

令和元年6月19日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09502

研究課題名(和文) カルモジュリンの心筋細胞内動態を標的とした新しい心肥大、心不全抑制治療法の探査

研究課題名(英文) Explore the new heart failure therapy focus on calmodulin translocation in cardiac myocytes

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋小胞体上に存在するCa放出チャンネルであるリアノジン受容体(RyR2)から解離したカルモジュリン(CaM)が心肥大や心不全のシグナル伝達に重要な役割をしていることを証明した。すなわち肥大心では、RyR2に結合しているCaMは減少し、核内のCaMは増加していた。RyR2からのCaMの解離を抑制すると言われているダントロレンは、RyR2からのCaMの解離、核内へのCaMの移行を抑制した。この結果はRyR2からのCaMが解離することが病的な心肥大の進展に関わっており、RyR2からのCaMの解離を抑制することにより、病的な心肥大や心不全の進展を防ぐことができる可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、我が国は超高齢化社会を迎えることが確実であり、今以上に心不全による死亡や入院が増加することが予想される。よって、今までの標準薬物治療にとって変わる、または標準治療に追加できる新たな心不全治療薬の開発が喫緊の課題である。本研究は、カルシウム放出チャンネルであるリアノジン受容体の安定化に寄与しているカルモジュリンの心筋細胞内動態に注目した。病的な心肥大や心不全時にはリアノジン受容体からカルモジュリンが解離し、その解離したカルモジュリンは細胞の核内へ移行しており、病的な心肥大のシグナル活性に関与していることを解明した。カルモジュリンの動態制御に注目した新しい病的な心肥大抑制薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In cardiac myocytes Calmodulin (CaM) bound to the ryanodine receptor (RyR2) constitutes a large pool of total myocyte CaM. Knock-in mice expressing RyR2 unable to bind CaM developed hypertrophy and early death. However, it is unknown whether CaM released from this RyR2-bound pool participates in pathological cardiac hypertrophy. We found that angiotensin II (AngII) causes CaM to dissociate from the RyR2 and translocate to the nucleus. To test whether this nuclear CaM accumulation depends on CaM released from RyR2, we enhanced CaM-RyR2 binding affinity with dantrolene. Dantrolene dramatically reduced nuclear CaM accumulation. After 2-8 weeks of pressure overload (TAC) the binding affinity of CaM to RyR2 was reduced, nuclear CaM was elevated. Stress (acute AngII or TAC) causes CaM dissociation from RyR2 and translocation to the nucleus. Thus CaM dissociation from RyR2 may be an important step in driving pathological hypertrophic gene transcription.

研究分野：循環器内科

キーワード：リアノジン受容体 カルモジュリン GRK5 ダントロレン アンレキサノクス HDAC5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) RyR2 結合カルモジュリン(CaM)の役割

近年、RyR2 の安定化に RyR2 に結合している CaM が重要な役割を担っていることが報告されている。

すなわち、細胞質内の Ca^{2+} 濃度の高い低いに関わらず、CaM は RyR2 のクランプ部位とハンドル部位の隙間に結合することにより、チャンネル開閉を安定化させ、不全心筋や CPVT 患者のストレス負荷時などに認められる RyR2 からの異常な Ca^{2+} 放出を制御している重要なタンパク質であることがわかってきた(図 1)。そこで、右心室高頻度刺激心不全犬モデルにおいて CaM の RyR2 に対する親和性が低下

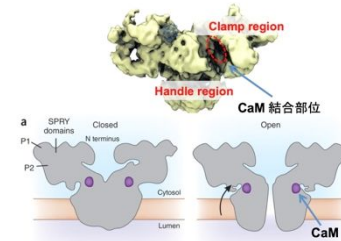


図 1. RyR2 に結合しているカルモジュリン(CaM)の役割
RyR2 の handle と clamp 部位との隙間に CaM が結合することによって、チャンネルの開閉を制御している

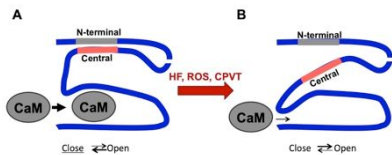


図 2. A. 正常状態の RyR2. B. ドメイン連関障害は CaM の RyR2 に対する結合親和性を低下させる。

していることを証明した(図 2)(Oda T et al. *Circ Res.* 2013; 112:487-97)。研究代表者ら以外でも RyR2 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 を持った遺伝子改変マウス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(図 3)(Yamaguchi N, et al. *J Clin Invest.* 2007; 117:1344-53)。さらに不全心筋での western blot 法において心筋組織全体では CaM の発現量は変わらないが、RyR2 に結合している CaM の発現量は減少していることが他施設でも報告されている。

