

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293189

研究課題名(和文) リアノジン受容体構造安定化による心不全・心肥大・致死的不整脈の包括的治療戦略

研究課題名(英文) Comprehensive strategy of heart failure, cardiac hypertrophy and lethal arrhythmia via stabilizing the structure of ryanodine receptor

研究代表者

矢野 雅文 (YANO, Masafumi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90294628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてわれわれはRyR結合CaMの親和性を制御することによりRyRの構造を安定化することに成功し、さらにはRyRの構造安定化は不全心筋のCaハンドリングを改善し、心不全の有効な治療法となりえることが分かった。また、RyRの構造安定化はRyRからのCaMの乖離を防ぐことで心肥大の抑制をも可能となることも解明できた。最後にRyRの構造安定化により遺伝的致死的不整脈や実験的心不全モデルにおける致死的不整脈をも治療することが可能であることが解明された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in stabilizing the structure of RyR by controlling the affinity of RyR-bound CaM, and further stabilizing the structure of RyR improves Ca handling of the defective myocardium, effective treatment of heart failure It turned out to be a law. We also clarified that stabilization of RyR structure can also suppress cardiac hypertrophy by preventing divergence of CaM from RyR. Finally, it was clarified that it is possible to treat genetic lethal arrhythmia and fatal arrhythmia in experimental heart failure model by structural stabilization of RyR.

研究分野：循環器内科学

キーワード：リアノジン受容体 Caハンドリング カルモジュリン

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、(1)心不全では RyR2 の構造変化による異常な Ca²⁺漏出が認められ、遮断薬および 1,4-benzothiazepine derivative の K201 (JTV519)はいずれも、作用点はそれぞれ異なるものの、RyR2 内の構造変化の是正という共通の機序を介して心不全時の Ca²⁺漏出を防ぎ、細胞内 Ca²⁺過負荷を改善すること (Circulation 2002, Circulation 2003, Circulation 2004)、さらに(2)この RyR2 内の構造変化を詳細に検討した結果、Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) や Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia(CPVT)にみられる RyR2 点突然変異集合領域 {N-terminal domain (1-600)、Central domain (2000-2500):正常では互いに連関し(domain zipping)チャネルを安定化}が、不全心筋や CPVT 型 RyR2 knock-in マウス (RyR2 R2474S/+)の心筋では、各々FKBP12.6 の解離や点突然変異により domain 連関障害 (zipping unzipping)を生じていること、(3) K201 (JTV519)、ならびに骨格筋型 RyR(RyR1)の点突然変異病である悪性高熱圧症 (MH) の特効薬のダントロレンが domain 連関を是正することにより (unzipping zipping)、Ca²⁺漏出を抑制することを見出した (Circulation 2005, J Am Coll Cardiol 2009, Circ Res 2010, Circulation 2011)。

さらに申請者らは、この N-terminal - central (N-C) domain 連関障害は、カルモジュリン(CaM : RyR2 と結合しチャネル活性を抑制)の binding domain (CaMBD:3583-3603)と、CaM と相同性の極めて高い CaM-like domain (CaMLD: 4064-4210)との異常な連関を誘導し、CaM の RyR2 からの解離を引き起こした結果、Ca²⁺漏出を生じることを見出した (Cardiovasc Res 2010, Biochem Biophys Res Commun. 2010, Cardiovasc Res 2012.)。

2. 研究の目的

心筋細胞内 Ca²⁺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 Ca²⁺調節の中心的器官である筋小胞体 (SR)に存在する心筋型 Ca²⁺放出チャネル (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 Ca²⁺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

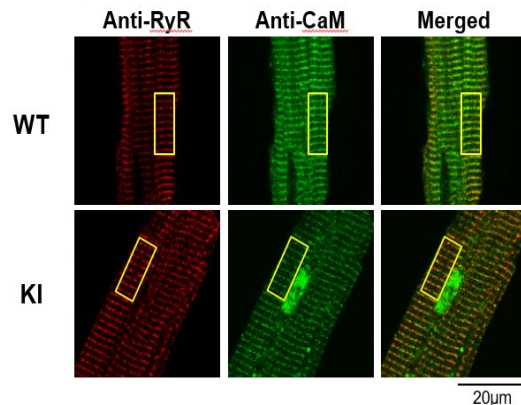
(1)RyR2 の点突然変異(N4103K)を内在する

knock-in(KI) マウス、HCM 型トランスジェニックマウス、およびマウス大動脈縮窄(TAC)心不全モデルにおいて、in vivo における心機能、不整脈を解析し、さらに各モデルの心筋より摘出した単離心筋細胞、SR を用いて、RyR2 内構造連関 (Domain switch:D Transmitter:T Gate manager:G))を定量的に評価し (D: by N-C domain 連関, T: by CaM 結合能, G: by Ca²⁺ spark)、RyR2 から Ca²⁺が漏出 (RyR2 の不安定化)する機序を解明する。(2) (1)で得られた知見に基づき、RyR2 内ドメイン連関への介入、または CaM の RyR2 に対する親和性を高めることによって、心不全、心肥大、不整脈に対する包括的治療法を確立する。

