

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590868

研究課題名(和文) リアノジン受容体分子内特定ドメインをターゲットとした致死的不整脈の新しい治療

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy of the fatal arrhythmia targeting specific domain in the ryanodine receptor molecule

研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO TAKESHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50363122

研究成果の概要(和文)：リアノジン受容体の安定化に特に重要ドメインを domain2114-2149 とその domain-domain interaction のパートナーであることを特定した。パートナードメインはやはりセントラルドメインの中にあることも特定した。この2つのドメインに作用する薬物は心不全、致死的不整脈の治療薬になり得る。

研究成果の概要(英文)：We identified the important RyR2 domain for the stabilization of the RyR2 channel as domain 2114-2149 and its counterpart. The counterpart of domain 2114-2149 is in the central portion of the RyR2. The compound which affect these two domains might be novel medicines for heart failure of fatal arrhythmias.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、致死的不整脈

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋型 RyR の突然変異病である悪性高熱症と central core disease

申請者らは骨格筋型 RyR の突然変異病である悪性高熱症 (MH) および central core disease (CCD) では、その突然変異アミノ酸が、約 5000 アミノ酸という巨大分子の 4 量体である RyR の中にランダムに分布せず、ごく限られた 3 箇所 (N 末端、central、C 末端) に集中しており、中でも N 末端と central のいずれのドメインで生じた突然変異も同様のチャンネル異常を示すことに注目した。チャネ

ル孔を形成している C 末端の突然変異集中部位はチャンネル孔への直接の影響によりチャンネル異常を生じると考えられる。一方、N 末端 (AA35-614) と central (AA2117-2458) の 2 箇所のドメインはチャンネルポアとは離れ、細胞質に飛び出たいわゆる foot 構造の中にあるため、RyR のチャンネル開閉を調節している非常に重要な部位であると考えられる。そこで申請者らはこの 2 つのドメインをチャンネル制御ドメイン (N-terminal domain & central domain) と名付け、通常は互いに連関しチャンネルを安定化しているが (zipping)、

MH/CCD ではどちらかのドメインのただ一箇所の突然変異がチャンネル制御ドメイン間の連関障害を引き起こし(unzipping)、チャンネルを不安定化するという仮説をたてた。その後、申請者らはこの zipping-unzipping 仮説の正当性を証明する多数のデータを発表してきた。(T.Yamamoto et al. J Biol Chem 275:11618, 2000, T.Yamamoto et al. Biochemistry 41:1492, 2002)

(2) 心筋型 RyR の突然変異病である ARVD, CPVT :

最近、ARVD と CPVT の患者において心筋型 RyR の突然変異 (40 箇所以上) が報告されたが、その突然変異部位の分布は骨格筋型 RyR における MH/CCD とほぼ同一の部位に存在する。このことは、これら 2 つのチャンネル制御ドメインが骨格筋に限らず心筋においてもチャンネル安定化にきわめて重要であることを示している。申請者らは骨格筋での研究を心筋にいち早く応用し、心筋においても同様のチャンネル制御ドメインがチャンネル安定化に重要な役割を果たしていることを示した (T.Yamamoto & N. Ikemoto, BBRC, 2002, T.Oda et al Circulation, 2005). ごく最近 Liu らは cryo-電顕を用いた研究で、central domain1 と N-terminal domain が実際に 3 次元構造上きわめて近くに位置することを報告した (J. Biol. Chem, 2005)。この報告はわれわれの zipping-unzipping 仮説の正当性を強く支持している。

(3) Ca²⁺ leak と致死的不整脈 :

ARVD/CPVT の突然変異 RyR においては delayed afterdepolarization (DAD) を介して致死的不整脈を誘発すると考えられている。すなわち、突然変異 RyR は正常の RyR に比べて Ca²⁺ leak を生じやすく運動時カテコラミン刺激により SERCA2a (Ca²⁺ポンプ) 活性が上がり SR 内の Ca²⁺量が増えると容易に Ca²⁺ leak を生じると考えられる。RyR からの拡張期の Ca²⁺ leak は Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) の forward mode を介した Na⁺の内向き電流を誘導する。この Na⁺の内向き電流が膜電位を浅くし、閾値レベルをこえると脱分極を生じる。以上のメカニズムから RyR の安定化は致死的不整脈の治療において、理にかなった治療ターゲットであると考えられる。申請者らは、Ca²⁺ leak が ARVD/CPVT のみならず心不全においても RyR のチャンネル制御ドメインの unzipping を介して生じることを見出している (Circulation 111:3400, 2005)。従って、重症心不全における致死的不整脈も ARVD/CPVT と同様のメカニズムにより発症すると考えられる。