(2) CaM の核内移行について

CaM が RyR2 から解離することによってチャンネルの開閉が不安定となり、致死的不整脈の起因となる異常な Ca^{2+} 放出を誘発することは前述の通り数々証明されてきたが、RyR2 から解離した CaM の動態や役割についてはまだ解明されていない。Neonatal myocyte(幼若心筋細胞)や神経細胞では、エンドセリン-1(ET-1)などの刺激を細胞に加えることにより核内の CaM の発現量が増加する現象が報告されているが、RyR2 から解離した CaM が核内へ移行するかどうかの検討はまだされていない。また、どのような経路で CaM が核内に移行するのかという点においても未解明のままである。

(3) G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5)の役割について

GRK は G タンパク質結合タンパク質 (G タンパク質) 共役型受容体 (GPCR) をアンギオテンシン II (AngII)、エンドセリン-1(ET-1)、フェニレフリン(PE)などの刺激でリン酸化し、脱感作させる上で重要なセリンスレオニンキナーゼである。7 種類の GRK が現在までに同定されており、心臓では主に GRK2, 5 が発現している。近年、GRK5 は AngII または PE の刺激により細胞質から核内へ移行することにより HDAC 5 や NFAT など心肥大を惹起する酵素を活性化することが報告されている。さらに興味深いことに GRK5 には CaM 結合部位が存在し、CaM の存在下でのみ GRK5 が核内に移行することができるとの報告がある。

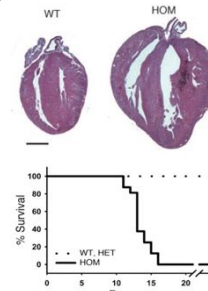


図 3. CaM の親和性の低い RyR2 をもつマウスでは著明な心肥大を呈し生後 20 日以内に死亡する

2. 研究の目的

圧負荷心肥大モデル (TAC モデル) マウスや AngII, PE または ET-1 負荷単離心筋細胞を用いて、核内への CaM の移行状況、また RyR2 に対する結合親和性や CaM のキャリアーとして予想される GRK5 の動態を検査することにより CaM の RyR2 に対する結合親和性に増強や核内への CaM 移行制御をターゲットとした心不全および心肥大を抑制できる全く新しい治療法の開発または薬剤を症的に探査することである。

3. 研究の方法

まずは、正常心筋細胞を用いて心肥大のシグナル活性を刺激する AngII および PE 負荷により CaM, GRK5 の心筋細胞内動態について心筋細胞免疫染色法を用いて検討した。また圧負荷心肥大モデルを作成し、CaM と GRK5 の細胞内分布を免疫染色法で評価した。さらに心肥大のシグナル伝達を担うヒストン脱アセチル化酵素(HDAC5)の細胞内動態を AngII または PE 負荷正常心筋細胞および圧負荷心筋細胞にて検討した。RyR2 から CaM の解離を促進するスラミンや CaM の RyR2 に対する親和性を増強させるダントロレンを用いて、CaM, GRK5, HDAC5 の細胞内動態を免疫染色法で評価した。

4. 研究成果

(1) Ang II および PE が CaM、GRK5、HDAC5 の心筋細胞内動態に及ぼす影響について
 病的な心肥大を惹起する AngII と PE を単離心筋細胞に負荷し、内因性 CaM の細胞内動態を免疫染色法で評価した。その結果、AngII および PE 負荷により RyR2 に結合している CaM は減少 (RyR2 から解離) したが、核内の CaM の濃度は増加していた。さらに、CaM の核内移行のキャリアーとなり得る GRK5 の細胞内動態も評価したところ、AngII や PE 負荷により CaM の細胞内動態と同様に核内の GRK5 の発現量は増加していた。また HDAC5 は AngII、PE を負荷することで、核外へ移行しており、心肥大のシグナルが活性化していることが実証された。

(2) ダントロレンやスラミンが CaM、GRK5、HDAC5 の心筋細胞内動態に及ぼす影響について

RyR2 からの CaM の解離を抑制すると言われていたダントロレンを AngII や PE を負荷する前に心筋細胞に投与したところ、RyR2 からの CaM の解離および CaM の核内移行、さらには核内 GRK5 の発現量の抑制がみられ、HDAC5 の核外への移行も抑制された。さらに特異的に RyR2 の CaM を強制的に解離させるスラミンを投与したところ、CaM、GRK5 の核内移行は促進し、HDAC5 は核外へと移行した。すなわち、正常心筋細胞に AngII や PE を負荷したときと同様な細胞内動態を示した。また GRK5 の活性阻害薬であるアンレキサノクスを投与したところ、AngII や PE 負荷でみられた、CaM と GRK5 の核内移行が抑制され、さらには HDAC5 の核外移行も抑制された。

