況下でも右室肥大から右心不全への進展を抑制し予後を改善させる治療を目的とした。

MCT誘発性ラットモデルにおいてダントロレンは、RyR2からのCaMの解離抑制を介して、右室心筋の肥大を抑制しつつ、右心機能を保ち、著しく予後を改善した。肺動脈縮窄（PAB）ラットモデルにおいて、ダントロレンの投与は、右室心筋の肥大を抑制し、右心機能を維持した。一方で、我々が開発したCaMのRyR2へのみの親和性を高めたRyR2 V3580K SD-ratでは、効果は認めなかった。このラット自体に問題があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、RyR2に対するCaMの結合親和性増強、CaM解離、Ca²⁺漏出抑制、右心肥大抑制、右心不全の阻止、という明確な機序に基づき、従来の肺血管抵抗でなく、右室機能保持をターゲットとした点が意義がある。PAHは今なお難病に分類され生命予後も不良な難治性疾患であり、新規治療法の開発は喫緊の課題である。この点、ダントロレンは安全性が高く、従来の血管拡張療法との併用も可能である点でも、本研究は臨床的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a treatment that would inhibit the progression of right ventricular hypertrophy to right heart failure even under pressure overload, thereby improving prognosis, by strengthening the binding of CaM to RyR2.

In an MCT-induced rat model, dantrolene inhibited right ventricular myocardial hypertrophy while maintaining right heart function by inhibiting the dissociation of CaM from RyR2, significantly improving prognosis.

In a pulmonary artery coarctation (PAB) rat model, administration of dantrolene inhibited right ventricular myocardial hypertrophy and maintained right heart function. However, no effect was observed in the RyR2 V3580K SD-rat that we developed, in which the affinity of CaM only for RyR2 was increased. It was thought that there was a problem with these rats themselves.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺高血圧 リアノジン受容体 カルモジュリン ダントロレン

1. 研究開始当初の背景

これまでの肺動脈性肺高血圧症(PAH)の治療は肺血管抵抗をターゲットに行われてきた。3種の肺血管拡張薬のコンビネーションセラピーの登場により予後は改善している¹⁾⁻³⁾。しかし臨床の現場では右心不全、右室リモデリングが進行し、三尖弁閉鎖不全が massive になってくると、治療に難渋する。このため PAH の予後の規定因子として右心不全が大きな位置を占めているのではないかという問いが生じる。一方で右室心筋、右心機能を直接ターゲットとした治療はいまだない(図1)。

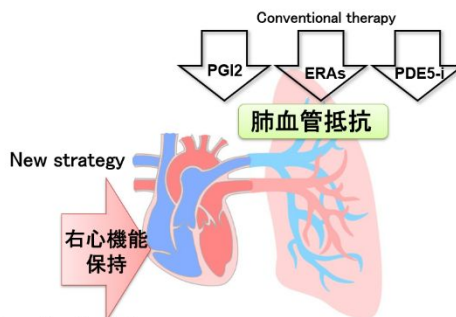


図1. 本研究の概念
肺動脈性肺高血圧症に対しての、これまでのプロスタサイクリン製剤(PGI2)、エンドセリン受容体拮抗薬(ERAs)、ホスホジエステラーゼ-5阻害薬(PDE5-i)のコンビネーションセラピーが肺血管抵抗の低下をターゲットにしていたのに対して、本研究は直接右室心筋をターゲットに右心機能を保持する治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究は PAH に対して、直接右心機能保持をターゲットとした初めての治療研究となる。我々のこれまでの研究により、心不全時の遺伝子発現の変化には RyR2 結合 CaM の RyR2 からの解離がクリティカルなトリガーであることが分かってきたことから、CaM の RyR2 への結合を薬理的にあるいは遺伝的に強固にすることにより、慢性的に圧負荷がかかる状況下でも右室肥大から右心不全への進展を抑制し予後を改善させるという全く新しい発想に基づいた治療法を確立することである。

本研究は、RyR2 に対する CaM の結合親和性増強→CaM 解離、Ca²⁺漏出抑制→右心肥大抑制→右心不全の阻止、という明確な機序に基づき、従来の肺血管抵抗でなく、右室機能保持をターゲットとした点が独自のものとなる。また、本研究においては、我々の教室で独自に開発した RyR2 上の CaM 結合ドメイン内の 1 アミノ酸を変異させ、CaM の RyR2 へのみの親和性を高めた RyR2 V3599K mouse⁴⁾のラット版 RyR2 V3580K SD-rat (図2)を用いて、作用機序が確かに RyR2 からの CaM の解離抑制を介していることを証明可能である点も独自性が高い。

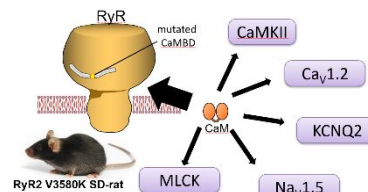


図2. RyR2 V3580K SD-ratにおいてCaMはRyR2に対してのみ高親和性

3. 研究の方法

(1)MCT 誘発性ラットモデル

モノクロタリン(MCT、60mg/kg、単回皮下注)にて PAH モデルを作成し、ダントロレン慢性投与(DAN、100mg/kg/day, p.o.)の右室肥大・拡大抑制効果、予後改善効果を検証する。

