

Enhancing calmodulin binding to cardiac  
ryanodine receptor completely inhibits  
pressure-overload induced hypertrophic  
signaling

(心臓型リアノジンレセプターとカルモジュリンの結合強化は圧負  
荷による心肥大シグナルを完全に抑制する)

氏名 河野 通暁

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態内科学講座

令和3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
第5章 結果	7
第6章 考察	20
第7章 結語	23
第8章 謝辞	24
第9章 参考文献	24
第10章 補足図	27

## 第1章 要旨

心肥大は、心血管疾患患者における、主要な予後不良因子である。また、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリング異常は、心肥大の病態に関与している。しかし、心肥大の正確なメカニズムについては解明されていない。今回、圧負荷によって誘発される心肥大が、カルモジュリン (CaM) の解離とそれに続く心臓リアノジン受容体 (RyR2) のチャネルの不安定化による  $\text{Ca}^{2+}$  漏出によって誘発されるかどうか、また、その肥大が、CaM の RyR2 への結合親和性を高めることで遺伝的に救済できるかどうかを調べた。圧力過負荷のごく初期の段階で心肥大が誘発され、心臓の収縮機能は維持されるが、活性酸素種 (ROS) を介した RyR2 の不安定化が、弛緩障害という形で既に起こっている。さらに、CaM の RyR2 への結合親和性を高めることによって RyR2 を安定化させると、肥大のシグナル伝達が完全に阻害され、生存率が向上した。私たちの研究は、RyR2 の不安定化と心肥大の、重要な関連を明らかにした。

## 第2章 研究の背景

心肥大は、心血管疾患を有する患者において、予後不良因子として知られている。心臓への圧力過負荷はまず肥大を引き起こし、これは通常壁ストレスを正常化するための代償反応と見なされるが、過度な肥大は有害であるとされ、酸素消費量の増加と心筋細胞死を促進する<sup>1</sup>。一方で収縮期圧過負荷への肥大の応答をなくすことでむしろ、収縮能や予後改善をもたらす実験的報告もある<sup>2,3</sup>。これらは、圧力過負荷に応答した初期肥大の代償性に疑問を投げかける。リアノジン受容体 (RyR2) を介した  $\text{Ca}^{2+}$  漏出は、肥大シグナル伝達と電気的リモデリングに影響を及ぼし<sup>4-5</sup>、薬理的に  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を阻害することで、心肥大の抑制につながっている<sup>5</sup>。池本らによって提案されたドメインスイッチ仮説に基づき<sup>6</sup>、我々は RyR2 の N 末端ドメイン (1-600 のアミノ酸配列) と中央ドメイン (2000-2500 のアミノ酸配列) 間のドメイン間の関連障害が、RyR2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を引き起こし、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) および心不全を誘発することを示した<sup>7-10</sup>。また、ドメイン関連障害により、RyR2 からの CaM の解離を介して  $\text{Ca}^{2+}$  の漏出が引き起こされ、RyR2 への親和性を強化した修飾 CaM (+ Gly-Ser-His) の導入により RyR2 機能が回復したことも示した<sup>11,12</sup>。これらの発見は、心不全の病態において、ドメイン関連障害が CaM 結合ドメイン (3583-3603) の構造変化により、CaM の解離とそれに続く  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を引き起こすことを強く示唆する。さらに、RyR2 の CaM 結合部位を遺伝的に変異させ {RyR2 (W3587A / L3591D / F3603A)}、CaM の RyR2 への結合を不可能としたマウスにおいて、実際に重度の心肥大とそれに続く心拡大と早期死亡を変異マウスにもたらしたという知見も、RyR2 への CaM の結合が心機能の調整に必須であることを強く示す<sup>13</sup>。Zipping-unzipping 仮説は、CPVT または心不全における  $\text{Ca}^{2+}$  漏出の病原性メカニズムを大部分説明可能だが、クライオ電子顕微鏡法 (cryo-EM) 解析によって、N-末端ドメインとセントラルドメインの示された高解像度構造解析によって、N 末端ドメインの関連部は異なるサブユニット間で3次的に近接して存在していることが判明した。ただし、N 末端 (1-600)、セントラル (2000-2500) といった広範囲にわたるドメイン関連ではなく、比較的狭い範囲のドメイン関連であることが判明した<sup>14,15,16</sup>。したがって、心不全における RyR2

機能とサブユニット間のドメイン連関障害の関係を明らかにするために、原子レベルの構造を念頭に置いて、より厳密な分析が必要となる。

近年我々は、RyR2 に対する CaM の結合親和性を高めるために、RyR2 の CaM 結合ドメインに単一の点突然変異が挿入されたヘテロ接合 RyR2<sup>V3599K/+</sup> マウスモデルを作成した。これらのマウスを RyR2<sup>R2474S/+</sup> マウスと交配して、ダブルヘテロ接合 RyR2<sup>R2474S/V3599K</sup> マウスを生成し、CaM の RyR2 への結合親和性の増強が CPVT から救済できるかどうかを調べた<sup>17</sup>。単一アミノ酸置換による RyR2 への CaM 結合親和性の遺伝的増強により、CPVT 関連不整脈発生を抑制することを示した<sup>17</sup>。

これらの結果に基づき、ホモ接合型 RyR2<sup>V3599K / V3599K</sup> マウスを使用して、圧過負荷誘発性心肥大の発症における CaM-RyR2 複合体の役割を調べた。我々は、遺伝的操作により RyR2 からの CaM 解離を抑制することで、Ca<sup>2+</sup>漏出を防ぎ、それによって心肥大から保護し、予後を改善することを示された。

### 第3章 目的

ホモ接合型 RyR2<sup>V3599K / V3599K</sup> マウスを使用して、横行大動脈縮窄(TAC)による圧過負荷心肥大の発症における CaM-RyR2 複合体の役割を調べた。

## 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。10から12週齢のC57BL/6マウスを使用した。野生型C57BL/6マウスは日本エスエルシー株式会社から、V3599Kノックインマウスはユニータック株式会社で作成した。マウスは各実験にランダムに割り当てられ、各実験で各群の順序はランダムに決定した。各群の遺伝的背景は異なり、この研究には治療薬の検査は含まれないため、割付けの盲検化はしていない。入手したデータの測定および解析はマウスの遺伝子情報を盲検化した研究者でなされた。

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<sup>10</sup>。

### 4.2 心エコー

心機能は 7.5 MHz プローブ ( Hitachi, UST 5413 ) 搭載の F37 超音波装置 ( Hitachi medical ) で分析をした。マウスはまず 2-3%イソフルラン吸入で麻酔し 1 ~ 2 %イソフルランで維持をした。



#### 4.3 左室圧測定

マウスは1-2%イソフルランで麻酔し、ヒートパッド(37°C)上にて、1.4 Fのマイクロマノメーターカテーテル (Millar Instruments, Houston, TX) を心尖部アプローチで導入し、左心室に進め測定した。左室圧と容積の関係を評価するために、下大静脈 (IVC) の閉塞を行った。左心室容積は、Teichholzの式によって計算した (左心室容積=  $[7 / (2.4 + LVID)] \times LVID^3$ ; ID = 内径)。左室収縮末期最大エラストランス (Ees) は、左室収縮末期圧と容積の関係の傾きとして計算した。

#### 4.4 組織

10%ホルマリンを使用して16~22週齢のWTおよび一連のノックインマウスの心臓を固定した。2つの左室乳頭筋レベルでの断面が形態分析に選択された。ヘマトキシリンエオジン染色およびマッソントリクローム染色が各断面に対し行われた。

#### 4.5 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<sup>10</sup>。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。

#### 4.6 Ca<sup>2+</sup>スパークと筋小胞体のCa<sup>2+</sup>貯蔵解析

Ca<sup>2+</sup>スパークの測定は従来通り<sup>10</sup>でZeiss×40油浸Plan-Neofluor対物レンズ (開口数1.3、励起488nm、蛍光>505nm) 使用の倒立顕微鏡 (Axiovert100, Carl Zeiss) のアルゴンイオンレーザー搭載の共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を使用して測定した。心筋細胞はfluo-4 AM (20 μM) を20分、24°Cでローディングした。ラインスキャンモードを使用し、核以外の部分で単一心筋細胞を長軸方向に繰り返しスキャンした。Ca<sup>2+</sup>スパーク計測にあたりCa<sup>2+</sup>トランジェントが定常状態になるまで心筋細胞を刺激した。刺激を停止し、その後約10秒間のCa<sup>2+</sup>スパークを記録した。データは、迅速かつ正確な自動分析プログラムであるSparkMaster (<https://sites.google.com/site/sparkmasterhome/>) で解析を行った。解析される変数には一般的な画像パラメーター (検出されたスパークの数、スパークの頻度など) と個々のスパークパラメーター (振幅、FWHMおよびFDHM) が含まれる。カフェイン (10mM) を急速に灌流し筋小胞体内のCa<sup>2+</sup>を放出させCa<sup>2+</sup>含有量を評価した。

#### 4.7 免疫蛍光抗体法

免疫蛍光抗体法は以下の抗体を使用して行った。Anti-RyR2 抗体 (C3-33; Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA), Anti-CaM 抗体(EP799Y, Abcam, Cambridge, UK), Anti-HDAC5 抗体((NBP2-22152, Novus Biologicals), Anti-NFATc4 抗体(ab3447, Abcam, Cambridge, UK).

#### 4.8 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、PBSでwash後、0.5%TritonX-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<sup>17</sup>。次に1%BSA と0.5%TritonX-100で希釈したAnti-CAM 抗体及びAnti-RyR 抗体とともに4°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 と組み合わせてそれぞれ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。

#### 4.9 CaM-SANPAHクロスリンク法によるCaMBPのCaMへの結合特性とRyR2へのCaMの結合の分析

これまで同様にRyR2へのCaMの結合は光反応性架橋剤sulfo-SANPAH (Thermo Fisher Scientific) を使用して評価した<sup>11</sup>。まず、暗所でコンジュゲーションバッファー (150mM KCl, 20mM MOPS, pH7.2) 内に50  $\mu$ M組み換えCaMと100  $\mu$ Msulfo-SANPAHを混合してCaM-SANPAHコンジュゲートを作成した。30分後、十分量のリジンを加えることでコンジュゲーションを停止させた。CaM-SANPAHコンジュゲートはスピナラムAmicon Ultra (分子量カットオフ10kDa) を使用して精製した。マウス心筋ホモジネートは結合バッファー (150mM KCl, 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 20mMMES, pH 6.8) で1mg/mlまで希釈され、暗室内でガラスチューブを使用しCaMBPありなしで100nM CaM-SANPAHと混合した。10分間の結合時間の後、UV照射を行い架橋を作成した。次にサンプルバッファーを架橋したSRに付加し、抗CaM抗体 (Merck, MilliporeSigma) を使用しウエスタンブロッティングを行った。RyR2に架橋したCaM-SANPAHは550kDaの高さのバンドで検出された。各CaMBPへのCaMの結合親和性はSR上のRyR2へのCaM-SANPAH結合の阻害として測定された。CaMのCaMBPへの結合親和性がRyR2より高い場合、付加されたCaM-SANPAHのほとんどはRyR2でなくCaMBPに結合する。CaMの立体構造を評価するため、CaMBPへの結合時にCaM内のトリプトファンの蛍光レベルを測定した。

#### 4.10 単離心筋細胞への急性圧負荷実験

単離心筋細胞への圧力負荷 (150 mmHg, 250 ms) は、Ca<sup>2+</sup>トランジェント期 (収縮期) または静止期 (拡張期) に、1Hzの電気ペーシング下で行った。Ca<sup>2+</sup>スパークは、10分間の圧力過負荷後に測定した。内因性CaM-RyR2結合実験および肥大シグナル伝達アッセイ (HDAC, NFAT) は、30分の圧力過負荷後に実施した。

