

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号： 15501  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2011~2012  
 課題番号： 23790856  
 研究課題名(和文) 肥大型心筋症の致死的不整脈に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup>制御による新しい治療法の開発  
 研究課題名(英文) The therapeutic approach of inductive lethal arrhythmia by inhibiting Ca<sup>2+</sup> leak through the cardiac ryanodine receptor in hypertrophic cardiomyopathy  
 研究代表者  
 奥田 真一 (OKUDA SHINICHI)  
 山口大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 90530212

研究成果の概要(和文)：肥大型心筋症(HCM)では、著明な心肥大とともに致死性不整脈により突然死するハイリスク群が存在する。本研究では拡張期の心筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に着目し、リアノジン受容体(RyR2)からの Ca<sup>2+</sup>漏出による拡張期の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と致死性不整脈を来す機序とが相互に深く関連性があること、Ca<sup>2+</sup>漏出の抑制による心筋筋小胞体機能の改善により拡張期の心筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を防ぐことで、不整脈誘発抑制を起こしうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypertrophic cardiomyopathy(HCM) is known to be a myocardial disorder characterized by severe hypertrophy of the left ventricle. In HCM patients, it is the cause of sudden death by lethal arrhythmia in younger age. Medical approach against inductive ventricular arrhythmia in HCM patients remains elusive. Here, we hypothesized that diastolic Ca<sup>2+</sup> leak through Ryanodine receptor (RyR2) is one of the important factor of regulating arrhythmogenesis in HCM. To verify this hypothesis, we investigated the pathogenic role of Ca<sup>2+</sup> leak through RyR2 in transgenic mouse (TG) model of Familial Hypertrophic cardiomyopathy-related cardiac troponin T mutation. Diastolic Ca<sup>2+</sup> leak through defective RyR2 is induced by beta-adrenergic stimulation in TG cardiomyocytes. Dantrolene and Calmodulin-kinaseII inhibitor can inhibit Ca<sup>2+</sup> leak by stabilizing RyR2. These results might suggest that the stabilization of RyR2 and inhibiting Ca<sup>2+</sup> leak might play a role for the pathogenesis of lethal arrhythmia in HCM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：肥大型心筋症、カルシウムハンドリング

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、心不全時には過剰な交感神経刺激や酸化ストレス刺激が慢性的に加わる結果、RyR2 から異常な Ca<sup>2+</sup>漏出が生じて拡張期の細胞 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し心機能障害や催不整脈性を引き起こすこと、β遮断薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬、抗酸化薬が機序は異なるが心不全時の 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を報告してき

た。また、カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)と心不全では RyR2 の N terminal domain と central domain 間でドメイン連関障害を生じていることを見出し Ca<sup>2+</sup>漏出を促して、結果として delayed afterdepolarization (DaD) を引き起こして催不整脈性を惹起することを明らかにした。

一方、肥大型心筋症の原因として、心筋収縮蛋白(ミオシン重鎖・軽鎖、トロポニン T、

トロポニン I、タイチンなど)に対する遺伝子の点突然変異が数多く報告され、それらのモデルマウスでは動態異常が指摘されてきた。一方、変異トロポニン T による HCM では心肥大の程度は著明ではないものの、心筋収縮蛋白のカルシウム感受性が高く、致死的不整脈による突然死の可能性が高いと報告されている。しかしながら、不整脈に対する未だに有効な特異的治療法はなく、埋め込み型除細動器 (ICD) を用いた、いわば対症療法にとどまる。

## 2. 研究の目的

肥大型心筋症 (HCM) において致死性不整脈を生じる機序として、拡張期の心筋細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に着目し、心筋筋小胞体機能の改善 ( $Ca^{2+}$  漏出の抑制、 $Ca^{2+}$  取り込みの亢進) により拡張期の  $Ca^{2+}$  濃度上昇を防ぐことで、致死性不整脈につながる細胞内シグナリングを抑制し不整脈誘発を抑制するという全く新しい治療戦略の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 拡張期の心筋細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇と心肥大との関連性の検討

① HCM における拡張期  $Ca^{2+}$  濃度上昇と心肥大との関連性の検討; 現有の TroponinT Glu160 欠損 HCM 型トランスジェニックマウスモデル (以下 TG) を用いて、コントロールおよび ISO 負荷を行い、心機能、肥大の評価、単離心筋細胞を用いた  $Ca^{2+}$  spark、 $Ca^{2+}$  transient の検討を行った。

② 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 に単離心筋細胞をまき、 $Ca^{2+}$  濃度を調整した上で培養し、実験に使用した。

③  $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$  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。

上記②, ③についてコントロール、低用量 ISO 負荷において検討を行った。

④ HCM において拡張期  $Ca^{2+}$  濃度の低下が  $Ca^{2+}$  ハンドリング、催不整脈性に及ぼす影響の検討; HCM 型 TG の心筋細胞を用いて  $Ca^{2+}$  漏出抑制効果とカルシウム動態に与える影響を検討した。すなわち、(1) RyR2 のドメイン連関障害の是正により拡張期の  $Ca^{2+}$  漏出を抑制するダントロレンを同マウスの心筋細胞に添加し、共焦点顕微鏡を用いて  $Ca^{2+}$  transient が改善されるか、また  $Ca^{2+}$  spark が抑制されるかを検討した。(2) RyR2 機能を修飾するリン酸化である、プロテインキナーゼ A (PKA) とカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) のリ

