

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670404

研究課題名(和文)細胞内Ca²⁺制御による新たな肥大型心筋症の分子標的療法の開発研究課題名(英文) New molecular targeting therapy for regression of cardiac hypertrophy by inhibiting abnormal Ca²⁺ leak through RyR2 in hypertrophic cardiomyopathy

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥大型心筋症(HCM)では、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Ca²⁺濃度との関連が報告されているが詳細は不明である。本研究では拡張期の心筋細胞内Ca²⁺濃度上昇に着目し、リアノジン受容体(RyR2)からの異常なCa²⁺leakによる拡張期のCa²⁺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、RyR2安定化を介したCa²⁺ leak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Ca²⁺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 a myocardial disorder characterized by idiopathic hypertrophy of the left ventricle. In familial HCM patients, it is the cause of sudden death by lethal arrhythmia in young age and the cause of heart failure disability at diastolic phase of HCM. However, medical approach of the regression of hypertrophy remains elusive. Here, we hypothesized that diastolic Ca²⁺ leak through ryanodine receptor (RyR2) is one of the important factor for triggering abnormal hypertrophy in HCM. To verify this hypothesis, we investigated the pathogenic role of Ca²⁺ leak through RyR2 in transgenic mouse (TG) model of familial HCM-related cardiac troponin T mutation. Diastolic Ca²⁺ leak through defective RyR2 caused by CaMKII activation was seen in TG cardiomyocytes and RyR2 stabilizer, dantrolene inhibited Ca²⁺ leak in TG. These results suggest that inhibiting Ca²⁺ leak by RyR2 stabilization might play a role for the regression of abnormal hypertrophy in HCM.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥大型心筋症 リアノジン受容体 カルシウムリーク

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

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+} leak が生じること (Circulation 2000 102:2131-2136)、この Ca^{2+} leak 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+} leak が心肥大を誘導する可能性が示された。即ち、RyR2 内のチャネル制御蛋白であるカルモジュリン (CaM) が RyR2 に結合できなくしたロックインマウスでは、RyR2 からの Ca^{2+} leak が生じ、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、未だに心不全進行や致死性不整脈発生に対する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) における心肥大を生じる機序として、拡張期の心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に着目する。つまり、点突然変異をきたした心筋収縮蛋白における Ca^{2+} 感受性の異常と、心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度調節に重要な役割を果たしている RyR2 の機能異常、すなわち Ca^{2+} leak 発生との関連性を RyR2 の修飾キナーゼの一つである Ca^{2+} /calmodulin kinase II (CaMKII) の活性化を介した機序から解明する。また、1) RyR2 安定化薬のダントロレン、2) RyR2 安定化作用を持つ制御蛋白であるカルモジュリンを使用し、それらの投与によりもたらされる RyR2 安定化を介した心筋筋小胞体機能の改善 (Ca^{2+} leak の抑制) により拡張期の Ca^{2+} 濃度上昇を防ぐこと、さらには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

CPVT 型 RyR2 点変異マウス (以下 KI) を用いた Ca^{2+} leak 発生に伴う催不整脈性の評価と RyR2 のチャネル制御蛋白である CaM 投与による RyR2 安定化の催不整脈性への効果: Exon48 内の 2474(Arg) が Ser に置き換わった R2474S の KI を使用し、その心筋細胞を単離して、a) 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 測定を、b) 蛍光指示薬 Di-8-ANNEPS を用いて膜電位を測定し同マウスの心筋細胞で遅延型後脱分極 (DAD) がみられるか、イソプロテレノール (ISO) 負荷により DAD 誘発が促進されるか、について検討した。また、RyR2 の機能を安定化させる制御蛋白である CaM と、RyR2 への結合能を高めた GSH-CaM を投与することによる a), b) への効果について検討した。

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: 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、心機能評価と単離心筋細胞を用いた Ca^{2+} spark とペーシングの後の静止期に見られる spontaneous Ca^{2+} transient (sCaT) の出現頻度を測定した。また、CaMKII 阻害薬を急性投与し、その効果を検討した。

ヒトの HCM 及び拡張型心筋症 (DCM) 患者で報告されている TnT 点突然変異を含んだペプチド (19 種類を作成) をサポニン処理したコントロールの単離心筋細胞に投与し、 Ca^{2+} spark の増加するペプチドが存在するかを評価した。また、cAMP の投与下で Ca^{2+} spark が著明に増加するペプチドの有無も合わせて検討した。

2) HCM において拡張期 Ca^{2+} 濃度の低下が Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 漏出抑制効果と Ca^{2+} 動態に与える影響を検討した。すなわち、RyR2 安定化作用により拡張期の Ca^{2+} leak 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 と sCaT の頻度が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

