

Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy of lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure

(圧負荷不全心において、リアノジン受容体に対するカルモジュリンの結合親和性低下を改善することは、新しい致死的不整脈の治療となる)

氏名 加藤 孝佳

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻 器官病態内科学分野

平成 28 年 11 月

目次

第1章 要旨.....	2
第2章 研究の背景.....	3
第3章 目的.....	3
第4章 研究方法.....	4
4.1 動物モデル.....	4
4.2 体表面心電図検査.....	4
4.3 カルモジュリン(CaM)と Gly-Ser-His-CaM(HA-CaM)の発現と精製.....	4
4.4 心筋細胞の単離.....	5
4.5 免疫蛍光抗体法による内因性 CaM の RyR2 に対する結合解析.....	5
4.6 Sham と TAC、それぞれの筋小胞体における CaM と RyR2 の架橋剤を用いた 検証.....	5
4.7 Ca ²⁺ スパークと Ca ²⁺ 貯蔵解析.....	6
4.8 心筋細胞の一過性 Ca ²⁺ 濃度変化(SCaT)モニタリング.....	6
4.9 解析.....	7
第5章 結果.....	8
5.1 TAC モデルでは Sham に比べて心室性不整脈の発生、誘発性が増加する.....	8
5.2 TAC モデルでは RyR2 への内因性 CaM の結合が低下する.....	9
5.3 TAC モデルでは筋小胞体と CaM-SANPAH の結合性も低下する.....	9
5.4 HA-CaM は TAC RyR2 において CaM と RyR2 の結合を改善させる.....	10
5.5 サポニンによる膜透過処理細胞において不全心の TAC-RyR2 への結合性を改善 すると Ca ²⁺ スパーク頻度を改善する.....	11
5.6 インタクト細胞 (膜透過処理をしていない細胞) において CaM の TAC-RyR2 に 対する結合性を回復させると催不整脈性が抑制される.....	13
第6章 考察.....	14
第7章 結語.....	15
第8章 謝辞.....	15
第9章 参考文献.....	16

第 1 章 要旨

背景：カルモジュリン(CaM)は、リアノジン受容体(RrR2)のチャネルの開閉制御において重要な役割を果たしている。

目的：マウスの圧負荷モデルを用いて心不全における筋小胞体からの Ca^{2+} 漏出と不整脈源性について検討する。

方法：12 週齢のマウスの大動脈弓部に 27G 針を用いて弓部に狭窄(TAC)を作成し、術後 8 週経過したものを不全心として使用した。

結果：TAC 術後 8 週の不全心では、sham に比べ有意に左心室拡大と左室収縮性低下を認めた。両群に 2 mg/kg エピネフリンと 120 mg/kg カフェインを腹腔内投与し不整脈発生率を評価した。Sham では心室性不整脈はほとんど観察されなかったが、TAC では心室性不整脈が必発し、心室頻拍や心室細動などの致死的不整脈の発生を認めた。

RyR2 に対する CaM の結合性は、単離心筋に蛍光標識した外因性 CaM を導入し評価した。CaM の TAC-RyR2 への結合性は Sham-RyR2 に比べ有意に低下し、3 アミノ酸を付加し RyR2 に対する結合性を高めた CaM(HA-CaM)を用いると TAC-RyR2 でも結合性は保持された。Ca²⁺スパーク、Ca²⁺貯蔵を比較すると、TAC 心筋は sham に比べて Ca²⁺スパーク頻度は高く Ca²⁺貯蔵は低かったが、HA-CaM 導入で正常化した。タンパク導入キットで WT-CaM、HA-CaM を細胞内に導入し、ペーシング後の自発性 Ca²⁺放出(SCaT)を評価すると、TAC では SCaT が増加していたが、HA-CaM 投与で正常化した。

結語：Ca²⁺漏出、遅延後脱分極、撃発活動、Ca²⁺スパークなどが上昇し、SCaT が上昇した圧負荷心不全モデル心筋における RyR2 のチャネル機構異常は、RyR2 に対する CaM の結合性を低下させる。RyR2 に対する CaM の結合性を正常化することにより、この異常を整えることができる。

第2章 研究の背景

カルモジュリン(CaM)はリアノジン受容体(RyR2)の修飾タンパクの一つであり、チャンネル開閉の内因性調整機構として知られている[1,2]。RyR2 に対する CaM の結合部位は、RyR2 分子構造のいわゆるクランプ領域と膜貫通チャンネル領域の中間に位置しており[3-5]、これまで我々は、以前より報告されていたクランプ領域に存在する N-terminal domain と Central domain が相互に関連し(すなわち、“ドメインスイッチ”)、CaM がシグナルトランスミッターとして作用して on/off の活動がチャンネルに伝達されるという仮説を提唱している[6-8]。これらの仮説を補助するデータとして、最近我々はカテコラミン誘発性多型性心室頻拍(CPVT)の原因となる N-terminal domain と Central domain のドメイン関連障害[9]が CaM の結合性を低下させ、結果として拡張期 Ca^{2+} スパークを生じ致死的不整脈につながることを示した[10]。さらに、RyR2 に対する結合性を WT-CaM に比べて高めた HA-CaM を投与することで、この CPVT の点突然変異をきたしたマウスモデルにおいて、異常な Ca^{2+} リリースを補正し、 Ca^{2+} 貯蔵を補正することにより、関連障害を改善させることを報告した[11]。正常の心筋細胞における RyR2 に結合する CaM の重要な結合規則や心機能障害の進行における CaM の解離の病的役割については Meissner、Yamaguchi らの先行する研究で示されている[12]。彼らは CaM 結合部位(3583-3603)の3つのアミノ酸配置を置換することによって RyR2 と CaM の結合ができないようにした遺伝子改変マウスを作成し、そのマウスは重度の収縮不全を伴う肥大型心筋症を呈し、若齢にして死亡することを報告した。この所見は CaM と RyR2 の関連性が正常なチャンネル機能を維持するために重要な役割を果たしていること、そして心肥大のような心臓疾患から保護するために重要であることを示している。

