

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670403

研究課題名(和文)酸化ストレス耐性リアノジン受容体の獲得を目指した新しい心不全治療

研究課題名(英文)Oxidation of Ryanodine Receptor (RyR) and Calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and Calmodulin affinity

研究代表者

小田 哲郎 (ODA, Tetsuro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40569290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は酸化ストレスがリアノジン受容体内(RyR2)のN末端-centralドメイン間の構造連関に及ぼす影響、さらにはRyR2安定化作用のあるFKBP12.6、カルモジュリン(CaM)などのRyR2結合タンパク、またRyR2スタビライザーであるダントロレンとの関わりを心筋細胞で検討した。研究成果としては心筋細胞への酸化ストレスはFKBP12.6のRyR2への結合親和性に影響を与えなかったが、CaMの結合親和性は有意に低下していた。さらに酸化ストレスは、RyR2内のドメイン連関障害を引き起こしたが、ダントロレンはCaMの結合親和性を高め、ドメイン連関障害を是正し、RyR2の安定化に寄与していた。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress contribute to cardiac ryanodine receptor (RyR2) dysfunction in heart failure (HF). However, effects of oxidative stress on RyR2 conformation and leak in myocytes are poorly understood. We used fluorescent CaM, FKBP12.6, and domain-peptide biosensor (F-DPc10) to measure (1) RyR2 activation by hydrogen peroxide (H2O2)-induced oxidation, (2) RyR2 conformation change caused by oxidation, (3) CaM-RyR2 and FK506-binding protein (FKBP12.6)-RyR2 interaction upon oxidation, and (4) whether dantrolene affects 1-3. H2O2 significantly increased the frequency of Ca<sup>2+</sup> sparks and dantrolene almost completely blocked this effect. H2O2 significantly reduced CaM-RyR2 binding, but had no effect on FKBP12.6-RyR2 binding. Dantrolene restored CaM-RyR2 binding but had no effect on oxidation levels. H2O2 also accelerated F-DPc10-RyR2 association while dantrolene slowed it. Thus, H2O2 causes conformational changes, and dantrolene reverses these RyR2 effects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子心臓学 リアノジン受容体 酸化ストレス カルモジュリン ドメイン連関障害 ダントロレン

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋型 RyR の突然変異病である ARVD、CPVT

2000 年以降、ARVD、CPVT の患者において RyR2 の突然変異が相次いで報告されたが、

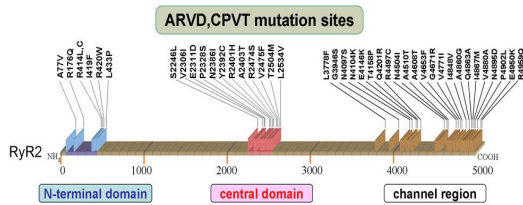


図 1. ARVD/CPVT の突然変異.

その突然変異部位は、限られた 3 カ所(N 末端、central、C 末端)に集中していることが確認された(図 1)。C 末端部位はチャンネル孔を形成しており、チャンネルの開閉に直接的に影響していると考えられるが、N 末端および central ドメインは、いわゆる細胞質に飛び出た foot 構造の中に互いに近接してチャンネル孔からは離れて存在している。そこで、我々はこの 2 つの部位(N 末端および central ドメイン)は互いに連関することによって(zipping)チャンネルの安定化に寄与しており、N 末端および central ドメインのどちらかの突然変異により、このドメイン間 N

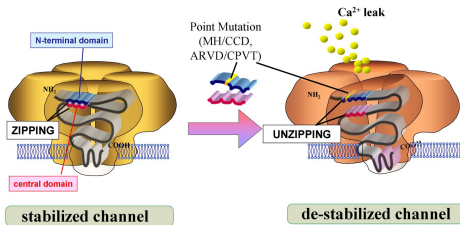


図 2. ドメイン連関障害 仮説.

