

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09085

研究課題名(和文) リアノジン受容体分子内シグナル伝達のキードメインを標的とした新しい不整脈治療

研究課題名(英文) Novel therapy of arrhythmia targeting key domain in ryanodine receptor

研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO, Takeshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50363122

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)：申請者らはCaM BDのペプチドに点突然変異を組み込んだペプチドを28種類作成した。作成した多数のCaM BDの変異ペプチドの中からCaMへの結合が最も強いものを2種類の方法でスクリーニングした。選んだ変異を組み込んだCaM高親和性RyR2変異を組み込んだKIマウス作成が完了し、このマウスではRyR2とCaMの親和性が高く、リン酸化してもCaMがRyR2から外れにくいことがわかった。CaM高親和性KIマウスの不整脈：CaM高親和性RyR2変異を組み込んだKIマウスとRyR-R2474S型CPVTマウスを掛け合わせたところ、運動負荷、および薬物負荷時の不整脈の頻度は激減した。

研究成果の概要(英文)：Applicants made 28 kinds of peptides incorporating point mutations in the peptide of CaM BD. Among the mutated peptides of many prepared CaM BDs, those with the strongest binding to CaM were screened by two methods. The creation of KI mouse incorporating the CaM high affinity RyR2 mutation incorporating the selected mutation was completed and the affinity of RyR2 and CaM was high in this mouse and it was found that CaM was not easily removed from RyR2 even when phosphorylated. Arrhythmia in CaM high affinity KI mice: Multiplying CaM high-affinity RyR2 mutated KI mice with RyR-R 2474 S CPVT mice resulted in a dramatic decrease in exercise burden and arrhythmia frequency at drug loading.

研究分野：循環器内科学

キーワード：リアノジン受容体 カルモジュリン

## 1. 研究開始当初の背景

RyR には様々な修飾蛋白があるがその中でカルモジュリン (CaM) は非常に重要な修飾蛋白であることを申請者らは報告してきた。申請者らは RyR に結合した CaM はチャネル制御ドメインからチャネル孔へシグナルを伝達する役割をしていると考えた。申請者らは右心室高頻度刺激心不全モデルにおいてチャネル制御ドメインの unzip に伴い CaM の RyR に対する親和性が低下していることを示し (Cardiovasc Res 2010)、CaM の N 末端に Gly-Ser-His の 3 つのアミノ酸をつけた GSH-CaM は RyR2 に高親和性を示し、不全心筋の Ca<sup>2+</sup>ハンドリングを改善することも示した (Cardiovasc Res 2012)。最新の申請者らの研究ではヒト CPVT 型 R2474S KI mouse において CaM の N 末端に Gly-Ser-His の 3 つのアミノ酸をつけた GSH-CaM は RyR2 に高親和性を示し、R2474S KI mouse 単離心筋細胞の Ca<sup>2+</sup>ハンドリングを改善し、Delayed after depolarization (DAD) を減少させることを示した。申請者ら以外にも RyR に結合した CaM の重要性についての研究は多く、Meissner らは RyR の 3 つのアミノ酸を変異させ CaM が結合しにくい変異 RyR を持った KI mouse は心肥大から心不全を経て著明に寿命が短くなることを示した (J Clin Invest. 2007)。さらに最近 CaM の突然変異により CaM が RyR に結合しにくくなり CPVT を生じることが報告された (Am J Hum Genet. 2012)。

2006 年 Hamilton SL らは RyR1 の中に CaM と相同性をもつ CaM like domain (CaM LD) とすべきドメインが存在することを報告した。さらに Ikemoto らは CaM binding domain (CaMBD) と CaM LD の間の interaction について報告している。これらの報告から申請者らは RyR に対する CaM の結合について興味深い仮説を作った。すなわち CaM LD は CaM と競合的に CaM BD に結合しているのではないかという仮説である。