(2)肺動脈縮窄 (PAB) ラットモデル

純粋に右室の圧負荷が右室肥大・拡大、生命予後に及ぼす影響と、RyR2 からの CaM 解離→Ca²⁺漏出抑制の rescue 効果を評価する目的で、肺動脈縮窄 (PAB) モデルを作成する。

(3)遺伝的 CaM 解離抑制ラットモデル

独自に開発した RyR2 内 CaM 結合ドメイン内で「RyR2 に対する CaM 結合親和性を増強した knock-in (KI) ラット(RyR2 V3580K KI ラット): 作成済」を用いて、「RyR2 からの CaM 解離」を選択的に抑制することが、右室肥大・拡大の抑制、生命予後の改善につながるかを、実験的に検証する。

我々の研究室では、RyR2 上の CaM 結合ドメインにアミノ酸変異を加えた 24 種のペプチドのスクリーニングの結果、CaM の親和性を上げる変異を見出し、まずはマウスにおいて、RyR2 V3599K KI マウスを作成した。この RyR2 V3599K KI マウスでは、大動脈縮窄 (TAC) 後に、左室圧負荷がかかっているにも関わらず、心肥大・心拡大は抑制され生存率も著明に改善した (Comm Biol 2020)。その際、心肥大関連遺伝子変化は著明に抑制されていた。これらの結果は、(代償性、非代償性に関わらず)心肥大そのものが予後悪化因子であり、心肥大を早期から降圧とは独立して細胞内 Ca²⁺制御により抑制すれば、心機能が保持され予後改善が図れる可能性を示唆する。この RyR2 V3599K KI マウス同様の CaM 結合ドメインの変異をラットに組み込んだのが、RyR2 V3580K KI ラットである。

4. 研究成果

(1)MCT 誘発性ラットモデル

MCT 群において収縮期圧が著明に増加したが、MCT-DAN 群では若干低下しており、DAN が肺血管抵抗も若干減少させている可能性が示唆された(図3)。MCT 群では、肺動脈周囲の炎症に加えて右室の肥大・拡大を認め、さらに 42 日間で 8 割近くが肺高血圧、右心不全で死亡した(図4)。一方、DAN 投与群では肺動脈

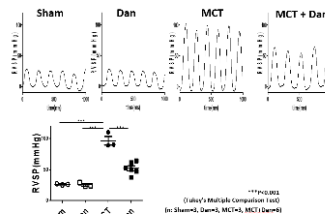


図3. MCT群では、右室収縮期圧は著明に増加し、ダントロレンの慢性投与により若干低下した。

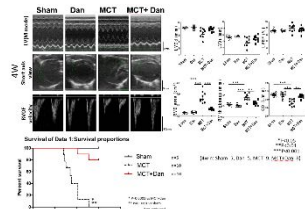


図4. ダントロン慢性投与により、MCT群でみられた右室肥大・拡大は退縮、心拍出量も増大し、死亡率は著しく低下した。

らの CaM 解離) と核内 CaM の増加が示されたが、MCT-DAN 群では CaM の移行が抑制されていた(図 6)。ここで心筋 Z-line 上の CaM の 90% 以上は RyR2 結合型 CaM であることが知られており、RyR2 は心肥大シグナル (CaMKII-HDAC 系と Ca²⁺-calcinulin 系) に対する重要な CaM の供給源となっている。

(2) 肺動脈縮窄 (PAB) ラットモデル

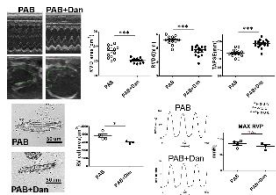


図7. ダントロン慢性投与により、右室の右下を持うことなく肺動脈縮窄に起因する右室の肥大・拡大、右室心筋細胞肥大が抑制された。

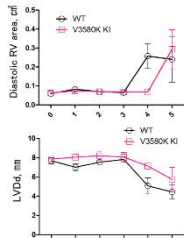


図8. MCT接種前から接種後5週のエコー画像の経時変化

図が見られたが、その後、RyR2V3580K KI においても死亡が見られ、WT と RyR2V3580K KI において Log-rank 検定で有意な差はみられなかった(図 10)。

心臓組織の HE 染色において WT と RyR2 V3580K KI で右室心筋の厚さに目立った差はなく、心重量を体重補正でも有意な差はみられなかった(図 11)。

心臓の切片を脱パラフィンして FITC 標識 WGA で蛍光染色し、細胞膜を染めた。その後 ImageJ を用いて、WGA 染色した右室心筋細胞を線で囲み、面積、長さ、体積を出した。図 12 に FITC-WGA で染色した右室心筋細胞を示す。右室心筋のサイズに有意差はなかった。

