

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592256

研究課題名(和文)細胞内カルシウム放出制御による新しい悪性高熱症・不整脈の治療開発と臨床応用

研究課題名(英文) Innovation of treatment for malignant hyperthermia and arrhythmia by inhibition of abnormal intracellular Ca²⁺ release through the ryanodine receptor

研究代表者

小林 茂樹 (KOBAYASHI, SHIGEKI)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90397993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症(MH)、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍症(CPVT)や心不全においては、リアノジン受容体(骨格筋型：RyR1,心筋型：RyR2)内のドメイン連関障害が、RyRからのCa²⁺漏出の原因と考えられている。MHの治療薬であるダントロレンは、RyR1に結合し、RyR1内のドメイン連関障害を是正し、RyR1からのCa²⁺漏出を抑制する。イヌ心不全モデルやCPVT型knock-inマウスにおいてもダントロレンは、RyR2に結合し、RyR2からのCa²⁺漏出を抑制し、心不全やCPVTを抑制する。このように、ダントロレンはRyR2を分子標的とした新しい心不全・不整脈治療薬となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia (MH), prevented abnormal Ca²⁺ leak by correction of the defective inter-domain interaction between N-terminal and central domains in MH-type RyR. In tachycardia-induced heart failure canine model and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-associated RyR2R2474S /+ knock-in (KI) mice model, dantrolene binds to the specific domain in RyR2, and then corrects defective inter-domain interactions within RyR2, subsequently inhibits diastolic Ca²⁺ leak. In turn, dantrolene improves cardiomyocyte function in failing hearts and prevents bidirectional VT induced by injection of epinephrine or exercise in CPVT. Thus, dantrolene may have a potential to treat heart failure and lethal arrhythmia, specifically targeting RyR2.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：悪性高熱症 心室頻拍症 心不全 ダントロレン リアノジン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) リアノジン受容体内のドメイン連関障害が筋小胞体からのCa²⁺漏出の原因である

筋小胞体は筋肉細胞内のCa²⁺貯蔵庫の役割を果たしており、リアノジン受容体(RyR)は筋小胞体膜上に存在する等しい4個のサブユニットからなるCa²⁺放出チャンネルである。各サブユニットは、約5000個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、4つのサブユニットの中央にチャンネルポア(孔)が存在する。RyR内のN末端ドメイン(1-600アミノ酸)とセントラルドメイン(2000-2500アミノ酸)の接触がしっかりしていると(Zipping)、チャンネルは安定化しているが、N末端ドメインとセントラルドメインの接触がルーズになると(Unzipping)、チャンネルは不安定になる。すなわち、悪性高熱症、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍症、不整脈原性右室心筋症、心不全においては、リアノジン受容体(骨格筋型: RyR1, 心筋型: RyR2)内のN末端ドメインとセントラルドメイン間のドメイン連関障害が、リアノジン受容体からのCa²⁺漏出の原因と考えられている。

(2) ダントロレンの悪性高熱症における分子的作用機序

最近、われわれは、悪性高熱症の治療薬であるダントロレンは、骨格筋型リアノジン受容体(RyR1)のN末端ドメインに結合し、N末端ドメインとセントラルドメイン間のドメイン連関障害を是正することによりRyR1からのCa²⁺漏出を抑制するという新しい分子作用機序を報告した。

(3) イヌ心不全モデルに対するダントロレンの心不全抑制効果

イヌ心不全モデルにおいて、ダントロレンは不全心筋の異常リアノジン受容体を分子標的とし、N末端ドメインとセントラルドメイン間のドメイン連関障害を是正することにより、Ca²⁺漏出を抑制し、その結果、心筋細胞機能を改善させ、新しい心不全・不整脈治療薬になる可能性があることをin vivoおよびin vitroの実験で証明した。さらに、ダントロレンによるRyR2内ドメイン連関障害の是正により、心不全では、RyR2から解離しているカルモジュリンのRyR2への親和性が増強し、その結果、拡張期の異常なCa²⁺漏出が抑制されることも明らかにした。

より、Ca²⁺漏出を抑制し、その結果、心筋細胞機能を改善させ、新しい心不全・不整脈治療薬になる可能性があることをin vivoおよびin vitroの実験で証明した。さらに、ダントロレンによるRyR2内ドメイン連関障害の是正により、心不全では、RyR2から解離しているカルモジュリンのRyR2への親和性が増強し、その結果、拡張期の異常なCa²⁺漏出が抑制されることも明らかにした。