KI の心筋細胞ではカテコラミン投与で WT に比べ、RyR2 における異常な Ca²⁺ leak を可視化した Ca²⁺ spark 頻度と DAD はともに著明に増加していた。またその際にはカルモジュリン (CaM) の RyR2 への結合能は低下していた。一方で、GSH-CaM 投与により RyR2 の CaM 結合能を高めることで Ca²⁺ spark 頻度と DAD は著明に減少した (発表論文 3:BBRC 2014)。これらのことは、CaM 結合能の増加による RyR2 安定化により拡張期の心筋細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が抑制され、催不整脈性が減少することを示しており、RyR2 安定化による拡張期の心筋細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇の抑制が治療ターゲットとなりうることを示唆している。

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、CaMKII 阻害薬とダントロレンを急性投与したところ、Ca²⁺ spark 頻度は著明に減少傾向であり、Ca²⁺ transient は改善傾向であった。

DCM または HCM 患者で見られた TnT 遺伝子変異を含むペプチドを投与した実験では、幾つかのペプチドの投与でコントロール状態及び cAMP 投与で Ca²⁺ spark が増加するペプチドが見つかった。

以上の成果は、(1) HCM において、CaMKII 活性化が RyR2 からの Ca²⁺ leak 発生による拡張期 Ca²⁺ 濃度上昇に深く寄与していること、(2) TnT 遺伝子変異と RyR2 からの異常

な Ca²⁺ leak 発生に関連性がある可能性があること、(3) RyR2 を介した拡張期 Ca²⁺ 濃度上昇と心肥大とが相互に関連性を持っていること、(4) RyR2 の安定化による拡張期 Ca²⁺ 濃度上昇の是正が心筋細胞内 Ca²⁺ 動態を改善しうることを示している。さらにこれらの成果は心筋細胞内 Ca²⁺ 動態の改善が心肥大退縮につなが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 4 件)

1. 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;10:e0114314. 査読あり、DOI: 10.1371/journal.pone.0114314.
2. Yano M, Okuda S. Does a ripple of Ca(2+) leak develop into a rogue wave that can trigger pathological hypertrophy? J Am Coll Cardiol. 2014;63:1580-2. 査読あり、DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.064.
3. 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 May 23;448(1):1-7. 査読あり、DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.152.

4. 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 the heart rate in patients with acute decompensated heart failure and rapid atrial fibrillation. *Cardiology*. 2014;127:105-13. 査読あり、DOI: 10.1159/000355312.

〔学会発表〕（計 23 件）

1. Okuda S, Kato M, Fukuda M, Nishimura S, Kobayashi S, Oda T, Yamamoto T, Yano M. RyR2 stabilization by inhibiting aberrant Ca²⁺ release mediated by CaMKII signaling and Ca²⁺ buffering function suppress arrhythmogenesis in Troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 2015; 36 (Supplement), 371.
2. Okuda S, Kato M, Sufu Y, Fukuda M, Nishimura S, Kobayashi S, Oda T, Yamamoto T, Yano M. Inhibition of aberrant Ca²⁺ release through RyR2 mediated by CaMKII and Ca²⁺ buffering suppresses arrhythmogenesis in Troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J* 2016; 80[Suppl] : 2390.
3. Okuda S, Kato M, Fukuda M, Nishimura S, Kobayashi S, Oda T, Yamamoto T, Yano M. RyR2 Stabilization by Inhibiting Aberrant Ca²⁺ Release Mediated by CaMKII and Ca²⁺ Buffering Suppresses Arrhythmogenesis in Cardiac Troponin T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Cir J* 2015; 79(Suppl.1): 2417.
4. Okuda S, Fukuda M, Kato M, Nishimura S, Kobayashi S, Oda T, Yamamoto T, Yano M. Dantrolene suppresses arrhythmogenesis by inhibition of aberrant Ca²⁺ release mediated by CaMKII and Ca²⁺ buffering in Troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Heart Failure*. 2015;21: 10, S188.
5. Okuda S, Kato M, Fukuda M, Nishimura S, Kobayashi S, Oda T, Yamamoto T, Yano M. 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. *Circulation* 2014; 130: A9414.
6. Okuda S, Fukuda M, Kato M, Nishimura S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Yano M. Stabilization of RyR2 by inhibition of CaMKII-mediated aberrant Ca²⁺ release may suppress arrhythmogenesis in cardiac troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal* 2014;35 (Supplement), 712.
7. Okuda S, Fukuda M, Kato M, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Yano M. RyR2 Stabilization by Inhibition of CaMKII-mediated Aberrant Ca²⁺ Release Suppress Arrhythmogenesis in Cardiac Troponin T-related Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*. 2014; 20: 10, S189
8. Yamamoto T, Katoh T, Nishimura S, Hino A, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Ryanodine Receptor Bound Calmodulin as a Novel Therapeutic Target of Heart Failure and Cardiac Hypertrophy. *Circ J* 2016; 80[Suppl] : 313.
9. Fukui G, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Dantrolene cannot inhibit aberrant Ca²⁺ release and arrhythmias without calmodulin in pressure overload heart failure. *Circ J* 2016; 80[Suppl] : 2382.
10. Nishimura S, Yamamoto T, Fukui G, Maeda T, Hino A, Suetomi T, Ono M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. High Affinity CaM, but not normal affinity CaM can prevent arrhythmias in CPVT which mutation is located at CaM-like domain of RyR2. *Circulation* 2015; 132: A13700.
11. Nishimura S, Yamamoto T, Fukui G, Maeda T, Hino A, Suetomi T, Ono M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. 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. *Circulation* 2015; 132: A13816.
12. Fukui G, Yamamoto T, Kato T, Maeda T, Nishimura S, Hino A, Suetomi T, Ono M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Dantrolene