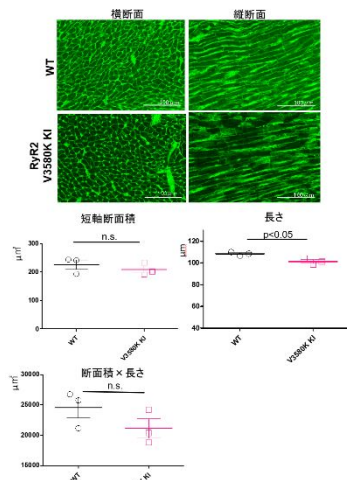


図12. 右室心筋細胞のサイズの比較

周囲の炎症は軽減し、右室の肥大・拡大は抑制され、死亡率も著明に低下した(図 4)。左室心筋細胞のサイズは各群で差はなかったが、右室心筋細胞サイズは MCT 群で大きく心肥大が示唆された。一方、MCT+DAN 群では右室心筋細胞サイズは正常にとどまっていた(図 5)。また蛍光免疫染色法により、MCT 群では z-line 上の CaM の減少 (RyR2 から

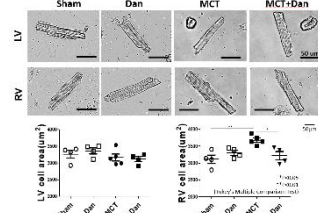


図5. ダントロン慢性投与により、MCT群でみられた右室の心筋細胞肥大が抑制された。

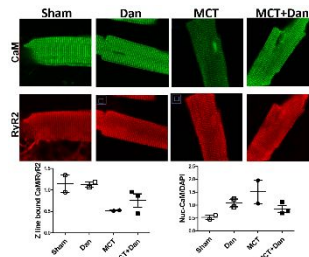


図6. ダントロン慢性投与により、CaMはZ-line上にとどまり(RyR2からのCaM解離の抑制)、核内移行が減少した。

右室収縮期圧は DAN 慢性投与の有無に関わらず PAB により同程度まで上昇していたが、DAN 慢性投与 (DAN 100mg/kg/day p.o.) により右室の肥大・拡大は抑制され、右室心筋細胞サイズも縮小した(図 7)。

(3) 遺伝的 CaM 解離抑制ラットモデル

MCT 接種後 4 週目以降 WT において、エコー像で右心室が有意に拡大し、左室は圧排され縮小していたが、RyR2V3580K KI では認められなかった(図 8)。しかし 5 週目以降には RyR2 V3580K KI においても右心室が有意に拡大し、左室は圧排され縮小していた。肺高血圧症発症により右室の Area は大きくなり、左室拡張期径は小さくなった(図 9)。MCT 接種後 4 週目の右室の Area と左室拡張期径において WT と RyR2 V3580K KI 間に有意な差がみられたが、5 週後には差はなくなった。予後解析では WT でより早期に死亡

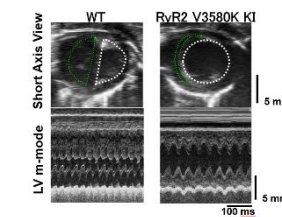


図9. MCT接種後4週のエコー像

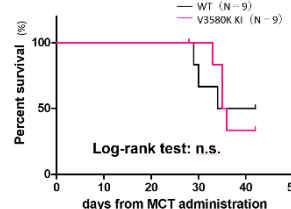


図10. 生存曲線

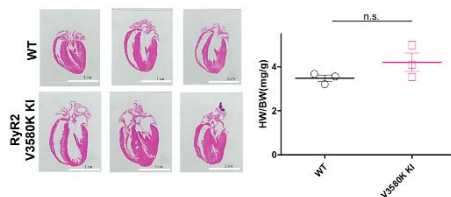


図11. MCT4週間後の心筋組織像と心筋重量

< 引用文献 >

- Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* 2018;360:j5492 doi: 10.1136/bmj.j5492
- Mandras SA, Mehta HS, Vaidya A. Pulmonary Hypertension: A Brief Guide for Clinicians. *Mayo Clin Proc* 2020;95:1978-1988 doi: 10.1016/j.mayocp.2020.04.039
- Yaghi S, Novikov A, Trandafirescu T. Clinical update on pulmonary hypertension. *J Investig Med* 2020;8:821-827 doi: 10.1136/jim-2020-001291
- Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T et al. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol* 2020;3:714 doi: 10.1038/s42003-020-01443-w

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 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 無
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 無
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, Uchinomi 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 無
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 無
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 -

〔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 藤井翔平、小林茂樹、矢野泰健、内田智之、常 耀偉、縄田純也、中村吉秀、末富 建、内海仁志、小田哲郎、岡村誉之、山本 健、矢野雅文
2. 発表標題 リアノジン受容体安定化治療が心筋梗塞後の左室リモデリングや心室頻拍を抑制する
3. 学会等名 第9回日本心筋症研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井翔平、小林茂樹、矢野泰健、内田智之、常 耀偉、中村吉秀、末富 建、内海仁志、小田哲郎、岡村誉之、山本 健、矢野雅文
2. 発表標題 心筋型リアノジン受容体 4 量体構造の安定化は心筋梗塞後の予後を改善する
3. 学会等名 第122回日本循環器学会中国四国合同地方会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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