申請者らは CaM binding domain の変異ペプチドを多数作成し、その中から野生型よりも CaM との親和性の高いペプチドを発見した。現在この変異を組み込んだ CaM 高親和性 KI mouse を作成中である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の最新知見に基づき CPVT 型 knock-in mouse を用いてリアノジン受容体内の CaM binding domain と CaM like domain の構造連関を解明し、リアノジン受容体に対する CaM の結合性をターゲットとした心不全および致死的不整脈の新しい治療法を開発することである。具体的にはすでに作成済みの CaM like domain 内に突然変異を有する N4103K KI mouse を用いその CPVT 発症メカニズムを調べる。N4103K における不整脈発生メカニズムが仮説通りか検討する。次に、

現在作成中の CaM 高親和性 KI mouse と CPVT 型 KI mouse を掛け合わせ、CaM 高親和性マウスが本当に不整脈や心不全耐性を示すか否かを検討する。さらに CaM に変わってリアノジン受容体に結合し、リアノジン受容体を安定化するコンパウンドを探索する。

## 3. 研究の方法

予備実験にて N4103K KI マウス心筋細胞を単離しサポニンで透過処理した後、蛍光ラベルした F-DP4066 を添加し共焦点顕微鏡で観察すると、WT マウスに比べ著しい結合の低下を示した。このことは N4103K 型の点突然変異では CaM BD-CaM LD の連関が強固になっている可能性を示唆している。今後さらに N4103K KI マウス心筋細胞に対する CaM の affinity の検討や F-DP4066 の結合解離 kinetics を検討することで N4103K 型の点突然変異では CaM BD-CaM LD の連関の異常を解明する。

CaM 高親和性 RyR2 変異を組み込んだ KI マウスを申請者らは現在作成中である。作成中の CaM 高親和性 RyR2 変異マウスであるがこれを当院の生命科学実験施設に搬入し交配し増やした上で、まず CaM の高親和性の確認を行う。このため蛍光ラベルした CaM (F-CaM) を用意し、単離培養した変異マウスの心筋細胞にサポニン処理後添加し結合親和性を測定する。次に我々が保有している 3 つの CPVT 型 KI マウス (R2474S, S2246L, N4103K) とこの KI マウスの掛け合わせを行い、genotyping 後、ヘテロマウスが抗不整脈性を獲得しているか否かを単離心筋のパッチクランプ、灌流心臓での心外膜 optical mapping を用いて検討する。

## 4. 研究成果

申請者らはすでに CaM BD のペプチドに点突然変異を組み込んだペプチドを 28 種類作成した。作成する際には CaM BD と CaM の PDB file から Swiss PDB viewer を用いて 3 次元構造を描出しながら、作成した突然変異が新たな共有結合を生み出すように設計を試みた。作成した多数の CaM BD の変異ペプチドの中から CaM への結合が最も強いものを 2 種類の方法でスクリーニングした。すなわち CaM BD 上にある Typ の蛍光を計測することで CaM の CaM BD への結合をみる方法で、もう一つは CaM にクロスリンカーである sulfo-SANPAH の succinimidylyl 基を結合させ、SR と暗所で SR と混和し UV をあてて RyR にクロスリンクさせ、western blot で RyR の 565kDa の RyR のバンドを抗 CaM 抗体で検出する。このクロスリンクを CaM BD の変異ペプチドの存在下で行い CaM の RyR へのクロスリンクを最も抑制するものが CaM に対する結合性の最も高い CaM BD の変異ペプチドであるという手法である。ともに 1 つの有望な変異

(Pep#26) を選び出した。

選んだ変異を組み込んだ CaM 高親和性 RyR2 変異を組み込んだ KI マウス作成が完了し、このマウスでは RyR2 と CaM の親和性が高く、リン酸化しても CaM が RyR2 から外れにくいことがわかった。CaM 高親和性 KI マウスの不整脈: CaM 高親和性 RyR2 変異を組み込んだ KI マウスと RyR-R2474S 型 CPVT マウスを掛け合わせたところ、運動負荷、および薬物負荷時の不整脈の頻度は激減した。

#### 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 7 件)

1. Nishimura S, Yamamoto T, Nakamura Y, Kohno M, Hamada Y, Sufu Y, Fukui G, Nanno T, Ishiguchi H, Kato T, Xu X, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M.

