

Stabilizing cardiac ryanodine receptor prevents the development of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II δc transgenic mice

(ダントロレン慢性投与によるリアノジン受容体の安定化は、CaMK II δc 過剰発現マウスでみられる心機能低下を改善し、致死性不整脈の誘発を抑制する)

氏名 清水 陽子

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

令和2年 1月

目次

第1章 要旨	2
第2章 研究の背景	2
第3章 目的	3
第4章 研究方法	3
4-1 動物モデル	3
4-2 ダントロレン(DAN)の投与方法と投与量の設定	4
4-3 心エコー検査	5
4-4 心筋細胞の単離	5
4-5 心筋細胞を用いた Cell shortening と Ca^{2+} 濃度イメージング測定	5
4-6 ウェスタンブロッティング	5
4-7 RyR2 に対する内因性 CaM の結合性についての免疫細胞化学的解析	6
4-8 統計処理	6
第5章 結果	7
5-1 CaMK II δc の過剰発現は進行性の心筋症を引き起こす	7
5-2 CaMK II δc の過剰発現は RyR2 と CaMK II のリン酸化を引き起こす	7
5-3 TG 心筋細胞では、 Ca^{2+} ハンドリングの異常を反映した sCaTs を誘発する	9
5-4 TG 心筋細胞では、RyR2 への内因性 CaM の結合性は低下している	9
5-5 TG マウスにおいて DAN の慢性経口投与は心機能障害の進行を抑制する	10
5-6 DAN の慢性経口投与は TG マウスでエピネフリン誘発性持続性心室頻拍の発生を抑制する	12
第6章 考察	13
6-1 CaMKII δc 過剰発現マウスでは、RyR2 における CaMK II のリン酸化は、RyR2 への CaM 結合能の低下により心機能低下を引き起こす	13
6-2 DAN は CaMK II δc 過剰発現マウスにおいて、RyR2 の CaMK II リン酸化レベルは変化させずに CaM と RyR2 間の結合能を改善させることで異常な Ca^{2+} 漏出を抑制し、心機能を改善させ、エピネフリンによる持続性心室頻拍の誘発を抑制した	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：様々な病的心において、カルシウム(Ca^{2+})/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) は心筋型リアノジン受容体(RyR2)からの異常な Ca^{2+} 漏出を引き起こすことが知られている。しかしながら、その詳細な機序は解明されていない。

目的：CaMK II δc 過剰発現(TG)マウスを用いて、心筋細胞内の RyR2 からの異常な Ca^{2+} 漏出、心機能、および致死性不整脈の誘発性を評価し、さらに TG マウスに対する RyR2 安定化薬であるダントロレン (DAN)の効果について検証する。

方法と結果：TG マウスでは左室拡張末期径の拡大および左室収縮末期径の拡大を伴って左室内径短縮率 (LVFS)が低下、すなわち心機能低下が見られ、RyR2 の CaMK II リン酸化部位である Ser2814 と CaMK II のリン酸化部位の Thr287 のリン酸化レベルの上昇を伴っていた。TG 心筋細胞では Cell shortening(CS)の変化率は低下し、ペーシングに依存しない自発的な Ca^{2+} トランジェント(sCaTs)の頻度が増加していた。また、内因性のカルモジュリン(CaM)の RyR2 への結合能が減少していた。

1ヶ月間のDANの慢性経口投与により、プラセボ投与群と比して心機能は改善していた。DAN慢性投与群のTG心筋細胞ではCSは改善、sCaTsの発生頻度が減少し、RyR2へのCaMの結合能が改善していた。一方で、DAN投与によるRyR2およびCaMK IIのCaMK II リン酸化の程度への影響はなかった。さらに、DAN慢性投与により、非投与群のTGで見られたエピネフリンによる持続性心室頻拍の誘発が抑制された。

結語：CaMK II を介した心機能低下や致死性不整脈の病態には RyR2 からの CaM 解離が深くその機序に関与している可能性があり、RyR2 への CaM の結合能の改善による RyR2 安定化は、心機能低下や致死性不整脈における新たな治療標的となりうる。

第2章 研究の背景

カルシウム(Ca^{2+})/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II)はセリン/スレオニン特異性のプロテインキナーゼであり、心臓や脳を含む多くの臓器の機能制御に関与しており[1]、CaMK II δc は心臓における主たるアイソフォームである。CaMK IIはその活性化により心筋型リアノジン受容体 (RyR2)、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル(例えばLタイプCaチャンネル)、ホスホランパンといった Ca^{2+} ハンドリング関連蛋白質の機能的な修飾を行うことで、正常心および病的心における心筋細胞内の Ca^{2+} 制御に深く関わっている [1]。一方、CaMK IIの活性化を介したRyR2のリン酸化が、心不全および致死性不整脈の病態に大きな役割があることがわかっている[1-3]。すなわち、CaMK IIは、CaMK II内のスレオニン 287(Thr287)のリン酸化によって Ca^{2+} が結合したカルモジュリン(Ca^{2+} /CaM)がCaMK IIに結合することによって活性化し、そのことでRyR2のセリン2814(Ser2814)がリン酸化する。RyR2のCaMK IIリン酸化によってRyR2を介した異常な Ca^{2+} 漏出が発生し、その結果、拡張期の心筋細胞内の Ca^{2+} イオン濃度($[\text{Ca}^{2+}]$)が

上昇し、心筋細胞肥大やアポトーシスの引き金となる[1-3]。

我々はこれまで様々な病的心において、5000以上のアミノ酸からなるRyR2のチャネル機能不全が、以下の機序で起こっていることを示してきた。つまり、RyR2の機能不全は、RyR2の接合領域であるN末端ドメイン（アミノ酸：1-600）、セントラルドメイン（アミノ酸：2000-2500）のドメイン連関障害によって引き起こされ(ドメインスイッチ仮説)、さらにカルモジュリン(CaM)がRyR2から外れることにより生じる[3-6]。CaMはユビキタスな蛋白質であるが、RyR2のチャネル開閉には抑制的に作用し、結果としてRyR2のチャネル開口確率は減少する[7]。それゆえ、RyR2からのCaMの解離はRyR2を介した異常なCa²⁺漏出を来とし、心不全や致死性不整脈を惹起する[5,6,8-10]。一方、悪性高熱症の治療薬であるダントロレン(DAN)が、ペーシング誘発性の心不全イヌモデル[5,11]、大動脈縮窄による心不全マウスモデル[9]、カテコラミン誘発性心室頻拍(CPVT)のマウスモデル [12,13]において、ドメイン連関障害により生じるRyR2の構造的な不安定性を改善させることが示されてきた。さらに、我々は最近、家族性肥大型心筋症のマウスモデルにおいて、DANがRyR2のCaMK II リン酸化を介した異常なCa²⁺漏出を抑制することを発見した[14]。しかしながら、RyR2のCaMK II リン酸化とRyR2ドメイン連関障害、RyR2-CaM解離との関連性についてはいまだにその詳細はよくわかっていない。

以上のことから、我々は以下の仮説をたてた。つまり、1) RyR2のCaMK II リン酸化がRyR2ドメイン連関障害を引き起こし、その結果、RyR2からCaMが解離することで異常なCa²⁺漏出をきたすこと、2) RyR2からの異常なCa²⁺漏出により心機能低下を引き起こすこと、3) DAN投与による薬理的なRyR2のチャネル安定化はCaMK II 活性化により生じた心機能低下および致死性不整脈の誘発を抑制すること。この仮説を証明するために、CaMK II δ c過剰発現マウスモデルにおいて、心筋細胞内のCa²⁺放出と心機能におけるDAN慢性投与の効果を検証した。