(4) チャンネル安定化の分子メカニズム

申請者らは 1, 4-benzothiazepine derivative の JTV519 が RyR からの Ca²⁺ leak を抑制することを報告しているが

(Circulation107;477, 2003)、さらに、最近、骨格筋型リアノジン受容体 (RyR1) の点突然変異部位 (R2163C) に対応する RyR2 内のドメイン (2114-2149) が JTV519 の作用部位であることを見出した。即ち、JTV519 は 2114-2149 に結合することにより、N 末端と central ドメイン間の unzipping を抑制し RyR を安定化することが判明した (論文投稿中)。興味深いことに、JTV519 結合部位のドメインペプチド (DP:2114-2149) は JTV519 と同様に RyR 安定化作用がある (論文投稿中)。このことは、RyR2 内にチャンネル安定化制御部位が内在されており、この部位は全く新しい心不全・致死的不整脈の治療ターゲットとなりうる可能性を示唆する。またこのドメイン (2114-2149) に結合する JTV519 以外のコンパウンドも JTV519 同様かそれ以上の RyR 安定化作用をもつ可能性がある。したがって安定化ドメインの詳細なメカニズムの解明とそこに結合する新たなコンパウンドの探索がまったく新しい治療法の開発につながる。

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 mice を用いて CPVT における不整脈発生の分子機序を解明し、リアノジン受容体内の分子内特定ドメインをターゲットとした致死的不整脈の治療を開発することである。

3. 研究の方法

(1) Knock-in mouse の作成

申請者らは CPVT 患者で実在する mutation (R2474S) を模した knock-in (KI) mouse (RyR2474S/+) をすでに作成する。

(2) Epinephrine 投与による不整脈誘発
WT および KI mouse ヘテロメトリー (Data Science International) 植え込み後、心電図監視下に腹腔内に epinephrine (2mg/KgBW) を caffeine (120mg/Kg) とともに投与し不整脈の誘発を試みる。

(3) 運動負荷による不整脈誘発

WT および KI mouse ヘテロメトリー植え込み後、心電図監視下にトレッドミルにて運動負荷を行った。

(4) ペプチドの作成

申請者らが強い RyR 安定化作用を持つことを発見した JTV519 は RyR 上の 2114-2149 に結合し、この部分のコピーであるペプチド DP2114-2149 も JTV519 同様に非常に強い RyR 安定化作用を示した。DP2114-2149 を化学合成する (外注)。合成したペプチドはマスマスペクトロスコーピーにて分子量を検定し、HPLC にて精製する (外注)。

(5) 心筋細胞の単離培養

WT および KI mouse の単离心筋細胞をコラゲナーゼの入った灌流液で灌流し単离心筋細

胞を作成、培養する。申請者らは十分な予備実験を行い KI mouse も WT mouse 同様に単離培養できる条件を見出している。

(6) SR 精製

WT および KI mouse の左室心筋から SR 分画を精製する。

(7) SR での Ca²⁺ leak の測定と JTV519 および DP2114-2149 の効果

KI および WT mouse より精製した SR にて ATP 投与により Ca²⁺ を uptake させた後 SERCA2a の特異的な阻害薬である thapsigargin を添加し Ca²⁺ leak を観察する。

(8) 単離心筋細胞の Ca²⁺ spark の測定

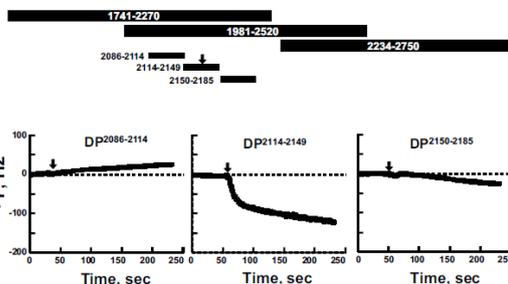
KI および WT mouse より単離培養した心筋細胞において Ca²⁺ spark を観察する。