4. 研究成果

CaM like domain(T)に mutation をもつ KI マウス(N4103K KI)においては、CaM の親和性は RyR のリン酸化レベルにかかわらず低下していることがわかった(図)。D に作用するダントロレンは D に mutation をもつ KI マウス (R2474S KI)においては CaM の親和性を上げ、チャネル安定化作用を示すが、T に mutation をもつ KI マウス(N4103K KI)においては CaM の親和性を上げることはなく、チャネル安定化作用を示さなかった。以上の結果から T に mutation をもつ KI マウス(N4103K KI)においては CaMLD が CaMBD に結合することにより CaM を kick-out しているという申請者らのモデルが確認できた。さらに D への介入はこの異常を是正できないことも確認できた。

TAC, MI のマウスモデルにおいて D に作用するダントロレンを用いて CaM の親和性を上げることで Ca ハンドリングの是正、心肥大の是正、不整脈の抑制が可能となることを確認した。



本研究により RyR2 における T の役割、および治療ターゲットとしての T の重要性が明らかとなった。今後は T に作用できる低分子コンパウンドの開発とこれまで余り分子メカニズムがわかっていない Gate manager:G の分子機構の解明、及びそれを利用した治療の可能性の解明が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. 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 Jan;14(1):120-127 査読有 doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.019.
2. 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 Ca²⁺ Leakage through the Ryanodine Receptor by Suppressing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Induced by Isoproterenol in Failing Cardiomyocytes. *PLoS One*. 2016 Sep 22;11(9):e0163250 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0163250
3. 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. 査読有 doi: 10.1016/j.ijcard.2016.03.003.
4. 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. 査読有 doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.132
5. Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, Thomas DD, Chen-Izu Y, Kato T, Yamamoto T, Yano M, Cornea RL, Bers DM. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:240-8. 査読有 doi: 10.1016/j.jcin.2015.10.037.
6. Kobayashi S, Myoren T, Oda S, Inari M, Ishiguchi H, Murakami W, Fukuda M, Tanaka T, Okuda S, Nao T, Doi M, Yamada J, Okamura T, Hoshii Y, Suga K, Matsuzaki M, Yano M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a novel biomarker of inflammatory activity in patients with cardiac sarcoidosis. *Int J Cardiol*. 2015;190:319-28. 査読有 doi: 10.1016/j.ijcard.2015.04.144
7. Kobayashi S, Susa T, Ishiguchi H, Myoren T, Murakami W, Kato T, Fukuda M, Hino A, Suetomi T, Ono M, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Doi M, Yamamoto T, Yano M. A low-dose 1-blocker in combination with milrinone improves intracellular Ca²⁺ handling in failing cardiomyocytes by inhibition of milrinone-induced diastolic Ca²⁺ leakage from the sarcoplasmic reticulum. *PLoS One*. 2015 Jan 23;10(1):e0114314. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0114314
8. Yoshimura M, Nao T, Miura T, Okada M, Nakashima Y, Fujimura T, Okamura T, Yamada J, Matsunaga N, Matsuzaki M, Yano M. New quantitative method to diagnose coronary in-stent restenosis by 64-multislice computed tomography. *J Cardiol*. 2015;65(1):57-62. 査読有 doi: 10.1016/j.jjcc.2014.03.013.
9. Uchida K, Wada Y, Ariyoshi T, Okuda S, Murakami W, Myoren T, Harada N, Yamamoto T, Ueyama T, Tanaka N, Yano M. Kinetics of left ventricular rotation during exercise and its relation to exercise tolerance in atrial fibrillation: assessment by two-dimensional speckle tracking echocardiography. *J Echocardiogr*. 2014;12(3):89-97. 査読有 DOI: 10.1007/s12574-014-0205-5
10. 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;448(1):1-7. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.152.
11. Nakashima T, Ohkusa T, Okamoto Y, Yoshida M, Lee JK, Mizukami Y, Yano M. Rapid electrical stimulation causes alterations in cardiac intercellular junction proteins of cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(9):H1324-33. 査読有 doi: 10.1152/ajpheart.00653.2013.
12. Yano M, Okuda S. Does a ripple of Ca²⁺ leak develop into a rogue wave that can trigger pathological hypertrophy? *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(15):1580-2. 査読有 DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.064

13. Kobayashi S, Murakami W, Myoren T, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Nao T, Wada Y, Matsuzaki M, Yano M. A low-dose β -blocker effectively and safely slows the heart rate in patients with acute decompensated heart failure and rapid atrial fibrillation. *Cardiology*. 2014;127(2):105-13. 査読有
doi: 10.1159/000355312.