第3章 目的

CaMK II δ c 過剰発現(TG)マウスを用いて、その心臓における表現型を、心筋細胞内の RyR2 からの異常な Ca²⁺漏出とそれによる Ca²⁺ハンドリングの異常、心機能、および致死性不整脈誘発を含めて検証する。また、TG マウスにおける RyR2 安定化薬であるダントロレン(DAN)の効果とその機序について検証する。

第4章 研究方法

4-1 動物モデル

本研究では CaMK II δ c の過剰発現マウスを新規に作成して使用した(Supplemental Fig. 1)。また、既に作成されている CPVT 型モデルマウスの、RyR2 の単一点突然変異(R2474S)である RyR2^{R2474S+/-}ノックイン(KI)マウスを使用した[12]。

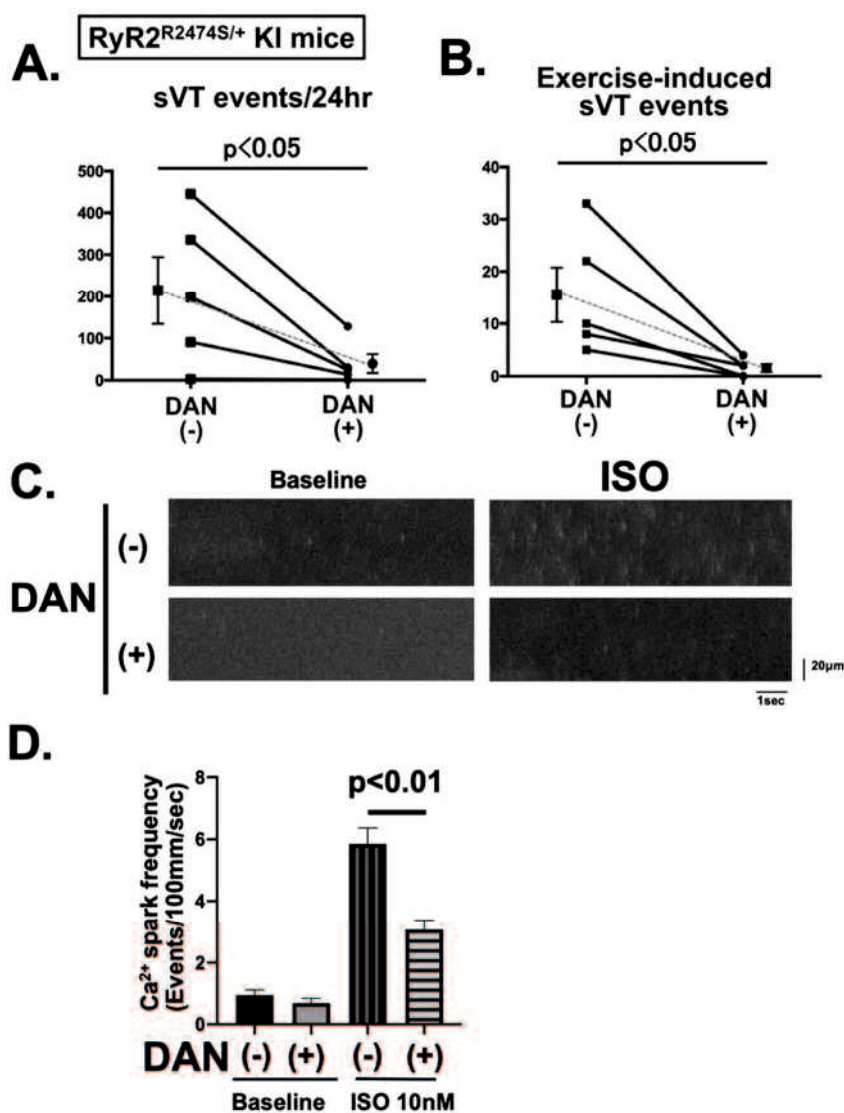
本研究は NIH による実験動物の保護と使用のガイドライン (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) を遵守して実施した。動物の飼育と実験計画は山口大学医学部動物倫理委員会の策定したガイドラインを

遵守して行った。

4-2 ダントロレン(DAN)の投与方法と投与量の設定

DANはWAKOおよびSigma-Aldrichより購入し、粉末飼料に混入させ、給餌装置(Roden CAFÉ)を用いて、3ヶ月齢のCaMK II δ c TGマウスに100mg/体重となるように調整し1ヶ月間、経口投与した。DANの加湿を防ぐために、DANを含む飼料は3日毎に交換した。慢性投与中は体重測定を行い、この研究ではすべての個体で1ヶ月間の投与後に体重は増加していた。

この量のDANの慢性経口投与は、RyR2^{R2474S/+}-ノックイン(KI)マウスの24時間または運動誘発性の持続性心室頻拍の頻度を有意に抑制した (Supplemental Figure 1A、B)。これは、DANの腹膜内投与と同様の抑制効果であった[13]。また、その単離心筋細胞ではRyR2からの異常なCa²⁺漏出を反映する、Ca²⁺スパーク頻度が低下していた(Supplemental Figure. 1C、D)。



Supplemental Figure 1: RyR2^{R2474S/+}-ノックイン(KI)マウスでのダントロレン(DAN)慢性経口投与の効果。(A)24時間の持続性心室頻拍(sVT)の頻度と(B)運動誘発性sVTの頻度。DAN投与群では、ともにsVTの誘発頻度が有意に抑制された(n=5)。(C)KIマウス心筋細胞の代

表的なラインスキャン図を示す。(D) Ca^{2+} スパーク頻度の結果を示す。DAN 非投与群では強心薬(ISO:イソプロテノール)投与で著明に Ca^{2+} スパーク頻度が増加したが、DAN 投与群では有意に低下していた。データは 4 hearts から得られた 20-42 細胞から算出し平均値 \pm SEM で示した。

4-3 心エコー検査

心機能はHDI-5000(Philips; Amsterdam, Netherlands)およびF37 (Hitachi Medical Systems; Steinhausen, Switzerland)の超音波装置と15-MHzのプロープを用いた。麻酔は4-5%の濃度のイソフルレン(酸素と混入)で導入し、検査中は1-2%のイソフルレン濃度を維持した。心拍数、左室拡張末期径(LVEDD)、左室収縮末期径(LVESD)および左室内径短縮率(LVFS: $[\text{LVEDD}-\text{LVESD}]/\text{LVEDD} \times 100$)を計測した。

4-4 心筋細胞の単離

心筋細胞の単離はマウスから、以前記載されているように単離した[12,13]。マウスの左室心筋をコラゲナーゼ含有溶液の中ではさみで分割し、混合ガス(95% O_2 と5% CO_2)によりバブリングされたコラゲナーゼ含有溶液により逆行性灌流を行って単離し、桿状(rod-shape)な心筋細胞を得て実験に使用した。心筋細胞はラミネコーティングしたガラス培養容器に移し、95% O_2 と5% CO_2 大気圧で37度で培養した。