本研究において我々は、不全心筋で頻発する不整脈の原因について CaM の役割を圧負荷心不全モデルを作成し検証した。また、RyR2 に対する結合親和性を高めた HA-CaM が TAC 心不全心筋における筋小胞体からの異常な Ca^{2+} 漏出や不整脈を補正するという仮説についても検証した。

第3章 目的

TAC を行い圧負荷による心不全に陥った心臓において、CaM の催不整脈性における役割について評価する。また、RyR2 に対する結合親和性を高めた HA-CaM を用いて、不全心における異常な持続的 Ca^{2+} 漏出や催不整脈性を補正しうるかを検証する。

第4章 研究方法

4.1 動物モデル

本研究は NIH による実験動物の保護と使用のガイドライン (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) を遵守して実施した。動物の飼育と実験計画は山口大学医学部動物倫理委員会の策定したガイドラインを遵守して行った。

圧負荷心不全モデルは弓部大動脈狭窄モデル(TAC)とした。以下に要約する。2% イソフルラン混合の酸素化したチャンバーで麻酔を行い、除痛除苦を行ったマウスに気管内挿管を行い呼吸管理を確立、開胸し大動脈弓部を露出させ、同部にカスタムメイドの 27G 針と 7-0 silk を用いて直径 0.4mm の狭窄を作成した。Sham は狭窄を設けない同様の手術負荷を与えたものとした[14]。術後、生存曲線で生存を評価した。

4.2 体表面心電図検査

対象マウスを 1-2% イソフルラン混合酸素化チャンバーに入れ、皮下針を用いて体表面心電図を記録した。安静状態の心電図を記録した後、体重あたり 2mg/kg エピネフリンと 120mg/kg のカフェインを腹腔内投与し、30 分の連続記録を行った[9]。

4.3 カルモジュリン(CaM)と Gly-Ser-His-CaM(HA-CaM)の発現と精製

哺乳類 CaM(mCaM)の cDNA は Dr Zenon Grabarek (Boston Biomedical Institute, Boston, MA)より提供された。ヒト CaM の cDNA は 2 つの制限酵素部位(the forward primer 5'-ACACAGGGGATCCCATATGGCTGAC-3' and the reverse primer 5'-CAAGCTTGGCTCGAGTCACTTTGC-3'),を含むオリゴヌクレオチドプライマーによって PCR 増幅した。cDNA は pGEX4T-1 ベクターに導入されて発現ベクターとして DH5 α *Escherichia coli* (Nippon gene, Tokyo, Japan)へ導入した。菌種は 30 度で 6 時間、アンピシリンを含む lysogeny broth (LB)で前培養され、次いでアンピシリンを含む 10 倍量の lysogeny broth (LB)とともに 37 度で 2 時間培養した。

4. 4 心筋細胞の単離

心筋細胞は以前我々が報告したように単離した[9-11]。すなわち、ペントバルビタール (70 mg/kg of body weight, 腹腔内投与) により麻酔、気管内挿管後に胸部切開を行い、速やかに心臓を摘出し、混合ガス (95% O₂/ 5% CO₂) により酸素化されたコラゲナーゼを含む MEM により大動脈から逆行性還流を行い心筋を還流させた。左室心筋を新鮮なコラゲナーゼ含有溶液内でハサミにより分割、桿状の成熟した障害のないマウス心筋を単離した。単離されたマウス単離細胞は Ca²⁺濃度を徐々に上昇させた培養液に順に移し(50 μmol/L, 100 μmol/L, 300 μmol/L, 600 μmol/L)、最終 Ca²⁺濃度を 1mmol/L まで上昇させた。その後ラミニンコーティングされた培養容器に移し、95% O₂/ 5% CO₂、大気圧中、37 度で培養し、実験に用いた。

4. 5 免疫蛍光抗体法による内因性 CaM の RyR2 に対する結合解析

単離心筋を 2 分間 2%パラホルムアルデヒドで固定し、-20 度のメタノールで透過処理を行った。次に心筋細胞を 1%ウシ血清アルブミンと 0.5%トリトン X-100 とともに Anti-CAM 抗体 (Abcam 社、EP799Y) 及び Anti-RyR 抗体 (Sigma-Aldrich 社、C3-33) とともに 4°C で一晩反応させた。さらに Alexa 標識された二次抗体 (Alexa488-conjugated goat anti-rabbit、Alexa633-conjugated goat anti-mouse) に反応させた。Alexa633 と Alexa488 標識の蛍光はサルコメアに沿って周期的にみとめた。ベースラインからの蛍光強度のサルコメアに一致する周期的な増加は、長軸方向に選択された距離 (~25 ミクロン) で積分した後、値を距離で除し計測・算出した。1 サルコメアあたりの蛍光強度の値は、RyR との RyR に結合した CaM の任意の量として計測・算出した。

4. 6 Sham と TAC、それぞれの筋小胞体における CaM と RyR2 の架橋剤を用いた検証

RyR2 に対する CaM の結合性について、光反応性架橋剤である Sulfo-SANPAH (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて評価した。まず、暗所にて CaM と Sulfo-SANPAH を反応させ、CaM-SANPAH 結合体を作成した。未反応の Sulfo-SANPAH は Sephadex G25 を用いてゲルろ過法により除去した。以前の報告をもとに[9]若干の改良を加えて筋小胞体をマウス心筋から生成した。すなわち、心臓を摘出し両心房、右室をとりのぞき左室のみとしホモジネートを作成、これを 5,500g で遠心分離し、得られた上清画分をさらに超遠心(143,000g、2 回)し精製した。CaM-SANPAH は暗所において、別に単離精製した筋小胞体と混合し、紫外線を 20 秒間当てて光分解させた。この混合液を電気泳動

法によって分離、膜に転写し RyR2 に結合した CaM はモノクローナル抗-CAM 抗体 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて検出した[14]。