(9) RyR チャンネル制御ドメイン連関状態の定量化

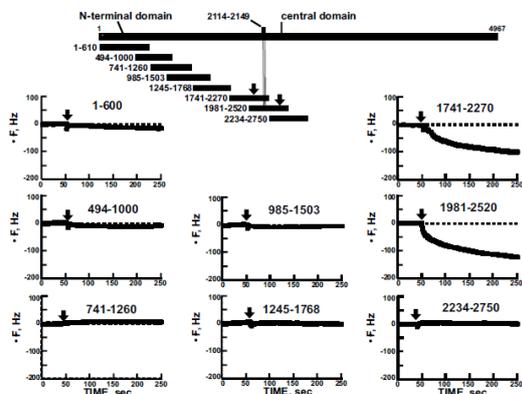
申請者らはチャンネル制御ドメインの zipping, unzipping 状態を可視化する手法として蛍光 quencher の accessibility で評価する方法を考案し、すでにいくつものデータを報告している (T. Yamamoto Biochemistry 2002, T. Oda Circulation 2005)。同様の手法で KI および WT mouse より精製した SR にてチャンネル制御ドメインを蛍光ラベルし zipping unzipping 状態を観察する。

4. 研究成果

(1) K201 の RyR2 上の結合サイトの同定

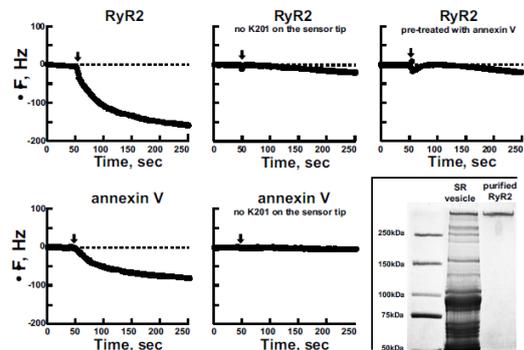


QCM による計測では K201 (JTV519) は



DP2114-2149 には結合を認めたものの、その両サイドのペプチドには結合を認めなかつ

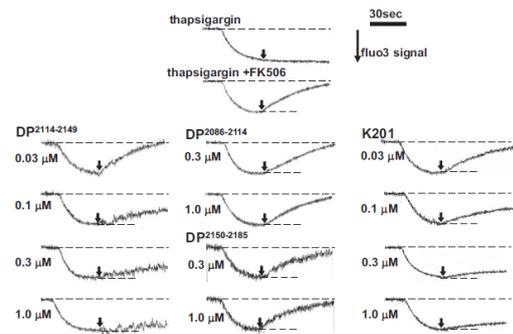
た。リアノジン受容体の発現フラグメントに対する K201 の結合を調べたところ先に実験における 2114-2149 を含むふたつのフラグメント (1741-2270, 1981-2520) に対する結合が認められた。



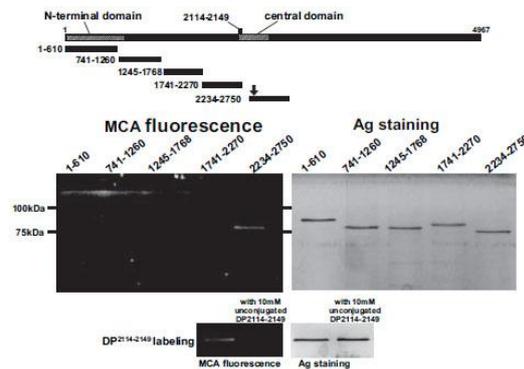
精製した RyR2 に対する結合も認められた。

(2) DP2114-2149 の K201 類似効果

DP2114-2149 には K201 同様の Ca leak 抑制効果が認められた。



この効果は DP2114-2149 がどこに作用して発現される効果かを検討を行った結果 2234-2750 のどこかであることがわかった。



(3) R2474S の催不整脈性

R2474S の KI mouse では運動負荷あるいはカフェイン+エピネフリンの投与により容易に bidirectional VT が誘発された。

(4) R2474S に対する DP2114-2149 の効果

単離心筋細胞に bioporter を用いて

DP2114-2149 を導入したところ Ca spark の減少を認めた。

(5) R2474S KI マウスのドメイン連関の評価

R2474S KI マウスより精製した SR においては N-terminal domain と central domain は unzip していたが DP2114-2149 の投与により zipping することがしまされた。