末端と central ドメイン間) が連関障害を起こすことにより(unzipping)、チャンネルが不安定化するという仮説をたて、数々の論文でその仮説を証明してきた(図 2)。さらに申請者のみならず、他施設の研究者からもこの仮説は支持されている (Circ Res 2011;108:871-83)

(2) 酸化ストレスと心機能障害

酸化ストレスは心機能の低下や心筋リモデリング(心拡大)を引き起こし、心不全の進展に深く関わっていると考えられている。この酸化ストレスによってリアノジン受容体(RyR2)から異常な Ca<sup>2+</sup>漏出が生じ、心筋細胞機能が低下することを我々は報告した。さらにその原因の一つとして、RyR2 内のシステイン基が酸化されることで N 末端ドメ

インと central ドメイン間のドメイン連関障害(unzipping)が生じ RyR2 から異常なカルシウムの漏出が生じることも犬の不全心筋から作成した SR を用いて明らかにしている(Circulation 2005;112:3633-43)。

2. 研究の目的

本研究では、酸化ストレスが致死的不整脈や慢性心不全の発症要因としての RyR2 不安定化に及ぼす影響、さらに RyR2 安定化に寄与する FKBP12.6 やカルモジュリンとの相互関係について、生体環境に近い単離心筋細胞を用いて調べることにより、全く新しい RyR2 安定化薬の開発をめざす。

3. 研究の方法

細胞内の酸化ストレス発生に過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を使用した。

正常のラットおよびマウスの単離心筋細胞を用いて酸化ストレスの(1) N 末端-central ドメイン連関、(2) カルモジュリン、FKBP12.6 の RyR2 に対する結合親和性に及ぼす効果を検討した。N 末端-central ドメイン連関障害の程度を蛍光標識した RyR2 の N 末端と central 間のドメイン連関障害を惹起するドメインペプチド(DPc10)を用いて測定した。DPc10 は対応する native のドメイン(N 末端ドメイン)に結合し N 末端ドメインと central ドメインの間に unzipping(ルーズな結合)を生じ、あたかも突然変異の擬態が生じているような状態となる。近年、申請者は、単離心筋細胞において、蛍光標識された DPc10(F-DPc10)の RyR2 結合部位への結合速度とドメイン連関障害の程度は相関していることを明らかにした(Circ Res 2013;112:487-97)。すなわち、RyR2 のドメイン連関が安定(zipping)していると F-DPc10 の結合速度は遅く、unzipping の状態だと F-DPc10 の結合速度は速くなる。よって F-DPc10 の結合速度を測定することは、ドメイン連関障害の程度を生きた心筋細胞内で測れる有力なツール

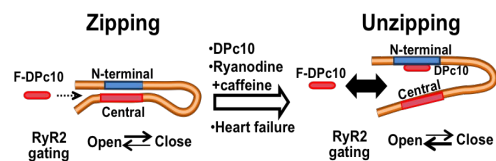


図3. F-DPc10の結合速度はドメイン連関障害の程度を示す

となり得ることを示した(図 3)。またドメイン連関障害は正薬であるダントロレンを用いて、酸化ストレス下でのドメイン連関障害の有無やカルモジュリン、FKBP12.6 の RyR2 への結合親和性の変化の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスがカルモジュリン、FKBP12.6 の RyR2 への結合親和性に及ぼす影響

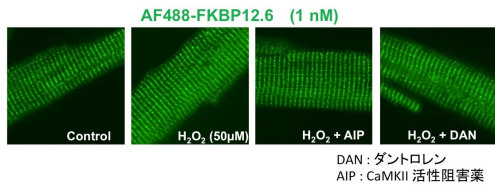


図4. 酸化ストレスはFKBP12.6のRyR2への結合親和性に影響を与えない

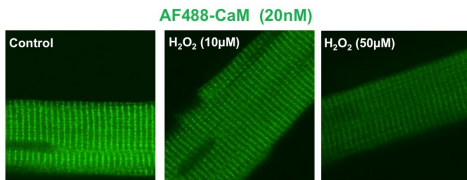


図5. 酸化ストレスによるカルモジュリンのRyR2への親和性の変化

図4、図5に示すように、単離心筋細胞へのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与はF-FKBP12.6のRyR2への結合親和性に影響を与えなかったが、F-CaMの結合親和性は有意に低下した。さらに、ダントロレンはF-FKBP12.6の結合親和性に影響を与えなかったが、F-CaMのRyR2に対する結合親和性を高めた。