4. 7 Ca²⁺スパークと Ca²⁺貯蔵解析

カルシウムスパーク(Ca²⁺スパーク)はサポニンによる膜透過処理をした単離心筋細胞を用いて以前に報告したようにレーザー共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を用いて測定した [9-11]。端的に述べると、心筋細胞を 23 度で Relaxing solution(0.1 mmol/L EGTA, 5 mmol/L ATP, 10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L K-aspartate, 0.25 mmol/L MgCl₂, and 10 mmol/L reduced glutathione)により還流した。心筋細胞膜は 30 秒間、サポニン(50μg/mL)溶液に浸すことにより膜透過処理を行った。透過処理後に心筋細胞は MaxChelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>)で計算された遊離 Ca²⁺濃度となるような細胞内溶液 ; internal solution(0.5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES, 120 mmol/L K-aspartate, 5 mmol/L ATP, 1 mmol/L free [Mg²⁺], 10 mmol/L reduced glutathione, 30 nmol/L free [Ca²⁺])に移した。Ca²⁺蛍光プローブである Fluo-3 は 20μmol/L、pH 7.2 で使用した。Fluo-3 は 488nm のレーザー光線で励起し、蛍光発光は 505-530nm の波長で取得した。Ca²⁺スパーク画像は膜透過処理を行った心筋細胞で収集し、CaMK II(Ca²⁺/CaM 依存性タンパクリン酸化酵素II)抑制薬である KN-93(1μmol/L)とオカダ酸(1μmol/L)によって CaMKIIの作用を抑制した。

Ca²⁺スパークデータは SparkMaster[15]を用いて解析した。これは高速で信頼性の高い、自動スパーク解析ソフトで、解析では一般的なパラメータ (FWHM: 半値振幅、FWHM: 半値持続時間) についても含まれる。筋小胞体のカルシウム含量(Ca²⁺ load)を測定するために 10mmol/L のカフェイン急速還流を行い評価した。

サポニンによる膜処理細胞における外因性 CaM の RyR2 に対する結合性の定量には、HiLyte Fluor 647(AnaSpec Inc., Fremont CA, USA)で蛍光標識した CaM(F-CaM)を用いた。上記 Ca²⁺スパークの測定実験と同様の条件でサポニンによる透過処理を行った Sham と TAC の単離心室心筋に導入し実験を行った。局在化した CaM は F-CaM の蛍光強度による濃度測定により分布を評価した。蛍光標識された細胞に共焦点レーザー顕微鏡で走査撮影した (LSM-510mCarl Zeiss)(アパチャー1.3、励起 633nm、蛍光 640nm)。サルコメアに沿った HiLyte Fluor 647 の蛍光強度の周期的な変化は長軸に沿った関心領域 (~25μm) で加算し、その距離で除して評価した。

4. 8 心筋細胞の一過性 Ca²⁺濃度変化(SCaT)モニタリング

単離心筋細胞は 20μM Fluo4 (アセトキシメチルエステル)に 30 分間室温で培養し、2 回

Tyrode 溶液で洗浄した。すべての実験は 35 度で実施した。電気刺激は IonOptix 社(USA)製のフィールドスティムレーターで行い、共焦点顕微鏡(LSM-510, Carl Zeiss)のレーザー走査、および蛍光デジタル顕微鏡(BZ9000, Keyence. Japan)により細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行った。Sham ,TAC の単離心筋にそれぞれ 1,2,3,4,5 Hz の刺激後の自発的 Ca^{2+} 放出を測定した[11]。タンパク導入キットである BioPORTER®を用いて WT-CaM と HA-CaM を導入を行い導入による効果を判断した。BioPORTER®はドライフィルムで導入タンパクを包み、細胞膜を通り細胞内に導入させるもので、CaM を目的とする細胞に導入できたことについては、F-CaM をそれぞれ WT-CaM、HA-CaM で作成し確認した。

4. 9 解析

2 群間の差の検定には対応のある/ない t 検定を行った。濃度依存性データの群間比較には Post hoc Scheffe 検定を併用した ANOVA で行った。イベント発生率 h では χ^2 乗検定によるクロス集計を行った。

第5章 結果

これまで我々は RyR1 に対する結合親和性が高いと報告された HA-CaM[16]を用いて RyR2 を安定化し、Ca²⁺漏出を抑制し低下した心機能を改善させることを示してきた[17]。今回我々はさらに不整脈源性について、TAC による心不全モデルを作成し検証した。

5. 1 TAC モデルでは Sham に比べて心室性不整脈の発生、誘発性が増加する

安静状態の TAC による心不全群は、Sham 群に比べて体表面心電図で P 波の延長(P<0.01)、QT 時間の延長(P<0.01)、PR 時間(P<0.05)の延長と QRS 幅の延長(P<0.05)をみとめた (図 1A,1B)。心室性期外収縮は、TAC 群で Sham に比べて有意に多く観察された (図 1C,1D)。カフェインとエピネフリンの腹腔内投与により不整脈を誘発したところ、Sham 群ではみられない 2 方向性または多形性心室頻拍などの心室性不整脈が有意に多く観察された (図 1E-1G)。