4-5 心筋細胞を用いた Cell shortening と Ca^{2+} イメージング測定

心筋細胞のCell shortening(CS)は、電場刺激装置(IonOptix, MA,USA)を用いて2Hzでペーシング刺激して記録した。記録前に少なくとも2分間のペーシングを行うことで安定させた状態で記録した。Fluo4(20 μM)を Ca^{2+} dyeとして使用し、心筋細胞を1,2,3,4,5Hz、20拍ずつペーシングした後の10秒間に生じるペーシングによらない自発的な Ca^{2+} トランジエントをSpontaneous Ca^{2+} transient(sCaT)と定義し、その発生頻度を計測した[12,14]。測定装置は電子蛍光顕微鏡(BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan)およびレーザー共焦点顕微鏡(LSM-510, Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いた。筋小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量は、筋小胞体内の Ca^{2+} を放出させるためにカフェイン(10mM)を急速投与して計測した。桿状心筋細胞でのデータを分析し、ペーシング刺激と関わらず光る心筋細胞や桿状以外の心筋細胞は除外した。

4-6 ウェスタンブロッティング

RyR2, RyR2 の CaMK II リン酸化部位である Serine2814、RyR2 の PKA(Protein kinase A)リン酸化部位である Serine2808、CaMK II δ 、CaMK II のリン酸化部位である Thr287、GAPDH に対してウェスタンブロッティングを行った[12,14]。

使用する心筋懸濁液(Cardiac homogenate)は左室心筋から、以下のように精製した[12]。10mMのEDTA

を含まないプロテアーゼ阻害薬を含むトリス-マレイン酸緩衝液(pH6.8)をHomogenateし、4000gで15分間遠心分離させ、その上清を再度12000gで20分間遠心分離し、その上澄み液を使用した。筋小胞体(SR)の生成には、上清をさらに遠心分離(100,000gで2回)し、そのpelletを回収することにより精製した。

4-7 RyR2 に対する内因性 CaM の結合性についての免疫細胞化学的解析

単離した心筋細胞をパラホルムアルデヒドで5分間固定し、0.1% Triton X-100で20分間 透過処理した。パラホルムアルデヒドで固定する前にCaMKII阻害薬であるKN93またはDANで一時間静置した。固定後に、0.1%ウシ血清アルブミンおよび 0.3%血清非含有ブロッキング剤の中で、Anti-CaM 抗体および anti-RyR 抗体を用いて反応させてから、Alexa で標識された二次抗体 (Alexa488-conjugated goat anti-rabbit、Alexa633-conjugated goat anti-mouse) に反応させた心筋細胞をもちいて免疫細胞化学的解析を行った。なお、結果に影響しうる CaMK II に直接結合する、Ca²⁺/CaM の CaMK II への結合を阻害するため、KN93 を添加した[15]。

4-8 統計処理

2群間の差の検定には、対応のある/対応のない検定を行い、統計的比較にはテューキー法で分散分析を行った。イベント発生率の分析にはカイ二乗検定とライアンの方法で行った。P < 0.05は統計的に有意と考えた。すべての値は平均を標準誤差(SEM)で表示した。

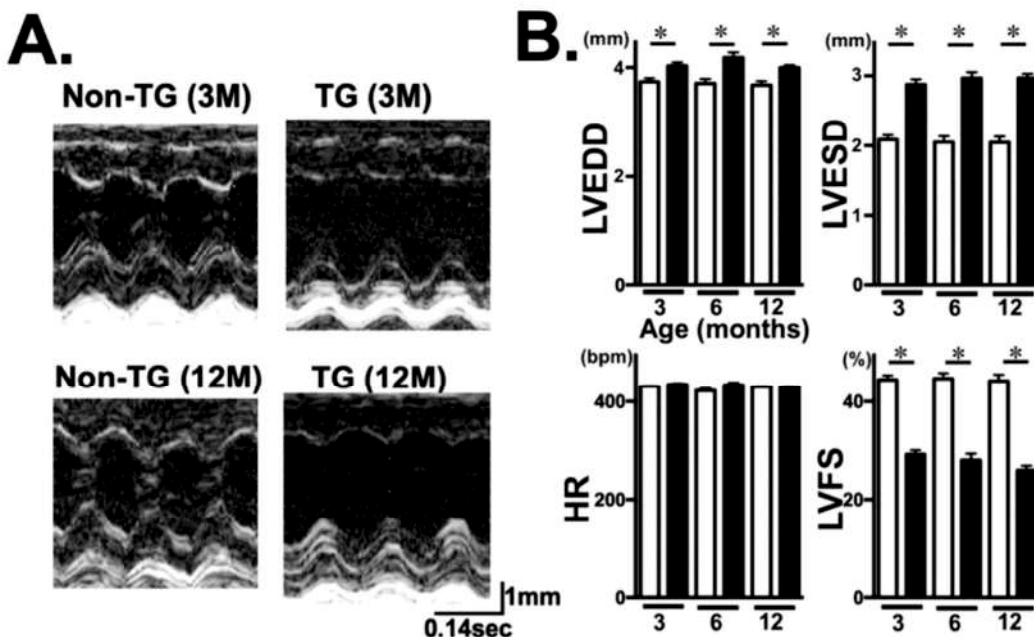
第5章 結果

5-1 CaMK II δ cの過剰発現は進行性の心筋症を引き起こす

慢性的なCaMKII δ c活性化の心機能への影響を評価するために、CaMK II δ c遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)モデルを新規に作成した (Supplemental Figure 2A)。サザンブロット分析で、TGでおよそ28コピーの導入遺伝子を同定した (Supplemental Figure 2B)。心エコーではTGにおいて、LVEDDとLVESDの拡大およびLVFSの低下を伴う進行性の心筋症が見られた(図1A、B)。TGはNon-TGと比較して、時間経過とともにLVが拡大傾向であった (Supplemental Fig. 1D and E)。TGの単離心筋細胞ではNon-TGの心筋細胞と比較して、Cell Shorteningのピークのベースラインからの変化率とピークに達する速度であるdeparture velocity(depV)は共に著明に減少した(図1C、D)。一方、TGでは心臓の収縮機能が低下しているにもかかわらず、生存率は100%であり(Supplemental Figure 3)、別の研究室で作製された、同じCaMK II δ c遺伝子を過剰発現させた以前の報告[16]より生存率は高かった。この相違の直接的な理由は明らかではないが、遺伝子発現の程度の違いにより心臓表現型の重症度の違いが生じた可能性がある。

5-2 CaMK II δ cの過剰発現はRyR2とCaMK II でリン酸化を引き起こす

TGではNon-TGと比して、CaMK II の蛋白発現量が13.1倍増加し(図1E、F)、導入した遺伝子に組み込んでいたHAタグの増加量と同程度であった (Supplemental Figure 2C)。これは、CaMK II 過剰発現による蛋白発現の増加が適切に見られたことを示唆する。ウェスタンブロットでは、TGではNon-TGと比較して、RyR2のCaMKIIのリン酸化部位[3]であるRyR2のSer2814のリン酸化と、CaMK II 蛋白におけるThr287のリン酸化は、それぞれNon-TGと比して1.87倍および2.53倍有意に増加していた(図1E、F)。一方、RyR2のPKAのリン酸化部位であるSer2808のリン酸化の程度はTGとNon-TGで明らかな違いはなかった。