## (2)酸化ストレスがN末端-centralドメイン連関 (zipping-unzipping)に与える影響について

蛍光標識したDPc10(F-DPc10)を用いて、酸化ストレスとドメイン連関の関係について検討した。上述したように、F-DPc10のRyR2への結合速度とドメイン連関障害の程度は相関しており、本研究でもその手法を用いた。本研究ではさらに、厳密にRyR2に特異的に結合したF-DPc10の結合速度を測定する目的でF-FKBP12.6(RyR2に特異的に結合)とF-DPc10間のFRETを用いた。図6に示すようにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下ではF-DPc10の結合速度(wash-in)は有意に速くなった。すなわち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投与(酸化ストレス)によって、ドメイン連関が障害されたことが示唆される。さらにダントロレンを添加することによりこのドメイン連関障害は是正された。

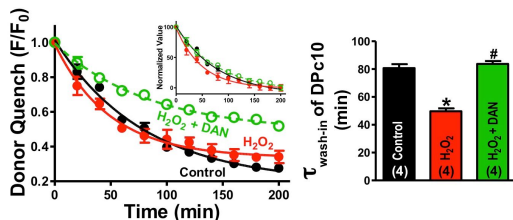


図6. 酸化ストレスとドメイン連関の関係

この結果より、ダントロレンはドメイン連関障害を是正することで、CaMのRyR2に対する結合親和性が高くなったと言える。次にダントロレンが細胞内の酸化ストレスレベルに及ぼす影響について心筋内の酸化ストレスのindicatorであるCM2-DCFDAを用いて検討した。その結果、ダントロレンには細胞内の酸化ストレスを抑制する働きはなかった。これらの結果より、ダントロレンは細

胞内酸化ストレスを抑制することなく、ドメイン連関を安定化させ、さらにCaMのRyR2に対する結合親和性を高めることにより、RyR2チャンネルの安定化に寄与している可能性が示唆された。

本研究の成果から、心不全進展の誘因の一つである酸化ストレスのRyR2内ドメイン連関障害に及ぼす影響を心筋細胞という生理的な条件下で詳細に検討したことにより、酸化ストレスの細胞内CaハンドリングRyR2の安定化に寄与しているCaMの動態に及ぼす直接的役割が明らかとなったのみならず、ドメイン連関障害の是正が酸化ストレス抵抗性(Caハンドリング)の獲得につながる可能性を示すことにもなった。また今後は運動やカテコラミン刺激で容易に致死的不整脈が発生するCPVT型knock-in mouseや犬心不全モデルを用いてドメイン連関障害の程度を(SRレベルでなく)心筋細胞レベルで検討することにより、心不全または致死的不整脈のRyR2をターゲットとした全く新しい治療薬の開発に直結するものと思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, Thomas DD, Chen-Izu Y, Kato T, Yamamoto T, Yano M, Cornea RL, Bers DM. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol* 85 査読有 2015、240-248

〔学会発表〕(計 1件)

- 小田 哲郎 In cardiomyocytes, dantrolene can correct defective domain interaction caused by oxidation, and restore the CaM binding affinity in RyR2  
日本循環器学会 2015年4月24日 大阪府大阪市(大阪国際会議場)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

小田 哲郎 (ODA, Tetsuro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40569290

##### (2)研究分担者

山本 健 (YAMAMOTO, Takeshi)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50363122

##### (3)連携研究者

なし