

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15443

研究課題名(和文) 心筋細胞内カルモジュリン制御による心肥大退縮の試み

研究課題名(英文) An attempt to regress cardiac hypertrophy by cardiomyocyte intracellular calmodulin control

研究代表者

矢野 雅文 (YANO, Masafumi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90294628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRyR2に対するCaMの結合を強める変異を見だし、その変異RyR2を組み込んだノックイン(KI)マウス(CaM HAマウス)を作成した。ダントロレン投与WTマウス、およびCaMHAマウスにおいては、RyR2からのCaMの解離が抑制された結果、RyR2からのCa leakが押さえられるばかりでなく、TAC後の心筋細胞の肥大が有意に抑制されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We found a mutation that strengthened the binding of CaM to RyR2 and created a knock-in (KI) mouse (CaM HA mouse) incorporating the mutant RyR2. Suppression of dissociation of CaM from RyR2 in dantrolene administered WT mice and CaMHA mice suppressed the Ca leak from RyR2 as well as that the hypertrophy of cardiomyocytes after TAC was significantly suppressed.

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 心肥大

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、不全心筋では過剰な交感神経刺激や酸化ストレスが慢性的に継続すると、RyR2 から拡張期に異常な Ca<sup>2+</sup>leak が生じて拡張期 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇をきたすが (Circulation 2000)、その発症の主因が RyR2 内でチャンネル開閉を調節する 2 か所 (N-terminal:1-600, central:2000-2500) の重要なドメイン間の連関障害;Unzipping にあることを見いだした (Circulation 2005)。その後、ダントロレンや JTV519 はドメイン連関障害を改善させることにより心不全の進行や致死性不整脈を抑制することも報告した (Circulation 2008, J Am Coll Cardiol 2009)。さらに、最近ドメイン連関障害は RyR2 から CaM (本来 Ca<sup>2+</sup>放出に抑制的に働く) を解離させることでチャンネルを leaky にし、心不全・不整脈の発症につながることを報告した (Cardiovasc Res 2012, BBRC 2014)。一方、他施設から RyR2 からの CaM の解離が心肥大を誘導する可能性が示された。即ち、RyR2 内 CaM 結合部位を変異し CaM が RyR2 に結合できなくしたマウスでは著明な心拡大と肥大、収縮能の低下を呈し生後 3 週間以内に死亡した (Yamaguchi N, et al. J Clin Invest. 2007;117:1344)。我々もマウス大動脈縮窄 (TAC) 心不全モデルにおいて、RyR2 に対する CaM の親和性低下、核内 CaM の増加を認めた。さらに HCM 型 TnT 点変異 TG マウスでも RyR2 に対する CaM の親和性が低かった。以上の知見を総合し、ドメイン連関障害に連動した RyR2 からの CaM の解離は心肥大を誘導し心不全につながる重要なステップであるという仮説を立てた。仮説が正しければ RyR2 からの CaM 解離は様々な原因で生じる心肥大に共通する新規治療ターゲットになると考えられる。

### 2. 研究の目的

心筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスの破綻は、収縮能の低下や致死的不整脈の発現を介して心不全の病態を著明に悪化させる。申請者らを含めた最近の研究により、細胞内 Ca<sup>2+</sup>調節の中心的器官である筋小胞体 (SR) に存在する心筋型 Ca<sup>2+</sup>放出チャンネル (リアノジン受容体: RyR2) の機能異常が心不全や致死的不整脈の発症に深く関与することが判明した。本研究の目的は、RyR2 内の構造連関の安定化により遅延型後脱分極 (DaD) から致死的不整脈につながる拡張期の局所的 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を遺伝的、薬理的に抑制し、新たな心不全・心肥大・致死的不整脈の包括的治療戦略をたて臨床応用につなげていくことである。

### 3. 研究の方法

我々を含めた最近の研究により、細胞内 Ca<sup>2+</sup>調節の中心的器官である筋小胞体 (SR) に存在する心筋型 Ca<sup>2+</sup>放出チャンネル (リアノジン受容体: RyR2) の機能異常が心不全や致死的不整脈のみならず、心肥大にも深く関与していることが明らかになってきた。我々は後述

