

Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts

(ダントロレンは圧負荷不全心においてリアノジン受容体を安定化させることで心室頻拍を抑制する)

氏名 梶井 俊郎

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態内科学分野

令和2年 6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 心筋細胞の単離.....	4
4.4 Ca <sup>2+</sup> スパークと筋小胞体内のCa <sup>2+</sup> 貯蔵解析.....	4
4.5 心筋細胞の一過性Ca <sup>2+</sup> 濃度変化モニタリングエラー!ブックマークが定義されていません。	
4.6 免疫蛍光抗体法による内因性CaMのRyR2に対する結合解析エラー!ブックマークが定義されていません。	
4.7 サポニン処理した心筋細胞における外因性CaMのRyR2に対する結合解析...	5
4.8 解析.....	6
第5章 結果.....	7
5.1 ダントロレンは薬理的に誘発された心室頻拍を抑制する.....	7
5.2 ダントロレンは圧負荷不全心のCa <sup>2+</sup> スパークや自発性Ca <sup>2+</sup> 放出を抑制する...	9
5.3 ダントロレンは圧負荷不全心においてRyR2に対するCaMの結合性を改善させる.....	10
第6章 考察.....	13
第7章 結語.....	14
第8章 謝辞.....	14
第9章 参考文献.....	15

## 第1章 要旨

背景：心不全においてリアノジン受容体（RyR2）からの異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が心室性不整脈の大きな原因の一つとなっている。我々は、以前に心不全において悪性高熱症の特効薬であるダントロレンが、RyR2 内の N 末端ドメイン (1-61 のアミノ酸配列) と中央ドメイン (2000-2500 のアミノ酸配列) 間のドメイン連関障害を是正し、カルモジュリン (CaM) の RyR2 への結合親和性を高めることによって、異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制することを報告した。

目的:我々はダントロレンがマウスの圧負荷心不全モデルにおいて、RyR2 からの異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制し、薬理的に誘発される心室頻拍 (VT) を予防することができるか否かについて検討した。

方法：横行大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷心不全モデルを作成し、術後 8 週後に心エコーによる心機能評価、VT 誘発試験を施行した。また、単離心筋細胞にて  $\text{Ca}^{2+}$ スパーク頻度、筋小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵、心筋細胞の自発性  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化 (SCaT) を評価した。また、RyR2 に対する CaM の結合性について、免疫染色法を用いて内因性 CaM と蛍光標識した外因性 CaM を導入することで評価した。

結果：TAC 群では、sham 群に比べ有意に左心室拡大と左室収縮性低下を認めた。エピネフリンを腹腔内注射したところ TAC 群では VT が誘発された。ダントロレンを前投与すると、薬理的に誘発された VT は抑制された。単離心筋細胞において TAC 群では  $\text{Ca}^{2+}$ スパーク頻度や SCaT は増加し筋小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵は低下し、ダントロレンの存在下では改善していた。RyR2 に対する CaM の結合性について TAC 群で低下していたが、ダントロレンの存在下で改善していた。

結語：RyR2 の安定化薬であるダントロレンは、異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制することで後天性の不全心に合併した薬理的な VT を抑制した。ダントロレンは、後天性の心不全に合併する致死性不整脈の新たな治療薬になりうる。

## 第2章 研究の背景

心肥大は、心血管疾患や心臓突然死の主な原因の一つとなっている。リアノジン受容体 (RyR2) からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が、心肥大の発生や心不全の進行に関与していることが示されており[1,2]、 $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制することが心肥大の抑制につながっている[3]。これまで我々は、RyR2 上の N 末端ドメイン (1-619 のアミノ酸配列) と中央ドメイン (2000-2500 のアミノ酸配列) の連関障害 (すなわち、“ドメインアンジッピング”) が、心不全やカテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) を引き起こすことを示した[4-6]。さらに、連関障害が心不全[7,8]や CPVT[9]において RyR2 からカルモジュリン (CaM) を解離させ、 $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が起こることを示した。また、圧負荷不全心における拡張期の  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が致死性不整脈の発生に重要な役割を果たしており、RyR2 に対する CaM の結合性を高めることで拡張期の  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が抑制されることが分かっている[10]。さらに、RyR2 に対する CaM の結合性を高めることで CPVT において遅延後脱分極や撃発活動中に観察される不整脈基質の発生を抑制することが示されている[11]。

ダントロレンは、骨格筋での RyR1 の単一アミノ酸変異による病気である悪性高熱症の治療に用いられる特効薬で、N 末端ドメインと中央ドメインの連関障害を是正し RyR2 に対する CaM の結合性を高めることで、心不全や CPVT において  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制することが報告されている[6-9]。

## 第3章 目的

横行大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷心不全モデルを用いて、ダントロレンの薬物誘発性心室頻拍や RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に対する効果を検討した。

## 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横行大動脈縮窄モデル (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、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[6]。