Mutation-linked, excessively tight interaction between the calmodulin binding domain and the C-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm*. 2018;15(6):905-914. doi: 10.1016/j.hrthm.2018.02.006 査読有

2. Okuda S, Sufu-Shimizu Y, Kato T, Fukuda M, Nishimura S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Morimoto S, Yano M.

CaMKII-mediated phosphorylation of RyR2 plays a crucial role in aberrant Ca<sup>2+</sup> release as an arrhythmogenic substrate in cardiac troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(4):1250-1256.

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.181 査読有

3. Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Sufu Y, Hamada Y, Maeda T, Nishimura S, Ishiguchi H, Murakami W, Fukuda M, Xu X, Hino A, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M.

Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm*. 2017;14(1):120-127.

doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.019 査読有

4. Tanabe N, Ikeda S, Tahara N, Fukuda K, Hatano M, Ito H, Nakayama T, Anzai T, Hashimoto A, Inoue T, Kajinami K, Kihara Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Murohara T, Okazaki O, Sakai S, Satoh T, Takeda Y, Takeishi Y, Taniguchi M, Watanabe H,

Yamamoto T, Yamauchi-Takahara K, Yoshioka K, Sasayama S.

Efficacy and Safety of an Orally Administered Selective Prostacyclin Receptor Agonist, Selexipag, in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ J*. 2017;81(9):1360-1367.

doi: 10.1253/circj.CJ-16-1348 査読有

5. Murakami W, Kobayashi S, Susa T, Nanno T, Ishiguchi H, Myoren T, Nishimura S, Kato T, Hino A, Oda T, Okuda S, Yamamoto T, Yano M.

Recombinant Atrial Natriuretic Peptide Prevents Aberrant Ca<sup>2+</sup> Leakage through the Ryanodine Receptor by Suppressing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Induced by Isoproterenol in Failing Cardiomyocytes. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163250.

doi: 10.1371/journal.pone.0163250 査読有

6. Tadaki S, Sakata Y, Miura Y, Miyata S, Asakura M, Shimada K, Yamamoto T, Fukumoto Y, Kadokami T, Yasuda S, Miura T, Ando S, Yano M, Kitakaze M, Daida H, Shimokawa H. Prognostic Impacts of Metabolic Syndrome in Patients With Chronic Heart Failure - A Multicenter Prospective Cohort Study. *Circ J*. 2016;80(3):677-88.

doi: 10.1253/circj.CJ-15-0942 査読有

7. 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*. 2015;85:240-8.

doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.06.009 査読有

[学会発表](計 11 件)

1. Yoko S Shimizu, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Kato, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto and Masafumi Yano.

Stabilization of Camkii-Phosphorylated Ryr2 by Dantrolene Prevents the Development of Age-Related Cardiomyopathy Caused by Camkii C Overexpression. 90th Scientific Session of American Heart Association. Anaheim 2017 Nov.

2. Hitoshi Uchinoumi, Ivanita Stefanon, Yi Yang, Mena Said, Xiaojiong Dong, Rogerio Faustino, Jose L Puglisi, Ye Chen Izu, Razvan L Cornea, Xander H Wehrens, Wayne S Chen, Takeshi Yamamoto, Yano Masafumi

and Donald M Bers.

Channel Pore Mutation of RyR2 Cause Calcium Leak Independent of FKBP12.6-RyR2 and Calmodulin-RyR2 Affinity in R4496C/+ Knock-in Mouse.

90th Scientific Session of American Heart Association. Anaheim 2017 Nov.

3. Go Fukui, Takeshi Yamamoto, Michiaki Kono, Yoshihide Nakamura, Takuma Nanno, Yorioni Hamada, Yoko Sufu, Hironori Ishiguchi, Shigehiko Nishimura, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi and Masafumi Yano.

Effect of Site Dependent RyR Stabilizers; a Clue to Trace a Signal Transmission Pathway Inside the RyR Molecule.