する様々な知見をもとに心肥大のスイッチを入れるのは RyR2 の修飾蛋白の 1 つであるカルモジュリン (CaM) の RyR2 からの解離であるという仮説を立てた。すなわち RyR2 から CaM が解離しなければ肥大のスイッチは入らないと考えた。本研究ではこの仮説を検証すると同時に、CaM の RyR2 に対する結合親和性を高めることにより、異常な心肥大シグナリングを抑制し、心肥大の退縮から予後の改善を図るという全く新しい心不全治療法の開発を目指す。

### 4. 研究成果

TAC 手術後経時的に心筋細胞を単離培養し CaM, HDAC, GRK5 が核、細胞質の分布の解析、リン酸化 HDAC の割合の解析、肥大遺伝子の発現の解析を行った。TAC モデルで CaM の核への translocation を認めた (図 1)。

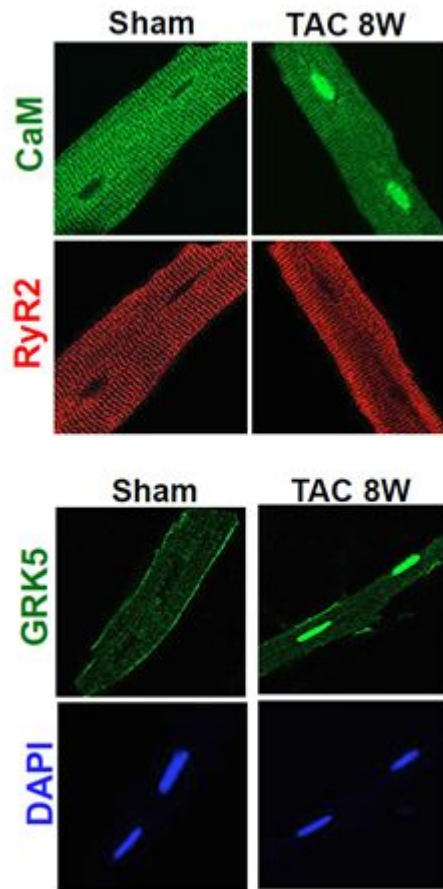


図 1 CaM と GRK5 の translocation

我々は RyR2 に対する CaM の結合を強める変異を見だし、その変異 RyR2 を組み込んだノックイン (KI) マウス (CaM HA マウス) を作成した。CaM HA マウスでは、DPC10 (CPVT における RyR2 内の変異部位: R2474S を含んだペプチドで、native domain と分子間競合してドメイン unzip を引き起こす) により CaM が解離しない、すなわちドメイン連関障害 CaM 解離が起きないことを確認している。この CaM HA マウスに対して TAC を行い 8 週間後に心筋細胞を単離し、形態、予後、肥大遺

伝子の発現を解析し、蛍光ラベルした recombinant CaM(F-CaM)を導入し、RyR2 に対する CaM の親和性を計測する。これらの解析によりドメイン連関障害 CaM 解離を抑制するという介入が心肥大を抑止することができるかを検討した。その結果 CaMHA マウスにおいては、RyR2 からの CaM の解離が抑制された結果、Ca leak が押さえられるばかりでなく、TAC 後の心筋細胞の肥大が有意に抑制されていることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Ishiguchi H, Kobayashi S, Okuda S, Okamura T, Okada M, Takemura G, Takahashi M, Mikamo A, Hamano K, Yano M.

Localized Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Complicated With Shower Emboli Originating From Apical Intramural Thrombi. *Circ J*. 2018 in press.

doi: 10.1253/circj.CJ-17-1231. 査読有

2. Yoshiga Y, Shimizu A, Ueyama T, Ono M, Fukuda M, Fumimoto T, Ishiguchi H, Omuro T, Kobayashi S, Yano M.

Strict sequential catheter ablation strategy targeting the pulmonary veins and superior vena cava for persistent atrial fibrillation. *J Cardiol*. 2018 in press. doi: 10.1016/j.jjcc.2018.01.004. 査読有

3. 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

4. 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

5. Fujimura T, Okamura T, Tateishi H, Nakamura T, Yamada J, Oda T, Mochizuki M, Nishimura S, Nishimura T, Yano M.

Serial changes in the side-branch ostial area after main-vessel stenting with kissing balloon inflation for coronary bifurcation lesions, assessed by 3D optical coherence tomography.

*Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2018 in press. doi: 10.1093/ehjci/jex213. 査読有

6. Ishiguchi H, Kobayashi S, Myoren T, Kohno M, Nanno T, Murakami W, Oda S, Oishi K, Okuda S, Okada M, Suga K, Yano M.

Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine as a Myocardial Oxidative Stress Marker Is Associated With Ventricular Tachycardia in Patients With Active Cardiac Sarcoidosis.

*Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(12). doi: 10.1161/CIRCIMAGING.117.006764. 査読有

7. Tsutsui H, Ito H, Kitakaze M, Komuro I, Murohara T, Izumi T, Sunagawa K, Yasumura Y, Yano M, Yamamoto K, Yoshikawa T, Tsutamoto T, Zhang J, Okayama A, Ichikawa Y, Kanmuri K, Matsuzaki M; J-EMPHASIS-HF Study Group.

Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Eplerenone in Japanese Patients With Chronic Heart Failure (J-EMPHASIS-HF). *Circ J*. 2017;82(1):148-158.

doi: 10.1253/circj.CJ-17-0323. 査読有

8. Ueyama T, Shimizu A, Yoshiga Y, Ono M, Fumimoto T, Yano M.

Macroreentrant form of an adenosine 5'-triphosphate-sensitive atrial tachycardia arising from the vicinity of the atrioventricular node involving the tricuspid and mitral annuli as its reentrant circuit.

*HeartRhythm Case Rep*. 2017;3(6):289-293. doi: 10.1016/j.hrcr.2017.03.001. 査読有

9. Nakamura T, Okamura T, Fujimura T, Yamada J, Nao T, Tateishi H, Maeda T, Oda T, Shiraishi K, Nakashima T, Nishimura S, Miura T, Matsuzaki M, Yano M.

Serial changes in the three-dimensional aspect of the side-branch ostium jailed by a drug-eluting stent assessed by optical coherence tomography. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2017;33(6):797-806.

doi: 10.1007/s10554-017-1080-8. 査読有

10. Fumimoto T, Ueyama T, Shimizu A, Yoshiga Y, Ono M, Kato T, Ishiguchi H, Okamura T, Yamada J, Yano M.

Inferior J waves in patients with

vasospastic angina might be a risk factor for ventricular fibrillation. *J Cardiol.* 2017;70(3):271-277. doi: 10.1016/j.jjcc.2016.12.003. 査読有

11. 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 of 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

12. 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

13. Myoren T, Kobayashi S, Oda S, Nanno T, Ishiguchi H, Murakami W, Okuda S, Okada M, Takemura G, Suga K, Matsuzaki M, Yano M. An oxidative stress biomarker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, predicts cardiovascular-related death after steroid therapy for patients with active cardiac sarcoidosis. *Int J Cardiol.* 2016;212:206-13. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.03.003. 査読有

14. Miyazaki Y, Okamura T, Fujita A, Mikamo A, Oda T, Wada Y, Yamashita A, Suzuki R, Takahashi M, Hamano K, Yano M. Coronary obstruction occurring 72h after transcatheter aortic valve replacement with a self-expandable valve. *Int J Cardiol.* 2016;223:1-3. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.132. 査読有

〔学会発表〕(計 12 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, Xiaoqiong 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, Yoriomi 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, Yoriomi 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

toRyR2 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 2016.11.12 ~ 16.

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 2016.11.12 ~ 16.

10. Yoshihide Nakamura, Takeshi Yamamoto, Takayoshi Kato, Yoriomi 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 2016.11.12 ~ 16.

11. Hironori Ishiguchi, Shigeki Kobayashi, Michiaki Kohno, Takuma Nanno, Gou Fukui, Yoko Sufu-Shimizu, Yoriomi Hamada, Takako Maeda, Shigehiko Nishimura, Tetsuro Oda, Shinnichi 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 2016.11.12 ~ 16.

12. Hironori Ishiguchi, Shigeki Kobayashi, Michiaki Kohno, Takuma Nanno, Takeki Myoren, Seiko Oda, Hiroki Tateishi, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Jutarō Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano.

Myocardial Oxidative Stress, Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, is Associated With Sustained Ventricular Tachycardia in Patient With Active Cardiac Sarcoidosis.

89th Scientific Session of American Heart Association. New Orleans 2016.11.12 ~ 16.

〔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

矢野 雅文 (YANO, Masafumi)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：9 0 2 9 4 6 2 8

### (2) 研究分担者

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：5 0 3 6 3 1 2 2