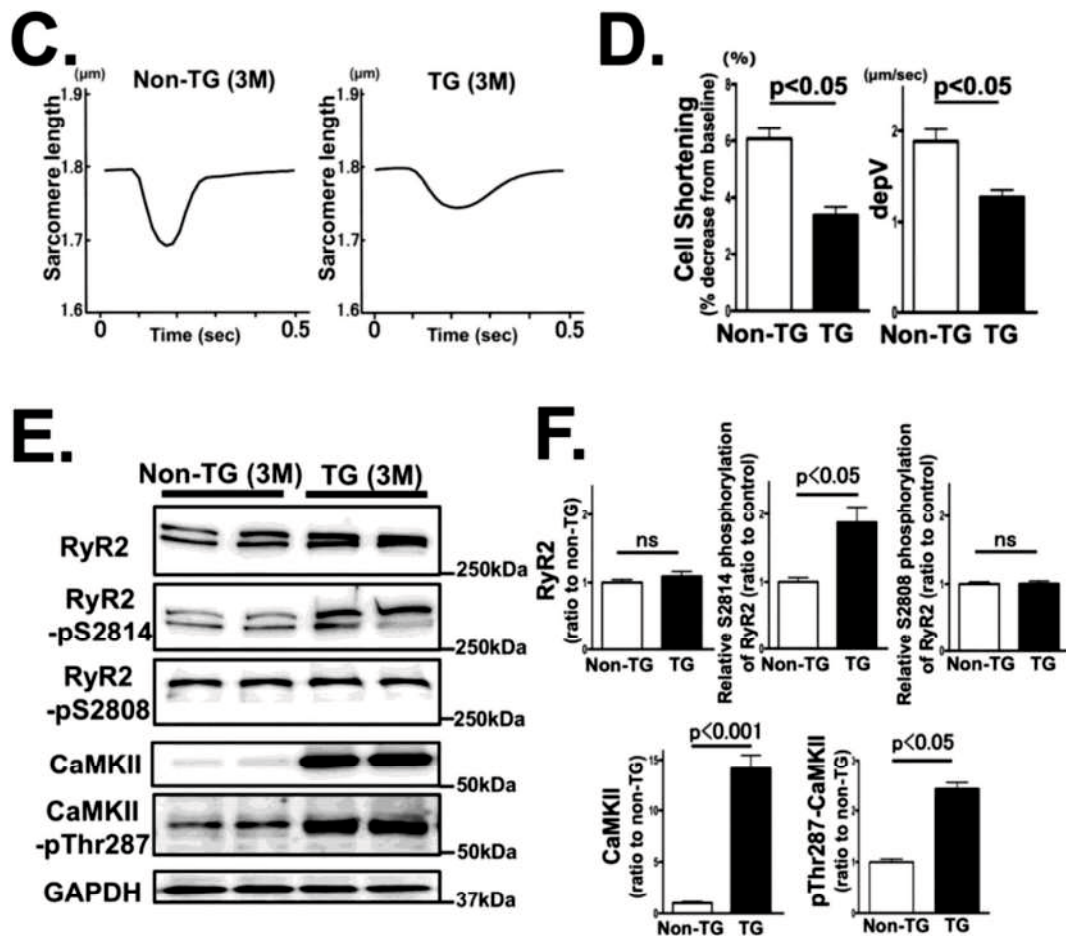
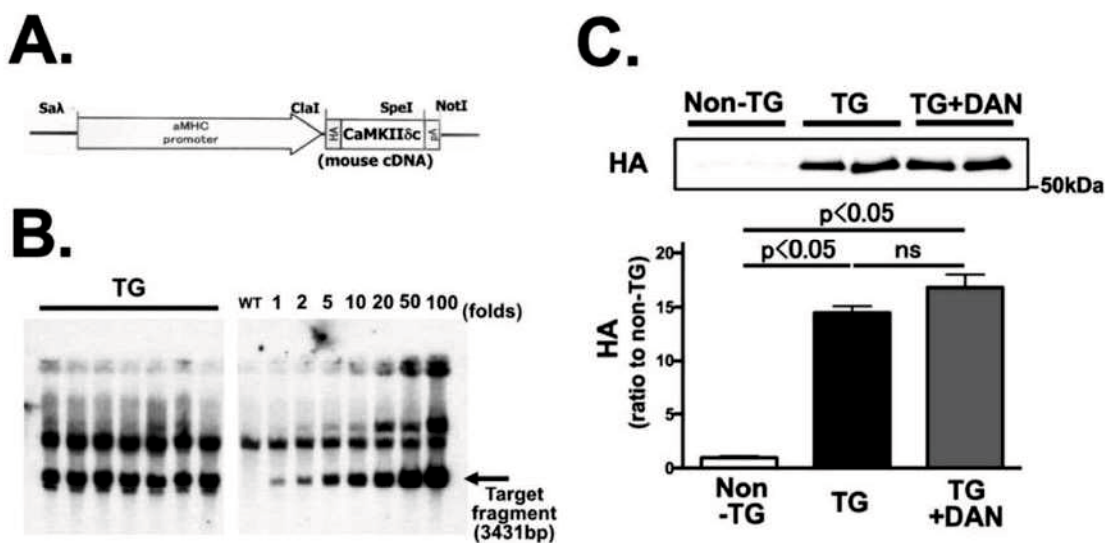
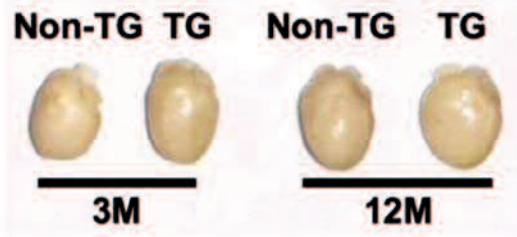
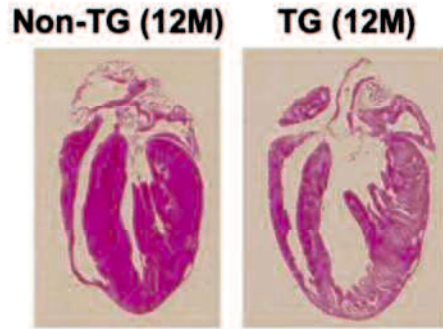
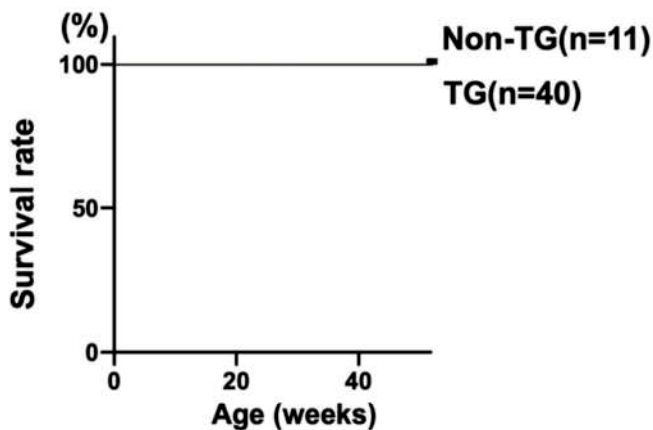


図1: CaMKII δ c トランスジェニックマウスの特徴。(A) TG、Non-TG における3ヶ月齢(3M)、12ヶ月齢(12M)でのMモード心エコー図記録。(B) 心エコーの結果。LVEDD; 左室拡張末期径(mm)、LVESD; 左室収縮末期径(mm)、LVFS; 左室内径短縮率(%), HR; 心拍数(bpm)。(C) TG、Non-TG における3ヶ月齢(3M)でのCell shortening 記録。(D) Cell shortening のピークのベースラインからの変化率(%)と、ピークに達する測度(depV)の結果(TG はn=4, Non-TG はn=8)。(E) TG、Non-TG における3ヶ月齢(3M)でのウェスタンブロットティングの代表例。(F) ウェスタンブロットティングの結果。CaMKIIの蛋白発現は著増し、RyR2のSer2814とCaMKIIのThr287のリン酸化レベルは有意に増加していた(両群ともn=6)。



