

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590331

研究課題名(和文) 心筋組織の動的細胞マッピング用いたリアノジン受容体を制御する抗不整脈薬の探索

研究課題名(英文) Exploration of anti-arrhythmic drugs acting on RyR2 using myocardium and cultured cells.

研究代表者

呉林 なごみ (Kurebayashi, Nagomi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50133335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞に存在するリアノジン受容体(RyR2)を制御する薬物は、致死性不整脈に対する新しい予防薬、治療薬として効果が期待される。本研究では、RyR2を制御する薬を探索するための実験システムを立ち上げた。一つは、不整脈を起こしやすいモデル動物の心筋を用いた心臓における様々な作用の検討システムであり、もう一つは培養細胞に発現させたRyR2の活性をCa²⁺モニタリングにより検討する系である。これらの実験系により、RyR2に作用する薬物の強力なスクリーニング系が構築できた。

研究成果の概要(英文)：The agents acting on type 2 ryanodine receptor (RyR2) are expected to be good anti-arrhythmic and/or preventive drugs. In this study, we developed experimental systems that are useful for search of anti-arrhythmic drugs acting on RyR2; one is arrhythmogenic myocardium and the other is a cultured cell system expressing recombinant RyR2 molecules.

研究分野：薬理学

キーワード：リアノジン受容体 不整脈 カルシウム カテコラミン誘発性多型性心室頻拍 抗不整脈薬

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞の小胞体膜に存在する Ca^{2+} 遊離チャネル/リアノジン受容体 (RyR2) は心筋の興奮-収縮連関に中心的役割を果たしているが、一方で致死性不整脈の鍵となる蛋白でもある。例えば心臓の Ca^{2+} 過負荷状態では RyR2 から自発的 Ca^{2+} 遊離が起こり、心室性不整脈を惹起する。またこの反応が特に起こりやすい遺伝性疾患はカテコラミン誘発性多型性心室頻拍 (CPVT) として知られ、現在 150 種類以上の RyR2 CPVT 変異が報告されている。従って RyR2 からの異常な自発的 Ca^{2+} 遊離を制御する薬物は致死性不整脈の予防薬、治療薬としての効果が期待されるが、現在、純粋に RyR2 に作用する薬物は見出されていない。しかし従来の抗不整脈薬のうち、主作用に加え RyR2 抑制効果を併せ持つと考えられる薬物が最近いくつか報告されたので、これらを基に RyR2 に作用する抗不整脈薬を探索するシステムの必要性を感じるようになった。

2. 研究の目的

RyR2 をターゲットとする抗不整脈薬を見出す為、薬物の RyR2 への作用を検討すると共に、他の細胞内 Ca^{2+} 調節系、活動電位、細胞間相互作用への作用を検証する系を確立する。そして実際に新たな治療薬の発見を目指す。

(1) 心筋組織を用いた検討法の確立：易不整脈性の強い拡張型心筋症 (DCM) モデルマウスの心筋組織を用い、異所性自動能発生に対する薬の効果の評価する系を確立する。その為、まず DCM マウス心筋の基本的な性質を明らかにする。

(2) 培養細胞系を用いた RyR2 への直接作用評価系の確立と検討：HEK293 細胞を用いた RyR2 発現系を構築し、薬物や CPVT 変異の効果の評価系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 心筋組織を用いた検討

材料：不整脈モデル標本として、拡張型心筋症原因遺伝子 (Tnnt2 Δ K210) を有するノックインマウスを用いた (引用文献) このモデルマウスは、DCM の進行に伴い、不整脈を発生するようになる (業績論文)。

心筋組織を用いた検討：乳頭筋を切り出し張力測定を行った。また心組織を切り出し、心筋細胞に Ca^{2+} 指示薬 fluo-4, rhod-2 または膜電位指示薬 Di-4-ANEPPS を負荷し、ニポウディスク型共焦点顕微鏡を用いて Ca^{2+} シグナル、膜電位を取得した (業績論文)。