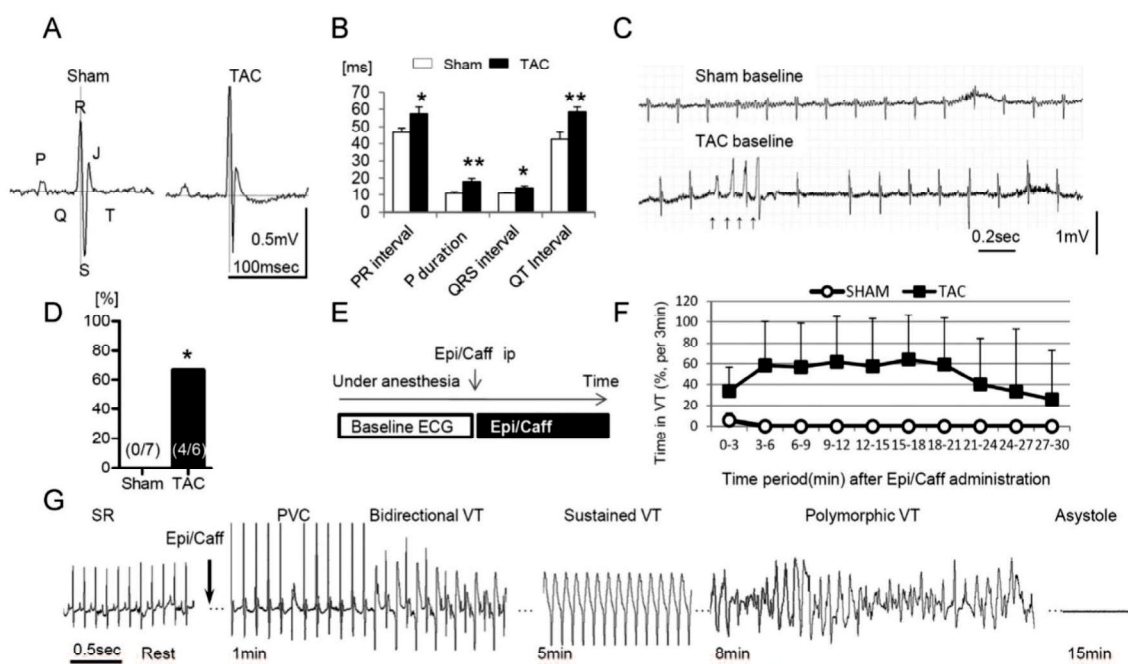


図1 Sham と TAC の体表面心電図を示す。A: Sham と TAC の安定状態での体表面心電図 (Power Lab/4SP で記録し付属ソフトで解析した)。B: 体表面心電図の体表面心電図の各パラメータ (Sham 6 匹、TAC 3 匹)。C: 代表的な安静心電図連続記録波形を示す。Sham ではほとんど見られないが、TAC では矢印で示すように心室性不整脈の自然発生を認める。D: 心室性不整脈の発生頻度を示す。TAC では Sham に比べて有意に多く心室性不整脈を認めた。E: 薬剤投与の手順を示す。Baseline の心電図を取得後に体重当たり 120mg/kg のカフェインと 2mg/kg のエピネフリンを腹腔内投与し、投与後の不整脈発生を記録した (投与前後 30 分)。F: 3 分間毎の心室性不整脈発生の時間割合を縦軸に、横軸に時間推移を示す (Sham 6 匹、TAC 3 匹)。G: 代表的な TAC の心室性不整脈の波形とその後の観察で得られた心電図を示す。

5. 2 TAC モデルでは RyR2 への内因性 CaM の結合が低下する

RyR2 と RyR2 に結合する内因性 CaM を免疫蛍光抗体法で検出した。RyR2 に結合する内因性 CaM の RyR2 への結合性は、Sham に比べて TAC では有意に低下していた (図 2)。

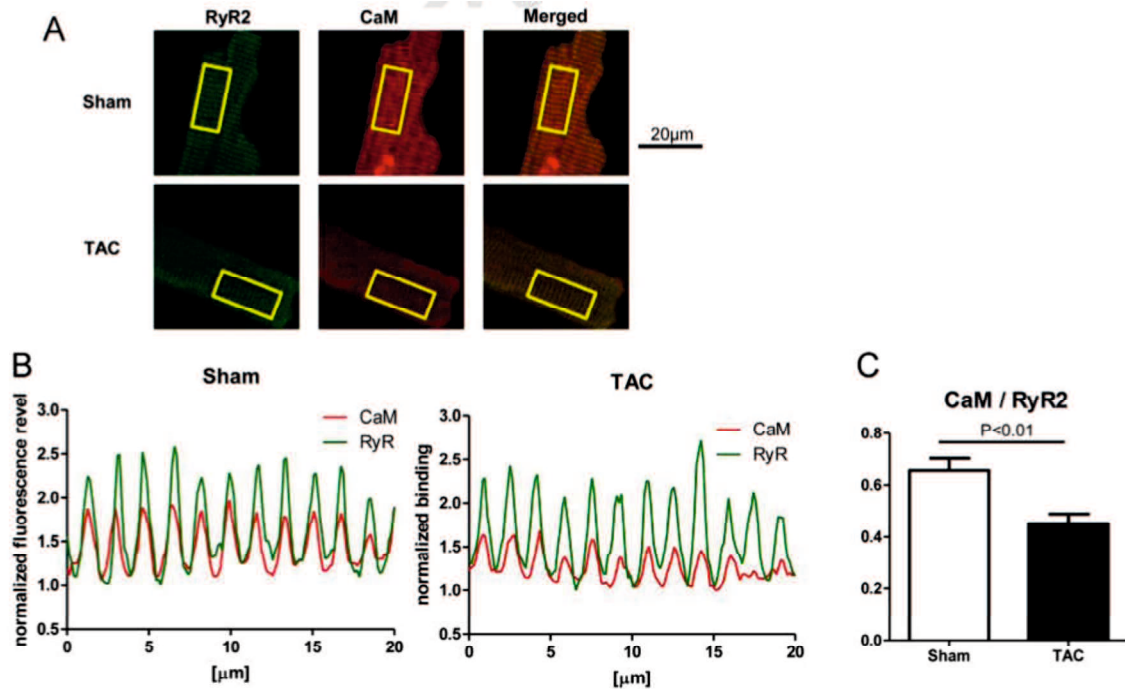


図 2 RyR2 に結合する CaM を評価した。内因性 CaM を免疫蛍光染色法を用いて評価した。A: 代表的な心筋細胞の免疫染色の共焦点顕微鏡画像を示す。左に RyR2 を、内因性 CaM を中央に、Merge 像を右に示す。それぞれ Anti-CaM 抗体、Anti-RyR2 抗体を用いた。上段に Sham を、下段に TAC を示す。B: 周期的な Alexa の蛍光強度の増高を示す。左に Sham を、右に TAC のデータを示す。赤で CaM の蛍光強度を示し緑で RyR2 の蛍光強度を示す。C: CaM の蛍光強度を RyR2 で除したものを示す。TAC では RyR2 に結合する CaM が低下している。値は 3-4 hearts から得られた 19-22 細胞から算出し平均値±SD で示した。CaM ; calmodulin、RyR2 ; ryanodine receptor 2、TAC ; transverse aortic constriction。