D.**E.**

Supplemental Figure 2: CaMKII δ c トランスジェニックマウス。(A) HA タグを挿入した CaMKII δ c のマウス DNA を α -MHC をプロモーターとして使用し過剰発現させた。(B) サザンブロットの結果。TG では ~28 コピーが見られた。(C) CaMKII δ c に導入していた HA タグのウェスタンブロット。HA タグの発現率は TG で著明に増加し、CaMKII の発現増加率と同様であった (n=4)。(D) TG、Non-TG における 3 ヶ月齢 (3M)、12 ヶ月齢 (12M) でのホルマリン固定した摘出心の代表例。(E) TG、Non-TG における 12 ヶ月齢 (12M) でのヘマトキシリン-エオジン染色の代表例。



Supplemental Figure 3: TG、Non-TG の生存率。ともに 52 週まで生存率は 100% であった。

5-3 TG 心筋細胞では Ca²⁺ハンドリングの異常を反映した sCaTs を誘発する

図 2A-C に示すように、TG の心筋細胞では Non-TG と比して sCaTs の発生頻度は有意に高く、カフェイン投与により測定した筋小胞体の Ca²⁺貯蔵量は、TG 心筋細胞で Non-TG と比して減少していた。それらの差異は、強心薬のイソプロテレノール (ISO: 10 nM) の投与で顕在化した。既に、我々は sCaTs の発生頻度の増加が催不整脈性の基質として、遅発後脱分極や誘発活動を惹起し得ることを報告している [10, 12]。以上のことは、CaMK II δ c の過剰発現は心筋細胞において、RyR2 の CaMK II リン酸化により Ca²⁺ハンドリングの異常を引き起こすことを示唆している。

5-4 TG 心筋細胞では RyR2 への内因性の CaM 結合性は低下している

免疫蛍光抗体法を用いて RyR2 に結合した内因性 CaM を測定した (図 2D-F)。Non-TG と比して、TG 心筋細胞では RyR2 へ結合する内因性 CaM が有意に減少していた。TG 心筋細胞では、RyR2 へ結合する

CaM 結合能の減少が、Ca²⁺ハンドリング異常の原因と考えられた。

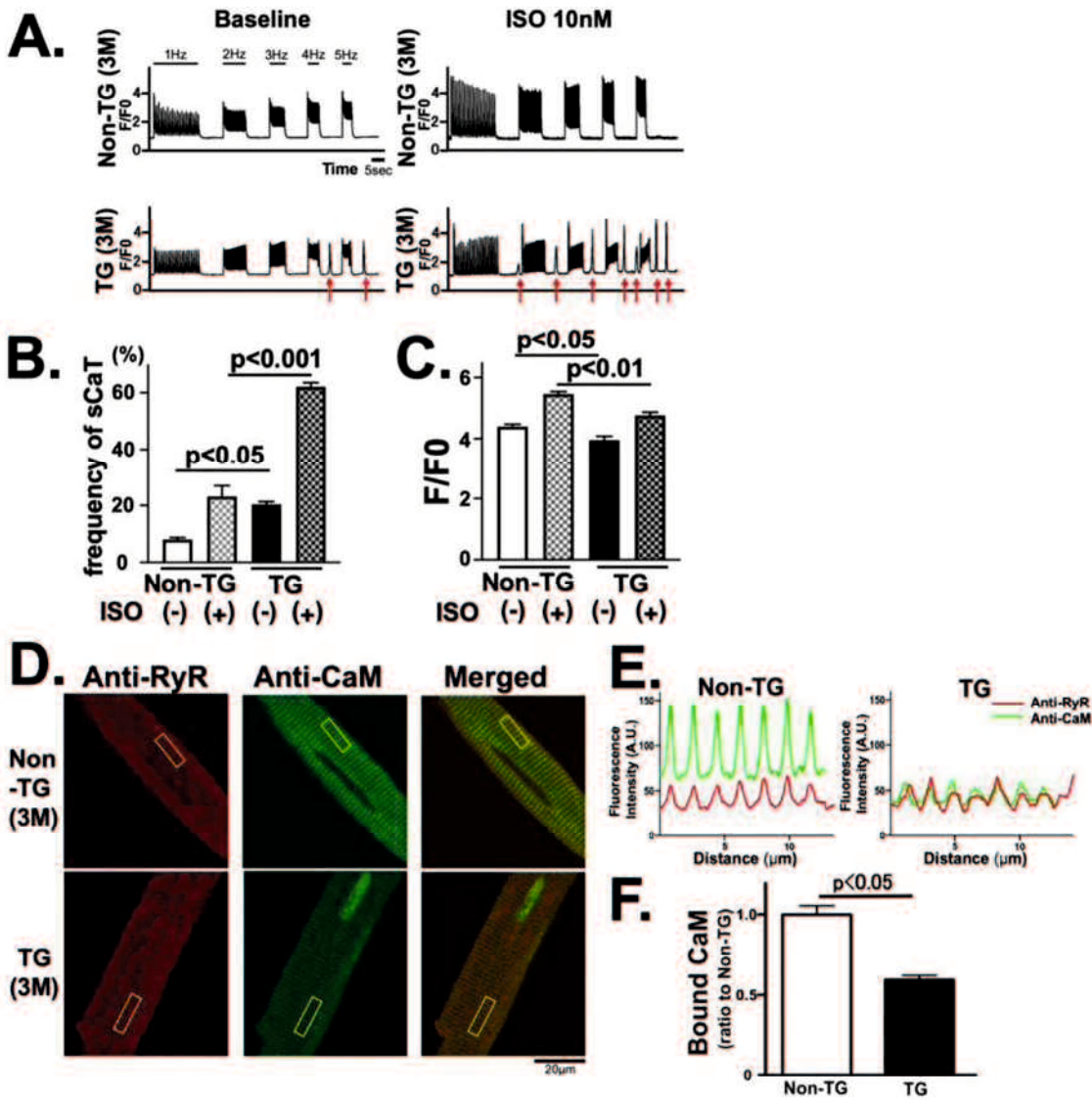


図 2: TG 心筋細胞では、sCaT 頻度の増加が見られ、RyR2 への CaM 結合能の低下を伴っていた。(A) TG、Non-TG における 3 ヶ月齢 (3M)での単離心筋細胞の Ca²⁺放出の図を示す。矢印が sCaT を示している。(B) sCaT 出現率(%)のデータを示す (TG は 6 hearts から得られた 678-1245 細胞、Non-TG は 4 hearts から得られた 853-1083 細胞より算出)。(C) カフェイン投与による筋小胞体の Ca²⁺貯蔵量の測定データ。(D) 免疫蛍光抗体法を用いた心筋細胞内の RyR2 に結合した内因性 CaM を検出した。代表的な心筋細胞の免疫染色画像を示す。内因性 CaM、RyR2 は各々 anti-CaM 抗体、anti-RyR2 抗体を用いて検出した。上段に Non-TG を、下段に TG を示す。左に RyR2 (赤)を、中央に内因性 CaM (緑)を、右に Merge 像を示す。(E) 代表的な蛍光強度の断面曲線 (RyR2 : 赤、CaM : 緑)を示す。RyR2 に結合した内因性 CaM は周期的に増高する蛍光強度として測定される。(F) CaM の蛍光強度から算出した CaM 結合能のグラフ。RyR2 に結合した内因性 CaM は Non-TG と比して TG 心筋細胞で有意に減少していた。データは 4 hearts から得られた 55-65 細胞から算出し平均値 ± SEM で示した。