DCM 心筋の異所性自動能・不整脈の原因の検討：遺伝子発現解析や心筋組織の抗体染色により、各種イオンチャネル、ギャップジ

ヤンクシオンチャネル等の局在を同定し、生組織・細胞におけるシグナルとの関連付けを行った。

(2) 培養細胞系を用いた検討

RyR2 野生型および疾患変異体の HEK 細胞への発現：マウス心筋から RyR2 mRNA をクローニングし、ベクターに挿入、Flp-In T-REX system により HEK293 細胞に導入しテトラサイクリン誘導性の RyR2 安定発現細胞を作製した。さらにヒト CPVT 変異と相同の変異を RyR2 遺伝子に導入した。

細胞内および小胞体内 Ca^{2+} 測定：細胞内 Ca^{2+} イメージングは HEK 細胞に蛍光 Ca^{2+} 指示薬 (細胞質：Fluo-4、小胞体：R-CEPPIA1er 引文文献) を導入して測定した。

RyR2 活性測定： $[^3H]$ リアノジン結合で行った。細胞質 Ca^{2+} を変化させ Ca^{2+} 依存性の活性を測定した (業績論文)。

4. 研究成果

(1) DCM マウス心筋組織を用いた抗不整脈薬評価系の検討

まず、DCM 心筋を用い、心室性不整脈の元となる異所性自動能の検出を試み、さらに抗不整脈薬の効果を検討した。2 か月齢の DCM マウスより摘出した心筋は野生型の 10 倍近い頻度の自発収縮を示す (図 1 A)。心筋に Di-4-ANEPPS を負荷し膜電位シグナルをモニターすると、自発的活動電位が発生しているのが確認された (図 2)。また、 Ca^{2+} シグナルも確認された。このような心筋に実際に抗不整脈薬を処置すると、クラス I_c Na チャネル阻害薬 (図 1 B)、Ca チャネル阻害薬 (図 1 C) では自発活動性が用量依存的に抑制されたが、K チャネル阻害薬では抑制されなかった (図 1 D)。これらから、DCM 心室筋では自動能が発生しており Na チャネルの阻害によりそれが抑制されること、少なくとも一部は Ca^{2+} 過負荷が関与している可能性が示唆された。膜電位、 Ca^{2+} のイメージングによる検証が可能な本実験モデルは抗不整脈薬の検証系として有用なことが分かった。

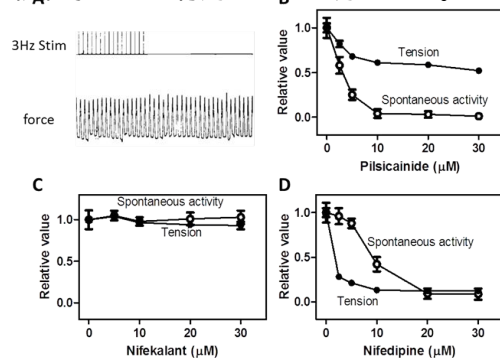


図 1 張力測定による DCM 心筋の異所性自動能の検出 (A) と、Na チャネル阻害薬 (B)、K チャネル阻害薬 (C)、 Ca^{2+} チャネル阻害薬 (D) の効果