14. Fujimura T, Miura T, Nao T, Yoshimura M, Nakashima Y, Okada M, Okamura T, Yamada J, Ohshita C, Wada Y, Matsunaga N, Matsuzaki M, Yano M. Dual-source computed tomography coronary angiography in patients with high heart rate. *Heart Vessels*. 2014 Jul;29(4):443-8. 査読有
doi: 10.1007/s00380-013-0383-5.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. Go Fukui, Takeshi Yamamoto, Takayoshi Kato, Takako Maeda, Shigehiko Nishimura, Akihiro Hino, Takeshi Suetomi, Makoto Ono, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano 「Dantrolene Cannot Inhibit Aberrant Ca²⁺ Release and Arrhythmias Without Calmodulin in Pressure Overload Heart Failure」 88th Scientific Session of American Heart Association Orlando 2015.11.7 ~ 11

7. Takuma Nanno, Shigeki Kobayashi, Seiko Oda, Hironori Ishiguchi, Takeki Myoren, Yosuke Miyazaki, Takeshi Suetomi, Makoto Ono, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Jutarō Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano 「A Marked Increase in Myocardial Oxidative Stress Associated With Sympathetic Hyperactivity is Related to Transient Myocardial Dysfunction in Patients With Takotsubo Cardiomyopathy」 88th Scientific Session of American Heart Association Orlando 2015.11.7 ~ 11

8. Shigehiko Nishimura, Takeshi Yamamoto, Go Fukui, Takako Maeda, Akihiro Hino, Takeshi Suetomi, Makoto Ono, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano 「Dantrolene Enhances Binding of Calmodulin to RyR2 in CPVT Which Mutation Located at Central Domain but Does Not Enhance That in CPVT With Mutation at CaM-like Domain」 88th Scientific Session

of American Heart Association
Orlando 2015.11.7~11

9. Shigehiko Nishimura, Takeshi Yamamoto, Go Fukui, Takako Maeda, Akihiro Hino, Takeshi Suetomi, Makoto Ono, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano 「High Affinity CaM, but Not Normal Affinity CaM Can Prevent Arrhythmias in CPVT Which Mutation is Located at CaM-like Domain of RyR2」 88th Scientific Session of American Heart Association Orlando 2015.11.7~11

10. Shinichi Okuda, Takayoshi Kato, Masakazu Fukuda, Shigehiko Nishimura, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano 「RyR2 Stabilization by Inhibiting Aberrant Ca²⁺ Release Mediated by CaMKII Signaling Within the Increase of Ca²⁺ Buffering Capacity Suppress Arrhythmogenesis in Cardiac Troponin T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

11. Tadimitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa, Tomoko Nao, Noriko Harada, Yasuaki Wada, Takeshi Ueyama, Shigeki Kobayashi, Yasuhiro Ikeda, Hiroyuki Sawatari, Akiko Chishaki, Shin-ichi Ando, Masafumi Yano 「Correlations Between Sleep Disordered Breathing Indexes and Cardiac Functional Parameters in Patients With Chronic Heart Failure」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

12. Tadimitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa, Tomoko Nao, Noriko Harada, Yasuaki Wada, Takeshi Ueyama, Shigeki Kobayashi, Yasuhiro Ikeda, Hiroyuki Sawatari, Akiko Chishaki, Shin-ichi Ando, Masafumi Yano 「Finding Out a Useful Parameter of Sleep Disordered Breathing in Chronic Heart Failure Patients」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

13. Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Kazuyoshi Suga, Masunori Matsuzaki 「Increased Stiffness of Aorta is Related to the Decreased Myocardial Flow Reserve Assessed by NH3 Myocardial Perfusion PET in Patients With Hemodialysis」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

14. Takayoshi Kato, Takeshi Yamamoto,

Takako Maeda, Shigehiko Nishimura, Wakako Murakami, Takeshi Suetomi, Makoto Ono, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano 「Dissociation of Calmodulin From RyR2 Causes Diastolic Ca²⁺ leak and Induces Lethal Arrhythmias in Pressure-overload Heart Failure」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

15. Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Hironori Ishiguchi, Takeki Myoren, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Kato, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano 「A Recombinant Atrial Natriuretic Peptide Prevents Aberrant Ca²⁺ Leakage Through Ryanodine Receptor by Suppression of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Failing Cardiomyocytes」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

16. Takeki Myoren, Shigeki Kobayashi, Hironari Ishiguchi, Wakako Murakami, Makoto Ono, Shinichi Okuda, Tomoko Nao, Jutarō Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano 「Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a Biomarker of Oxidative Stress, Predicts Cardiac Events in Patients With Cardiac Sarcoidosis」 87th Scientific Session of American Heart Association Chicago 2014.11.15~19

〔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：90294628

(2) 研究分担者

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

小林 茂樹 (KOBAYASHI, Shigeki)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90397993