5. 3 TAC モデルでは筋小胞体と CaM-SANPAH の結合性も低下する

RyR2 に対する CaM-SANPAH の結合を検証した。CaM-SANPH の RyR2 に対する結合を TAC と Sham の心筋から精製した筋小胞体を用いて検証したところ、TAC での結合性は低下していた (図 3)。

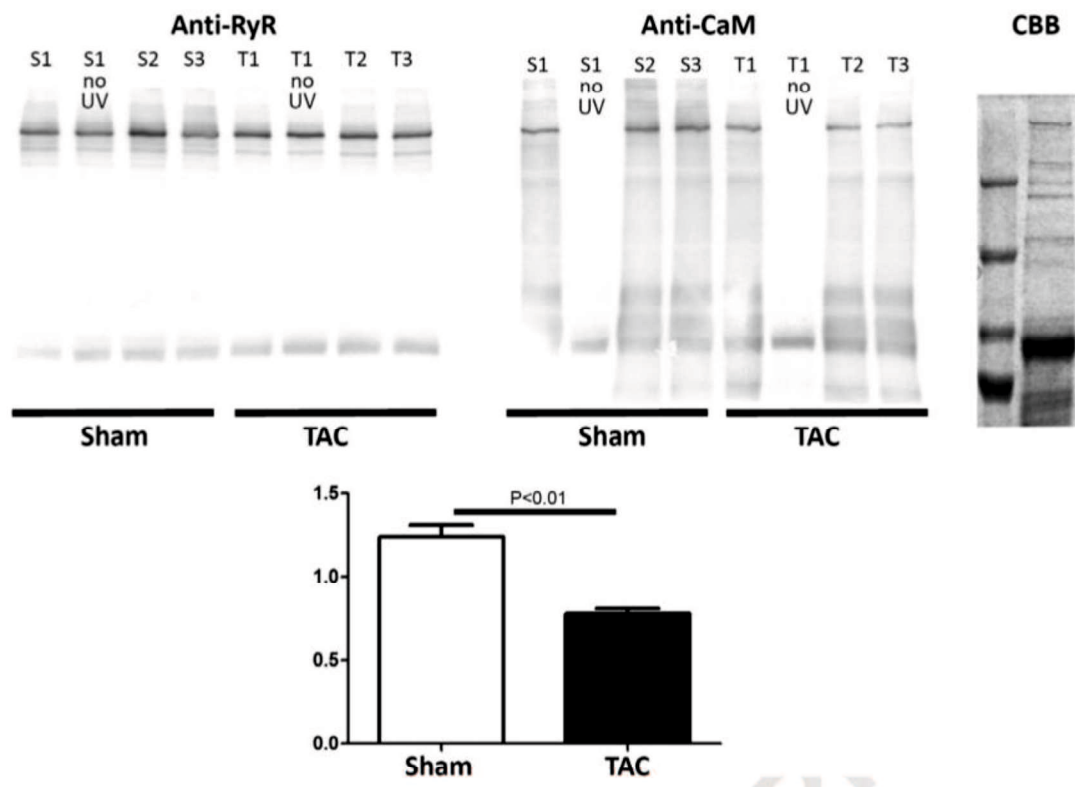


図3 架橋によるCaMとRyR2に対するSham、TACにおける結合の評価を精製したSRを用いて行った。RyR2にクロスリンクさせたCaMの代表的なウェスタンブロットティングを示す。CaM-SANPAH混合液をSR液に暗室で反応させ、その後紫外線に20秒間当ててサンプルを作成した。モノクローナル抗体であるAnti-CaM抗体(Millipore)を用いてRyR2に直接結合するCaMを免疫プロットした。RyR2のバンドは多くの他のSR中のタンパクの中からAnti-CaM抗体により同定されている。紫外線照射を行わなかったものではRyR2はAnti-CaM抗体で同定できなかった。値は6検体からの平均値±SDで示している。CaM; calmodulin、RyR2; ryanodine receptor 2、SR; sarcoplasmic reticulum、TAC; transverse aortic constriction、CCB; Coomassie Brilliant Blue。

5. 4 HA-CaMはTAC RyR2においてCaMとRyR2の結合を改善させる

蛍光標識をしたWT-CaM、HA-CaMを用いてRyR2に対する結合性を評価した。図4Dに示す通り、WT-CaM、HA-CaMは濃度依存性にRyR2に結合する。この結合親和性はSham心筋RyR2でWT-CaM、HA-CaM間で差異をみとめなかった。対照的に、TACのRyR2では図4Fに示す通り、結合親和性はWT-CaMではshamに比べてはるかに高い濃度に最大結合するため、結合親和曲線は大幅な右側移動がみられ、推定される親和性は有意に低下していた。しかし、TAC-RyR2に結合するHA-CaMの親和曲線は通常のRyR2に対する正常のWT-CaMの結合曲線とほぼ同等であった。これはHA-CaMを用いることでTAC-RYR2に正常のCaMの結合を還元させることができる可能性を示唆した。

