

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390215

研究課題名(和文) 心筋細胞内カルシウム制御による心不全・心肥大・致死的不整脈の包括的治療法の確立

研究課題名(英文) Development of comprehensive treatment of heart failure, hypertrophy, and arrhythmia by regulating intracellular Ca

研究代表者

矢野 雅文 (YANO, Masafumi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90294628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：3年間でCPVT、圧負荷心肥大などにおける不整脈発生の根本がRyR2からのCaリークであり、そのリークを起こすメカニズムとしてRyR2内のチャネル制御ドメインのunzipping、そしてその下流にあるcalmodulin結合ドメインの2つが重要な役割を果たしていることがわかった。さらにチャネル制御ドメインをzipさせるdantroleneや高親和性calmodulinなどの治療法も開発した。

研究成果の概要(英文)：In this three years, we revealed that basic mechanism of arrhythmogenesis in CPVT and pressure overload HF is Ca leak from SR. The underlying mechanism of Ca leak is unzipping of channel regulatory domains and CaM binding domain. We also investigate the dantrolene, zipper of the channel regulatory domains and high affinity CaM as a therapeutic agents.

研究分野：医歯薬学

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：心不全 筋小胞体 カルシウム リアノジン受容体

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、(1) 心不全では RyR2 の構造変化による異常な Ca<sup>2+</sup>漏出が認められ、遮断薬および 1,4-benzothiazepine derivative の K201 (JTV519)はいずれも、作用点はそれぞれ異なるものの、RyR2 内の構造変化の是正という共通の機序を介して心不全時の Ca<sup>2+</sup>漏出を防ぎ、細胞内 Ca<sup>2+</sup>過負荷を改善すること (Circulation 2002, Circulation 2003, Circulation 2004)、さらに (2) この RyR2 内の構造変化を詳細に検討した結果、Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) や Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) にみられる RyR2 点突然変異集合領域 {N-terminal domain (1-600)、Central domain (2000-2500):正常では互いに関連し(domain zipping)チャネルを安定化}が、不全心筋や CPVT 型 RyR2 knock-in マウス (RyR2 R2474S/+)の心筋では、各々FKBP12.6 の解離や点突然変異により domain 関連障害 (zipping unzipping) を生じていること、(3) K201 (JTV519)、ならびに骨格筋型 RyR (RyR1) の点突然変異病である悪性高熱圧症 (MH) の特効薬のダントロレンが domain 関連を是正することにより (unzipping zipping)、Ca<sup>2+</sup>漏出を抑制することを見出した (Circulation 2005, J Am Coll Cardiol 2009, Circ Res 2010)。

2. 研究の目的

RyR2 内の構造連関の安定化により拡張期の局所的 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑制することによる新たな心不全・心肥大・致死的不整脈の包括的治療法を確立すること。

3. 研究の方法

現有の CPVT 型突然変異 RyR S2246L/+ knock-in (KI) マウス、TroponinT Glu160 欠損 HCM 型トランスジェニックマウスにおける心機能、Ca<sup>2+</sup>放出動態および催不整脈性の解析：

申請者らは、すでに犬心不全モデル (Cardiovasc Res 2010)、R2474S マウス (Circ Res 2010, BBRC 2010)において、RyR2 内構造連関 (D T G) の異常、すなわち N-C domain unzipping CaM 解離 Ca<sup>2+</sup>漏出が生じていることを明らかにしてきた。本研究ではさらに、(1) RyR2 S2246L KI マウスを用いて、点変異部位が異なっても、同様の RyR2 内構造連関異常が存在するか、また、(2) HCM 型マウスにおいても同様の連関異常が存在するかを検討する。具体的には、各モデルの baseline の心機能、催不整脈性を in vivo で評価し、心筋細胞を単離後、Fluo3 により RyR2 からの局所的 Ca<sup>2+</sup> 放出である Ca<sup>2+</sup> spark の amplitude, frequency を測定し、domain 連関 (zipping-unzipping 状態) を蛍光ラベル RyR2 に対する