(4) in vivo CPVT型 knock-in マウス (R2474S/+)に対するダントロレンの心室頻拍抑制効果

われわれは、ヒトRyR点突然変異モデルのCPVT型 knock-in マウス(R2474S/+)を用いて、RyR2の1遺伝子変異に起因するN末端ドメインとセントラルドメイン間のドメイン連関障害を是正することにより、筋小胞体内のCa²⁺に対するチャンネル開口感受性が増大し、自発的なCa²⁺ sparkや遅延後期脱分極(delayed afterdepolarization: DAD)が誘発され、CPVTが生じることを明らかにした。さらに、このCPVT型 knock-in マウス(R2474S/+)にダントロレンを投与すると、ダントロレンがRyR2からのCa²⁺漏出を抑制することにより、トレッドミル運動誘発性あるいはエピネフリン誘発性心室頻拍をほぼ完全に抑制することを報告した。

2. 研究の目的

本研究は、骨格筋および心筋筋小胞体(SR)のCa²⁺放出チャンネルであるリアノジン受容体(RyR)の点突然変異病として知られる悪性高熱症(Malignant Hyperthermia: MH)、催不整脈性右室異形成(ARVC)/カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)、および心不全に合併した心室頻拍(VT)の患者のRyRを分子標的とした根本的治療法の開発と実臨床への応用(translational research)を目的とするものである。

3. 研究の方法

イヌ心不全モデルおよびCPVT型 knock-in マウスモデルでダントロレンが有効であったため、2011年より、臨床試験「心疾患を有する心室頻拍症に対するダントロレンの安全確認試験(UMIN000004346)」を開始した。臨床プロトコルは以下の通りである。

(1) 対象:

心筋梗塞、心サルコイドーシス、拡張型心筋症、肥大型心筋症、CPVT(ARVC)など基礎疾患のある心室頻拍症症例

日本循環器学会不整脈薬物治療ガイドライン(2009年改訂版)にそった薬物治療が無効あるいは副作用のため投与できない症例(アミオダロン禁忌例、肺線維症、甲状腺機能異常症合併例)

(2) 研究のプロトコル

心室頻拍の治療アルゴリズムを適用しても治療効果が不十分でVTが出現する場合には、悪性高熱症のときの用法および用量に従って、その通常の投与量の1/3から開始し(ダントロレンを0.3mg/kg静注)効果がない場合は20mgずつ追加投与する。年齢、症状により適宜増減するが、1日総投与量は200mgまでとする。心電図モニター下(ホルター心電図)で、HR、VPCs/h、%VPC、VTの出現回数/hを24時間記録観察する。50%以上VPCおよびVT抑制効果があった場合は、悪性症候群のときの用法および用量に従って、ダントロレンを最大200mg/日を最大7日まで静注で投与する。

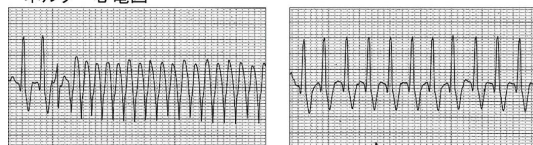
4. 研究成果

リアノジン受容体を分子標的としたダントロレンによる心不全・致死的不整脈の臨床応用:

申請者らは、犬心不全モデルやヒトCPVTマウスモデルにおいて、in vivoでダントロレンが心不全への進展を抑制したり、心室頻拍を抑制することを報告してきた(*J Am Coll*

Cardiol. 2009;53:1993-2005. *Cir Res.*2010;81:1413-1423. *CirJ.*2010;74:2579-84. *Circulation.*2011;124:682-94.)。ダントロレンの作用機序の最も注目すべき点はRyRの安定化作用であるため、遮断薬や他の抗不整脈薬と違い、心抑制がないことである。したがって、心不全の患者には非常に使いやすい。そこで、平成2011年度から、ダントロレンの心不全・致死的不整脈に対する安全性を確認するための臨床試験(*YUMIN4346*)を開始した。当院で臨床試験を行った3症例において、ダントロレンの安全性・有効性が示された。

A. ダントロレン投与前 B. ダントロレン投与後
ホルター心電図



(図1)ダントロレン投与前後のホルター心電図

(図1)に示すように、ホルター心電図でダントロレン投与前に認められたVTはダントロレン投与後にはVTは認められなくなった。また、ダントロレン投与前後で、VT studyを施行した。2連刺激(S1S2350msec)にてダントロレン投与前に再現性を持って誘発されたVTはダントロレン投与後には誘発されなくなった。

これらの結果を踏まえて、今後、RyR2安定化薬ダントロレンの心不全・心筋症患者における心室頻拍(VT)抑制効果を多施設共同試験で検証する予定である。

ダントロレンは、通常の臨床投与量では、心抑制がなく、従来の抗不整脈薬や心不全治療薬とは全く異なった作用機序(異常リアノジン受容体を分子標的)を持つことから、心機能の低下した心不全患者や薬物抵抗性の致死的不整脈に対する新しい治療薬となることが期待される。

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 8 件)

1. Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, in press. 査読有
2. Kobayashi S, Murakami W, Myoren T, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Nao T, Wada Y, Matsuzaki M, Yano M. A low-dose 1 blocker effectively and safely slows heart rate in patients with acute decompensated heart failure and rapid atrial fibrillation. *Cardiology*. 2014;127:105-113. 査読有
3. Fujita T, Fujino N, Anan R, Tei C, Kubo T, Doi Y, Kinugawa S, Tsutsui H, Kobayashi S, Yano M, Asakura M, Kitakaze M, Komuro I, Konno T, Hayashi, Kawashiri M, Ino H, Yamagishi M. Sarcomere Gene Mutations Are Associated With Increased Cardiovascular Events in Left Ventricular Hypertrophy. *JACC Heart Failure* 2013;6:459-466. 査読有
4. Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Murakami W, Fukuda S, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Okamura T, Yano M, Matsuzaki M. A low-dose blocker in combination with milrinone safely improves cardiac function and eliminates pulsus alternans in patients with acute decompensated heart failure *Circ J*. 2012 ;76:1646-53. 査読有
5. Susa T, Kobayashi S, Tanaka T, Murakami W, Akashi S, Kunitsugu I, Okuda S, Doi

M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Okamura T, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a novel biomarker for predicting cardiac events and evaluating the effectiveness of carvedilol treatment in patients with chronic systolic heart failure. *Circ J*. 2012;76:117-26. 査読有

6. Hino A, Yano M, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Murakami W, Susa T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2012;96:433-43. 査読有
7. 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;124:682-94. 査読有
8. 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; 13:29-36. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Takeki Myoren, Shigehiko Nishimura,

- Takayoshi Katoh, Masakazu Fukuda, Makoto Ono, Hiroki Tateishi, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
 「 A Novel Selective EP4 Receptor Agonist Improves Intracellular Ca²⁺ Handling and Cardiomyocyte Function in Intact Failing Cardiomyocytes」
86th Scientific Session of American Heart Association, 2013.11 , Dallas, (U.S.A)
2. Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Tadamitsu Nakashima, Hiroki Tateishi, Shinichi Okuda, Masahiro Doi, Yasuaki Wada, Tomoko Nao, Jutaro Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki
 Oral 「 Elevated Myocardial Oxidative Stress Induced by Catecholamines Related to Transient Left Ventricular Dysfunction in Patients With Takotsubo Cardiomyopathy」
85th Scientific Session of American Heart Association, 2012.11 , Los Angeles, (U.S.A)
3. Shigeki Kobayashi, Wakako Murakami, Seiko Fukuta, Masakazu Fukuda, Shinichi Okuda, Tomoko Nao, Masahiro Doi, Yasuaki Wada, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki
 Oral 「 Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, An Oxidative Stress Marker, Predicts The Inflammatory Activity within the Heart in Patients with Cardiac Sarcoidosis」
85th Scientific Session of American Heart Association, 2012.11 Los Angeles , (U.S.A)
4. Shigeki Kobayashi, Wakako Murakami, Takayoshi Kato, Masakazu Fukuda, Akihiro Hino, Hiroki Tateishi, Takeshi Yamamoto, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki
 Oral 「 Fixing Ca²⁺ Leakage From Cardiac Ryanodine Receptor by Low-dose of Blocker Safely Enhances Inotropic Response to Milrinone in Acute Heart Failure」
5th Scientific Session of American Heart Association, 2012.11 , Los Angeles, (U.S.A)
5. Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Takamasa Oda, Hiroki Tateishi, Tomoko Nao, Jutaro Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki
 Poster 「 Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a Novel Marker of Left Ventricular Remodelling in Patients With Dilated Cardiomyopathy」
85th Scientific Session of American Heart Association, 2012.11 Los Angeles, (U.S.A)
6. Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano, Takeshi Yamamoto, Masunori Matsuzaki
 Symposium 「 Ryanodine receptor-targeting therapy against heart failure and lethal arrhythmia」
The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, 2011.12, The National Center of Science Building(Tokyo)
7. Seiko Fukuta, Shigeki Kobayashi, Takeo Tanaka, Takehisa Susa, Wakako Murakami, Shinichi Okuda, Masahiro

Doi, Yasuaki Wada, Tomoko Nao, Jutaro Yamada, Takeshi Ueyama, Takayuki Okamura, Shuji Kawamura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki

Poster 「 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 」
Circulation.2011 ;124:A10269

84rd Scientific Session of American Heart Association, 2011.11 Orlando, (U.S.A)

8. Shigeki Kobayashi, Takehisa Susa, Tanaka Takeo, Wakako Murakami, Shinichi Okuda, Masahiro Doi, Tomoko Nao, Yasuaki Wada, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki.

Poster 「 Low-dose of blocker in combination with milrinone improve cardiac function in patients with acute decompensated heart failure 」
Eur Heart J32[Suppl 1] :785
European Society of Cardiology Congress 2011, 2011.8, Paris, (France)

〔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
http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~ninai/result/paper_eng.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

なし