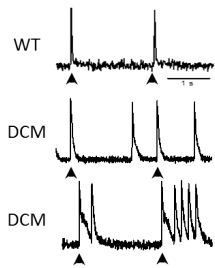


図2 DCM マウス心筋の活動電位シグナル。野生型は刺激時(矢頭)のみ活動電位を示すが、DCM心筋はEAD、DAD型自発的活動電位を示すことが分かった。

DCM 心筋における異所性自動能の分子の裏付け: DCM マウス心臓で起こる不整脈の理由を知るため、その性質をqPCR、ウェスタンブロット、免疫組織学的染色により検討したところ、複数のKチャンネルおよびその修飾蛋白(Kv4.2, Kv1.5, KChIP2)の低下が活動電位持続時間を延長させてEADを起りやすくすると共に、Ca²⁺流入を増してCa²⁺過負荷を起こしている可能性が示唆された(業績論文)。また、組織染色より、ギャップジャンクションの構造に異常が見られた。さらに、RyR2のリン酸化にも変化がみられた(業績文献)。まとめると、DCMマウス心筋は不整脈モデルとして、抗不整脈薬の検証に良い標本であることが明らかとなった。しかし、薬物は様々な部位に作用する可能性があるため、純粋なRyR2への作用を検証することは、本モデルのみでは出来ない。そこで、RyR2への直接作用を検証するため、HEK293細胞のRyR2発現系を用いて検証することにした。

(2) HEK293 培養細胞系を用いた検討

RyR2 安定発現細胞を用いた測定システムの構築: RyR2 発現細胞は、周期的なCa²⁺オシレーションを示すようになった。Ca²⁺ストアである小胞体Ca²⁺シグナルはR-CEPIA1erを用いてモニターした(引用文献、業績文献)。この実験では、Ca²⁺濃度を推定するため、測定の最後にイオノマイシンを添加してCa²⁺のキャリアレーションをとり、シグナルを定量化した。

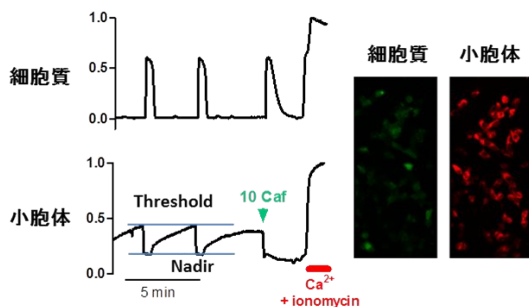


図3 細胞質とER Ca²⁺濃度の定量的同時測定。左上: G-GECO1.1による細胞質Ca²⁺濃度変化。左下: R-CEPIA1erによるER濃度変化。右: 同時取得した細胞像

RyR2 不整脈原性変異の効果の検討
RyR2の変異体を約30種類発現した。図4に典型例を示す。CPVT変異はすべて野生型に比べCa²⁺オシレーションの頻度を増加させ(図5A)、ER Ca²⁺遊離が起こる閾値(threshold)濃度および最低値(Nadir)を減少させた(図5B)。またオシレーション頻度とthresholdレベルには強い相関があった。(図5C)

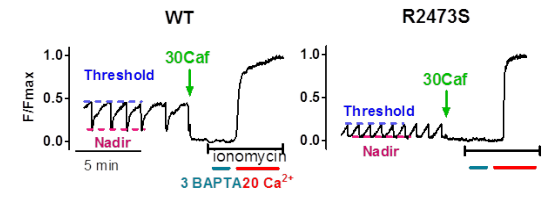


図4 野生型(左)とCPVT変異(右)のER Ca²⁺濃度測定の典型例

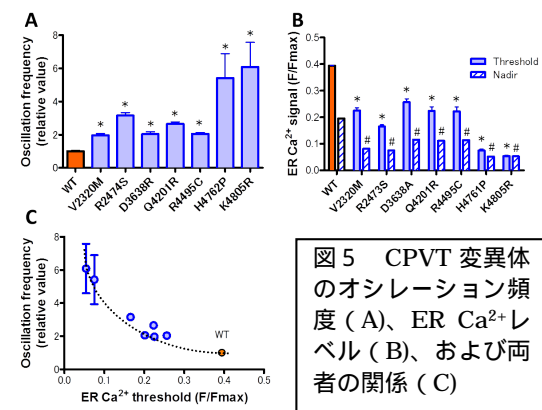


図5 CPVT変異体のオシレーション頻度(A)、ER Ca²⁺レベル(B)、および両者の関係(C)