90th Scientific Session of American Heart Association. Anaheim 2017 Nov.

4. Yoshihide Nakamura, Takeshi Yamamoto, Michiaki kono, Yorioni Hamada, Go Fukui, Yoko Sufu, Takuma Nanno, Hironori Ishiguchi, Shigehiko Nishimura, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano.

Dantrolene Prevents Right Ventricular Hypertrophy Without Reducing Pulmonary Arterial Pressure In Monocrotaline-induced PAH In Mice.

Division of Cardiology, Department of Medicine and Clinical Science, Yamaguchi University Graduate School of Medicine.

90th Scientific Session of American Heart Association. Anaheim 2017 Nov.

5. 奥田真一, 周布陽子, 加藤孝佳, 岡本陽子, 西村滋彦, 小田哲郎, 小林茂樹, 山本 健, 矢野雅文.

Improvement of Defective RyR2 Function Mediated by CaMKII Activation Suppresses Arrhythmogenesis in TnT-related Hypertrophic Cardiomyopathy.

The 81th Annual Scientific Meeting of the the Japanese Circulation Society. Kanazawa 2017 3.

6. 西村滋彦, 山本 健, 中村吉秀, 福井 剛, 大野 誠, 望月 守, 小田哲郎, 奥田真一, 小林茂樹, 矢野雅文.

Dantrolene Enhances Binding of Calmodulin to RyR2 in CPVT Which Mutation Located at Central Domain but not at CaM-like Domain.

The 81th Annual Scientific Meeting of the the Japanese Circulation Society. Kanazawa 2017 3.

7. 周布陽子, 奥田真一, 岡本陽子, 加藤孝佳, 西村滋彦, 小田哲郎, 小林茂樹, 山本 健,

矢野雅文.

Dantrolene Prevents the Progression of Age-related Cardiomyopathy by Stabilizing CaMKII-phosphorylated RyR2 in CaMKII c Transgenic Mice.

The 81th Annual Scientific Meeting of the the Japanese Circulation Society. Kanazawa 2017 3.

8. Tetsuro Oda, Takeshi Yamamoto, Takayoshi Kato, Shigehiko Nishimura, Go Fukui, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Donald Bers and Masafumi Yano.

Nuclear Translocation of Calmodulin, Which Dissociated From Cardiac Ryanodine Receptor, Promotes the Pathological Cardiac Hypertrophy.

89th Scientific Session of American Heart Association. New Orleans 2016 11.

9. Shinichi Okuda, Yoko Sufu-Shimizu, Takayoshi Kato, Yoko Okamoto, Shigehiko Nishimura, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano.

Improvement of Defective Channel Function on RyR2 Mediated by CaMKII Activation Suppresses Arrhythmogenesis in TnT-related Hypertrophic Cardiomyopathy.

89th Scientific Session of American Heart Association. New Orleans 2016 11.

10. Yoshihide Nakamura, Takeshi Yamamoto, Takayoshi Kato, Yorioni Hamada, Go Fukui, Yoko Sufu, Takuma Nanno, Shigehiko Nishimura, Hironori Ishiguchi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano.

Correction of Impaired Calmodulin Binding to RyR2 as a Novel Therapy of Lethal Arrhythmia in the Pressure-Overloaded Heart Failure.

89th Scientific Session of American Heart Association. New Orleans 2016 11.

11. Hironori Ishiguchi, Shigeki Kobayashi, Michiaki Kohno, Takuma Nanno, Gou Fukui, Yoko Sufu-Shimizu, Yorioni Hamada, Takako Maeda, Shigehiko Nishimura, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Takeshi Ueyama, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano.

Correction of the Defective Channel Gating of Cardiac Ryanodine Receptor Improves Cardiac Function and Suppresses Ventricular Arrhythmia in Post Myocardial Infarction Heart Failure.

89th Scientific Session of American Heart Association. New Orleans 2016 11.

〔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

山本 健 (YAMAMOTO, Takeshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50363122

### (2) 研究分担者

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

小林 茂樹 (KOBAYASHI, Shigeki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90397993

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし