

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659154

研究課題名（和文）肥大型心筋症における心肥大退縮療法の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic therapy for regression of cardiac hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy

研究代表者

矢野 雅文（YANO MASAFUMI）

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90294628

研究成果の概要（和文）：肥大型心筋症(HCM)は、異常な心筋肥大に伴い致死的不整脈ないしは左室の拡張障害から心不全を生じるが、現時点で心肥大を退縮させる有効な薬物療法は存在しない。心肥大を生じる機序として、心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度との関連も報告されている。本研究では拡張期の心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に着目し、リアノジン受容体(RyR2)からの Ca^{2+} 漏出による拡張期の Ca^{2+} 濃度上昇と心肥大を来たす機序とが相互に深く関連性があること、 Ca^{2+} 漏出の抑制による心筋筋小胞体機能の改善により拡張期の心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を防ぐことで、心肥大の退縮を起こしうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Hypertrophic cardiomyopathy(HCM) is known to be a myocardial disorder characterized by idiopathic hypertrophy of the left ventricle. In HCM patients, sudden death occurs owing to lethal arrhythmia in young age and diastolic heart failure can be sometimes developed. Medical approach for regression of hypertrophy in HCM patients remains elusive. Here, we hypothesized that diastolic Ca^{2+} leak through ryanodine receptor (RyR2) might predispose to abnormal hypertrophy in HCM patients. To verify this hypothesis, we investigated the pathogenic role of Ca^{2+} leak through RyR2 in transgenic mouse (TG) model of familial hypertrophic cardiomyopathy-related cardiac troponin T mutation. Diastolic Ca^{2+} leak through defective RyR2 is induced by beta-adrenergic stimulation in TG cardiomyocytes. Dantrolene, which was found to stabilize RyR2 inhibited Ca^{2+} leak. These results suggest that stabilization of RyR2 and subsequent inhibition of Ca^{2+} leak might play a pivotal role for regression of abnormal hypertrophy in HCM patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：循環器内科学

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：肥大型心筋症、カルシウムハンドリング

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに不全心筋では、過剰な交感神経刺激や酸化ストレスが慢性的に継続した結果、筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR2) から拡張期に異常な Ca^{2+} 漏出が生じること (Circulation 2000; 102:2131-2136, Circulation 2003;107:477-484.)、この Ca^{2+} 漏出は、数十個の群れをなして存在する RyR2 からの不規則な自発的 Ca^{2+} 放出に起因し、拡張期 Ca^{2+} 濃度の上昇につながることを報告した。最近、この RyR2 からの Ca^{2+} 漏出が心肥大を誘導する可能性が示された。即ち、RyR2 内のカルモジュリン (CaM) 結合部位のアミノ酸変異により、CaM が RyR2 に結合できなくした knock-in マウスでは、RyR2 のチャネル開口確率は異常に高まりチャネルは漏出しやすくなり、肥大型心筋症 (HCM) の phenotype (著明な心拡大と肥大、収縮能の低下) を呈し生後 3 週間以内に死亡することが報告された (Yamaguchi, et al. J Clin Invest. 2007;117:1344-53)。また一部の HCM 患者では RyR2 の点突然変異がみられるとの報告もある。

一方、肥大型心筋症 (HCM) は、異常な心筋肥大に伴って、致死的不整脈ないしは左室の拡張障害から心不全を生じ、また一部の症例では長期間の経過をへて拡張型心筋症に移行する疾患で、未だに有効な特異的治療法はなく利尿薬や埋め込み型除細動器 (ICD) を用いた、いわば対症療法にとどまる。**また、HCM において心肥大を退縮させる有効な薬物療法は未だに存在しない。**

2. 研究の目的

肥大型心筋症 (HCM) において心肥大を生じ

る機序として、拡張期の心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に着目し、心筋筋小胞体機能の改善 (Ca^{2+} 漏出の抑制、 Ca^{2+} 取り込みの亢進) により拡張期の Ca^{2+} 濃度上昇を防ぐことで、異常な心肥大につながる細胞内シグナリングを抑制し心肥大を退縮させるという全く新しい治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 拡張期の心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と心肥大との関連性の検討