#### 4.11 RNA-seqによる全トランスクリプトーム解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用し、マウスの心臓からRNAを抽出し、オリゴdTビーズ (NEBNext Poly (A) mRNAマグネット分離モジュール、New England Biolabs、NEB) でmRNAを精製した。イルミナシーケンサー用の相補DNA (cDNA) ライブラリは、NEBNext Ultra II RNAライブラリ準備キット (NEB) とイルミナ用NEBNextplexオリゴを使用して生成した。簡単に説明すると、断片化はNEBNext First Strand Synthesis Reaction Bufferで94° Cで15分間、NEBNext Random Primersを使用して実行し、逆転写はNEBNext Strand Synthesis EnzymeMixを使用して実行した。ライゲーション後、ライブラリーフラグメントを濃縮し、PCR増幅でインデックス配列を挿入した。 AMPure XPビーズ (Beckman Coulter) で精製した後、Agilent 2200 TapeStation (D1000、Agilent Thermo Fisher) を使用してライブラリの品質と濃度を評価した。確認されたライブラリーは、75bpペアエンドサイクルシーケンスキット (Illumina) を備えたIllumina Next-seqDNAシーケンサーでのクラスタリングおよびシーケンスに対して等しい分子量に混合した。 raq bclまたはベスコールファイルを作成するために、Next-seqパッケージングソフトウェアReal Time Analysisを使用して品質評価と画像分析を実行し、サンプルの逆多重化にbcl2fastaq変換ソフトウェアv2.19を使用した。 2つ以上のあいまいなヌクレオチドを含む読み取りとPhredプログラムによって計算された品質スコアが20未満の読み取りは、CLC Genomics Workbenchソフトウェア (ver. 8.01、Qiagen) を使用して削除した。 1000ヌクレオチドを超える長い読み取りと20ヌクレオチド未満の短い読み取りも破棄した。トリミングされたリードは、デフォルト設定でマウスリファレンスゲノムGRCm38release-92にマッピングした。簡単に説明すると、ミスマッチコスト2、挿入コスト3、削除コスト3の設定条件を使用して、リードをリファレンスシーケンスにアラインメントしました。さらに、アラインメントの少なくとも半分がリファレンスシーケンスと一致したときにリードをマッピングした (0.8)、一致したアラインメントは参照配列と少なくとも80%同一であり (類似度0.8)、10領域内の非特異的に一致したリードがランダムにマッピングされた。パスウェイ解析は、上位100個の遺伝子を選択し、JMP Pro ver. 14.0ソフトウェアの主成分分析を使用して因子負荷を計算し、検出された遺伝子のパスウェイ解析をIngenuity Pathway Analysis (Qiagen)、KEGGパスウェイ解析 (<http://www.kegg.jp/>または<http://www.genome.jp/kegg/>)、およびGO分析 (<http://www.geneontology.org>) を使用して行った。

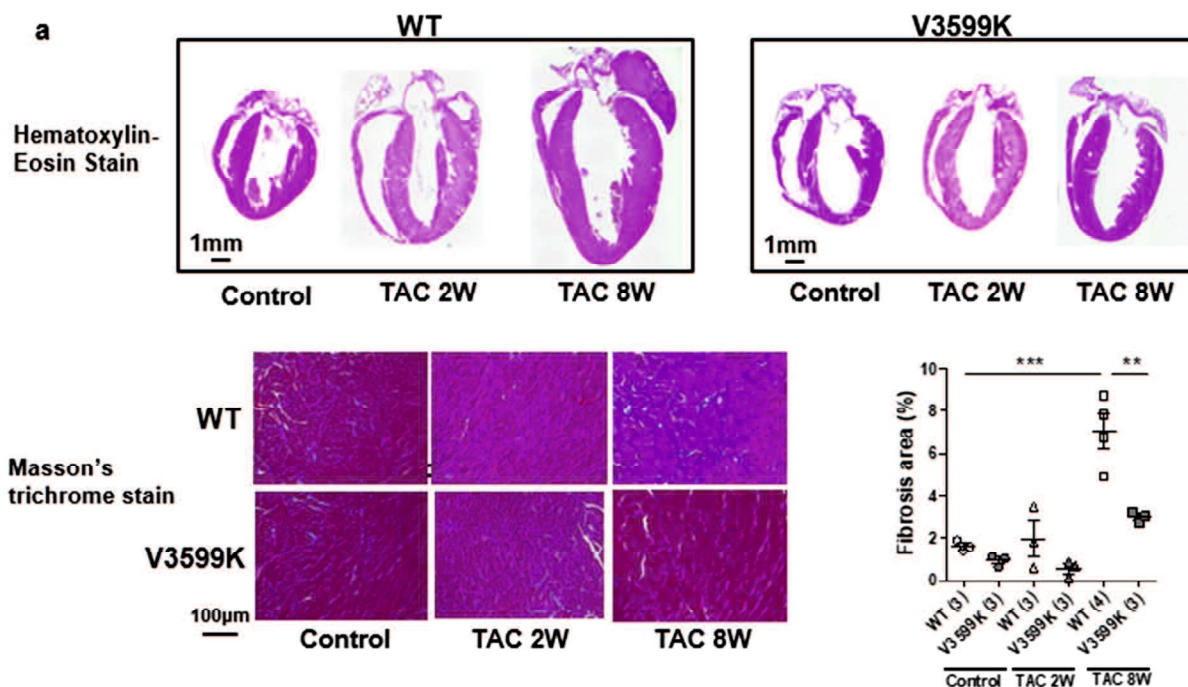
#### 4.12 解析

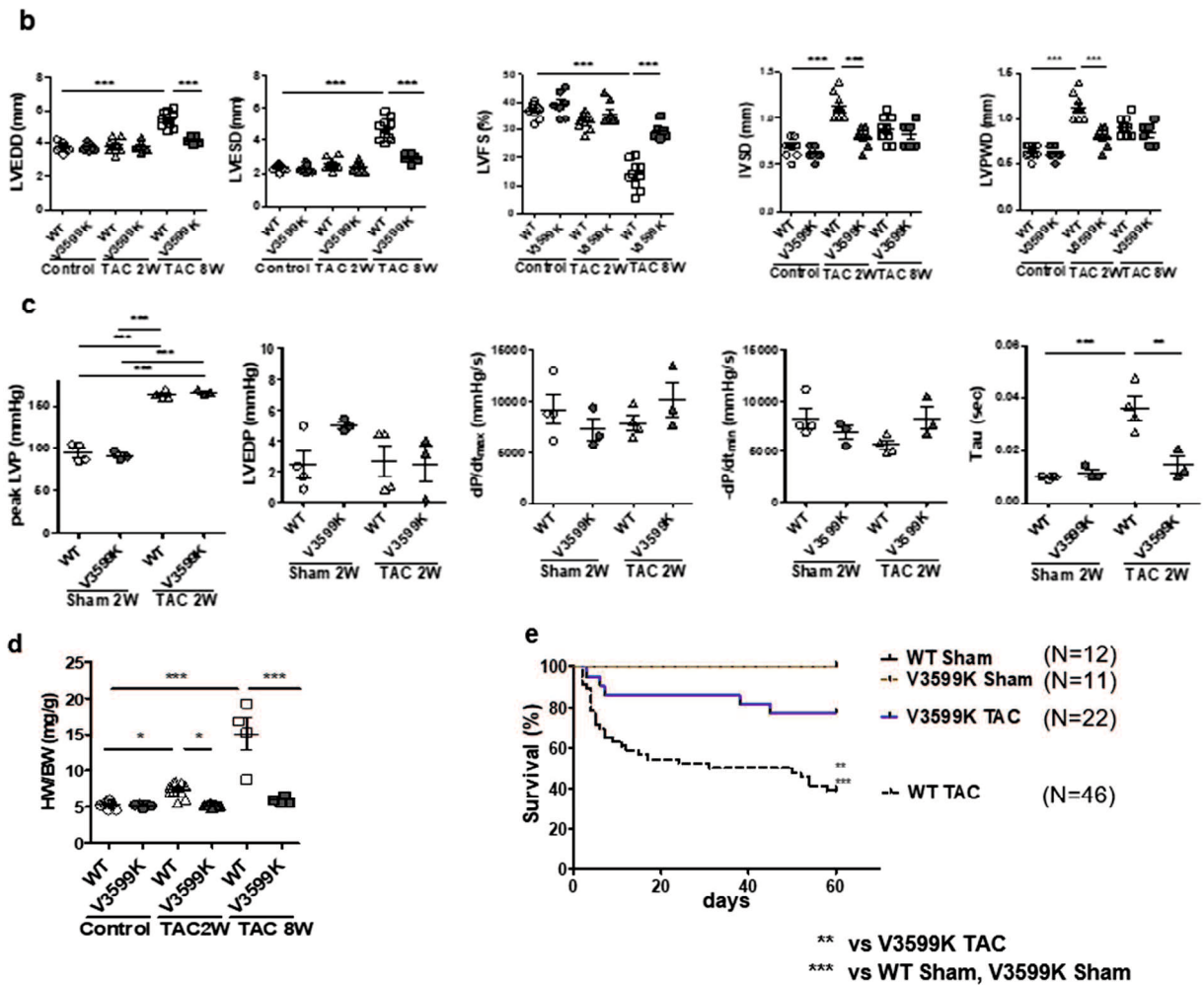
2 群間の差の検定には対応のないt 検定を行った。2 群間以上の差の検定にはPost hoc Tukey test 検定を併用したANOVA で行った。すべてのデータは平均±標準誤差 (SEM) で示した。P 値0.05 以下を統計学的に有意差があるとした。

## 第 5 章 結果

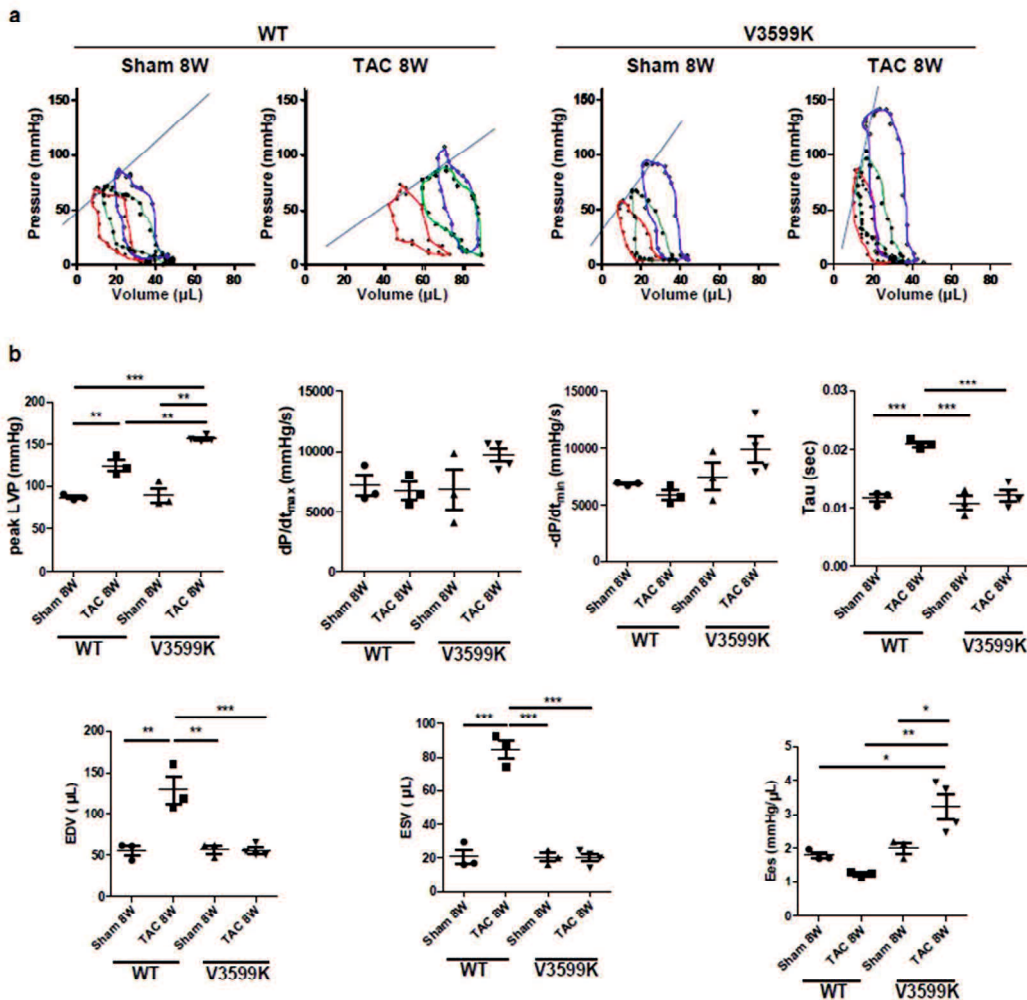
### 5.1 RyR2 V3599K 変異マウスは、心肥大を抑制した

横大動脈縮窄 (TAC) 手術前のベースラインでは、野生型 (WT) マウスと V3599K マウス間で心臓の構造的または機能的特徴に違いは見られなかった (補足図 1a、図 1a-d)。TAC の 2 週間後、WT マウスでは左室壁厚と左室重量いずれも増加したが、V3599K マウスでは見られなかった。また、TAC の 8 週間後、左室径は著しく拡大し、肥大と収縮機能の低下が見られた (図 1a、b、d)。TAC 後、間質線維化は WT 心筋で観察されたが、V3599K 心筋では観察されなかった (図 1a)。このような構造的および機能的変化は、V3599K マウスにおいて大幅に減少した (図 1a、b、d)。ピーク収縮期圧は、WT マウスと V3599K マウスの両方で TAC 後に同程度に増加し、同程度の圧力負荷が左室に課されたことを示している (補足図 1b、図 1c)。WT マウスでは、左心室圧の  $dP/dt_{max}$  は TAC の 2 週間後に維持されたが、左心室圧減衰の  $dP/dt_{min}$  と時定数 (Tau) の両方がすでに悪化してした (補足図 1b、図 1c)。また、生存率は WT マウスよりも V3599K マウスの方が著しく高かった (図 1e)。左室が慢性的な圧力過負荷にどのように適応するか評価するため、下大静脈の閉塞による収縮期圧の急激な低下中に左室内圧と体積の関係を得た。左心室収縮末期圧-容積関係 (Ees) の傾きは、WT マウスの TAC 後 8 週間で減少し、左心室収縮性の低下を示した。対照的に、Ees は、sham (V3599K) マウスよりも V3599K マウスの方が TAC 後 8 週間で急勾配になっており、左室収縮性の増加を示している (図 2)。