5-5 TGマウスにおいてDANの慢性経口投与は心機能障害の進行を抑制する

CaMK II δ cの過剰発現により生じる心臓への有害な事象が、RyR2のCaMK IIリン酸化およびRyR2へのCaM結合能の減弱を介したRyR2機能異常が原因であるのかについて検証を試みた。その検証方法として、3ヶ月齢のTGマウスにRyR2安定化薬であるDANを1ヶ月間慢性投与した。その結果、DAN慢性投与群のTGでは非投与群のTGと比較して、LVESDの縮小を伴ったLVFSの改善が見られた(図3A、B)。DAN慢性投与群のTG心筋細胞では、CSの変化率およびdepVは改善していた(図3C、D)。注目すべき事に、RyR2のSer2814およびCaMK IIのThr287のCaMK IIのリン酸化レベルは、DAN慢性投与群、非投与群ともに高値であり、投与の有無によるCaMK IIリン酸化レベルへの影響はなかった(図3E、F)。

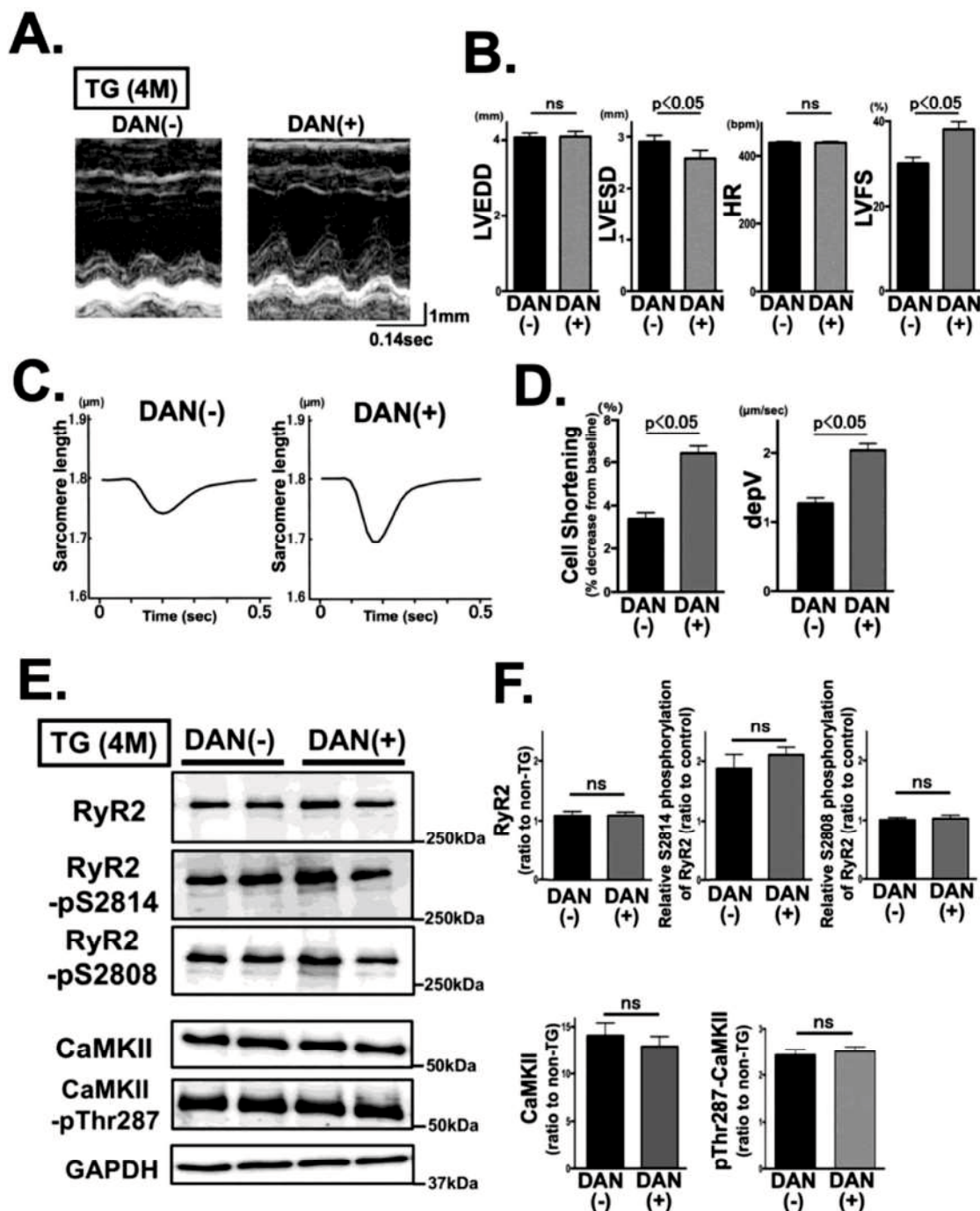


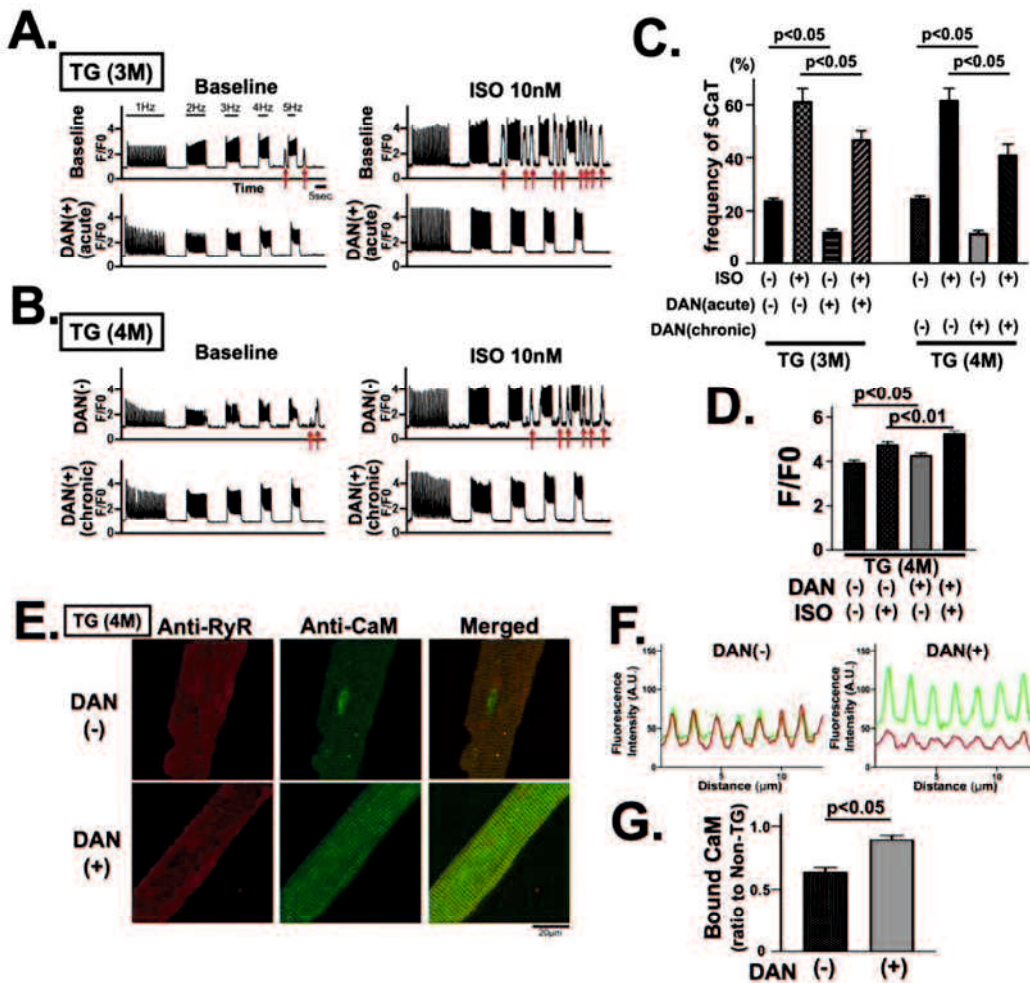
図3: ダントロレン慢性投与はRyR2およびCaMKIIのCaMKIIリン酸化レベルを変化させることなく、TGで見られる心機能低下を改善