(3) 圧負荷心肥大モデルを用いた検討

圧負荷心肥大モデル (TAC モデル) を作成して CaM、GRK5、HDAC5 の細胞内動態を評価した。図 4 に示すように、TAC モデルでは、RyR2 に結合している CaM は正常マウスに比べて減少し、核内の CaM 発現量は増加して

おり、核内の GRK5 の発現量も増加し、HDAC5 に核外移行も増加していた。この現象は TAC 2 週間モデル (心肥大期)、8 週間モデル (心不全期) とともに認められた。

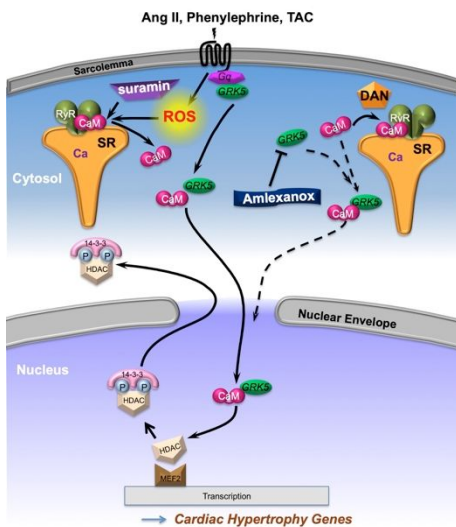


図5. RyR2に結合しているCaMが、RyR2から解離すると肥大のシグナルを活性化する。このことから、CaMの動態制御に注目した新しい心肥大抑制薬の開発が期待される

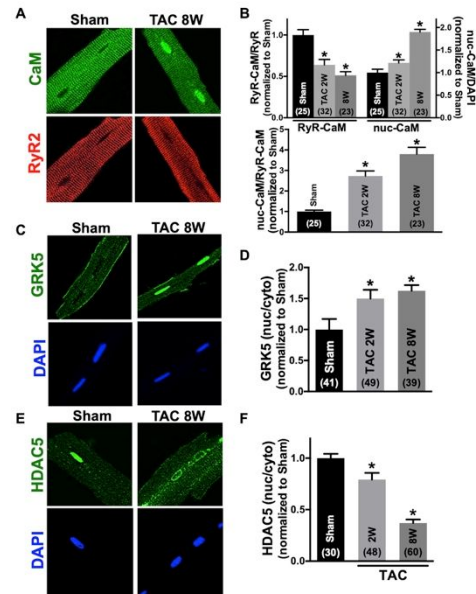


図4. TACモデルでは、CaM、GRK5がともに核内へ、HDAC5は核外への移行が認められた。

これらの結果より、RyR2 から CaM が解離することを引き金として、CaM-GRK5 複合体が核内へ移行するという現象が病的な心肥大の進展に深く関わっていることが示唆され、この RyR2 からの CaM の解離を抑制すること、さらには GRK5 の核内移行を抑制することが、病的な心肥大や心不全の進展を防ぐことができる可能性があることが示唆された。今後、CaM の心筋細胞内動態に着目した全く新しい心肥大、心不全抑制効果を要する薬剤や治療法の開発が期待される (図 5)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Oda T, Yamamoto T, Kato T, Uchinoumi H, Fukui G, Hamada Y, Nanno T, Ishiguchi H, Nakamura Y, Okamoto Y, Kono M, Okuda S, Kobayashi S, Bers DM, Yano M. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol* 125 査読有 2018、87-97
 doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.10.011

〔学会発表〕(計 3件)

小田 哲郎 Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor plays a pivotal role in driving pathological cardiac hypertrophy. Biophysical Society 62nd Annual Meeting 2018年2月20日 San Francisco, California, (Moscone Center)

小田 哲郎 Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor plays a pivotal role in driving pathological cardiac hypertrophy. 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム 2018年1月6日 東京都品川区 (品川インターシティホール)

小田 哲郎 Calmodulin, which dissociated from cardiac ryanodine receptor and translocation to the nucleus, plays a pivotal role in driving pathological cardiac hypertrophy. 第21回日本心不全学会学術集会. 2017年

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 健

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Takeshi)

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：50363122

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。