**図1** 構造および機能的特徴、およびWT、V3599KマウスにおけるTAC後の予後。(a)心臓の長軸切片、およびヘマトキシリン・エオジン染色またはマッソン・トリクローム染色された左室組織の代表的な画像。(b)左室拡張末期径(LVEDD)、左室収縮末期径(LVESD)、LVFS  $\{ (LVEDD - LVESD) / LVEDD \} \times 100$ 、拡張期左室中隔壁厚(IVSD)、拡張期左室後壁壁厚(LVPWD)。(c)最大左室圧(LVP)、左室拡張末期圧(LVEDP)、左室圧の最大微分値(dP/dt max)、左室圧の最小微分値(dP/dt min)、時定数(Tau)。(d)心臓重量/体重(HW/BW)。(e) Kaplan-Meier生存分析。個々のマウスの値は、平均±SEMとして表記。括弧はマウスの匹数。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.001 (事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。



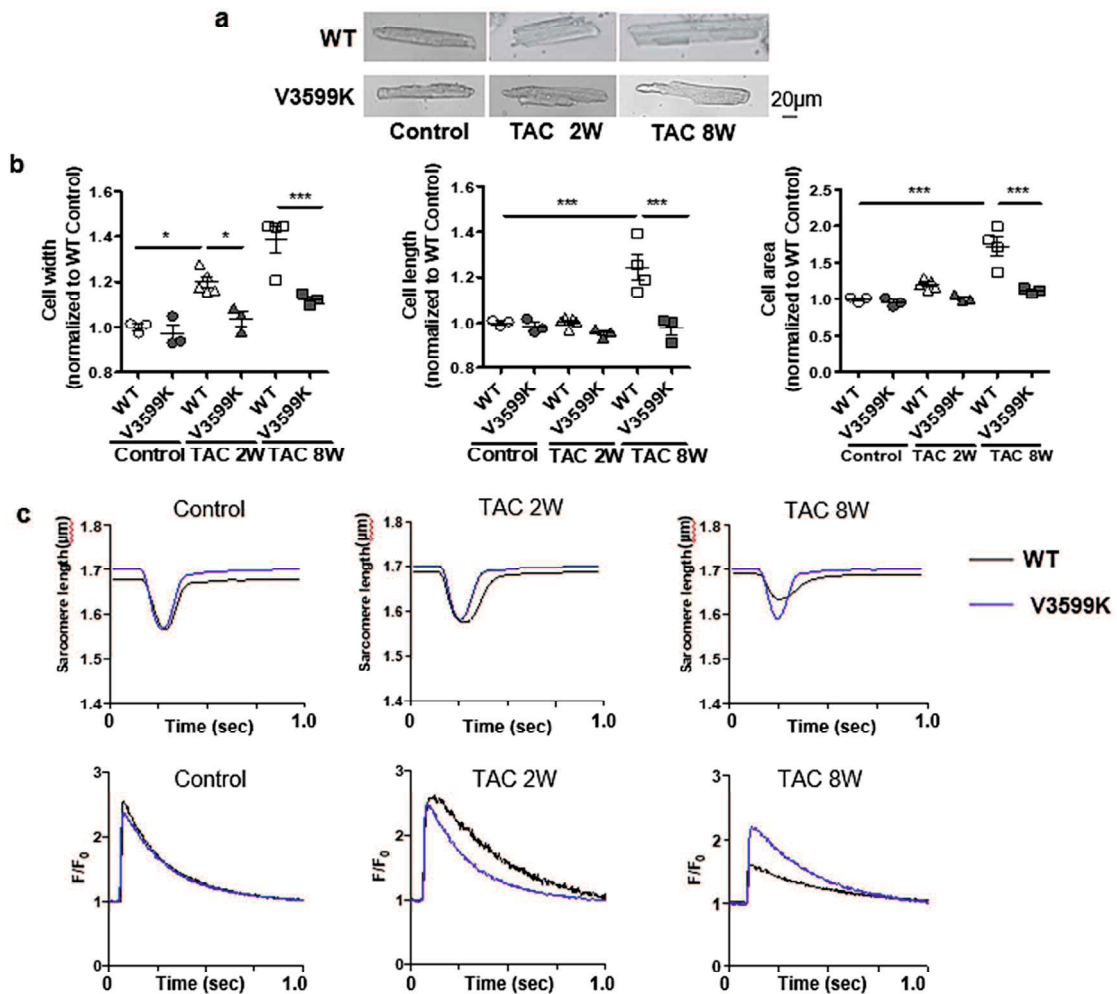
**図 2** 慢性的な圧力過負荷後の左心室圧 (P) -容積 (V) 関係。(a) 代表的な P-V ループ。(b) 血行力学的パラメーター: 最大左室圧 (LVP)、左室圧の最大微分値 ( $dP/dt_{max}$ )、左室圧の最小微分値 ( $dP/dt_{min}$ )、時定数 (Tau)。左室拡張末期容積 (LVEDV)、左室収縮末期容積 (LVESV)、および左室収縮末期圧-容積関係 (Ees)。\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 、\*\*\*  $P < 0.001$  (事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。

## 5.2 RyR2 V3599K 変異マウスは、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ハンドリング異常を改善した

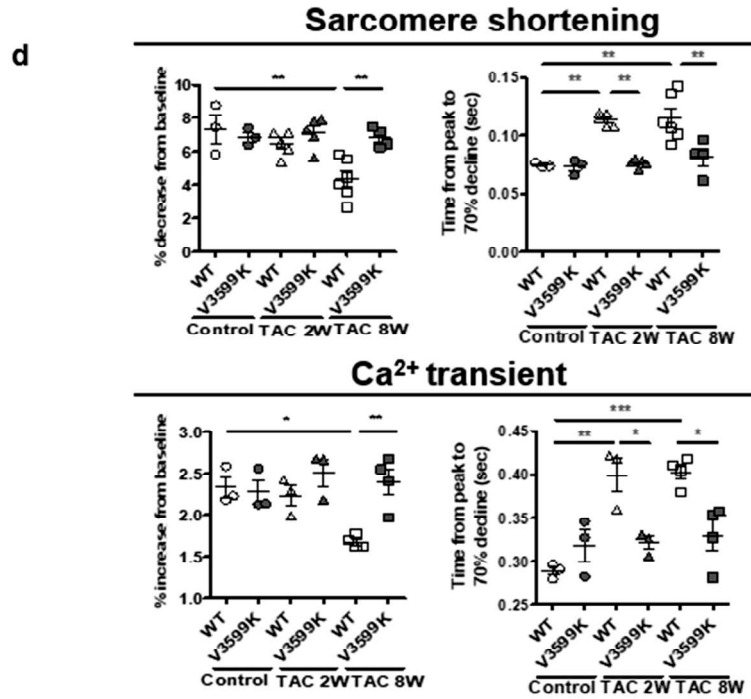
これらの *in vivo* のデータと一致し、WT 心筋細胞では TAC 後に心筋細胞の肥大が観察されたが、V3599K 心筋細胞では観察されなかった (図 3a, b)。WT 心筋細胞と V3599K 心筋細胞間で、ベースラインでの  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントまたはサルコメアショートニングに有意差は見られなかった (図 3c, d)。TAC の 2 週間後、サルコメアショートニングと  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントのピークは WT マウスと V3599K マウス間で同等であった。しかし、サルコメアショートニングと  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントはともに、ピークから 70% の低下までの時間は、V3599K 心筋細胞と比較して、WT 心筋細胞ではすでに延長していた (図 3c, d)。TAC の 8 週間後、サルコメアショートニングが減少し、 $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントのピークが減少し、WT 心筋細胞で持続時間の延長が見られたが、V3599K 心筋細胞

ではこれらすべてのパラメーターが改善された (図 3c、d)。

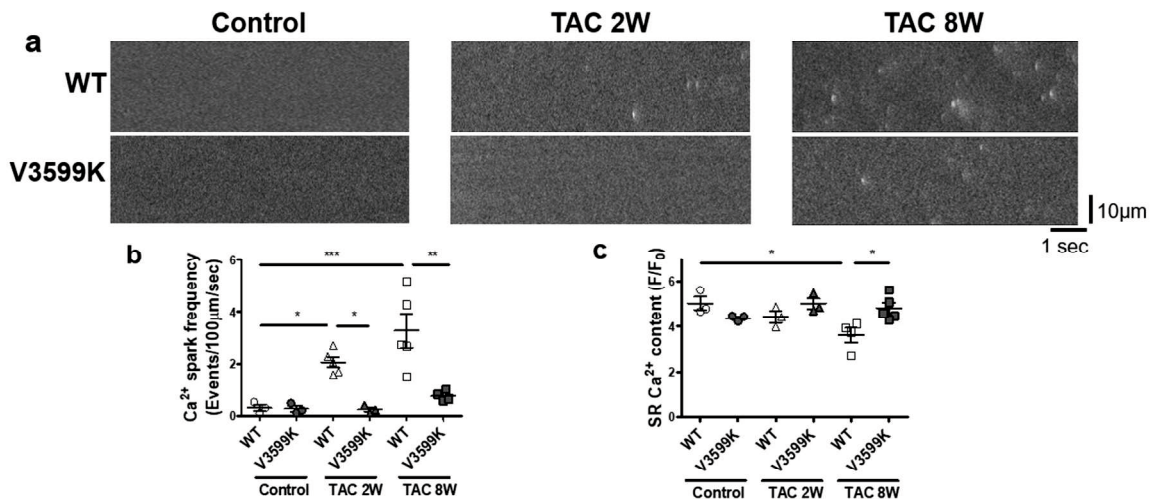
WT 心筋細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$ スパーク頻度は TAC の 2 週間後でも増加しており、 $\text{Ca}^{2+}$ トランジェントの延長を起し得るが、これらの異常は V3599K 心筋細胞で改善した (図 4a、b)。筋小胞体 (SR) 内の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量は、WT 心筋細胞において TAC の 8 週間後に減少したが、V3599K 心筋細胞では減少は見られなかった (図 4c)。まとめると、これらの結果は、圧力過負荷に対する初期の「代償性」肥大大心においても、異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出がすでに生じていること示唆している。この結果から、心肥大から心不全へ進展の抑制するためには、この異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を制御することが新たな治療戦略になると考えられる。