させた。(A) TGにおける4ヶ月齢(4M)での DAN 投与群{DAN(+)}、非投与群{DAN(-)}での M モード心エコー図記録。(B) 心エコーの結果(両群ともに n=19)。(C) TGにおける4ヶ月齢(4M)での Cell shortening 記録。(D) Cell shortening のピークのベースラインからの変化率(%)と、depVの結果(DAN(+))は 9hearts から得られた 151 細胞、DAN(-)は 4 hearts から得られた 59 細胞より算出)。(E) TG における4ヶ月齢(4M)でのウェスタンブロットティングの代表例。(F) ウェスタンブロットティングの結果。CaMKII の蛋白発現量および RyR2 と CaMKII における CaMKII リン酸化の程度は DAN(+)と DAN(-)で著変なかった (両群とも n=6)。

DAN慢性投与群のTG心筋細胞では、sCaTsの発現頻度は、非投与群と比して、著明に減少し、カフェイン投与により測定した筋小胞体のCa²⁺貯蔵量の増加を伴っていた(図4B-D)。これは、DAN慢性投与によりRyR2からの異常なCa²⁺漏出の抑制が生じた事が示唆される。同様のDANのsCaTs発生の抑制効果は、TG心筋細胞にDAN(1μM)を急性投与した際にも見られた(図4A、C)。また、DAN慢性投与群では、非投与群で見られた、RyR2に結合する内因性のCaMの減少が改善していた(図4E-G)。

5-6 DANの慢性経口投与はTGマウスでエピネフリン誘発性の持続性心室頻拍の発生を抑制する

エピネフリンの腹腔内投与(2mg/kg)により、TGマウスでは持続性心室頻拍(sVT)の発生頻度はNon-TGと比して著明に増加した(図4H、I)。ダントロレンの慢性投与後には、sVTの発生頻度は有意に減少した(図4H、I)。



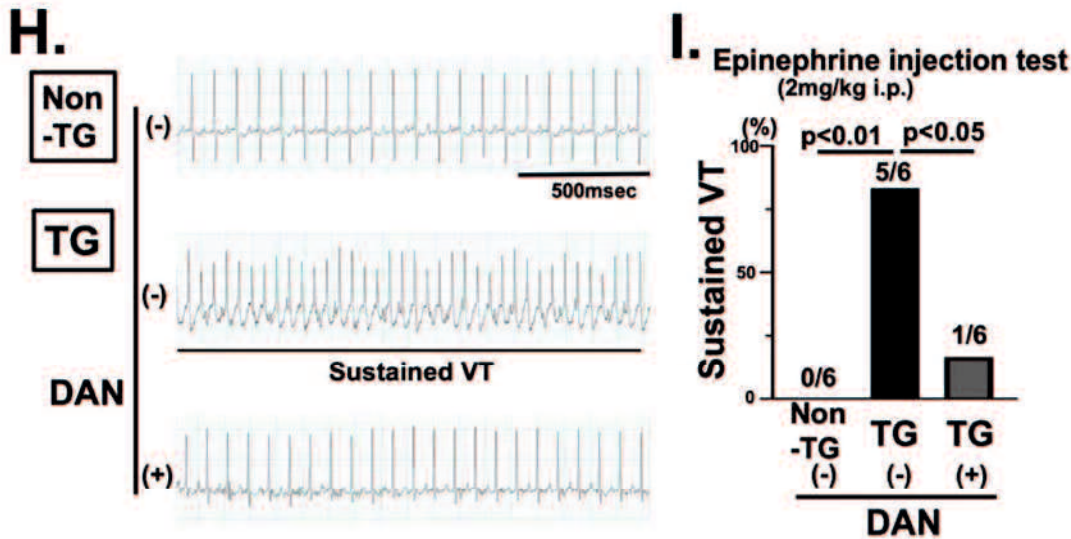


図4: ダントロレン慢性投与はTGで見られたエピネフリン誘発性持続性心室頻拍を抑制し、投与群の心筋細胞ではsCaT発生頻度が減少し、RyR2へのCaM結合能が保たれていた。(A)3ヶ月齢のTG心筋細胞におけるDAN急性投与群(1 μ M)および非投与群での単離心筋細胞のCa²⁺放出の図を示す。矢印がsCaTを示している。(B)DAN慢性投与群、非投与群での4ヶ月齢のTG心筋細胞における単離心筋細胞のCa²⁺放出の図。(C)sCaT出現率(%)のデータを示す(DAN急性投与群(3ヶ月齢)およびDAN非投与群(4ヶ月齢)は4 heartsから得られた685-1286細胞、DAN慢性投与群(4ヶ月齢)は9 heartsから得られた586-1689細胞より算出)。(D)カフェイン投与による筋小胞体のCa²⁺貯蔵量の測定データ。(E)免疫蛍光抗体法を用いた心筋細胞内のRyR2に結合した内因性CaM。代表的な心筋細胞の免疫染色画像を示す。(F)代表的な蛍光強度の断面曲線(RyR2:赤、CaM:緑)を示す。(G)CaMの蛍光強度から算出したCaM結合能のグラフ。RyR2に結合した内因性CaMはNon-TGと比してTG心筋細胞で有意に減少していた。データはDAN非投与群は4 heartsから得られた50細胞、DAN慢性投与群は6 heartsから得られた74細胞から算出し平均値 \pm SEMで示した。(H)Non-TG、DAN非投与群のTG、DAN慢性投与群のTGにおけるエピネフリン(2mg/kg)の腹腔内投与による不整脈誘発試験の代表的な心電図像。(I)持続性心室頻拍の発生頻度のグラフ(各群n=6)。

第6章 考察

本研究では以下の2つのことが判明した。第一に、CaMK II δ cの過剰発現はRyR2のS2814のリン酸化レベルを増加させ、それによりRyR2からのCaMの解離を伴うことで異常なCa²⁺漏出が生じ、心機能低下と致死的不整脈の誘発を引き起こす。第二に、ダントロレン慢性投与は、RyR2のSer2814のリン酸化の程度を変化させることなく、RyR2からのCaMの結合性を高めることで異常なCa²⁺漏出を抑制し、心機能を改善させ、致死性不整脈の誘発を抑制させた。