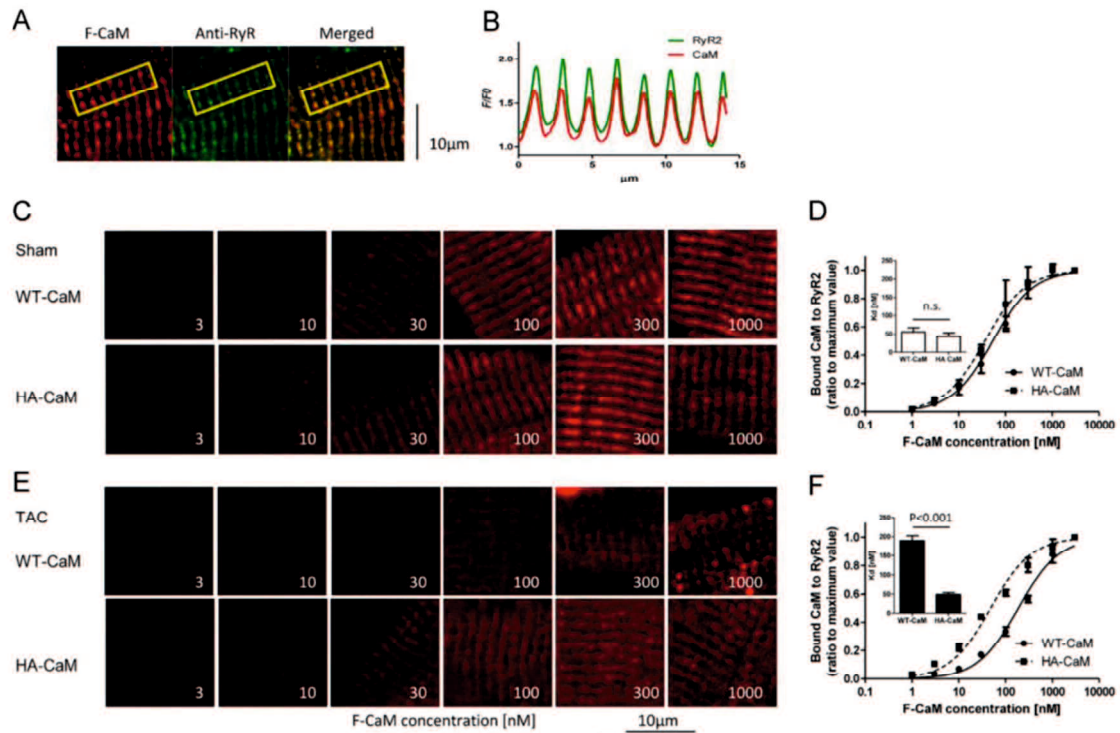


図 4 外因性 CaM の結合親和性をサポニンによる膜処理心筋細胞で行った。A,B: 代表的な蛍光標識した CaM (F-CaM) 導入し固定して免疫染色した細胞とその同所性を示す。A: 左パネルに F-CaM、中央に抗 RyR2 抗体(C3-33)、Merge 像を右に示す。B: 蛍光強度を縦軸に、横軸に距離を示す。C: Sham に F-CaM を導入した代表的な共焦点顕微鏡によるレーザー走査画像を示す。WT-CaM、HA-CaM にそれぞれ蛍光標識を行い、サポニン膜処理心筋細胞に導入し観察した。D: Sham 心筋に対する WT-CaM、HA-CaM の結合親和性曲線を示す。E: Sham に F-CaM を導入した代表的な共焦点顕微鏡によるレーザー走査画像を示す。WT-CaM、HA-CaM にそれぞれ蛍光標識を行い、サポニン膜処理心筋細胞に導入し観察した。F: Sham 心筋に対する WT-CaM、HA-CaM の結合親和性曲線を示す。それぞれの結合親和性曲線は少なくとも 8 細胞 119-122 のサルコメアから得られたデータから、二乗平均法を用いて Hill の式に近似させて平均 Kd 値を求めた。それぞれ Sham 3 hearts、TAC 3 hearts から算出した。CaM ; calmodulin、RyR ; ryanodine receptor、TAC ; transverse aortic constriction。

5. 5 サポニンによる膜透過処理細胞において不全心の TAC-RyR2 への結合性を改善すると Ca²⁺スパーク頻度を改善する

CaM と RyR2 の結合性の補正が、自発的 Ca²⁺リリースイベントを是正するかどうかを評価するため、我々はサポニンによる膜透過処理を行った心筋細胞で Ca²⁺スパーク頻度(SpF)を評価した。基礎状態では Sham に比べて TAC では SpF が有意に上昇していた。WT-CaM の導入では有意な変化はないものの、HA-CaM を導入すると有意に SpF の上昇を抑制した。

図 5A に示す通り、FWHM: 半値振幅、FWHM: 半値持続時間は TAC で上昇していた。このパラメータは CaM 導入では改善ができなかったが、HA-CaM 導入で正常化した。

不全心で多く観察される SpF と対照的に、不全心では Ca²⁺スパーク振幅は正常心筋に比べて低下していた。WT-CaM では補正効果が不十分であったが、HA-CaM ではより大きく Ca²⁺スパーク振幅を増加することができた。