Quencher (QSA+BSA) の accessibility により定量する (Circulation 2005;112:3633-43)。

さらに、Ca<sup>2+</sup> transient, 遅延型後脱分極 (DaD)、cell shortening, に及ぼす効果を検討する。

4. 研究成果

(1) S2246L+KI マウスにおいてヒトと同様の bidirectional VT の頻発を確認した (図 1)。

WT



KI

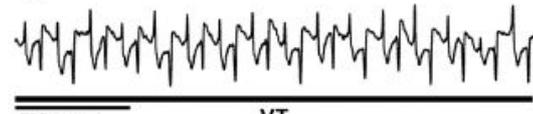


図1 S2246L の bidirectional VT

(2) S2246L においては RyR に対する DP2246 よりも DP2246mut の方が結合親和性が高く S2246L の mutation が domain-domain interaction を強めていることが示唆された (図 2)。

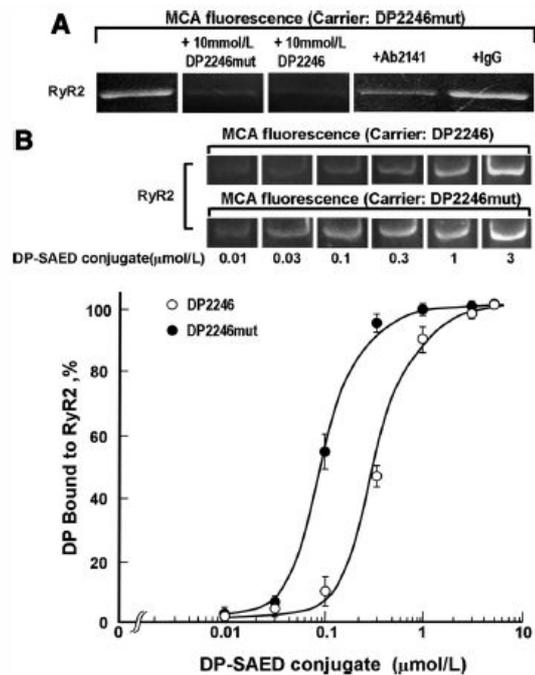


図2 RyR に対する DP2246, DP2246mut の結合

(3) R2474S+KI マウスでは、CaM の RyR2 に対する結合親和性を著しく高めた GSH-CaM は iso で誘発した Ca spark 頻度を著明に抑制した。

(4) R2474S+KI マウスの心筋細胞では GSH-CaM の導入で after transient や DAD の出現を押さえることができた。

(5) Tac モデルマウスにおいても CaM の親和性の低下が示唆された。

以上、CPVTのCa<sup>2+</sup>ハンドリング異常のメカニズムとして、RyR2内ドメイン連関障害CaM解離Ca<sup>2+</sup>漏出が示唆され、さらに心不全においても同様のメカニズムで不整脈を生じることが強く示唆された。高親和性のGSH-CaMでCa<sup>2+</sup>漏出を防ぐことにより新たな心不全・不整脈治療が可能となることが示唆された。

#### 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10件)

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. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.152

Yano M, Okuda S. Does a ripple of Ca(2+) leak develop into a rogue wave that can trigger pathological hypertrophy? *J Am Coll Cardiol*. 2014 Apr 22;63(15):1580-2. 査読有  
doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.064

Kobayashi S, Murakami W, Myoren T, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Nao T, Wada Y, Matsuzaki M, Yano M. A low-dose  $\beta$ -blocker effectively and safely slows the heart rate in patients with acute decompensated heart failure and rapid atrial fibrillation. *Cardiology*. 2014;127(2):105-13. 査読有  
doi: 10.1159/000355312

Maeda T, Okamura T, Yamada J, Nao T, Tateishi H, Yoshimura M, Oda T, Shiraishi K, Nakashima T, Nakamura T, Miura T, Yano M. Serial three-dimensional optical coherence tomography assessment of strut coverage and intraluminal structures after drug-eluting stent implantation. *Cardiovasc Interv Ther*. 2014 Jan;29(1):31-9 査読有  
doi: 10.1007/s12928-013-0209-5

Fujita T, Fujino N, Anan R, Tei C, Kubo T, Doi Y, Kinugawa S, Tsutsui H,

Kobayashi S, Yano M, Asakura M, Kitakaze M, Komuro I, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Ino H, Yamagishi M. Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan. *JACC Heart Fail*. 2013 Dec;1(6):459-66. 査読有  
doi: 10.1016/j.jchf.2013.08.007