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 12 件)

- ① Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M. Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca²⁺ cycling. *Cardiovasc Res*. 2011 ;89(1):79-88 査読有り
- ② Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Doi M, Nao T, Yoshiga Y, Yamada J, Okamura T, Ueyama T, Kawamura S, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Reflects Symptomatic Status and Severity of Systolic Dysfunction in Patients with Chronic Heart Failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Jan;13(1):29-36 査読有り
- ③ Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, Suetomi T, Susa T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Yamamoto T, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2 R2474S/+ knock-in mouse model. *Circ J*. 2010 ;74(12):2579-2584. 査読有り
- ④ Ono M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca²⁺ release in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2010; 87(4) 609-617. 査読有り
- ⑤ Xu X, Yano M, Uchinoumi H, Hino A, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 ;394(3):660-666. 査読有り
- ⑥ Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res*. 2010;106(8):1413-1424. 査読有り
- ⑦ Ando M, Yamamoto T, Hino A, Sato T, Nakamura Y, Matsuzaki M. Norepinephrine spillover during exercise as a novel parameter to evaluate the severity of heart failure. *J Nucl Cardiol*. 2010; 17(5) 868-873 査読有り
- ⑧ Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol*. 2009 ;53(21):1993-2005. 査読有り
- ⑨ Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Matsuzaki M. Role of ryanodine receptor as a Ca²⁺ regulatory center in normal and failing hearts. *J Cardiol*. 2009 ;53(1):1-7. 査読有り
- ⑩ Tateishi H, Yano M, Mochizuki M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective domain-domain interactions within the ryanodine receptor as a critical cause of diastolic Ca²⁺ leak in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2009 ;81(3):536-545. 査読有り
- ⑪ Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Ikeda Y, Matsuzaki M. Defective Ca²⁺ cycling as a key pathogenic mechanism of heart failure. *Circ J*. 2008;72 Suppl A:A22-30. 査読有り
- ⑫ Yamamoto T, Yano M, Xu X, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, Oda T, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to

correct channel disorder in failing hearts. Circulation. 2008;117(6):762-772. 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ① Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Masahiro Fukuda, Akihiro Hino, Takeshi Suetomi, Masahiro Doi, Shinich Okuda, Shigeki Kobayashi, and Masunori Matsuzaki
Interruption of Novel Inter-domain Interaction Within RyR2 as a Common Therapeutic Target by Channel Stabilization in Heart Failure and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)
American Heart Association Scientific Sessions 2010. 11. 15 Chicago IL, USA
- ② Yamamoto, T, Yano, M, Suedomi, T, Ohno, M, Xu, XJ, Tateishi, H, Okuda, S, Kobayashi, S, Ikeda, Y, Matsuzaki, M
Domain2114-2149 Within RyR2 Plays a Key Role for Correcting Channel Disorder in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)
Scientific Sessions 2008 of American Heart Association, NewOrleans, USA, 2008. 11. 8-12
- ③ Yamamoto, T, Yano, M, Suedomi, T, Ohno, M, Xu, XJ, Tateishi, H, Okuda, S, Kobayashi, S, Ikeda, Y, Matsuzaki, M
Identification of Target Domains of the Cardiac Ryanodine Receptor to Correct Channel Disorder in Failing Hearts
Basic Cardiovascular Sciences Annual Conference 2009 - Molecular Mechanisms of Cardiovascular Disease. Keystone, USA 2008. 7. 20-23

[図書] (計1件)

- ① Ikeda Y, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Heart Failure Pathophysiology in Supportive Care in Heart Failure. Oxford University Press. Ch. 3, p27-47, 2008

[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) 研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO TAKESHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50363122

(2) 研究分担者

小林 茂樹 (KOBAYASHI SHIGEKI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90397993

(3) 連携研究者

なし