図 5F に SpF と Ca²⁺ロードをプロットしたものを示す。TAC による不全心ほど左方移動を認める。

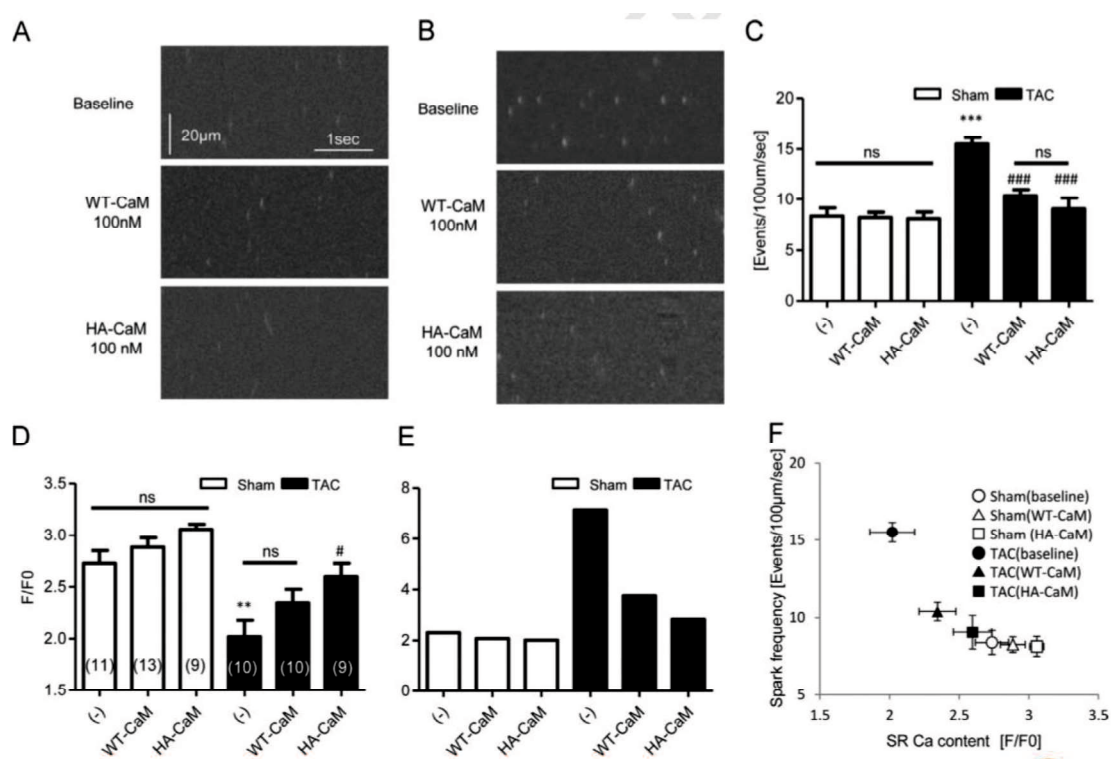


図 5 Ca²⁺スパーク頻度(SpF)と SR Ca²⁺貯蔵をサポニンによる膜処理心筋細胞において検証した。A: Sham 心筋の Ca²⁺スパークの代表波形を示す (Ca²⁺濃度 30 nM)。上段が Baseline、中段に 100nM WT-CaM 導入細胞、下段に 100nM HA-CaM 導入細胞のラインスキャンを示す。B: TAC 心筋の Ca²⁺スパークの代表波形を示す (遊離 Ca²⁺濃度 30 nM)。上段が Baseline、中段に 100nM WT-CaM 導入細胞、下段に 100nM HA-CaM 導入細胞のラインスキャンを示す。C: SpF の結果を示す。D: Ca²⁺貯蔵結果を示す。E: SpF を Ca²⁺貯蔵で除したものを示す。F: SpF と Ca²⁺貯蔵の関連を示す。ns; 有意差なし、** P<0.01 vs Sham baseline、***P<0.001 vs Sham baseline、# P<0.05 vs TAC baseline、###P<0.001 vs TAC baseline。

5. 6 インタクト細胞（膜透過処理をしていない細胞）において CaM の TAC-RyR2 に対する結合性を回復させると催不整脈性が抑制される

インタクト細胞において 1-5 Hz でペーシングを行い自発性 Ca²⁺放出(SCaT)を評価した。Sham 単離心筋では事実上存在しなかった(図 6A)。しかし、TAC 心筋では SCaT を有意に多く認めた(図 6B)。TAC で多く認めた SCaT に対して、タンパク導入キットを用いて WT-CaM、HA-CaM を導入した。WT-CaM の導入では抑制できなかったが、HA-CaM では抑制できた(図 6C,D)。

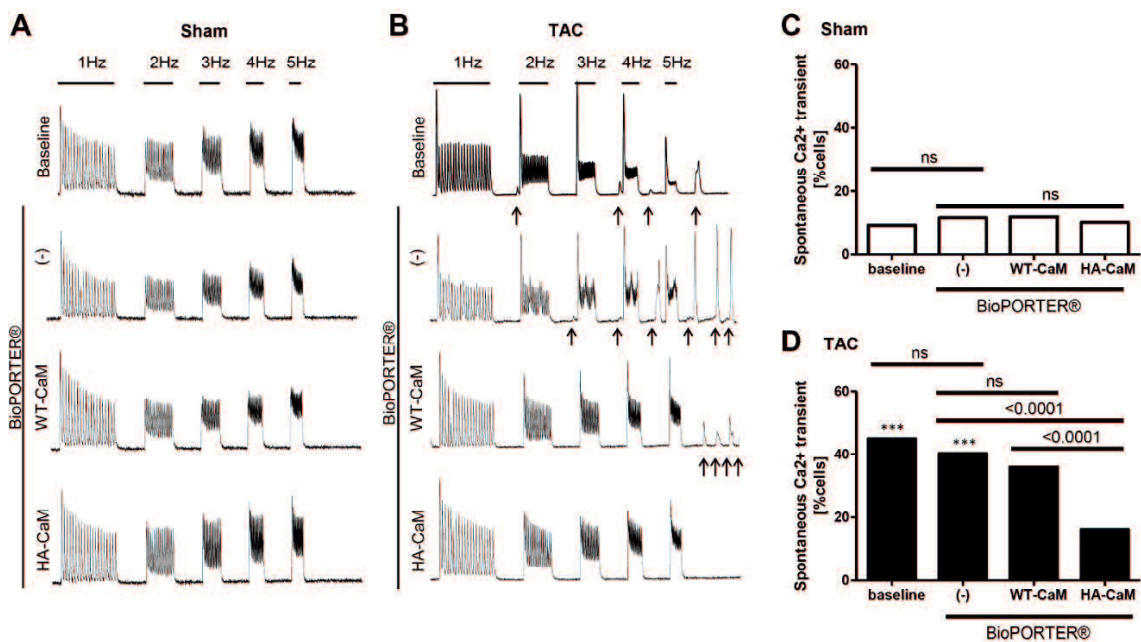


図 6 インタクト細胞における自発性 Ca²⁺放出(SCaT)データを示す。A: 代表的な Sham インタクト細胞の SCaT を示す。心筋細胞は Tyrode 溶液に浸し 1-5Hz で細胞にフィールドスティミュレーションを加えた。WT-CaM、HA-CaM は BioPORTER®を用いて導入した。B: TAC 細胞における SCaT を示す。矢印で示すようにペーシング後に SCaT を認める。C: Sham のデータを示す。D: TAC のデータを示す。ns; 有意差なし、***P<0.001 vs Sham baseline。CaM ; calmodulin、TAC ; transverse aortic constriction。

第6章 考察

心臓性突然死は重症心不全患者において一つの主要な死因である。また、致死的不整脈は心不全治療において重要な問題の一つである。我々が今回行ったマウスを用いた TAC モデルの生存曲線の解析では、8 週後の死亡率が 6 割であった。ほとんどのマウスは致死的不整脈が主因と考えられる突然死をしていた。今回我々は TAC モデルにおける不整脈の発生状況と分子メカニズムについてその催不整脈性を補正できるという仮説について検証した。