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. 査読有  
doi: 10.1093/cvr/cvs271

Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Murakami W, Fukuda S, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Okamura T, Yano M, Matsuzaki M. Low-dose  $\beta$ -blocker in combination with milrinone safely improves cardiac function and eliminates pulsus alternans in patients with acute decompensated heart failure. *Circ J*. 2012;76(7):1646-53. 査読有

Susa T, Kobayashi S, Tanaka T, Murakami W, Akashi S, Kunitsugu I, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Ueyama T, Okamura T, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a novel biomarker for predicting cardiac events and evaluating the effectiveness of carvedilol treatment in patients with chronic systolic heart failure. *Circ J*. 2012;76(1):117-26. 査読有

Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca<sup>2+</sup> release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2011 Aug 9;124(6):682-94.

査読有

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.

Yoshida M, Ohkusa T, Nakashima T, Takanari H, Yano M, Takemura G, Honjo H, Kodama I, Mizukami Y, Matsuzaki M. Alterations in adhesion junction precede gap junction remodelling during the development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res.* 2011 Oct 1;92(1):95-105. 査読有  
doi: 10.1093/cvr/cvr182

[学会発表](計8件)

Shinichi Okuda, Masakazu Fukuda, Takayoshi Katoh, Shigehiko Nishimura, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano  
Dantrolene May Suppress Arrhythmogenesis by Inhibition of CaMKII-mediated Aberrant Ca<sup>2+</sup> Release Within the Ryanodine Receptor in Cardiac Troponin T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy  
86th Scientific Session of American Heart Association Dallas(U.S.A) 2013.11.16

Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Takeki Myoren, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Katoh, Masakazu Fukuda, Makoto Ono, Hiroki Tateishi, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano  
A Novel Selective EP4 Receptor Agonist Improves Intracellular Ca<sup>2+</sup> Handling and Cardiomyocyte Function in Intact Failing Cardiomyocytes  
86th Scientific Session of American Heart Association Dallas(U.S.A)2013.11.16

Masakazu Fukuda, Takeshi Yamamoto, Shigehiko Nishimura, Takeki Myoren, Takayoshi Katoh, Wakako Murakami, Makoto Ono, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano  
Dantrolene Inhibits Aberrant Ca<sup>2+</sup> Release and Arrhythmogenesis via Enhancing Binding of Calmodulin to RyR2 in CPVT-Associated Mutation  
86th Scientific Session of American Heart Association Dallas(U.S.A) 2013.11.16

Shigeki Kobayashi, Wakako Murakami, Takayoshi Kato, Masakazu Fukuda,

Akihiro Hino, Hiroki Tateishi, Takeshi Yamamoto, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki  
Fixing Ca<sup>2+</sup> Leakage From Cardiac Ryanodine Receptor by Low-dose of Blocker Safely Enhances Inotropic Response to Milrinone in Acute Heart Failure  
85th Scientific Session of American Heart Association Los Angeles(U.S.A)2012.11.3

Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Takamasa Oda, Hiroki Tateishi, Tomoko Nao, Jutaro Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki  
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a Novel Marker of Left Ventricular Remodelling in Patients With Dilated Cardiomyopathy  
85th Scientific Session of American Heart Association Los Angeles(U.S.A)2012.11.3

Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Tadimitsu Nakashima, Hiroki Tateishi, Shinichi Okuda, Masahiro Doi, Yasuaki Wada, Tomoko Nao, Jutaro Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki  
Elevated Myocardial Oxidative Stress Induced by Catecholamines Related to Transient Left Ventricular Dysfunction in Patients With Takotsubo Cardiomyopathy  
85th Scientific Session of American Heart Association Los Angeles(U.S.A)2012.11.3

Shigeki Kobayashi, Wakako Murakami, Seiko Fukuta, Masakazu Fukuda, Shinichi Okuda, Tomoko Nao, Masahiro Doi, Yasuaki Wada, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki  
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, An Oxidative Stress Marker, Predicts The Inflammatory Activity within the Heart in Patients with Cardiac Sarcoidosis  
85th Scientific Session of American Heart Association Los Angeles (U.S.A)2012.11.3

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 雅文 (YANO, Masafumi)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90294628

(2) 研究分担者

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