

ミニ・レビュー —小西賞受賞者—

ダントロレンによるリアノジン受容体を分子標的とした
新しい心不全・不整脈治療

小林茂樹

山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学(内科学第二) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : ダントロレン, リアノジン受容体, 悪性高熱症, 心不全, 心室頻拍

和文抄録

悪性高熱症, カテコラミン誘発性多形性心室頻拍症 (Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia : 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) 内のドメイン関連障害が, 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. 悪性高熱症の治療薬であるダントロレンは, RyR1に結合し, RyR1内のドメイン関連障害を是正することによってRyR1からのCa²⁺漏出を抑制する. 同様に, 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, 心不全の進展や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.

はじめに

心不全は心筋の収縮, 弛緩の障害を基盤とする症候群であり, その原因として心筋細胞内Ca²⁺調節の異常が重要である. 本来, リアノジン受容体 (RyR) は, 筋小胞体 (Sarcoplasmic reticulum : SR) 膜に存在するCa²⁺放出チャネルであるが, 心不全時には, 拡張期に, RyRからCa²⁺漏出が生じる. その結果, 筋小胞体内のCa²⁺枯渇と細胞内Ca²⁺過負荷が惹起され, 収縮・拡張不全や頻脈性不整脈が引き起こ

される. 一方, カテコラミン誘発性多形性心室頻拍症 (Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia : CPVT) は, 心筋型リアノジン受容体 (RyR2) の遺伝子変異による遺伝子疾患であるが, 筋小胞体からCa²⁺漏出がトリガーダクティビティを介した心室頻拍の原因となっていることが明らかになってきた. 本稿では, 最近のわれわれの知見をもとにダントロレンによる心不全や致死的不整脈に対するRyR2を標的とした新たな心不全不整脈治療について考察する.

1. リアノジン受容体内のドメイン関連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, 不整脈源性右室心筋症, 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 (図1) ¹⁻¹⁰⁾.

2. ダントロレンの悪性高熱症における分子学的作用機序

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^{11, 12)} (図1).

3. ダントロレンの心筋型リアノジン受容体への結合部位の同定

ダントロレンのRyR1の結合部位 (Leu⁵⁰⁰-Cys⁶⁰⁹) のアミノ酸配列が、RyR2において完全に保存されていることから、ダントロレンはRyR2へも結合することが予想された。そこで、われわれは、水晶発振子マイクロバランス法を用いて、ダントロレンとRyR2の結合部位がRyR1と同じアミノ酸配列のLeu⁶⁰¹-Cys⁶²⁰であることを同定した¹²⁾.

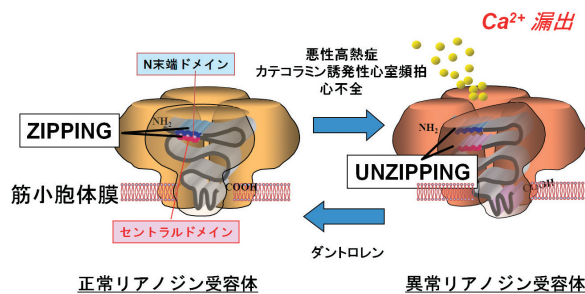


図1 リアノジン受容体のドメイン連関障害とCa²⁺漏出の関係

悪性高熱症、カテコラミン誘発性心室頻拍、心不全のリアノジン受容体 (RyR) は、N末端ドメインとセントラルドメイン間の接触がルーズになり (ドメイン連関障害: Unzipping), その結果、RyRのCa²⁺に対する感受性が異常に亢進し、RyRの4量体の中央に存在するチャンネル孔からCa²⁺漏出が起きる。ダントロレンは、このドメイン連関障害を是正する (Zipping) ことにより、Ca²⁺漏出を止める。

4. 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¹³⁾ (図2)。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⁹⁾.

5. 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、RyR2のCa²⁺に対するチャンネル開口感受性

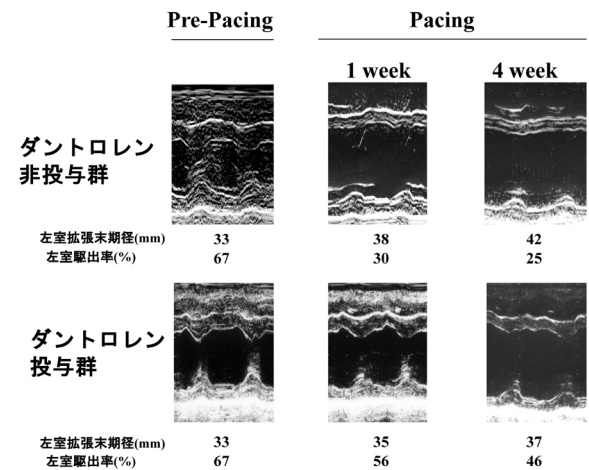


図2 心不全モデルにおけるダントロレンの効果
慢性高頻度右室ペーシング (250bpm) によるイヌ心不全モデルの経胸壁心エコー図 (左室長軸Mモード) を示す。ダントロレン非投与群では、ペーシング開始1週間後、4週間後と左室拡大の進展と左室駆出率の低下を認めた。一方、ダントロレン投与群では、ダントロレン非投与群に比較して、高頻度右室ペーシングに伴う左室拡大と左室駆出率の低下は抑制された。