6-1 CaMK II δ c過剰発現マウスでは、RyR2におけるCaMK IIリン酸化は、RyR2へのCaM結合能の低下により心機能低下を引き起こす

RyR2のリン酸化によるチャンネル機能制御には、主にプロテインキナーゼ(PKA)とCaMK IIの2種類が判明している。我々はこれまでに、ペーシング誘発性イヌ心不全モデルでは、RyR2のPKAのリン酸化部位

であるSer2808が過リン酸化されることによりRyR2からの異常なCa²⁺漏出がみられ、その機序にRyR2からのCaMの解離が関与していることが報告した[5,6,17]。最近、内海らは、RyR2のCaMK IIのリン酸化部位を常時リン酸化させたモデルマウスであるRyR2-S2814Dノックインマウスを作成し、そのマウスの心筋細胞で筋小胞体からのCa²⁺漏出が増加し、CaMとRyR2の親和性が低下し、RyR2のドメイン連関障害による構造変化が生じていることを示した[18]。今回の研究における我々の知見から、RyR2におけるSer2814およびSer2808のリン酸化はともにN末端ドメインとセントラルドメインのドメイン連関障害(Unzipping)を引き起こし、RyR2からCaMを解離させることで異常なCa²⁺漏出を来し、Ca²⁺漏出は致死性不整脈の基質の原因となることがわかった。構造学的には、RyR2のドメイン5の中のN末端領域はドメイン6の中のセントラルドメインに近く[19]、PKAのリン酸化部位であるSer2808のリン酸化部位は3次的にドメイン間の結合に近く位置する[20]。このことは、Ser2808(またはSer2814)により、PKAの過リン酸化はN末端ドメインとセントラルドメインのドメイン間結合を変化させることを示唆している。

RyR2のCaMK IIのリン酸化部位を常時リン酸化させたRyR2-S2814Dノックインマウスでは、RyR2における慢性的なS2814の活性化は、異常なCa²⁺漏出や筋小胞体のCa²⁺貯蔵量および心筋の収縮能の低下と関連していた[21]。この所見は、我々のTGマウスでみられた知見に合致する(図2A-C)。つまり、S2814でのRyR2のCaMK IIの過リン酸化が筋小胞体からの異常なCa²⁺漏出を引き起こし、それが筋小胞体のCa²⁺貯蔵量の減少、ひいては心機能低下の原因となることを示唆している。

6-2 DANはCaMK II δ c過剰発現マウスにおいて、RyR2のCaMK IIリン酸化レベルは変化させずにCaMとRyR2間の結合能を改善させることで異常なCa²⁺漏出を抑制し、心機能を改善させ、エピネフリンによる持続性心室頻拍の誘発を抑制した

DANはRyR2のN末端ドメイン(アミノ酸基：600-620)に直接結合し[11]、本研究で使用したCPVT型RyR2^{R2474S/+}ノックインマウスの心臓や不全心において、CaMのRyR2への結合親和性が回復し、RyR2からの異常なCa²⁺漏出、遅発後脱分極ならびに致死性不整脈を抑制することがわかっている[5,11-13]。これらの報告と同様に、CaMK II δ c過剰発現マウスに対するDANの慢性投与は異常なCa²⁺漏出を抑制し、CaMのRyR2への結合能の上昇(図4E-G)、筋小胞体のCa²⁺貯蔵量の増加(図4D)をもたらすと同時に心機能を改善させた(図3A,B)。ここで注目すべき点は、心筋細胞内Ca²⁺ハンドリング異常、特にRyR2からの異常なCa²⁺漏出を示唆するsCaTsの発生頻度は、TG心筋細胞にDANを急性投与した際にもその発生頻度が減少した(図4A,C)。このことは、慢性投与でみられたDANの心臓に対する有用な効果は、RyR2のドメイン連関の正常化(unzippingからzipping)というRyR2への直接作用によってもたらされたものであるということを示唆する所見である。また、DAN慢性投与により、CaMK IIリン酸化レベルが低下することで心臓への有用な効果がみられている可能性を除外するために、RyR2のSer2814とCaMK IIのThr287のリン酸化レベルを確認した。その結果、DANの慢性投与後のTGマウスではどちらのリン酸化レベルも減少しておらず(図3E,F)、このことは、DANの有用な効果はRyR2およびCaMK IIのリン酸化レベルの変化によって生じた二次的な効果ではないことを示すものである。

第7章 結語

CaMK II δ c の過剰発現による RyR2 の Ser2814 のリン酸化により CaM が RyR2 から解離した結果、RyR2 からの異常な Ca^{2+} 漏出が惹起され、結果として心機能低下や薬剤誘発性の持続性心室頻拍が生じる。ダントロン慢性投与による RyR2 安定化は、RyR2 の Ser2814 のリン酸化の程度を変化させることなく RyR2 に対する CaM の結合能を高めることで、心機能を改善させ、致死性不整脈誘発を抑制する。RyR2 に対する CaM の結合親和性を高めることが、心不全や致死的不整脈に対して新たな治療戦略となるかもしれない。

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、奥田真一先生、および、器官病態内科学講座スタッフの皆様、実験助手の岡本陽子様、楯田聡美様へ心から感謝申し上げます。

第9章 参考文献

1. Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circ. Res.* 2012; 110: 1661–1677.
2. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail.* 2013; 1: 1–20.
3. 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; 15:1580–1582.
4. Yano M, Okuda S, Oda T, Tokuhisa T, Tateishi H, Mochizuki M, et al. Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation.* 2005; 112: 3633–3643.
5. 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.
6. Hino A, Yano M, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, et al. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc. Res.* 2012; 96: 433–443.
7. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium signaling and cardiac arrhythmias. *Cir. Res.* 2017; 120: 1969–1993.
8. Oda T, Yang Y, Nitu FR, Svensson B, Lu X, Fruen BR, et al. In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding. *Circ. Res.* 2013; 112: 487–497.
9. Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Sufu Y, et al. Correction of impaired calmodulin binding RyR2 as a novel therapy of lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm.* 2017; 14: 120–127.
10. Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, et al. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 448: 1–7.
11. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53: 1993–2005.

12. Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ. Res.* 2010; 106 : 1413–1424.
13. Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, Suetomi T, Susa T, M. Ono M, et al. 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.
14. Okuda S, Sufu-Shimizu Y, Kato T, Fukuda M, Nishimura S, Oda T, et al. CaMKII-mediated phosphorylation of RyR2 plays a crucial role in aberrant Ca²⁺ release as an arrhythmogenic substrate in cardiac troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 496: 1250–1256.
15. Pellicena P, Schulman H, CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front. Pharmacol.* 2014; 21: 1–10.
16. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross Jr J, Bers DM, et al. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res.* 2003; 92 : 912–919.
17. Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, et al. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation.* 2005; 111: 3400-3410.
18. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016; 98: 62–72.
19. Wang R, Chen W, Cai S, Zhang J, Bolstad J, Wagenknecht T, et al. Localization of an NH(2)-terminal disease-causing mutation hot spot to the "clamp" region in the three-dimensional structure of the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 2007; 282: 17785-17793.
20. Meng X, Xiao B, Cai S, Huang X, Li F, Bolstad J, et al. Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 2007; 282: 25929-225939.
21. van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL, et al. Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation.* 2010; 122: 2669-79.

この学位論文は、Sufu-Shimizu Y, Okuda S, Kato T, Nishimura S, Uchinoumi H, Oda T, et al. Stabilizing cardiac ryanodine receptor prevents the development of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II δ c transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Jan 29. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.107. に原著論文として発表したものからデータを引用して作成しました。