本研究の 3 つの大きなポイントとして、第一に Sham マウスではカフェイン、エピネフリンを投与しても心室性不整脈は殆ど観察されないが、TAC マウスでは高率に誘発されること、第二に TAC 不全心における RyR2 に対する CaM の結合性低下は異常な Ca^{2+} イベントを引き起こすこと。第三に人工的に WT-CaM より RyR2 への親和性を高めた HA-CaM を用いることにより RyR2 に対する CaM の結合性を高めることで、CaM の結合性が著明に低下した TAC の不全心筋において異常な Ca^{2+} リリースを抑制できる、ということが挙げられる。

我々はこれまでにペーシング誘発性心不全において、Ser 2808 の PKA リン酸化[18]および酸化ストレス[19]により domain switch の domain unzipping を生じていること、およびそのことにより異常な Ca^{2+} 漏出を生じ、筋小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵が低下し、心筋の収縮不全をきたすことを報告してきた。また最近、ペーシング誘発性心不全では CaM の解離によって異常な Ca^{2+} リリースを引き起こしていること報告している[14]。また、CaM の RyR2 への再結合はペーシング誘発性心不全において RyR2 の安定性を改善させることも報告している[17]。Oda らによると、RyR2 への CaM の結合は Unzipping ペプチドである DPc10 投与によって減ることと報告されている[4]。これらの所見は、CaM の解離がクランプ領域の domain unzipping にアロステリックに関連し、異常な Ca^{2+} リリースを生じている不全心筋において共通する異常な細胞内 Ca^{2+} ハンドリングに非常に重要な役割を果たしていることを示している。Gangopadhyay と Ikemoto は、新生児心筋細胞に Endothelin-1 を投与した肥大刺激を検した実験で、RyR2 からの CaM の解離を示し、これは SCaT を増やし核内への CaM、CaMKII、および Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) の移行を誘導することを示した[20]。さらに彼らは抗 CaMBD 抗体を用いて、この抗体が calmodulin binding domain; CaMBD/ calmodulin like domain; CaMLD の相互作用を遮断することにより、ET-1 誘発性の病理学的な細胞内事象のすべてを防止し、その結果、肥大の発症を防ぐことを実証した。これらのデータは、CaM の解離によって誘発された RyR2 における CaMBD と CaMLD のチャンネル活性化の相互作用の異常形成が、心肥大および心不全発症につながる初期の重要な事象である仮説を支持する。

我々が以前報告したように、N-terminal domain と Central domain の対となる部位の

Unzipping は、CPVT ミュータントマウスにおける β アドレナリン受容体刺激による PKA リン酸化によっても観察される[10,11]。これらは CPVT ミュータントマウスにおいて不整脈の起こる起点となる事項で、通常の CaM に比べて RyR2 に対する結合親和性を高めた HA-CaM を導入することで、CPVT ミューテーションでみられる異常な RyR2 機能を改善できる証拠となる。今回得た我々の知見は、RyR2 の CaMBD に対する特異性が高く、結合親和性の高いペプチドは、CaMBD/CaMLD の相互作用を遮断する分子の楔となり、その結果 CPVT に関連する不整脈の有用な治療薬となりうることを示唆する。

本研究の限界について

本研究の限界として以下のことがあげられる。HA-CaM を不全心筋に導入した *in vivo* データがないこと、さらに TAC モデルは急激な圧負荷を加えるモデルであるため、完全にヒトにおける心不全と同等に扱えない。

第 7 章 結語

圧負荷心不全モデルの心筋細胞では、 Ca^{2+} 漏出、遅延後脱分極、撃発活動、 Ca^{2+} スパークなどが上昇し、SCaT が上昇している。同不全心筋における RyR2 のチャネル機構異常は、CaM の RyR2 への結合性を低下させる。RyR2 に対する正常の CaM の結合によりこの異常を整えることができる。

第 8 章 謝辞

本研究を行うために多大なご指導・ご支援をいただいた山口大学大学院医学系研究科器
官病態内科学 矢野雅文教授、山口大学大学院医学系研究科保健学系学域病態検査学 山
本健教授、および、器官病態内科学講座スタッフの皆様、岡本陽子様、石原里江様へ心から
感謝申し上げます。また、本研究へのアドバイスと吟味をいただいた Noriaki Ikemoto 博士
に感謝申し上げます。

第 9 章 参考文献

1. Rodney GG , Williams BY, Strasburg GM, Beckingham K, Hamilton SL. Regulation of RYR1 activity by Ca(2+) and calmodulin. *Biochemistry*. 2000; 39:7807-7812.
2. Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Meissner G. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem*. 2003;278:23480-23486.
3. Samsó' M, Wagenknecht T. Apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2002;277:1349–1353.
4. Oda T, Yang Y, Nitu FR, Svensson B, Lu X, Fruen BR, Cornea RL, Bers DM. In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding. *Circ Res*. 2013;112:487-497.
5. Huang X, Liu Y, Wang R, Zhong X, Liu Y, Koop A, Chen SR, Wagenknecht T, Liu Z. Two potential calmodulin-binding sequences in the ryanodine receptor contribute to a mobile, intra-subunit calmodulin-binding domain. *J Cell Sci*. 2013;126:4527-4535.
6. Ikemoto N, Yamamoto T. Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca²⁺ channel regulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10:310-316
7. Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci*. 2002;7:d671-d683
8. 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.
9. 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.
10. 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

11. 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;448:1-7

12. Yamaguchi N, Takahashi N, Xu L, Smithies O, Meissner G. Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel. *J Clin Invest.* 2007;117:1344-1353.

13. deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp.* 2010;38: 1729

14. Ono M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Susa T et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca²⁺ release in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010;87:609–617.

15. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293:C1073-C1081.

16. Moore CP, Rodney G, Zhang JZ, Santacruz-Toloza L, Strasburg G, Hamilton SL. Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *Biochemistry* 1999;38:8532–8537.

17. 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;96:433-443.

18. 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.

19. Yano M, Okuda S, Oda T, Tokuhisa T, Tateishi H, Mochizuki M, Noma T, Doi M, Kobayashi

S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*. 2005; 112:3633-3643.

20. Gangopadhyay JP, Ikemoto N. Intracellular translocation of calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II during the development of hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:515-21.