### 4. 2 体表面心電図検査

心電図はテレメトリー (Data Sciences International, St. Paul, MN) を使用して測定した[12]。体表心電図は、安静状態とエピネフリン 2mg/kg を腹腔内注射後 30 分の連続記録を行った。ダントロレン群では、エピネフリンを腹腔内注射する 3 日前よりダントロレン 40mg/kg/day を腹腔内注射した。

### 4. 3 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[6]。すなわち、ペントバルビタール (70 mg/kg of body weight, 腹腔内投与) により麻酔後に胸部切開を行い、速やかに心臓を摘出し、混合ガス (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) 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った。左室心筋は新鮮なコラゲナーゼ含有溶液内でハサミにより分割し、桿状の成熟したマウス心筋細胞を単離した。単離されたマウス単離細胞はラミニンコーティングされた培養容器に移し、95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>、大気圧中に 37 度で培養した。

#### 4. 4 Ca<sup>2+</sup>スパークと筋小胞体内のCa<sup>2+</sup>貯蔵解析

Ca<sup>2+</sup>スパークは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[6]。簡単に述べると、心筋細胞を 20 $\mu$ M Fluo4-AM(Molecular Probes, OR, USA) に 20 分間室温で培養した。顕微鏡設定をラインスキャンモードで使用し、心筋細胞の核を避けて長軸方向に繰り返し (520.8Hz) スキャンした。Ca<sup>2+</sup>トランジェントが定常状態に達するまで心筋細胞を刺激し、刺激を停止した後 10 秒間 Ca<sup>2+</sup>スパークを記録した。Ca<sup>2+</sup>スパークデータは高速で信頼性の高い、自動スパーク解析ソフトである SparkMaster を用いて解析した[6]。既報の通り、筋小胞体のカルシウム貯蔵量を測定するために 10mM カフェインの急速還流を行い評価した[6]。

#### 4. 5 心筋細胞の一過性Ca<sup>2+</sup>濃度変化モニタリング

単離心筋細胞は 20 $\mu$ M Fluo4-AM に 20 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 28 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、蛍光デジタル顕微鏡 (BZ9000, Keyence, Japan) により細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定を行った。単離心筋において 1,2,3,4,5 Hz 刺激後の自発性 Ca<sup>2+</sup>放出を測定した[6]。

#### 4. 6 免疫蛍光抗体法による内因性CaMのRyR2に対する結合解析

単離心筋細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し、0.1%トリトン X-100 と 1%ウシ血清アルブミン (BSA) で 20 分間透過処理を行った[12]。次に 1%BSA と 0.5%トリトン X-100 の中の Anti-CaM 抗体 (Abcam 社、EP799Y) 及び Anti-RyR 抗体 (Sigma-Aldrich 社、C3-33) とともに 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。それぞれ Alexa488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes) と Alexa633-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes) の 2 次抗体で標識した。その後リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した。Anti-CaM 抗体 (Alexa488;緑) と Anti-RyR 抗体 (Alexa633;赤) の局在化のために、LP 650 フィルターと BP 505-530nm と組み合わせそれぞれ 633nm および 488nm 励起で画像を撮影した。両方の二次抗体は検出可能な蛍光パターンを示さず、どちらの一次抗体とも交差反応はしなかった。共局在の解析では、蛍光のクロストークを防ぐために蛍光画像を連続して撮影した。

#### 4. 7 サポニン処理した心筋細胞における外因性 CaM の RyR2 に対する結合解析

HiLyte Fluor 647 (AnaSpec Inc, Fremont CA, USA) で蛍光標識した CaM (F-CaM) をサポニンによる膜透過処理した心筋細胞に導入した[10]。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。簡単に述べると、蛍光標識された細胞を共焦点レーザー顕微鏡で走査撮影した (LSM-510, Carl Zeiss) (絞り 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 (~25 $\mu$ m) で加算し、その距離で除して評価した。

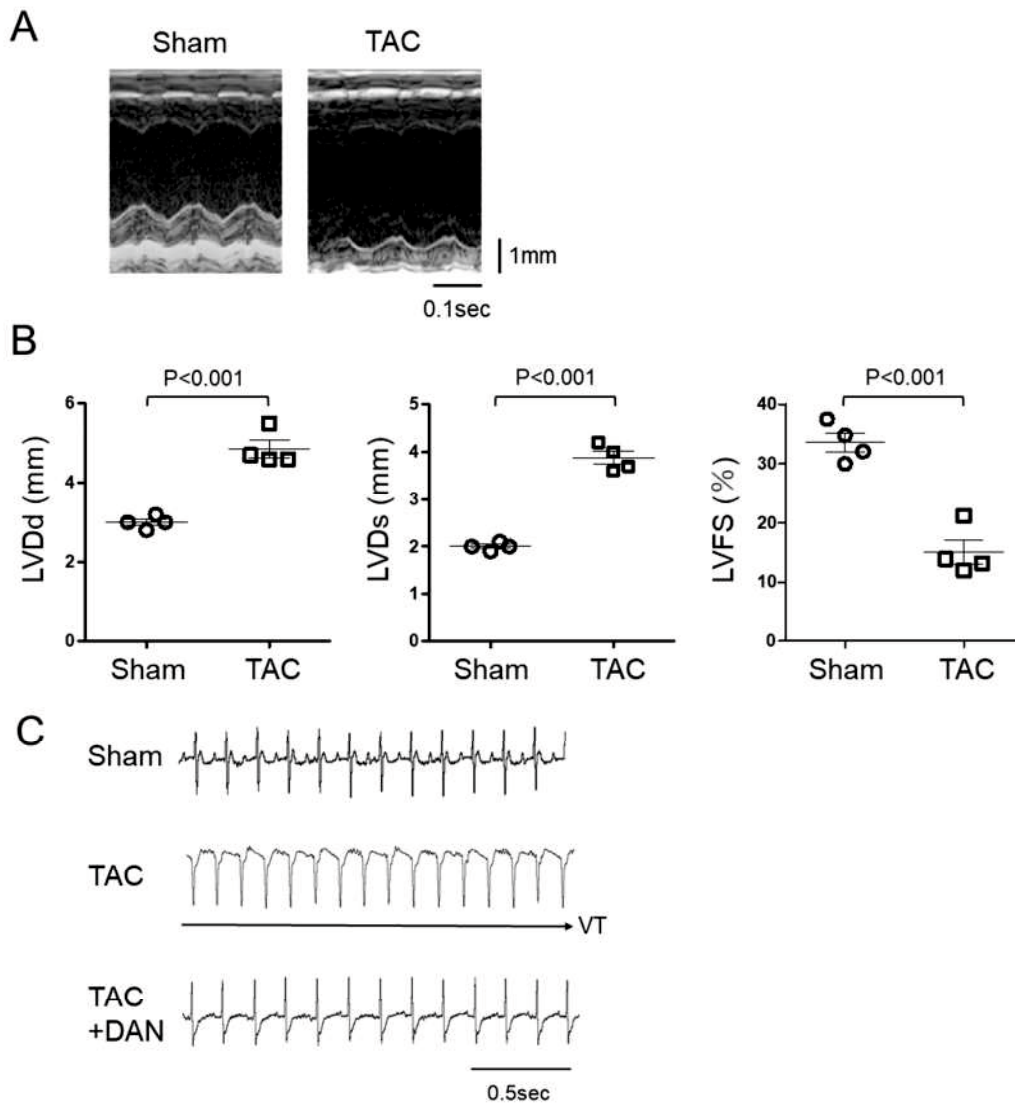
#### 4. 8 解析

2 群間の差の検定には対応のない t 検定を行った。2 群間以上の差の検定には Post hoc Tukey's test 検定を併用した ANOVA で行った。すべてのデータは平均±標準誤差 (SEM) で示した。P 値 0.05 以下を統計学的に有意差があるとした。

## 第5章 結果

### 5.1 ダントロレンは薬理的に誘発された心室頻拍を抑制する

TACを行った8週後のモデルでは、左室径は拡大し、左室収縮能の低下を認めた(図1A)。TAC群で sham群に比べて左室拡張末期径(LVDd)、左室収縮末期径(LVDs)の拡大を認め、左室収縮率(LVFS)は有意に低下していた(LVDd:  $3.00 \pm 0.08$ mm in sham vs  $4.85 \pm 0.22$ mm in TAC,  $P < 0.001$ ; LVDs:  $2.00 \pm 0.04$ mm in sham vs  $3.88 \pm 0.14$ mm in TAC,  $P < 0.001$ ; LVFS:  $33.6 \pm 1.6\%$  in Sham vs  $15.08 \pm 2.1\%$  in TAC,  $P < 0.001$ ) (図1B)。エピネフリンの腹腔内注射により不整脈を誘発したところ、TAC群では心室頻拍が観察されたが、ダントロレンを投与したTAC群では観察されなかった(図1C, 1D)。





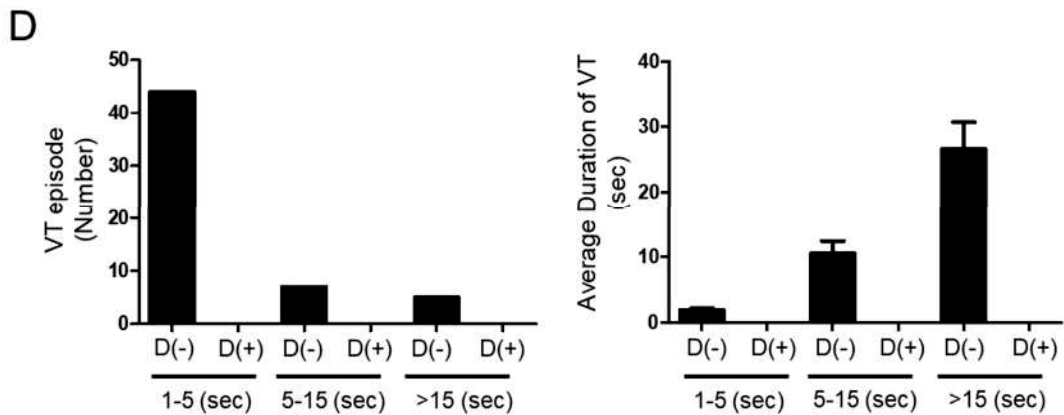


図1 Sham と TAC の心エコー図と体表心電図を検証した。A: Sham と TAC の代表的な心エコー図。 B: 心エコー図の各パラメータ。 C: エピネフリン 2mg/kg を腹腔内投与した後の代表的な心電図。ダントロレン (DAN) 40mg/kg はエピネフリン 2mg/kg 投与の3日前より腹腔内投与した。D: TAC マウスにおいてダントロレン前投与あり群 D(+)とダントロレン前投与なし群 D(-)でのエピネフリン 2mg/kg 投与後5分間の心室頻拍の発生頻度と持続時間を示す。データは各群3匹のマウスでそれぞれ2回ずつ計6回施行した結果を示す。TAC=transverse aortic constriction

## 5. 2 ダントロレンは圧負荷不全心において Ca<sup>2+</sup>スパークや自発性 Ca<sup>2+</sup>放出を抑制する

前述したダントロレンの抗不整脈効果が、RyR2からの異常な Ca<sup>2+</sup>漏出を抑制した結果かどうかを明らかにするために、自発的な Ca<sup>2+</sup>漏出 (すなわち、自発的な Ca<sup>2+</sup>スパークやトランジェント) の頻度を評価した。Ca<sup>2+</sup>スパーク頻度 (SpF) は TAC 群で有意に増加していたが、ダントロレン (1 μM) 存在下では有意に低下していた (図 2A,B)。筋小胞体内の Ca 貯蔵は、TAC 群で低下していたがダントロレン (1 μM) 存在下では改善しており、RyR2からの自発的な Ca<sup>2+</sup>漏出が筋小胞体の Ca 貯蔵の低下に一部関わっていることが示唆された (図 2C)。対照的に、TAC 群において 1-5 Hz ペーシングでの自発性 Ca<sup>2+</sup>放出 (SCaT) が出現していたが、ダントロレン存在下で消失していた (図 3)。

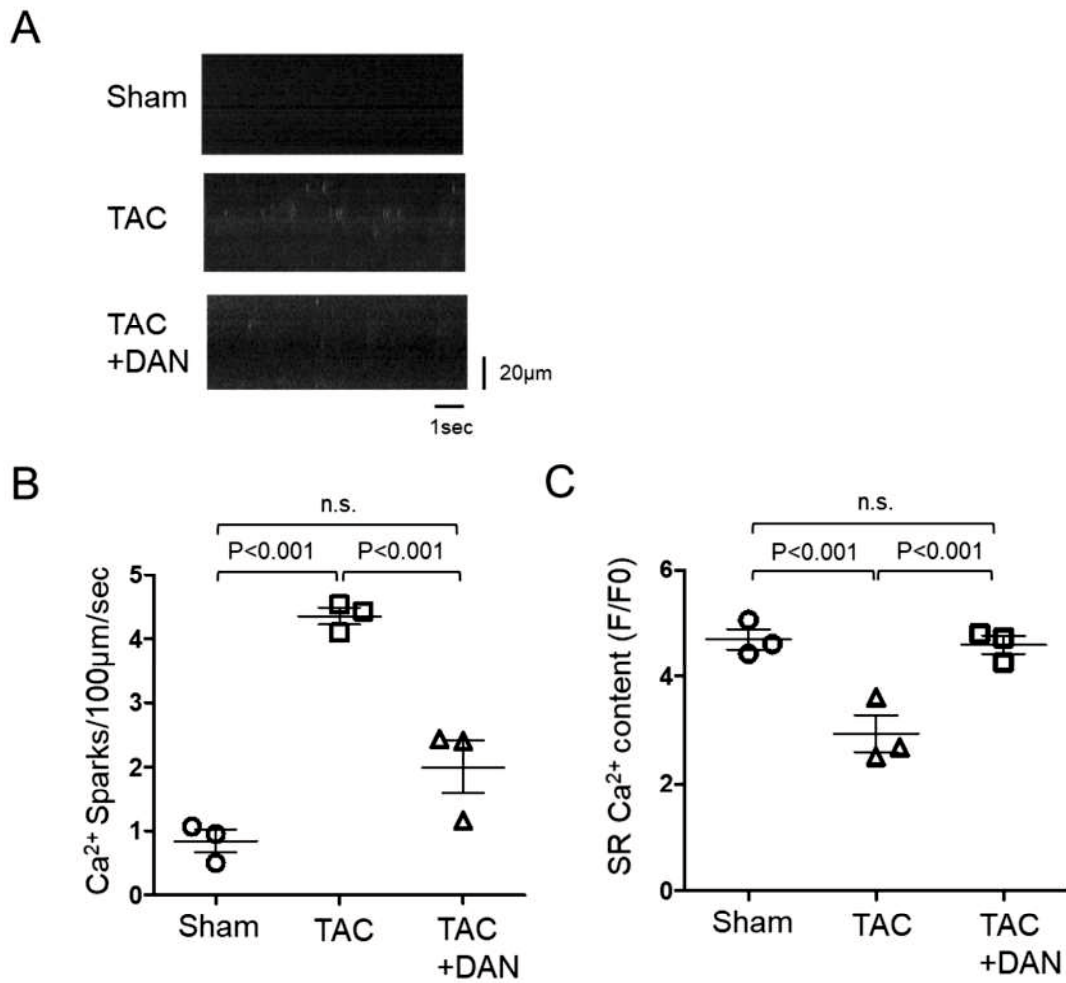


図2 TAC心筋におけるCa<sup>2+</sup>スパークや筋小胞体内のCa<sup>2+</sup>貯蔵に対するダントロレンの急性効果を示す。A: Sham心筋細胞、TAC心筋細胞、ダントロレン(1µM)存在下でのTAC心筋細胞でのCa<sup>2+</sup>スパークの代表波形。B,C: Sham心筋細胞と、TAC心筋細胞、ダントロレン(1µM)存在下のTAC心筋細胞のCa<sup>2+</sup>スパーク頻度と筋小胞体内のCa<sup>2+</sup>貯蔵。データはsham心筋細胞においては3heartsから得られた11細胞、TAC心筋細胞においては3heartsから得られた10-12細胞から算出し平均値±標準誤差で示す。

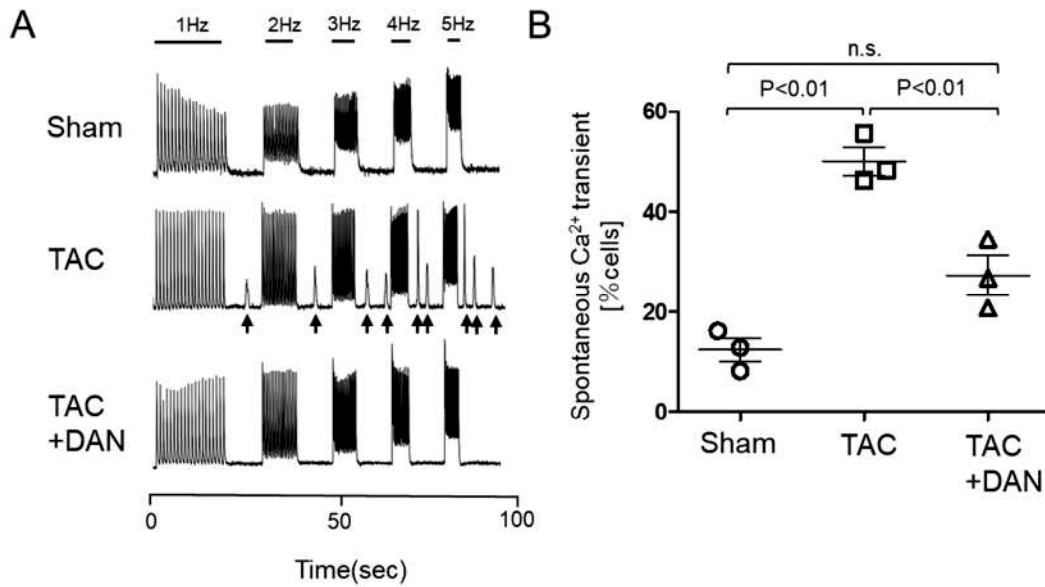


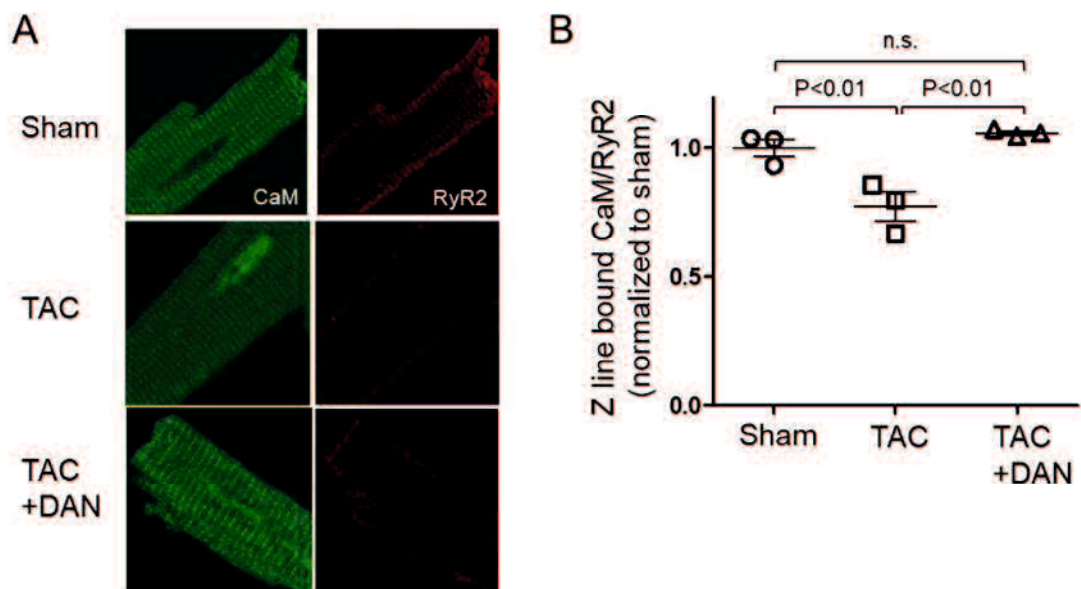
図3 Sham 心筋細胞と TAC 心筋細胞における 1,2,3,4,5Hz の電気刺激後に誘発された自発性 Ca<sup>2+</sup>放出に対するダントロレンの急性効果。A: Sham 心筋細胞、TAC 心筋細胞、ダントロレン (1  $\mu$ M) 存在下の TAC 心筋細胞における電気刺激中の Ca<sup>2+</sup>トランジェントの代表波形を示す。B: Sham 心筋細胞、TAC 心筋細胞、ダントロレン (1  $\mu$ M) 存在下の TAC 心筋細胞における自発性 Ca<sup>2+</sup>放出 (SCaT) の出現率。データは、sham 心筋細胞においては 3hearts から得られた 230 細胞、TAC 心筋細胞においては 3hearts から得られた 117-192 細胞から算出し平均値  $\pm$  標準誤差で示す。

### 5.3 ダントロレンは圧負荷不全心において RyR2 に対する CaM の結合性を改善させる。

私たちは、これまで TAC 心筋細胞において RyR2 に対する CaM の結合性が低下していることが原因で RyR2 からの異常な Ca<sup>2+</sup>漏出が起こることを示してきた[10]。そこで私たちは、ダントロレンが、RyR2 に対する CaM の結合性の低下を改善させるかを評価した。以前の実験[9,10]からも、内因性 CaM は、Z line 上の RyR2 の局在とよく一致していることが分かっている。基礎状態の心筋細胞では、自由に拡散している CaM は約 1%のみで、結合した CaM は Z line 上に集中しており、90%以上が RyR2 に結合している。したがって、Z line 上のほとんどの CaM が、RyR2 に結合していると推定できる。TAC 心筋細胞では Z line 上の内因性 CaM は減少していたが、ダントロレン存在下では正常化していた (図 4B)。

TAC 心筋細胞での RyR2 に結合している CaM の動態におけるダントロレンの効果を検討するために、サポニンによる細胞膜透過処理を行った心筋細胞に HiLyte Fluor 647 により蛍光標識した CaM (F-CaM) を導入し、異なる細胞分画に結合した CaM を評価した (図 4C)。私たちは、この方法を利用して、外因性に導入した F-CaM の蛍光と RyR2 を免疫染色した蛍光が、サルコメアに沿った周期的なパターンを取っており、重要なことは CaM と RyR2

の蛍光パターンが非常に一致していることを確認した。Z line 上の CaM の濃度依存性は、TAC 心筋細胞で sham 心筋細胞に比べて高濃度にシフトしていたが、ダントロレン ( $1 \mu\text{M}$ ) 存在下では改善していた (図 4D)。



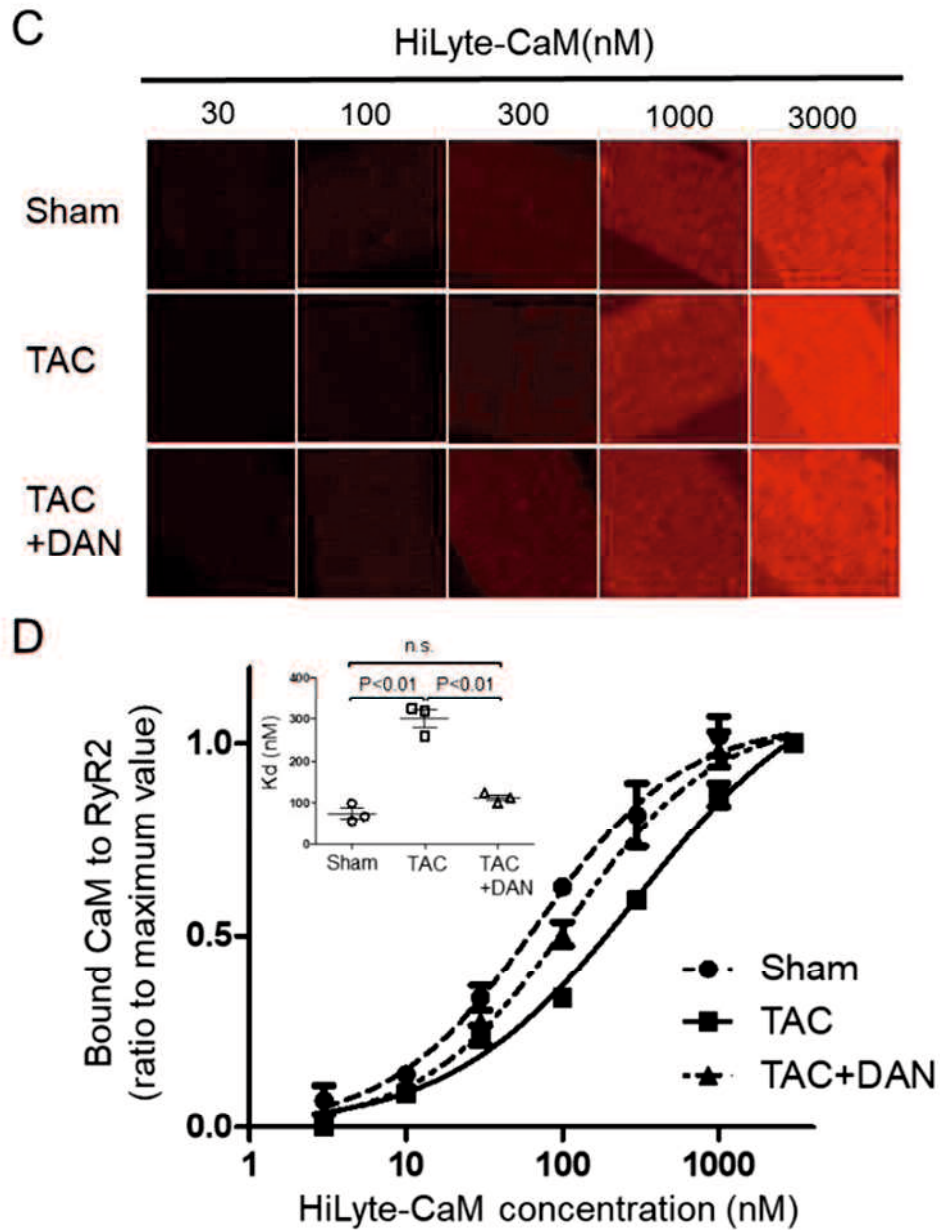


図4 Sham 心筋細胞と TAC 心筋細胞における RyR2 に対する CaM の結合性のダントロレンによる急性効果。A: anti-CaM 抗体を使用し標識した RyR2 に結合する内因性 CaM の代表的な画像。左に CaM (緑) を、右に RyR2 (赤) を示す。B: CaM の蛍光強度を RyR2 で除し、コントロールに対する比率を示す。データは、sham マウスにおいては 3hearts から 15 細胞、TAC マウスにおいては 3hearts から 14-15 細胞から算出した平均値±標準誤差で示した。C: サポニン処理した sham 心筋細胞、TAC 心筋細胞、ダントロレン (1  $\mu$ M) 存在下の TAC 心筋細胞における外因性に導入し HiLyte で蛍光標識した CaM (HiLyte-CaM) の結合性。D: 結合親和性曲線。HiLyte-CaM の蛍光強度を測定し、その最大値を除いたデータから Hill の式を用いて結合親和性曲線を作成した。Sham マウスにおいては 3hearts から 9-15 細胞、TAC マウスにおいては 3hearts から 9-15 細胞より結合親和性曲線を作成し、平均値±標準誤差で示した。平衡解離定数 (Kd) を棒グラフで比較した。

## 第6章 考察

持続性心室頻拍は、さまざまな心疾患において心臓突然死の主要な原因の一つである。臨床現場では、致死性不整脈に使用できる薬剤は $\beta$ 遮断薬やアミオダロンに限定されている [15]。しかし、 $\beta$ 遮断薬やアミオダロンを使用したにもかかわらず、難治性の心室頻拍が観察されることがある。したがって、心室頻拍に対する新しい治療が必要となってくる。RyR2からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization) や撃発活動 (triggered activity) を引き起こし、致死性不整脈が起こると言われている [16]。私たちはこれまで悪性高熱症の治療薬であるダントロレンを使用し、プロテインキナーゼ A のリン酸化による $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制し、エピネフリン誘発性や運動誘発性の心室頻拍を抑え、CPVT 関連のノックインマウスの運動耐容能を大幅に改善させた [17]。ダントロレンは、RyR1 または RyR2 で同じアミノ酸配列 (RyR1 上の Leu590-Cys609 または RyR2 上の Leu600-Cys619) の場所に付き、病的な RyR2 を安定化させ心室頻拍を抑制する可能性が高い [18-21]。さらに、ダントロレンはこれらの受容体タンパクの N 末端ドメインと中央ドメイン間の連関障害を是正することで RyR2 からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制する [6,18,19]。

最近、いくつかの研究で CaM と RyR2 の連関障害がさまざまな心疾患の原因となることが示唆されている。たとえば、Meissner らによると CaM と結合できない変異 CaM 結合ドメインを持つ RyR2 のノックインマウスは心肥大や早期死亡を認めた [22]。また、ペーシング誘発性心不全や圧負荷心不全マウスで CaM の RyR2 に対する結合性が、正常より有意に低いことを示した [7,8,10]。さらに、CPVT 関連 RyR2 の $\beta$ 受容体刺激で RyR2 に対する CaM の結合性が低下していたが、野生型マウスでは変化しなかった [9]。対照的に、CaM の N 末端への3つのアミノ酸置換 (GSH-CaM) により RyR2 に対する CaM の結合性を高めることで、ペーシング誘発性心不全 [8] や CPVT 関連マウス心不全 [11] で異常な $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制した。以上のことから、RyR2 の末端ドメインと中央ドメイン間の連関障害が CaM の結合性に関連しており、それによって異常な $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が起こっていることが示唆された。また、ダントロレンがこれらの現象を抑制し、致死性不整脈を抑制することが分かる。

この研究の最も重要なことは、ダントロレンが CPVT 関連心と同様、圧負荷心不全においても RyR2 の安定化と致死性不整脈の予防に有効であることである。

ダントロレンの臨床利用では、心機能に有害な影響を与えずに急性の抗不整脈効果を発揮することであり、さらに不全心の心機能も改善させた [17,19]。これらの効果は、 $\beta$ 遮断薬やアミオダロンのようなその他の抗不整脈薬とはまったく異なっている。

## 第7章 結語

RyR2 の安定化薬であるダントロレンは、圧負荷不全心において異常な  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を抑制することで、薬理学的に誘発された持続性心室頻拍を抑えることができた。

## 第8章 謝辞

本研究を行うために多大なご指導・ご助言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 矢野雅文教授に感謝を申し上げます。また、小林茂樹准教授には指導教官として終始ご指導いただき、深謝の意を表します。また、器官病態内科学の多くの先生方、スタッフの方々にご指導、ご協力いただきました。ここに改めて感謝の意を表します。

## 第 9 章 参考文献

1. Ling H, Zhang L, Pereira L, Means C.K, Cheng H, Gu Y, Dalton N.D, Peterson K.L, Chen J, Bers D, Brown J.H. Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1230-1240
2. Fisher T.H, Herting J, Tirilomis T, Renner A, Neef S, Toischer K, Ellenberger D, Förster A, Schmitto J.D, Gummert J, Schöndube F.A, Hasenfuss G, Maiser L.S, Sossalla S. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in human cardiac pathology. *Circulation.* 2013; 128: 970-981.
3. Sedej S, Schmidt A, Denegri M, Walther S, Matovina M, Arnstein E.M, Windhager I, Ljubojević S, Negri S, Heinzl F.R, Bisping E, Vos M.A, Napolitano C, Priori S.G, Kockskämper J, Pieske B. Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol* 2014; 63: 1569-1579.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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<sup>2+</sup> release in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2010; 87: 609–617.



8. 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.
9. Xu X, Yano M, Uchinomi 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
10. 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 for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm.* 2017; 14: 120-127.
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. Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, Tamitani M, Hamada Y, Fukui G, Xu X, Nishimura S, Kato T, Uchinomi H, Oda T, Okuda S, Yano M. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight.* 2019; 4: e126112.
13. Wu X, Bers D.M. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes. *Cell Calcium.* 2007; 41: 353-364.
14. Yang Y, Guo T, Oda T, Chakraborty A, Chen L, Uchinomi H, Knowlton A.A, Fruen B.R, Cornea R.L, Meissner G, Bers D.M. Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure. *Circ. Res.* 2014; 114: 295-306.

15. Ponikowski P, Voors A.A, Anker S.D, Bueno H, Cleland J.G, Coats A.J, Falk V, González-Juanatey J.R, Harjola V.P, Jankowska E.A, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis J.T, Pieske B, Riley J.P, Rosano G.M, Ruilope L.M, Ruschitzka F, Rutten F.H, van der Meer P. Authors/Task Force Members; Document Reviewers. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016; 18: 891-975.
16. Wagner S, Maier L.S, Bers D.M. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ. Res.* 2015; 116: 1956-70.
17. 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: 2579-84.
18. Kobayashi S, Bannister M.L, Gangopadhyay J.P, Hamada T, Parness J, Ikemoto N. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 6580-6587.
19. 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 interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53: 1993-2005.
20. Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Bhat M.B, Ma J, Ikemoto N, Jimenez L.S, Morimoto H, Williams P.G, Parness J. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 34918-34923.
21. Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Ikemoto N, Jimenez L.S, Morimoto H, Williams P.G, Ma J, Parness J. Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem. J.* 2005; 387: 905-909.
22. 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. Investig.* 2007; 117: 1344-1353.

この学位論文は、Kajii T, Kobayashi S, Shiba S, Fujii S, Tamitani M, Kohno M, et al. Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jan 1;521(1):57-63.doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.071. 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。