薬物効果の検討

上記のHEK細胞RyR2発現系を用い、薬物のCPVT変異体に対する効果を検討した。これまで、RyR活性を抑制するものとしてプロカインおよびテトラカインが知られているが、これらはER Ca²⁺レベルを増加させ、オシレーション頻度を減少させた(図6)。これらの薬物は野生型に対してはCa²⁺遊離を抑制するので望ましくないが、ER Ca²⁺を下げるようなCPVT変異に対しては効果を表す可能性がある。

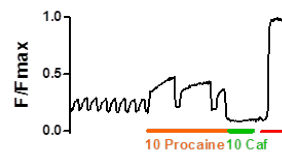


図6 プロカインのCPVT変異体に対する効果。プロカイン投与前に比べ、投与後はERCa²⁺レベルが増加し、オシレーション頻度は低下して野生型に近い波形になった。

また、ブロッカーのカルベジロールはチャンネル開確率を低下させると共にCa²⁺オシレーション頻度を減少させることが報告されている。HEK発現系においてはカルベジロールはER Ca²⁺レベルを減少させ、オシレーシ

ン頻度を減少させた。この作用は RyR2 への作用では説明できないので、Ca²⁺ - ATPase への作用、あるいは ER 膜への非特異的なリークなどが疑われた。一方、クラス IC 群フレカイニドは RyR2 を開状態でブロックすることにより自発的 Ca²⁺遊離を抑制すると報告されたが、異論も報告される。我々が試したところ、フレカイニドは HEK-RyR2 発現細胞には全く効果がなかった。同じ IC のピルジカイニドも効果がなかった。現在のところ、報告されている以外には RyR2 に強く作用する薬物は見つかっていない。しかし、本研究により、RyR2 に作用する薬物の強力なスクリーニング系が構築できたので、今後は、薬物ライブラリを利用しながら、探索を続ける計画である。

引用文献

Du et al., *Circ Res* 101:185-94, 2007
Suzuki et al., *Nat Comm* 5:4153, 2014
Zhou et al., *Nat Med.* 17(8):1003-9, 2011
Hilliard FA., *J Mol Cell Cardiol*, 48:293-30, 2010
Bannister ML et al, *Circ Res* ; 116: 1324-35, 2015

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7件)

Murayama T, Kurebayashi N, Yamazawa T, Oyamada H, Suzuki J, Kanamaru K, et al. Divergent activity profiles of type 1 ryanodine receptor channels carrying malignant hyperthermia and central core disease mutations in the amino-terminal region. *PLoS ONE*. 2015; in press. 査読有

Nonaka M, Morimoto S, Murayama T, Kurebayashi N, Li L, Wang YY, et al. Stage-dependent benefits and risks of pimobendan in mice with genetic dilated cardiomyopathy and progressive heart failure. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(9): 2369-82. doi: 10.1111/bph.13062. 査読有

Kamiya K, Yum SW, Kurebayashi N, et al. Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires connexin 26. *J Clin Invest*. 2014 **124**, 1598-607. doi 67621 10.1172/JCI67621 査読有

Odagiri F, Inoue H, Sugihara M, Suzuki T, Murayama T, Shioya T, Konishi M, Nakazato Y, Daida H, Sakurai T, Morimoto S, Kurebayashi N. Effects of candesartan on electrical remodeling in the hearts of inherited dilated cardiomyopathy model

mice. *PLoS One*. 2014, **9**, e101838 pone.0101838 PONE-D-13-54574. 査読有

Sugihara M, Odagiri F, Suzuki T, Murayama T, Nakazato Y, Unuma K, Yoshida K, Daida H, Sakurai T, Morimoto S, Kurebayashi N; Usefulness of running wheel for detection of congestive heart failure in dilated cardiomyopathy mouse model. *PLoS One*, 2013 (1): e55514, doi 10.1371/journal.pone.0055514 PONE-D-12-02326 査読有