ン酸化の、RyR2 および  $Ca^{2+}$  transient や  $Ca^{2+}$  spark に与える効果を検証した。

(2) 心筋細胞内  $Ca^{2+}$  ハンドリング是正による催不整脈性抑制効果の検討

TG にダントロレンとリン酸化抑制薬を投与し、催不整脈抑制効果があるかどうかを催不整脈性の一つの指標である、Spontaneous  $Ca^{2+}$  transient を用いて検討した。

## 4. 研究成果

HCM 型 TG では、加齢に伴い軽度の心肥大と拡張機能障害を呈した。単離心筋細胞ではコントロール状態で  $Ca^{2+}$  transient の下行脚の延長を認め、 $Ca^{2+}$  spark 頻度は増加し、ISO 負荷でその傾向はさらに顕在化した。これらのことは、心肥大をきたした HCM では拡張期  $Ca^{2+}$  濃度が上昇していることを示唆している。また、ダントロレンを投与したところ、 $Ca^{2+}$  spark 頻度は著明に減少傾向であり、 $Ca^{2+}$  transient は著明に改善傾向であった。リン酸化に影響を与える PKA 阻害薬と、CaMKII 阻害薬を投与したところ、CaMKII 阻害薬でのみ  $Ca^{2+}$  spark 頻度は著明に減少傾向であり  $Ca^{2+}$  transient は改善傾向であった。また、催不整脈性の一つの指標である Spontaneous  $Ca^{2+}$  transient のダントロレンと PKA 阻害薬と、CaMKII 阻害薬における効果を検討したところ、ダントロレンと CaMKII 阻害薬においてのみ Spontaneous  $Ca^{2+}$  transient を抑制した。これらの結果は、RyR2 を介した拡張期  $Ca^{2+}$  濃度上昇と催不整脈性が強い関連性を持っていること、RyR2 直接または CaMKII のリン酸化を抑制することにより、RyR2 安定化による拡張期  $Ca^{2+}$  濃度上昇の是正が催不整脈性を抑制しうる可能性を示すものであり、今後の治療法につながる重要な成果である。

## 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 4 件)

- ① 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;96:433-43. 査読有
- ② Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Murakami W, Fukuta 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

- ③ 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
- ④ 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  $Ca^{2+}$  release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2011;124:682-94. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Okuda S, Fukuda M, Yano M, Suetomi T, Hino A, Kato T, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. CaMKII-mediated aberrant  $Ca^{2+}$  release play a key role in the arrhythmogenesis in Cardiac Troponin T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. Japanese Circulation Society Scientific Meeting 2013, March 15 2013, Pacifico Yokohama, Japan.
- ② Okuda S, Yano M, Fukuda M, Suetomi T, Hino A, Kato T, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. Correcting inter-domain interaction of cardiac ryanodine receptor inhibits aberrant  $Ca^{2+}$  release in Cardiac Troponin

T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy mouse model. The 16th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society. Sendai International center, Japan, Nov 30 2012.

- ③ Okuda S, Fukuda M, Yano M, Suetomi T, Hino A, Kato T, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. CaMKII-mediated aberrant  $Ca^{2+}$  release may play a key role in the arrhythmogenesis in Cardiac Troponin T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. American Heart association Scientific meeting 2012, Nov 3-7 2012, Los Angeles, USA.
- ④ Fukuda M, Yamamoto T, Kato T, Hino A, Suetomi T, Tateishi H, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Matsuzaki M, Yano M. Enhanced Binding of Calmodulin to RyR2 Inhibits Aberrant  $Ca^{2+}$  Release and Arrhythmogenesis in CPVT-Associated Mutation. American Heart association Scientific meeting 2012, Nov 3-7 2012, Los Angeles, USA.
- ⑤ Suetomi T, Yano M, Kato T, Fukuda M, Hino A, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M. Coupled Conformational Changes in the Local and Global Inter-Domain Interactions Trigger Diastolic  $Ca^{2+}$  Release and Lethal Arrhythmia in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT). American Heart association Scientific meeting 2011, Nov 12-16 2011, Orland, USA.
- ⑥ Fukuda M, Yano M, Kato T, Hino A, Suetomi T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M. Enhancement of Calmodulin Binding to RyR2 Inhibits Aberrant  $Ca^{2+}$  Release in CPVT-Associated Mutation. American Heart association Scientific meeting 2011, Nov 12-16 2011, Orland, USA.
- ⑦ Fukuda S, Kobayashi S, Tanaka T, Susa T, Murakami W, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Ueyama T, Okamura

T, Kawamura S, Yano M, Matsuzaki M.  
Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine  
as a Novel Biomarker of Inflammatory  
Activity in Patients with Cardiac  
Sarcoidosis: Insight From  
Immunohistochemical Technique and  
18F-FDG PET/CT. American Heart  
association Scientific meeting 2011,  
Nov 12-16 2011, Orland, USA.

〔図書〕（計 3 件）

- ① 奥田真二、矢野雅文；日本臨床社，慢性心不全治療ガイドライン，2011，595-604
- ② 奥田真二、矢野雅文；ライフ・サイエンス，慢性心不全の治療，2011，4-6
- ③ 奥田真二、矢野雅文；メディカルレビュー社，シグナル伝達系からみた心不全の機序と治療戦略，2011，129-137

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥田 真一 (OKUDA SHINICHI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90530212