- cannot inhibit aberrant Ca²⁺ release and arrhythmias without calmodulin in pressure overload heart failure. *Circulation* 2015; 132: A14991.
13. Oda T, Yamamoto T, Nishimura S, Kato M, Okuda S, Kobayashi S, Bers DM, Yano M. In Failing Cardiomyocytes, Calmodulin Dissociation From RYR2 and Defective Domain Interaction Leads To Channel Destabilization. *Journal of Heart Failure*. 2015;21: 10, S190.
 14. Yamamoto T, Katoh T, Maeda T, Nishimura S, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. RyR Bound Calmodulin Plays a Key Role in Arrhythmogenesis in End-Stage Heart Failure. *Circ J* 2015; 79[Suppl] : 282.
 15. Katoh T, Yamamoto T, Maeda T, Ishiguchi H, Nishimura T, Nishimura S, Myoren T, Murakami W, Suetomi T, Ohno M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Ueyama T, Kobayashi S, Yano M. Dantrolene Might be a New Anti-arrhythmic Drug Targeting Intracellular Calcium Release Channels in Pressure-overloaded Heart Failure. *Circ J* 2015; 79[Suppl] : 803.
 16. Katoh T, Yamamoto T, Maeda T, Ishiguchi H, Nishimura T, Nishimura S, Myoren T, Murakami W, Suetomi T, Ohno M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Ueyama T, Kobayashi S, Yano M. Stabilization of Ryanodine Receptor by High Affinity Calmodulin is a Novel Therapeutic Strategy in End-stage Heart Failure. *Circ J* 2015; 79[Suppl] : 2294.
 17. Oda T, Yamamoto T, Kobayashi S, Okuda S, Katoh T, Nishimura S, Yano M. In Cardiomyocytes, Dantrolene can Correct Defective Domain Interaction Caused by Oxidation, and Restore Calmodulin Binding Affinity in RyR2. *Circ J* 2015; 79[Suppl] : 1594.
 18. Nishimura S, Yamamoto T, Maeda T, Katoh T, Suetomi T, Ohno M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Calmodulin Binding Affinity to RyR2 is Decreased without Beta Stimulation in CPVT with Mutation at Calmodulin-like Domain. *Circ J* 2015; 79[Suppl] : 2291.
 19. Kato T, Yamamoto T, Maeda T, Nishimura S, Murakami W, Suetomi T, Ono M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Dissociation of Calmodulin From RyR2 Causes Diastolic Ca²⁺ leak and Induces Lethal Arrhythmias in Pressure-overload Heart Failure. *Circulation* 2014; 130: A13176.
 20. Murakami W, Kobayashi S, Ishiguchi H, Myoren T, Nishimura S, Kato T, Oda T, Okuda S, Yamamoto T, Yano M. A Recombinant Atrial Natriuretic Peptide Prevents Aberrant Ca²⁺ Leakage Through Ryanodine Receptor by Suppression of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Failing Cardiomyocytes. *Circulation* 2014; 130: A17163.
 21. Kato T, Yamamoto T, Maeda T, Nishimura S, Suetomi T, Ono M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Dantrolene Inhibits Aberrant Ca²⁺ Release and Arrhythmogenesis in Pressure-overloaded Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2014; 20: 10, S173.
 22. Kato T, Yamamoto T, Maeda T, Nishimura S, Suetomi T, Ono M, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Binding Affinity of Calmodulin to Cardiac Ryanodine Receptor, as the Novel Therapeutic Target in the Pressure-overloaded Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2014; 20:10, S173.
 23. Nishimura S, Yamamoto T, Maeda T, Kato T, Suetomi T, Mochizuki M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yano M. Defective Ca²⁺ Regulation Causes Lethal Arrhythmia in CPVT KI Mice Model with Mutation in CaM-like Domain of RyR2. *Journal of Cardiac Failure*. 2014; 20: 10, S173.
- 〔図書〕（計2件）
1. 矢野雅文 他、科学評論社、心不全に対する多面的治療戦略、循環器内科、2015、220(105,112-118)。
 2. 奥田真一、矢野雅文、心筋細胞内カルシウム動態異常と心不全、臨床心不全の一番大切なところ 60、メディカ出版、2014年、350(24-31)
- 〔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

奥田 真一 (OKUDA, Shinichi)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90530212