Suzuki T, Shioya T, Murayama T, Sugihara M, Odagiri F, Nakazato Y, Nishizawa H, Chugun A, Sakurai T, Daida H, Morimoto S, Kurebayashi N; Multistep ion channel remodeling and lethal arrhythmia precede heart failure in a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy. *PLoS One*, 2012 (4): e35353, doi 10.1371/journal.pone.0035353 PONE-D-11-21504 査読有

Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, Kurebayashi N, et al., Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J*. 2012; 31(2): 417-28. doi: 10.1038/emboj.2011.386. 査読有

[学会発表](計8件)

Kurebayashi N, Murayama T, Suzuki J, Kanamaru K, Iino M, Sakurai T: Effects of arrhythmogenic mutations on ca²⁺-induced ca²⁺ release activities of type 2 ryanodine receptors. **Biophysical society, 59th Annual Meeting Baltimore, USA**. FEB 7-11, 2015

村山 尚、呉林なごみ、小山田英人、鈴木純二、金丸和典、小口勝司、飯野正光、櫻井隆; 1型リアノジン受容体チャネルに対する疾患変異の多様な効果. 第86回日本薬理学会年会, 福岡, 2013年3月23日(口頭)

呉林なごみ: 拡張型心筋症におけるアンジオテンシン受容体阻害薬(ARB)感受性および非感受性リモデリング. **第92回日本生理学会大会 シンポジウム**; 神戸. 2015年3月24日(口頭)

呉林なごみ, 村山尚, 太田亮作, 山下富義, 鈴木純二, 金丸和典, 飯野正光, 櫻井隆: 2型リアノジン受容体の不整脈原性変異はCICR活性とCa²⁺動態にどのような影響を及ぼすか?. **第88回日本薬理学会年会**; 名古屋. 2015年3月19日(口頭)

呉林なごみ, 小田切史徳, 井上華, 杉原匡美, 村山尚, 木森義隆, 小西真人, 森本幸生, 櫻井隆: 拡張型心筋症における構造的リモデリングと電気的リモデリングの関係. **第 130 回 日本薬理学会関東部会**; 星薬科大学 (東京). 2014 年 7 月 5 日 (口頭)

呉林なごみ, 村山尚, 太田亮作, 山下富義, 鈴木純二, 金丸和典, 飯野正光, 櫻井隆: 心筋型リアノジン受容体 (RyR2) 不整脈原性変異の Ca^{2+} 動態と CICR 活性に対する効果. **第 24 回 日本循環薬理学会**; 山形テルサ. 2014 年 12 月 5 日 (口頭)

呉林なごみ, 村山尚, 鈴木純二, 金丸和典, 飯野正光, 櫻井隆: 不整脈原性 2 型リアノジン受容体の CICR 特性. **第 87 回日本薬理学会年会**; 仙台. 2014 年 3 月 21 日 (口頭)

呉林なごみ: 遺伝性拡張型心筋症における無症候期、突然死危険期、破綻期と、これらを左右する因子. **第 90 回日本生理学会大会: 疾患モデル動物を用いた心不全の病態生理研究の最前線**. 東京 2013 年 3 月 29 (シンポジウム)

呉林なごみ, 小田切史徳, 杉原匡美, 鈴木剛, 井上華, 村山尚, 塩谷孝雄, 小西真人, 中里祐二, 代田浩之, 櫻井隆, 森本幸生: **拡張型心筋症モデルマウス心臓の電気的リモデリングに対するカンデサルタンの効果**. **第 86 回日本薬理学会年会**. 福岡; 2013 年. (口頭)

〔図書〕(計 1 件)

呉林なごみ: 心筋 Ca^{2+} transient と不整脈発生. 不整脈学 pp153-156: 南江堂; 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://pharmacology.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉林 なごみ (KUREBAYASHI, Nagomi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 50133335

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

村山 尚 (MURAYAMA, Takashi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 10230012

森本幸生 (MORIMOTO, Sachio)

九州大学・医学部・准教授

研究者番号: 50202362

中里祐二 (NAKAZATO, Yuji)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 30266035