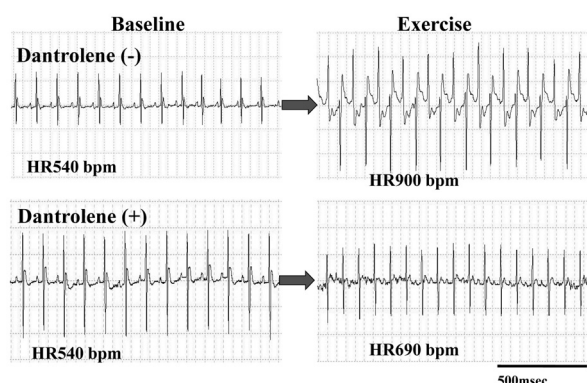


図3 マウスCPVTモデルにおけるダントロレンの効果
ヒトRyR点突然変異モデルのCPVT型knock-in マウス (R2474S/+) を用いて、トレッドミルによる心室頻拍誘発試験を行った。ダントロレン非投与下では、両方向性心室頻拍が誘発されたが、ダントロレン投与下では、両方向性心室頻拍は完全に抑制された。

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^{14, 15)}。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がほぼ完全に抑制されることを報告した^{16, 17)} (図3)。

6. ヒト心不全患者に対する抗不整脈効果の検討

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、臨床プロトコール「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)」を作成し、現在、臨床試験を行っているところである。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。

引用文献

- 1) Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mechanisms of Disease : ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006 ; 3 : 43-52.
- 2) Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci* 2002 ; 7 : d671-683.
- 3) Yamamoto T, El-Hayek R, Ikemoto N. Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca²⁺ channel regulation. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 11618-11625.
- 4) Kobayashi S, Yamamoto T, Parness J, Ikemoto N. Antibody probe study of Ca²⁺ channel regulation by interdomain interaction within the ryanodine receptor. *Biochem J* 2004 ; 380 : 561-569.
- 5) Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, Ohkusa T, Ikeda Y, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation* 2005 ; 111 : 3400-3410.
- 6) Mochizuki M, Yano M, Oda T, Tateishi H, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca²⁺ leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007 ; 49 : 1722-32.
- 7) 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 : 762-772.
- 8) 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 Ca^{2+} leak in failing hearts. *Cardiovasc Res* 2009 ; **81** : 536-45.
- 9) 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 Ca^{2+} release in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010 ; **87** (4) : 609-617.
- 10) Liu Z, Wang R, Tian X, Zhong X, Gangopadhyay J, Cole R, Ikemoto N, Chen SR, Wagenknecht T. Dynamic, inter-subunit interactions between the N-terminal and central mutation regions of cardiac ryanodine receptor. *J Cell Sci* 2010 15 ; **123** : 1775-1784.
- 11) Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Bhat MB, Ma J, Ikemoto N, Jimenez LS, Morimoto H, Williams PG, Ma J, Parness J. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2002 ; **277** : 34918-34923.
- 12) Kobayashi S, Bannister ML, Gangopadhyay JP, Hamada T, Parness J, Ikemoto N. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2005 ; **280** : 6580-6587.
- 13) 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 inter-domain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol* 2009 ; **53** : 1993-2005.
- 14) 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** : 1413-1424.
- 15) 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** : 660-666.
- 16) 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** : 2579-2584.
- 17) McCauley MD, Wehrens XH. J. Targeting ryanodine receptors for anti-arrhythmic therapy. *Acta Pharmacol Sin* 2011 ; **32** : 749-757.

Ryanodine Receptor-targeting Therapy against Heart Failure and Lethal Arrhythmia

Shigeaki KOBAYASHI

Medicine and Clinical Science (Internal Medicine II.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

The inter-domain interaction between N-terminal (1-600) and central domains (2000-2500) of the ryanodine receptor (RyR) plays a critical role in channel gating in both skeletal (RyR1) and cardiac (RyR2) muscle RyR-s. We previously reported that dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia (MH), prevented

abnormal Ca^{2+} leak by correction of the defective inter-domain interaction between N-terminal and central domains in MH-type RyR. The amino acid sequence of the putative dantrolene binding site of cardiac RyR2 is identical with the RyR1 (Leu⁵⁹⁰-Cys⁶⁰⁹). Here, we investigated the molecular mechanism and the in-vivo therapeutic effect of dantrolene against heart failure as well as lethal arrhythmia, in tachycardia-induced heart failure canine model and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) - associated RyR2^{R2474S/+} knock-in (KI) mice model. Dantrolene specifically bound to the

corresponding domain 601-620 in RyR2 by using a quartz crystal microbalance technique (a highly sensitive mass-measuring technique). Dantrolene was also found to correct defective inter-domain interactions within RyR2 in the both models, inhibited diastolic Ca^{2+} leak, in turn improved cardiomyocyte function in failing hearts and prevented 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.