① CPVT 型 RyR2 点変異マウス (以下 KI) の作成と心機能および心筋組織所見の検討; Exon48 内の 2474(Arg) が Ser に置き換わった R2474S (KI#1), Exon43 内の 2246(Ser) が Leu に置き換わった S2246L (KI#2), の 2 種類の RyR2 点突然変異ノックインマウス (KI) を作成し、マウス及び心臓の構造的解析を行った。また、心臓組織標本を作成し、組織学的な所見について検討した。さらに、低用量イソプロテレノール (ISO) を投与し、心肥大の有無を含めた同様の評価を行った。

② 心筋細胞の単離; 全身麻酔下でマウス心筋細胞を単離した。単離前にコーティングした dish に単離心筋細胞をまき、 Ca^{2+} 濃度を調整した上で培養し、実験に使用した。

③ Ca^{2+} spark 測定; 単離したマウスの心筋細胞に蛍光指示薬 Fluo-4 AM を用い共焦点顕微鏡を使用して Ca^{2+} spark を測定した。データ解析には自動解析プログラムの SparkMaster を用いた。

上記②, ③についてコントロール、低用量 ISO 負荷において検討を行った。

④ HCM における拡張期 Ca^{2+} 濃度上昇と心肥大との関連性の検討

現有の TroponinT Glu160 欠損 HCM 型トラン

スジェニックマウスモデル (以下 TG) を用いて、コントロールおよび ISO 負荷を行い、心機能、肥大の評価、単離心筋細胞を用いた Ca²⁺ spark、Ca²⁺ transient の検討を行った。

⑤ HCMにおいて拡張期 Ca²⁺濃度の低下が Ca²⁺ ハンドリング、催不整脈性に及ぼす影響の検討; HCM型 TGの心筋細胞を用いて Ca²⁺漏出抑制効果とカルシウム動態に与える影響を検討した。すなわち、RyR2のドメイン連関障害の是正により拡張期の Ca²⁺漏出を抑制するダントロレンを同マウスの心筋細胞に添加し、共焦点顕微鏡を用いて Ca²⁺ transient が改善されるか、また Ca²⁺ spark が抑制されるかを検討した。

(2) 心筋細胞内 Ca²⁺ハンドリング是正による心肥大退縮効果の検討; TGにダントロレンを4週間にわたって慢性投与し、*in vivo* で心エコーにより心機能改善効果を検討した。

4. 研究成果

KIではKI#1, KI#2ともにコントロール状態では心機能、組織学的ともに Wild type (WT) のマウスと比して著変はなかった。一方、カテコラミン投与でKI#1, KI#2の心筋細胞ではWTに比べ、Ca²⁺ spark 頻度は著明に増加していた(発表論文 5: Circulation Res 2010, 発表論文 1: Circulation 2011)。また、KI#2において低容量 ISOの慢性投与で著明な心肥大を呈し、Ca²⁺ spark 頻度は著明に増加した。これらのことは、拡張期の心筋細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が心肥大を惹起することに深く関わっていることを示唆する。

一方、HCM型 TGでは、加齢に伴い軽度の心肥大と拡張機能障害を呈した。単離心筋細胞ではコントロール状態で Ca²⁺ transient の下行脚の延長を認め、Ca²⁺ spark 頻度は増加し、ISO 負荷でその傾向はさらに顕在化した。これらのことは、心肥大をきたした HCMでは拡張期 Ca²⁺濃度が上昇していることを示唆して

いる。また、ダントロレンを投与したところ、Ca²⁺ spark 頻度は著明に減少傾向であり、Ca²⁺ transient は著明に改善傾向であった。ダントロレンの慢性投与における TG に対する効果については、現在実験が継続中である。以上の成果は、RyR2を介した拡張期 Ca²⁺濃度上昇と心肥大とが相互に強い関連性を持っていること、拡張期 Ca²⁺濃度上昇の是正が心肥大退縮を起こしうる可能性を示すものであり、今後の治療法につながる重要な成果である。

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6件)

- ① Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca²⁺ release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation. 2011;124(6):682-94. 査読有
- 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;13(1):29-36. 査読有
- 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;74:2579-84. 査読有
- ④ 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 ; 394:660-6. 査読有

⑤ 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. *Cir Res.* 2010; 106:1413-24. 査読有

⑥ 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; 87:609-17. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① Suetomi T, Yano T, Kato T, Fukuda M, Hino A, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M. Coupled Conformational Changes in the Local and Global Inter-Domain Interactions Trigger Diastolic Ca²⁺ Release and Lethal Arrhythmia in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT). American Heart association Scientific meeting 2011. 15 Nov 2011. Orland, USA.

② Fukuda M, Yano M, Kato T, Hino A, Suetomi T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M. Enhancement of Calmodulin Binding to RyR2 Inhibits Aberrant Ca²⁺ Release in CPVT-Associated Mutation. American Heart association

Scientific meeting 2011. 14 Nov 2011. Orland, USA.

③ Fukuta S, Kobayashi S, Tanaka T, Susa T, Murakami W, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Ueyama T, Okamura T, Kawamura S, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a Novel Biomarker of Inflammatory Activity in Patients with Cardiac Sarcoidosis: Insight From Immunohistochemical Technique and 18F-FDG PET/CT. American Heart association Scientific meeting 2011. 14 Nov 2011. Orland, USA.

④ Yano M. Structure-based drug design to modulate RyR2 function. American Heart association Scientific meeting 2011. 13 Nov 2011. Orland, USA.

⑤ Fukuda M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Ono M, Uchinoumi H, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. Correction of Defective Calmodulin Binding to Cardiac Ryanodine Receptor Inhibits Aberrant Ca²⁺ Release in CPVT-associated Mutation. American Heart association Scientific meeting 2010. 17 Nov 2010. Chicago, USA.

⑥ Suetomi T, Yano M, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mutation-linked Defective Domain Interaction within the Ryanodine Receptor Causes Ca²⁺ Leak Leading to Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. American Heart association Scientific meeting 2010. 17 Nov 2010. Chicago, USA.

- ⑦ Hino A, Yano M, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Uchinoumi H, Susa T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Matsuzaki M. Increased Affinity of Calmodulin Binding to Cardiac Ryanodine Receptor Corrects the Defective Channel Gating in Failing Hearts
American Heart association Scientific meeting 2010. 16 Nov 2010. Chicago, USA.
- ⑧ Uchinoumi H, Yano M, Hino A, Suetomi T, Ono M, Xu X, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M.
Correction of Defective Inter-domain Interaction Within the Cardiac Ryanodine Receptor as a New Therapeutic Strategy Against Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT)
American Heart association Scientific meeting 2009. 18 Nov 2009. Orlando, USA.
- ⑨ Kobayashi S, Tanaka T, Susa T, Ono M, Uchinoumi H, Okuda S, Doi M, Kawamura S, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M.
Low-dose of β Blocker Improves Cardiac Function in Patients With Acute Heart Failure Partly by Inhibiting Ca^{2+} Leak Through the Ryanodine Receptor
American Heart association Scientific meeting 2009. 18 Nov 2009. Orlando, USA.
- ⑩ Suetomi T, Yano M, Hino A, Ono M, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M.
Mutation-linked Channel Disorder in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) is Caused by Abnormally Tight Domain-Domain Interaction in RyR2

American Heart association Scientific meeting 2009. 17 Nov 2009. Orlando, USA.

- ⑪ Xu X, Yano M, Hino A, Suetomi T, Ono M, Uchinoumi H, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ohkusa T, Matsuzaki M.
Decreased Affinity of Calmodulin to RyR2 May Be a Cause Mechanism of Leaky Channel in CPVT-associated Mutation
American Heart association Scientific meeting 2009. 16 Nov 2009. Orlando, USA.

〔図書〕 (計 2 件)

1. 奥田真一、矢野雅文；メディカルレビュー社，シグナル伝達系からみた心不全の機序と治療戦略，Cardiology Frontier, 2011年 p129-137.
2. 奥田真一、矢野雅文；医学書院，不全心筋における逆リモデリングの分子生物学的機序，呼吸と循環，2010年7月号 p657-666.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 雅文 (YANO MASAFUMI)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90294628

(2) 研究分担者

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

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00260349