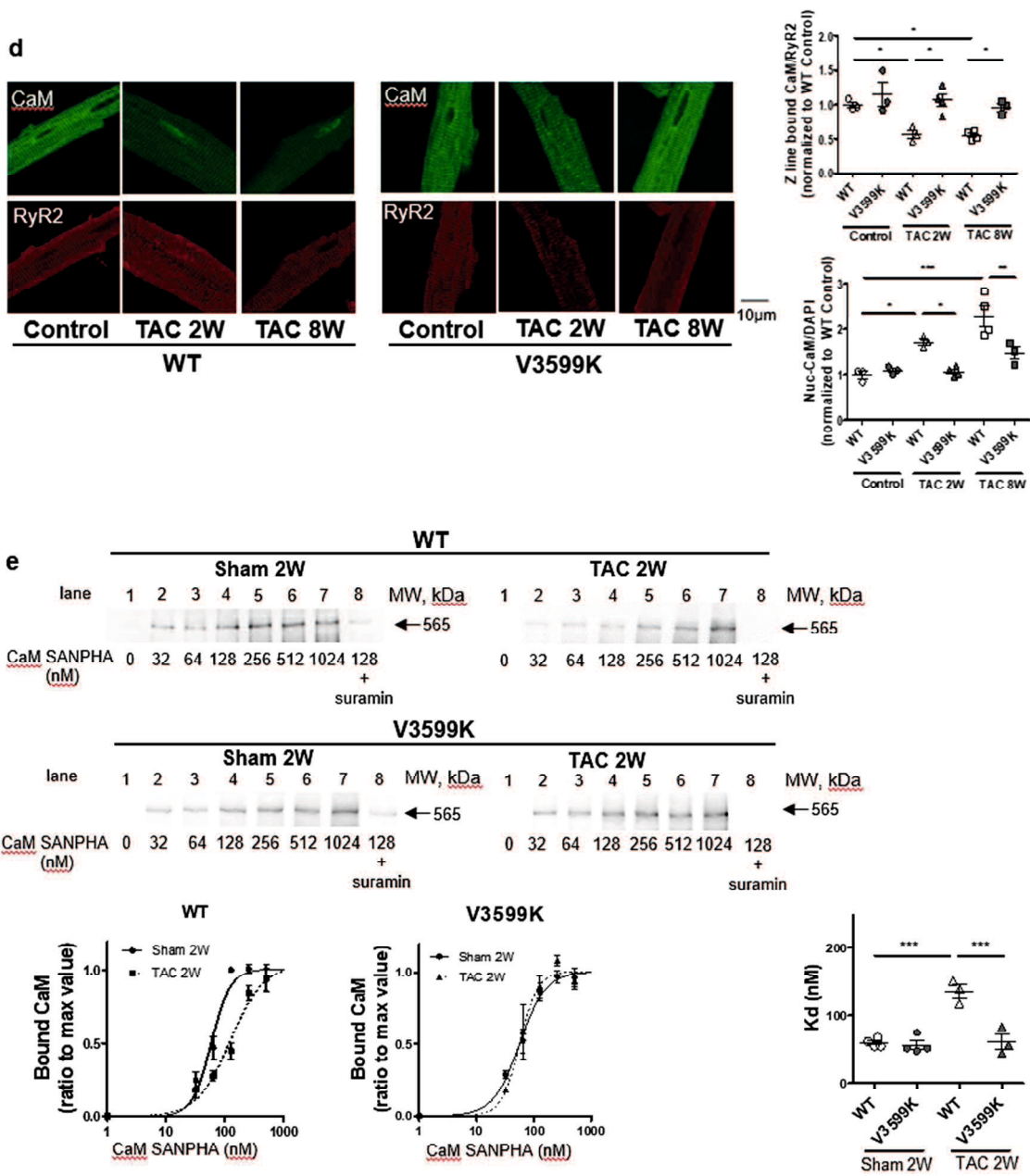




**図 3** 正常心筋細胞における形態および Ca<sup>2+</sup> トランジェント。(a) 心筋細胞の代表的な画像。(b) 単離心筋細胞における細胞幅、細胞長、および細胞面積の要約データ。N = 3~5 個の心臓からの 250~400 個の細胞。(c) 1Hz のペーシングレートでのサルコメアショートニングおよび Ca<sup>2+</sup> トランジェントの代表的な記録。(d) サルコメアショートニング、ピーク Ca<sup>2+</sup> トランジェント、Ca<sup>2+</sup> トランジェントのピークから 70%低下までの時間、およびサルコメア短縮の要約データ。N = 3~6 個の心臓からの 22~31 個の細胞。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロットした。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 (事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。







**図 4** 心筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  スパークと CaM-RyR2 相互作用。(a) 自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  スパークの代表的な記録。(b) 自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  スパーク頻度の要約データ。N = 3~5 個の心臓からの 20~40 個の細胞。(c) カフェイン誘発  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントから測定された  $\text{SRCa}^{2+}$  含有量の要約データ。N = 3~5 個の心臓からの 12~15 個の細胞。(d) RyR2 と共局在する内因性 CaM の代表的な画像、および Z 線結合 CaM と核 CaM の要約データ。Z 線に結合した CaM の免疫蛍光シグナルを RyR2 のシグナルで割って、コントロール (WT のベースライン) に対して正規化し、比率として表した。核 CaM の免疫蛍光シグナルを核染色用の DAPI のシグナルで割って、コントロール (WT のベースライン) に対して正規化し、比率として表した。N = 3~4 個の心臓からの 20~38 個の細胞。(e) (上) RyR2 結合 CaM-SANPAH (光反応性架橋剤; N-スクシンイミジル-6-[4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ]) の代表的な免疫プロット。RyR2 への CaM の結合は、RyR2 に結合した CaM を検出するために抗 CaM を用いたイムノプロットティングで評価した。(下) 左: CaM-SANPAH の濃度の関数としての RyR2 への

CaM 結合の要約データ。CaM 結合は、CaM の最大結合 (1024 nM) に対する比率として表わした。右：解離定数 (Kd)。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロットした。\* P <0.05、\*\* P <0.01、\*\*\* P <0.001 (事後テューキーの多重比較検定を使用した一元配置分散分析)。

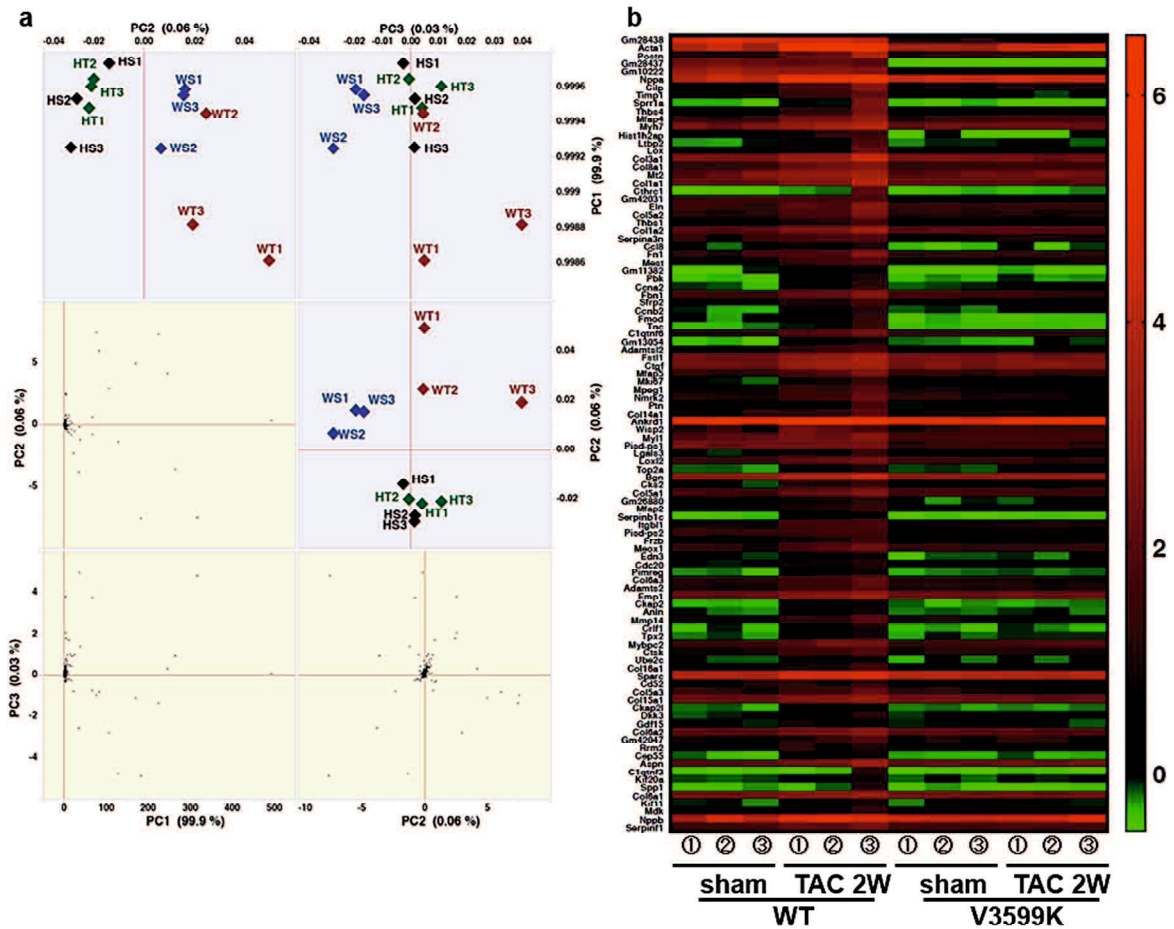
### 5.3 慢性的な圧力過負荷は、WT では RyR2 からの CaM 解離を引き起こすが、V3599K マウスではそれを抑制した。

肥大心筋における細胞内 Ca<sup>2+</sup>ハンドリングの役割をさらに解明するために、心筋細胞における CaM と RyR2 の関連、および Ca<sup>2+</sup>動態を評価した。内因性 CaM は、TAC 前の WT 心筋細胞の Z ライン上で RyR2 と共局在していた (補足図 2a、図 4d)。対照的に、WT 心筋細胞では TAC 後に減少が見られたが、V3599K 心筋細胞では、内因性 CaM は Z 線に沿って RyR2 と共局在が保たれていた (図 4d)。コントロール間 (TAC 前) の内因性 CaM には違いは見られなかった。WT および V3599K マウスにおける sham2W および sham8w を示す (補足図 2b)。外因性 CaM の RyR2 への直接結合も、UV 架橋剤を CaM に結合させることで評価を行った。CaM の RyR2 への結合親和性は、WT 心臓では TAC 後に著しく減少したが、V3599K 心臓では改善していた (図 4e)。スラミン (10 μM) (RyR-CaM 結合阻害薬) は、RyR2 への CaM 結合を阻害しており、RyR2 への CaM 結合の特異性を確認した。

### 5.4 RyR2 への CaM 結合を強化することで、肥大関連遺伝子の発現を減少させた

心臓の RyR2 シグナル伝達経路を解明するために、TAC の有無にかかわらず WT および V3599K マウスの心臓における RNA-seq 分析を使用した全トランスクリプトーム分析を実施した。心臓では、各サンプルの約 2,700 万回の読み取りから 19,000 を超える遺伝子が検出された。RyR スーパーファミリーの中で、RYR2 は主にマウスの心臓で発現し、その発現は 4 群間で差は認めなかった。(補足図 3)。CaM をコードする Calm1 の発現は、WT マウスの心臓では TAC によって増強され、V3599K マウスでは発現が消失した (補足図 3)。主成分分析 (PCA) は、遺伝子発現パターンに従って心臓をクラスター化するために行なった。PCA プロットでは、V3599K {TAC なし (-TAC) または TAC あり (+TAC)} と WT マウス {TAC なし (-TAC) または TAC あり (+TAC)} は PC2 によって明確に分離された。PC3 では、WT (-TAC) と WT (+TAC) は異なる遺伝子発現パターンを示すが、V3599K (-TAC) と V3599K (+TAC) は分離されていない (図 5a)。これらの結果は、遺伝子発現パターンが V3599K (-TAC) と V3599K (+TAC) の間で類似しているのに対し、WT (-TAC) と WT (+TAC) は大幅に異なることを示す。ヒートマップは、PC3 の因子負荷によって示される上位 100 個の遺伝子の遺伝子発現を示している。遺伝子発現は、WT (-TAC) 心臓と比較して WT (+TAC) 心臓で増加した。ただし、この増加は V3599K (+TAC) 心臓では観察されなかった (図 5b)。既知の肥大マーカーであるアクチンアルファ 1 (Acta1)、ミオシン重鎖 7 (Myh7)、ナトリウム利尿ペプチド A (ANP、Nppa)、およびナトリウム利尿ペプチド B (Nppb) は、WT (-TAC) 心臓比較して、WT (+TAC) 心臓において有意に増加した。一方、V3599K (+TAC) 心臓において増加は認めなかった (図 5c)。これらのデータは、ヘマトキシリン-エオジン染色によって観察された肥大性の形態学的変化と一致していた。心臓の肥大変化につながるシグナル伝達経路を調

べるために、PC3 の因子負荷によって検出された上位 100 個の遺伝子を使用して Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を実行した。毒性分析は、心肥大が高スコアで検出されたことを示した。ネットワーク解析では、アクチン-ミオシン複合体による心筋細胞収縮の活性化がトップスコアとして示唆され (図 5d)、KEGG および遺伝子オントロジー解析のデータから RyR2 によって放出された細胞内 Ca<sup>2+</sup>によって活性化が引き起こされることが示されました (補足図 4a-c)。ネットワーク解析の中心で Nppa と Nppb が検出され、Ca<sup>2+</sup>に依存する活性を持つカルシニューリンが Nppa と Nppb の上流分子として観察された (補足図 5a)。3 番目のネットワークとして示される Nfat (活性化 T 細胞の核因子、NFAT) ファミリーのシグナル伝達経路は、肥大変化に関する ERK1 活性化と関連していた (補足図 5b)。Ca<sup>2+</sup>依存性肥大経路を示す遺伝子群を用いた上流解析では、転写因子筋細胞エンハンサー因子 2 (MEF2) が検出され、GATA 結合タンパク質 4 (GATA4) の活性化を介して (補足表 1 および補足図 6)、Acta1、Myh7、Nppa などの肥大遺伝子の誘導にシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。これらの発見は、TAC による左室圧負荷の結果、RyR2 から異常な Ca<sup>2+</sup>漏出が生じ、さらに、この Ca<sup>2+</sup>漏出が肥大性シグナル伝達経路を活性化することを示唆している。



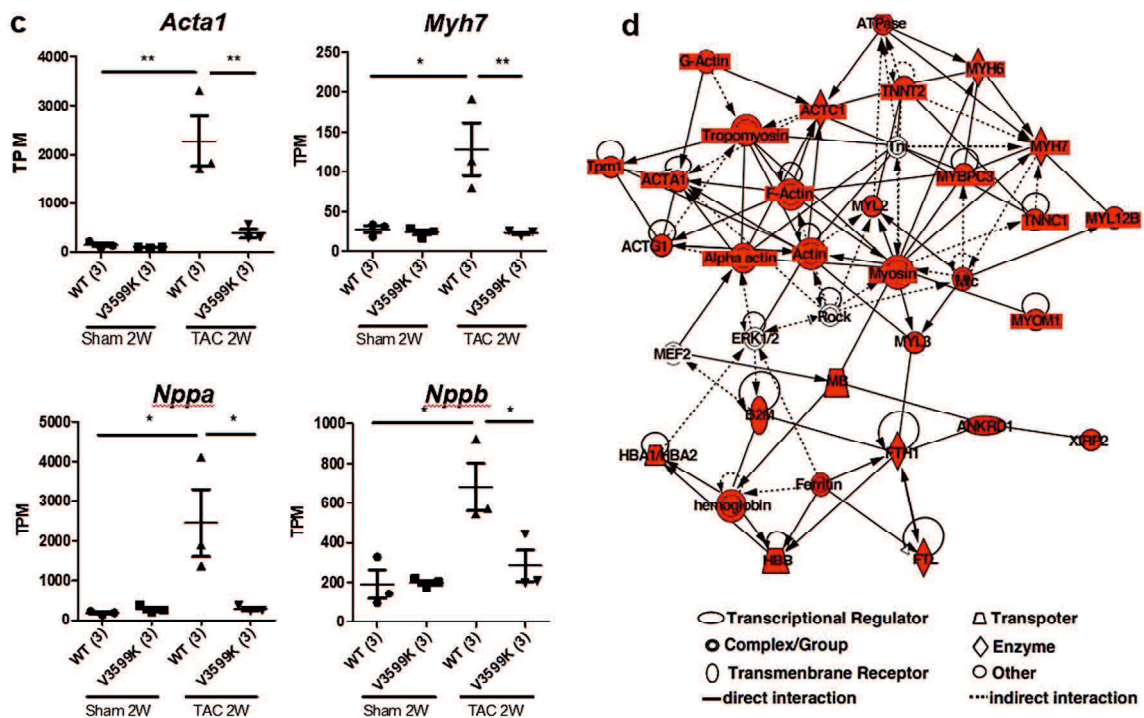


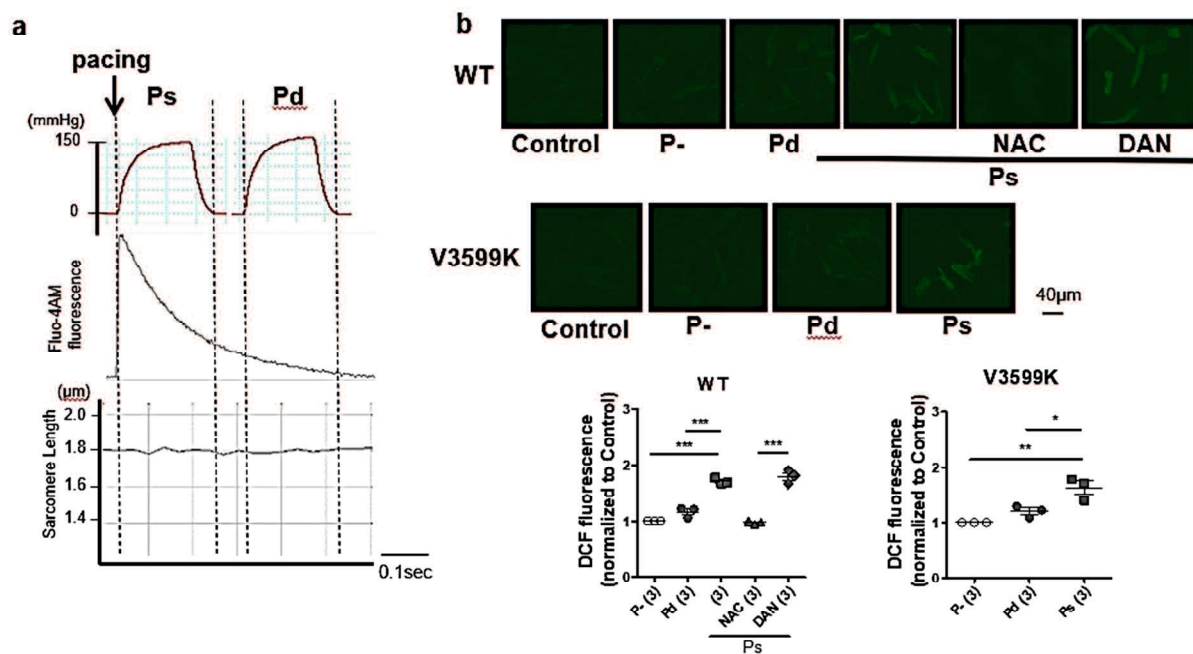
図5 TACモデルマウスの心臓への慢性的な圧力過負荷後の遺伝子発現とネットワーク経路の分析。

(a) WT マウス{TACなし (WS : n = 3) または TACあり (WT : n = 3)} および V3599K マウス{TACなし (HS : n = 3) または TACあり (HT : n = 3)} における遺伝子発現を示す主成分分析 (PCA)。 (b) ヒートマップは、PC3 の因子負荷におけるスコアの上位 100 遺伝子の遺伝子発現を示している。 (c) 棒グラフは、WS、WT、HS、および HT マウスモデルの心臓における肥大マーカー遺伝子の *Acta1*、*Myh7*、*Nppa*、または *Nppb* の遺伝子発現を示している。 (d) ネットワークは、PC3 の因子負荷の上位 100 個の遺伝子で検出されたシグナル伝達経路を示している。赤い記号は上位 100 個の遺伝子意味着。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロットしている。括弧はマウスの数を示す。\* P < 0.05、\*\* P < 0.01 (事後 Tukey の多重比較検定を使用した一元配置分散分析)。

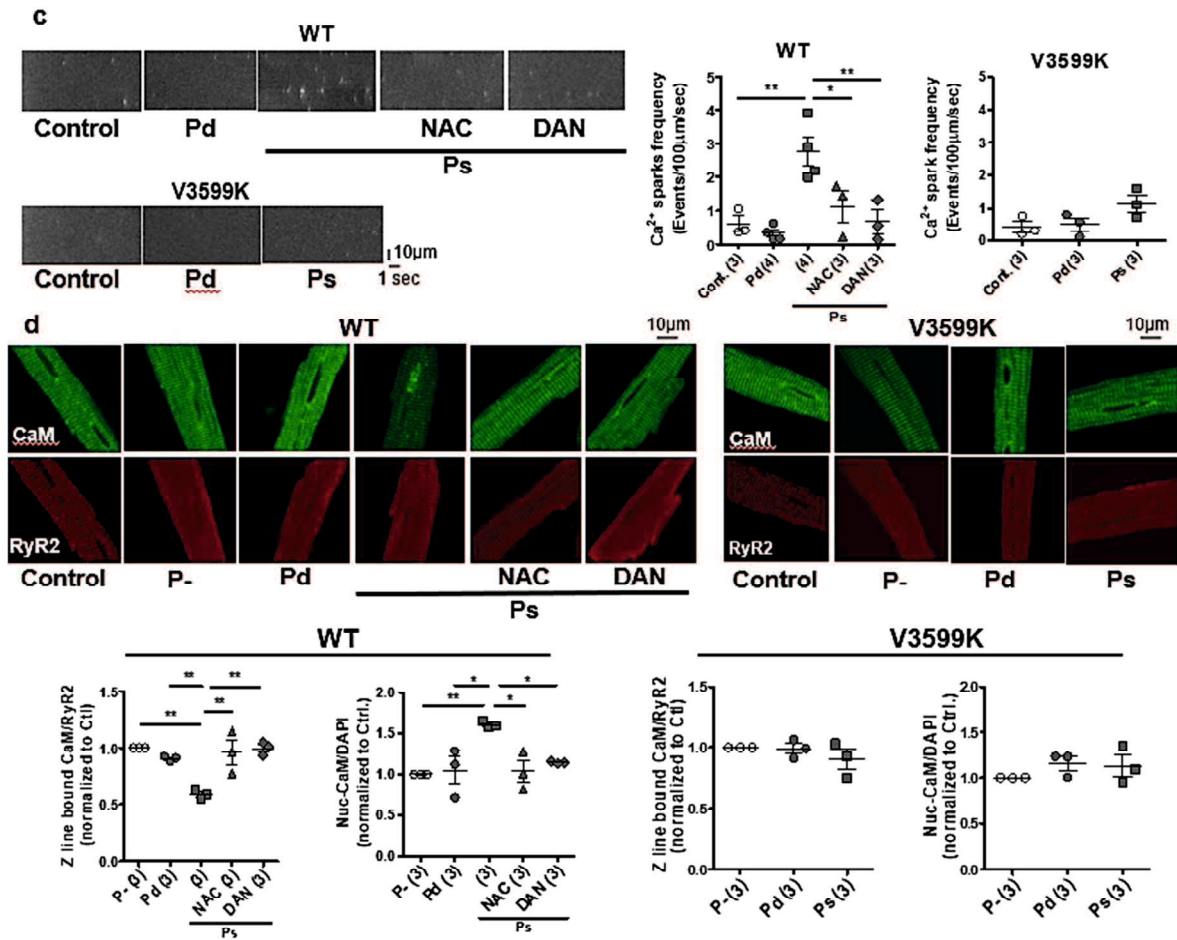
### 5.5 拡張期ではなく、収縮期における急性圧力過負荷は、肥大型シグナル伝達にとって重要である

次に、RyR2 からの CaM の解離またはその後の Ca<sup>2+</sup>漏出のいずれかが、圧力負荷誘発性肥大の発症に不可欠であるかどうかを明らかにするために、空気圧による圧力過負荷が (補足図 7)、単離心筋細胞において、Ca<sup>2+</sup>スパークに及ぼす影響、RyR2 に結合した CaM の割合、核からサイトゾルへの HDAC の輸出、およびサイトゾルから核への NFAT のインポートを評価した。肥大シグナル伝達に対する、細胞収縮の影響を除くために、すべての実験は、2,3-ブタンジオンモノキシム (BDM) の存在下で実施した。したがって、電気ペーシング後、サルコメアの短縮なしに Ca<sup>2+</sup>トランジェントのみ観察された (図 6a)。圧力過負荷 (150 mmHg) は、Ca<sup>2+</sup>トランジェント期 (収縮期)、または静止期 (拡張期) に 1 Hz の電氣的ペーシング下で行った (図 6a)。心筋の伸展は活性酸素種 (ROS) の生成を介して Ca<sup>2+</sup>スパークを引き起こすことが示されているため、空気圧

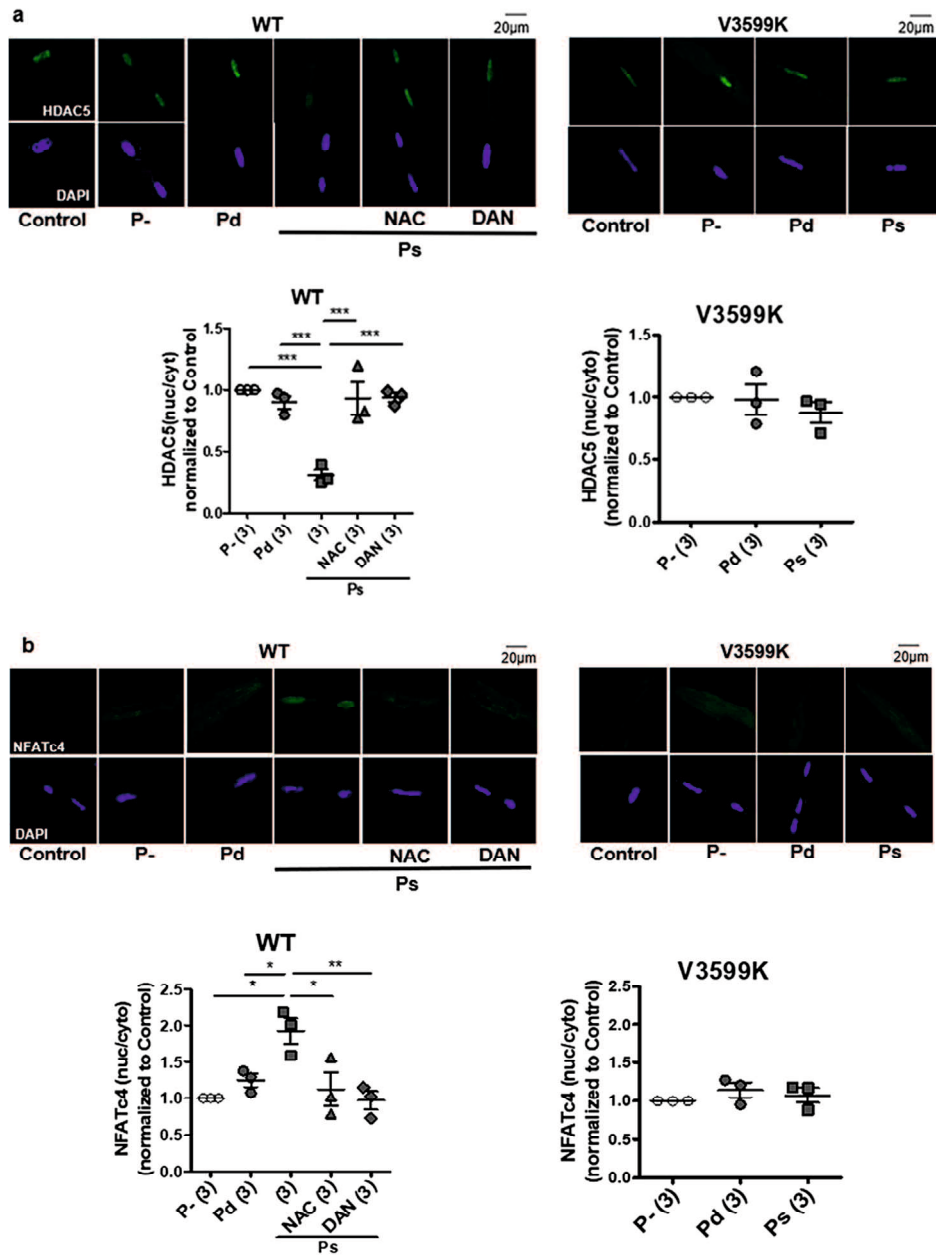
縮による圧力過負荷も ROS を生成し、Ca<sup>2+</sup>の漏出を引き起こす可能性があるかと予想した。圧負荷後の心筋細胞の ROS を測定した。Ca<sup>2+</sup>トランジェント期（静的期では見られない）での圧力過負荷は、実際に WT および V3599K 心筋細胞で同程度の ROS を生成した。抗酸化剤である N-アセチルシステイン（NAC）（1 mM）は、WT 心筋細胞での ROS 産生を阻害した（**図 6b**）。さらに、WT 心筋細胞における ROS、Ca<sup>2+</sup>スパーク、CaM-RyR2 相互作用、および肥大シグナル伝達に対するダントロレンの効果も評価した。ダントロレンは、CaM の RyR2 への結合親和性をアロステリックに増加させることにより、CPVT または心不全における RyR2 を介した Ca<sup>2+</sup>漏出を阻害することを報告している。ダントロレンは、WT 心筋細胞における ROS 産生を阻害しなかった（**図 6b**）。WT 心筋細胞では、Ca<sup>2+</sup>トランジェント期（収縮期）における圧力過負荷の場合にのみ、急性圧力過負荷が Ca<sup>2+</sup>スパーク、RyR2 からの CaM の解離（**図 6c、d**）、核から細胞質ゾルへの HDAC の輸出、および細胞質ゾルから核への NFAT の輸入を誘発し、静止期（拡張期）にはこれらは見られなかった（**図 7**）。NAC とダントロレンの両方が、前述のすべての異常、すなわち、WT 心筋細胞の圧力過負荷による Ca<sup>2+</sup>漏出および肥大シグナル伝達を阻害した（**図 6c、d、7**）。V3599K 心筋細胞では、圧力過負荷は Ca<sup>2+</sup>スパーク、CaM 解離、HDAC、または NFAT の核-細胞質間の移動を引き起こさなかった（**図 6c、d、7**）が、ROS は WT 心筋細胞と同程度に生成された（**図 6b**）。これらのデータから、圧力過負荷によって誘発された肥大シグナル伝達は、ROS を介した RyR2 からの CaM 解離とそれに引き続いて起こる異常な Ca<sup>2+</sup>漏出によって惹起されると考えられた。







**図 6** WT および V3599K 心筋細胞における ROS、Ca<sup>2+</sup>スパーク、CaM-RyR2 相互作用、および肥大シグナル伝達に対する急性圧負荷の影響。(a) 心筋細胞への空気圧縮 (+ 150mmHg) による急性圧力過負荷のタイミング。上: Ca<sup>2+</sup>トランジェント; 下: サルコメアのショートニング。(b) DCFHDA 蛍光の代表的な画像と要約されたデータ。N = 3~4 個の心臓からの 30~51 個の細胞。(c) Ca<sup>2+</sup>スパークの代表的な画像と要約されたデータ。N = 3~4 個の心臓からの 19~28 個の細胞。(d) RyR2 と共局在する内因性 CaM の代表的な画像、および Z 線結合 CaM と核内 CaM の要約データ。Z 線に結合した CaM の免疫蛍光シグナルを RyR2 のシグナルで割って、コントロール (WT のベースライン) に対して正規化し、比率として表した。核 CaM の免疫蛍光シグナルを核染色用の DAPI のシグナルで割って、コントロール (WT のベースライン) に対して正規化し、比率として表した。N = 3 の心臓からの 23-39 個の細胞。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロットしている。括弧はマウスの数を示す。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 (事後 Tukey の多重比較検定を使用した一元配置分散分析)。

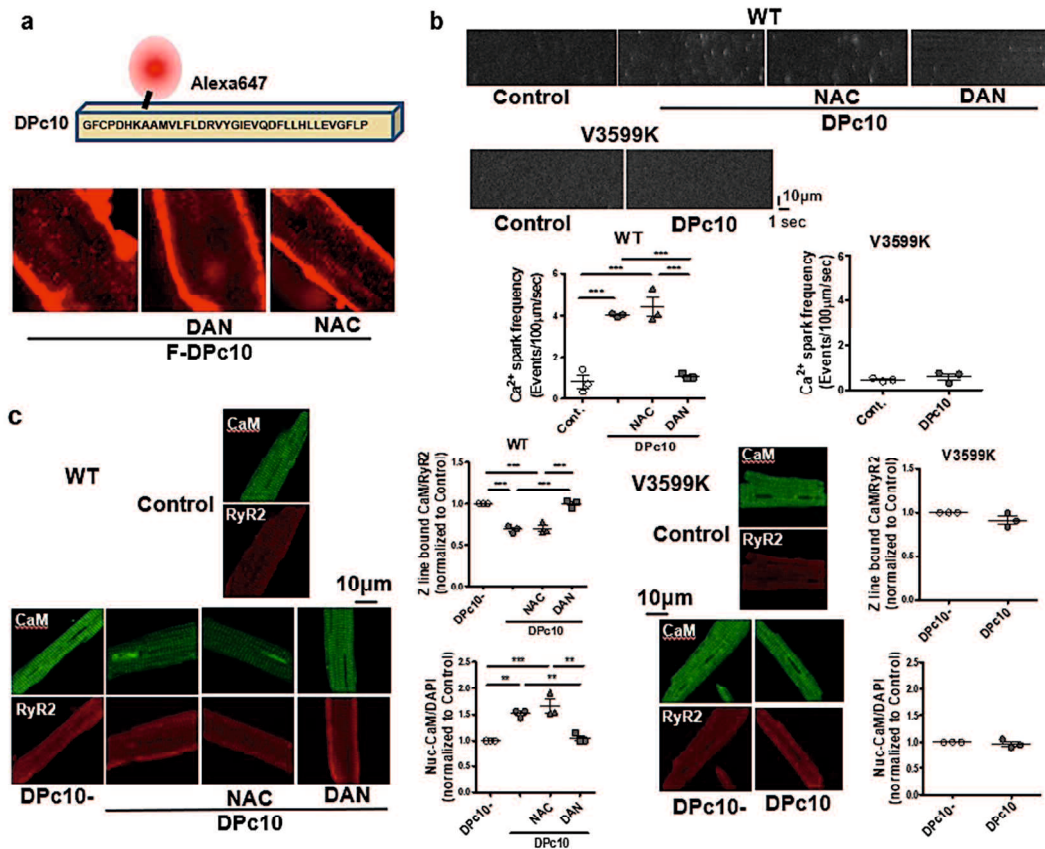


**図7** 肥大シグナル伝達に対する心筋細胞への空気圧縮 (+ 150mmHg) による急性圧力過負荷の影響。(a)HDAC の転座。N = 3つの心臓からの42-60細胞。(b)NFATの転座。3つの心臓からのN = 47-58細胞。個々のマウスの値は、平均±SEMとともにプロット。括弧はマウスの数を示す。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 (事後 Tukey の多重比較検定を使用した一元配置分散分析)。

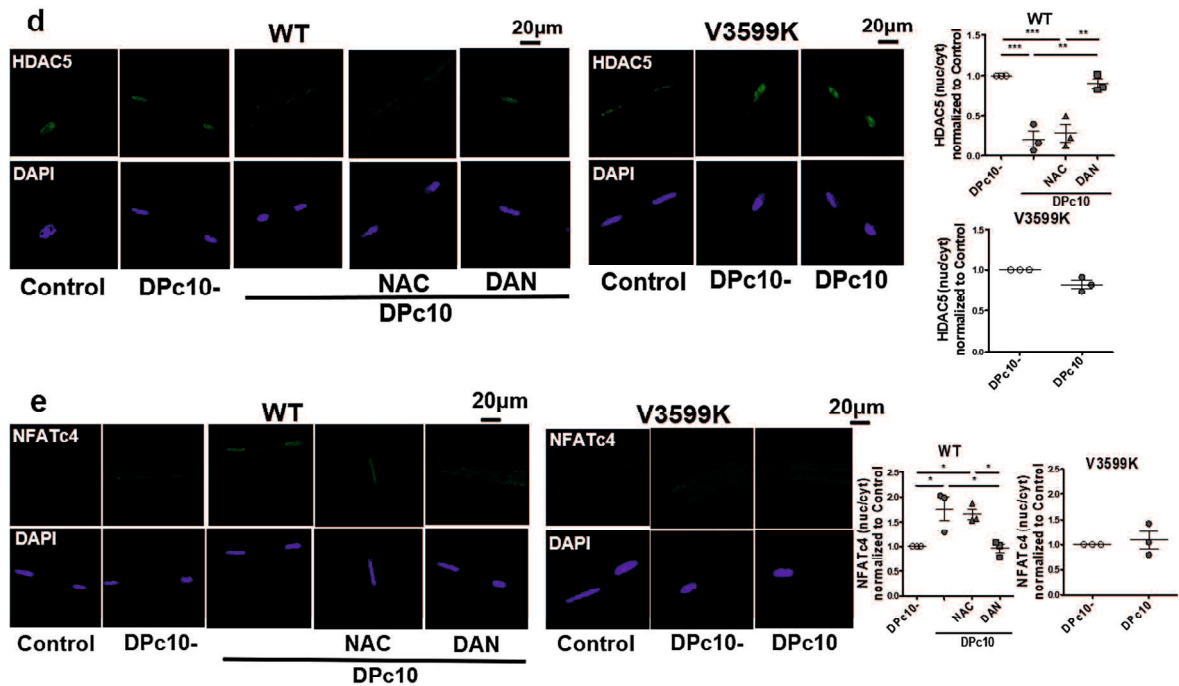
### 5.6 RyR2 の不安定化は、肥大型シグナル伝達を直接活性化する

ドメイン連関障害(unzipping)を介した  $Ca^{2+}$ 漏出は、ROS によって引き起こされる可能性があるため、圧力過負荷とそれに続く ROS 生成がなくても、直接 unzipping を起こす DPc10 によって肥大シグナル伝達が誘導されると予想した。DPc10 は、RyR2 セントラルドメイン残基(2460〜

2495)に対応するペプチドであり、セントラルドメインと連関するN末端ドメインと競合的に結合し、ドメイン連関障害 (unzipping) を引き起こす。蛍光標識された DPc10 は、タンパク質送達キットである Bioporter (図 8a) によって、WT 心筋細胞の Z 線に沿って正常に送達されたが、ダントロレンの存在下では、N 末端およびセントラルドメイン間の zippering 状態による効果で DPc10 が RyR2 の N 末端ドメインに結合するのを妨げることを反映して、DPc10 の Z 線への送達が阻害された。V3599K 心筋細胞において、蛍光標識された DPc10 が Z 線に沿ってみられなかった (図 8a) という発見は、前述のように、N 末端ドメインとセントラルドメイン間のドメイン間相互作用が CaM-RyR2 相互作用とアロステリックに関連するという考えを強く支持する。つまり、domain unzipping は CaM の解離につながり、CaM 結合親和性の強化は domain zippering につながる。予想通り、WT 心筋細胞への DPc10 の取り込み (圧力過負荷なし) は、Ca<sup>2+</sup>スパーク、RyR2 からの CaM 解離 (図 8b、c)、核からの HDAC のエクスポート、および NFAT の核へのインポートを直接引き起こしたが、V3599K 心筋細胞ではそうならなかった (図 8d、e)。まとめると、今回の結果は、圧力過負荷が最初に Ca<sup>2+</sup>トランジェント期 (収縮期) にのみ ROS を生成し、それが RyR2 の酸化を引き起こし、次に CaM の解離を介して異常な Ca<sup>2+</sup>放出を引き起こし、肥大シグナル伝達を引き起こすことを強く示唆する。RyR2 への CaM 結合の親和性を高めることによる異常な Ca<sup>2+</sup>放出と CaM 解離の抑制は、ROS が生成されたとしても、肥大性シグナル伝達を完全に阻害した。







**図 8** Ca<sup>2+</sup>スパーク、CaM-RyR2 相互作用、および肥大シグナル伝達に対する DPc10 の効果。(a) 心筋細胞の Z 線に沿った蛍光標識 DPc10 の取り込み。(b) Ca<sup>2+</sup>スパーク。N = 3 つの心臓からの 18-31 個の細胞。(c) RyR2 に結合した内因性 CaM の蛍光シグナル。N = 3 つの心臓からの 19-25 個の細胞。(d) HDAC の転座。N = 3 つの心臓からの 38-50 細胞。(e) NFAT の転座。N = 3 つの心臓からの 36-53 細胞。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロット。括弧はマウスの数を示す。\* P < 0.05、\*\*\* P < 0.001 (事後 Tukey の多重比較検定を使用した一元配置分散分析)。

## 第 6 章 考察

この研究の主な発見は、1) 左室収縮能が低下していない、いわゆる「代償性」肥大期において左室弛緩能はすでに低下していたが、これは RyR2 への CaM 結合親和性を遺伝的に増強することで是正された。2) 慢性的な CaM 解離の抑制は、心不全の発症を予防し、予後を改善した。3) Ca<sup>2+</sup> トランジェント期の心筋細胞への急性圧負荷は、心筋が収縮しない条件下でも、ROS による CaM 解離を介した肥大シグナル伝達を開始する可能性があるが、静止期には見られない。4) CaM と RyR2 の結合性を増強すると、Ca<sup>2+</sup>漏出が抑制され、肥大シグナル伝達を抑制した。これらから、CaM と RyR2 の間の相互作用の障害が、圧過負荷による肥大シグナル伝達を活性化するために不可欠であり、RyR2 への CaM 結合の遺伝的増強により、心肥大を抑制することが示された。

心肥大は、心血管疾患の発症の主な危険因子である。近年、報告されたエビデンスは、慢性的な圧力過負荷はミトコンドリア機能障害、代謝のリプログラミング、Ca<sup>2+</sup> トランジェント異常、サルコメア構造の変化、線維化を含むさまざまな病理学的シグナルを誘発し、圧力過負荷下での適応反応が、運動やその他の形態の生理学的肥大と比較して、非常に異なる遺伝的特徴を持っていることを示唆している(28) しかし、これらの病理学的信号の変化が、多くの形態の肥大の主な原因なのか副次的な影響であるかを判断することは困難である。この研究は、RyR2 からの CaM

解離による異常な  $\text{Ca}^{2+}$  漏出が圧負荷誘発性肥大の主な原因であり、RyR2 への CaM 結合を増強することによる  $\text{Ca}^{2+}$  漏出の防止が肥大を完全に抑制することを明確に示した。さらに、V3599K マウスは WT マウスよりも TAC 後に明らかに心機能と予後の改善を示したことに基づき、心肥大は肥大初期から不適応反応であり、心筋に対する圧負荷発生後、できるだけ早く治療介入する必要があることが強く示唆された。

V3599K RyR2 変異心臓が肥大なしに慢性的な圧力過負荷に適応するメカニズムを説明する必要がある。左心室圧-容積の関係から、Ees は、sham (V3599K) マウスよりも V3599K マウスの方が TAC 後に急勾配であり、収縮性の増加を示している (図 2)。この収縮性の増加は、V3599K 心臓が心拡大することなく、慢性的な圧力過負荷に適応できることを示唆している。しかし、V3599K 心臓で左室収縮性が増加する理由は不明である。一般に「生理学的肥大」で観察される病理学的肥大反応に拮抗するシグナル伝達経路は、左室収縮性の増加に関与している可能性がある。例えば、収縮性が増加する原因としては、細胞生存シグナル伝達、エネルギー生産と効率の増加、抗酸化システム、ミトコンドリアの質のコントロール、および心筋細胞の増殖と再生等が考えられる<sup>28</sup>。特に、細胞肥大がなく、V3599K 心筋細胞の TAC 前後のサルコメアショートニングに違いがなかったことを考えると、細胞増殖プロセスは、V3599K 心臓の左室収縮性の増加に関与している可能性がある。

圧力過負荷後の肥大シグナル伝達の正確なメカニズムを解明するために、電気ペーシング後の任意の期間に空気圧による圧力過負荷を心筋細胞に加えることができるチャンバーシステムを開発し、いくつかの新しい発見を得た。第一に、静止期には活性化されないが、 $\text{Ca}^{2+}$  トランジェント期に圧負荷したときのみ、肥大シグナル伝達を活性化したことは、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が圧力負荷誘発性肥大の前提条件であることを示唆している。第二に、心筋細胞への圧力過負荷は最初に ROS を生成し、その後、おそらく RyR2 の酸化のために、RyR2 からの CaM 解離を引き起こし、 $\text{Ca}^{2+}$  漏出と肥大シグナル伝達の活性化を引き起こす<sup>26</sup>。第三に、RyR2 の unzipper である DPc10 は、RyR2 からの CaM の解離を引き起こし、ROS を増加させることなく  $\text{Ca}^{2+}$  スパークを誘発し、それによって肥大性シグナル伝達を活性化した。第四に、遺伝的に RyR2 への CaM 結合を増強することで、圧力過負荷または DPc10 によって誘発される肥大シグナル伝達を阻害した。まとめると、カルモジュリンと RyR2 の解離は、圧力負荷誘発性肥大の発症の重要な初期トリガーと考えられる。この仮説と一致して、トランスクリプトーム分析では、遺伝的に CaM の解離を抑制した場合、Acta1、Myh7、Nppa、および Nppb を含む肥大関連遺伝子が TAC 後に増加しなかったことを示した。隣接するサブユニット間の N 末端ドメインとセントラルドメインの連関は、CaM-RyR2 の結合と連動していた。つまり、RyR2 を DPc10 にさらずと RyR2 への CaM 結合が抑制され、CaM の RyR2 への結合は、その部位への DPc10 のアクセスを低下させる<sup>27</sup>。近年、Gong らが、ApoCaM と Ca-CaM は、RyR2 内のハンドルドメインとセントラルドメインで形成される裂け目に、結合することを報告した (PBD ID:6jV2 ref15)。彼らは、Ca-CaM の N ロープと C ロープが、それぞれ C 末端 (3596-3605) と、ヘリックス  $\alpha$ -1 の N 末端 (3587-3592) と相互作用し、Ca-CaM の N ロープはまた、ハンドルドメイン内のヘリックス 2b にある Arg2209 とヘリックス  $\alpha$ -9 の Met3820 と相互作用

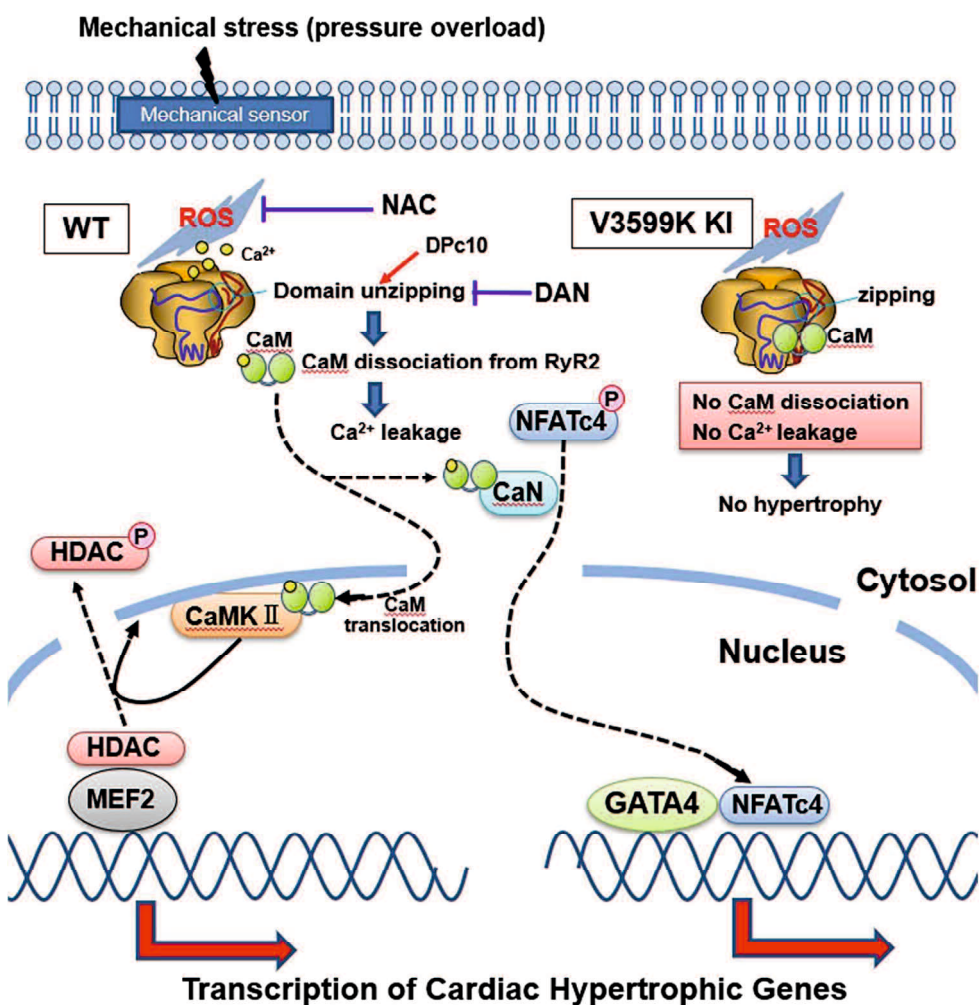
用することを見出した。彼らのRyR2のクライオ電子顕微鏡上の構造によると、Zipping時の、N末端とセントラルドメインの接着面は、我々が予想していたより小さく、またRyR2のサブユニット間に位置しており、またCaM結合部位と近接していた(補足図 8)。それゆえに、N末端ドメイン(1-220)とセントラルドメイン(2250-2500)の間の「core domain unzipping」が起こることで、サブユニット間の相互作用に欠陥が生じ、CaM結合部位でアロステリックにコンフォメーション変化が誘発され、それにより、不全心においてCaMが置き換わる可能性がある。非常に興味深いことに、我々が世界で最初に発見したRyR2のチャンネル安定化薬のダントロレンの結合部位(601-620)や、別のRyR2安定薬であるK201 (JTV519)の結合部位(2114-2149)は、RyR-CaM結合部位に、近接しており、この位置関係から、いずれの薬剤も共通して、病的心におけるCaMのRyR2への親和性の低下を是正する可能性があることを示唆している(補足図 8)。

V3599K 変異が、圧力過負荷の心臓における RyR2 への CaM の親和性低下を防ぐメカニズムは、まだ解明されていない。V3599K 変異 RyR2 への CaM 結合の親和性は、圧力過負荷が課されない限り WT RyR2 と同様であったことを考えると(図 4e)、V3599K 変異 CaM 結合部位への CaM の結合は、サブユニット間の相互作用に障害が生じたときのみ、アロステリックに増強される可能性がある。CaM は RyR2 の 3 つのドメイン(ヘリックス  $\alpha$ -1、ヘリックス 2b、ヘリックス  $\alpha$ -9) と密に相互作用するため<sup>15</sup>、CaM 結合部位ペプチド(3583-3603)における V3599K 変異は CaM への結合親和性を著しく強化したが<sup>17</sup>、その結合部位への *in situ* CaM のアクセスのし易さは、V3599K 変異によって容易には強化されない可能性がある。対照的に、圧力過負荷によるサブユニット間連関障害は、CaM 結合領域のコンフォメーション状態を、アロステリックに変化させ、V3599K 変異体のヘリックス  $\alpha$ -1 のドメインへの CaM 結合を促進する可能性がある(これは WT では見られない)。CaM 結合領域が 3 次的に「ジッピングインターフェイス」に近接しているという事実は、この考えを裏付けている(補足図 8)。

2 つの主要な  $\text{Ca}^{2+}$  が活性化する心肥大シグナル伝達経路に、 $\text{Ca}^{2+}$  /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) -HDAC 経路と CnA-NFAT 経路がある<sup>20,21</sup>。CaMKII を介した HDAC のリン酸化は、核からの HDAC 輸出をもたらし、MEF2 の HDAC を介した転写抑制の緩和、および肥大遺伝子の MEF2 依存性転写につながる<sup>20</sup>。さらに、CnA は NFAT を脱リン酸化し、NFAT の核内移行および ANP や GATA4 などの肥大遺伝子の NFAT 依存性転写のアップレギュレーションにつながる<sup>21</sup>。以前の報告と一致して、MEF2C は、TAC モデルで活性化された遺伝子の経路分析において、上流の因子として検出され、MEF2C の活性化は GATA4 の活性化と HDAC の阻害によって媒介されることが示された。特に興味深いのは、圧力過負荷を介した RyR2 の不安定化が、これら 2 つの主要な肥大シグナル伝達経路に必要な 2 つの重要な因子、つまり CaM と  $\text{Ca}^{2+}$  の拡張期増加を同時にもたらすことを示した。この点を支持して、心筋細胞への急性の圧力過負荷が、RyR2 からの CaM の解離を介して、核からの HDAC 輸出と、核への NFAT 輸入を誘導し、薬理的に、もしくは遺伝的に、CaM-RyR2 結合の低下の抑制により、HDAC と NFAT の転送を防いだことを示した(図 9)。

HFpEF は、高齢者の心不全の最も一般的な形態であり、運動不耐性、生活の質の低下、再入院、生存率の低下を特徴とする<sup>31</sup>。ただし、心肥大を伴う拡張機能障害は HFpEF の重要な決定要因で

ある。HFpEF の病因については、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の阻害剤、すなわち ACE 阻害剤、AngII 拮抗薬、アルドステロン阻害剤など、心臓肥大を阻害する可能性のあるすべての治療候補は、HFpEF 患者の予後を改善できていない<sup>31</sup>。よって、最適な治療法は依然として不明であり、HFpEF の効果的な治療が必要とされる。肥大に対するダントロレンの抑制作用は、RyR2 の直接安定化によって媒介されるため、異常な Ca<sup>2+</sup>漏出が関与している限り、さまざまな要因によって引き起こされるあらゆるタイプの肥大に対して有効である可能性がある。したがって、ダントロレンの心肥大に対する抑制作用は HFpEF 治療の新しい候補となる可能性がある。



**図 9** 圧力過負荷によって誘発された心肥大の分子メカニズム。圧力過負荷は最初に ROS 産生を誘発し、次に CaM 解離と Ca<sup>2+</sup>漏出を誘発し、それによって CaM-CaMKII と Ca<sup>2+</sup>-カルシニューリン経路を介した肥大シグナル伝達を活性化する。RyR2 の CaM 結合ドメイン内の V3599K 変異は、RyR2 への CaM 結合を強化し、それによって、圧力過負荷による ROS 生成にもかかわらず、CaM 解離と Ca<sup>2+</sup>漏出を阻害し、したがって肥大シグナル伝達の活性化が抑制される。

## 第 7 章 結語

圧負荷による心肥大、心不全は、ROS を介する RyR2 不安定化（ドメイン間連関障害→CaM 解離→Ca<sup>2+</sup>漏出）により引き起こされ、薬理的に、もしくは遺伝的に CaM と RyR2 の結合親和性を増

強することで、心肥大のシグナル伝達経路を抑制し、それにより心不全への進展を抑制できた。

## 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。

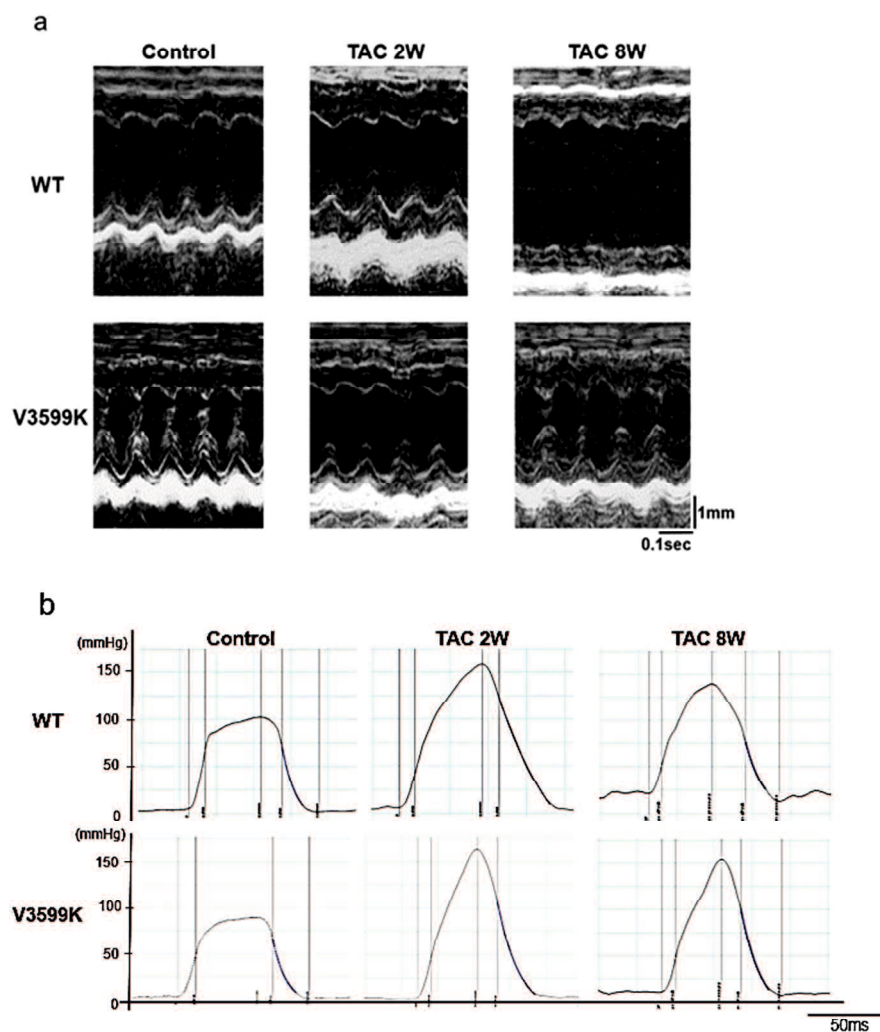
## 第9章 参考文献

1. Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* **56**:56-64 (1975).
2. Hill, J.A. et al. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation* **101**, 2863-9 (2000).
3. Esposito, G. et al. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* **105**, 85-92 (2002).
4. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 23-49 (2008).
5. Sedej, S. et al. 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.* **63**, 1569-79 (2014).
6. Ikemoto, N. & Yamamoto, T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front. Biosci.* **7**, d671-d683 (2002).
7. Oda T. et al. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation* **111**, 3400-3410 (2005).
8. Tateishi, H. et al. Defective domain-domain interactions within the ryanodine receptor as a critical cause of diastolic Ca<sup>2+</sup> leak in failing hearts. *Cardiovasc. Res.* **81**, 536-545 (2009).
9. Yamamoto, T. et al. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation* **117**, 762-772 (2008).
10. Uchinoumi, H. et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ. Res.* **106**, 1413-1424 (2010).
11. Ono, M. et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes

- aberrant Ca<sup>2+</sup> release in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **87**, 609-617 (2010).
12. Hino, A. et al. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc. Res.* **96**, 433-443 (2012).
  13. 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.* **117**, 1344-1353 (2007).
  14. Peng, W. et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science* **354**: aah5324 (2016).
  15. Gong, D. et al. Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin. *Nature* **572**:347-351 (2019).
  16. Tung C. C., Lobo P. A., Kimlicka L. & Van Petegem, F. The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature* **468**, 585-588 (2010).
  17. Nakamura, Y, et al. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight.* **4**. pii: 126112 (2019).
  18. Papineni, .RV.L., O'Connell, K.M.S., Zhang, S., Dirksen, R.T. & Hamilton, S.L. Suramin interacts with the calmodulin binding site on the ryanodine receptor, RYR1. *J. Biol. Chem.* **277**, 49167-49174 (2002).
  19. Hill, A.P., Kingston, O. & Sitsapesan, R. Functional regulation of the cardiac ryanodine receptor by suramin and calmodulin involves multiple binding sites. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1258-1268 (2004).
  20. Anderson, M.E., Brown, J.H. & Bers, D.M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 468-473 (2011)
  21. Heineke, J. & Molkentin, J.D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**:589-600 (2006).
  22. Prosser, B.L., Ward, C.W. & Lederer, W.J. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* **333**, 1440-1445 (2011).
  23. Yano M, et al. Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*, **112**, 3633-3643 (2005).
  24. Kobayashi, S. et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2(R2474S/+) knock-in mouse model. *Circ. J.* **74**, 2579-2584 (2010).
  25. Kobayashi, S. et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain

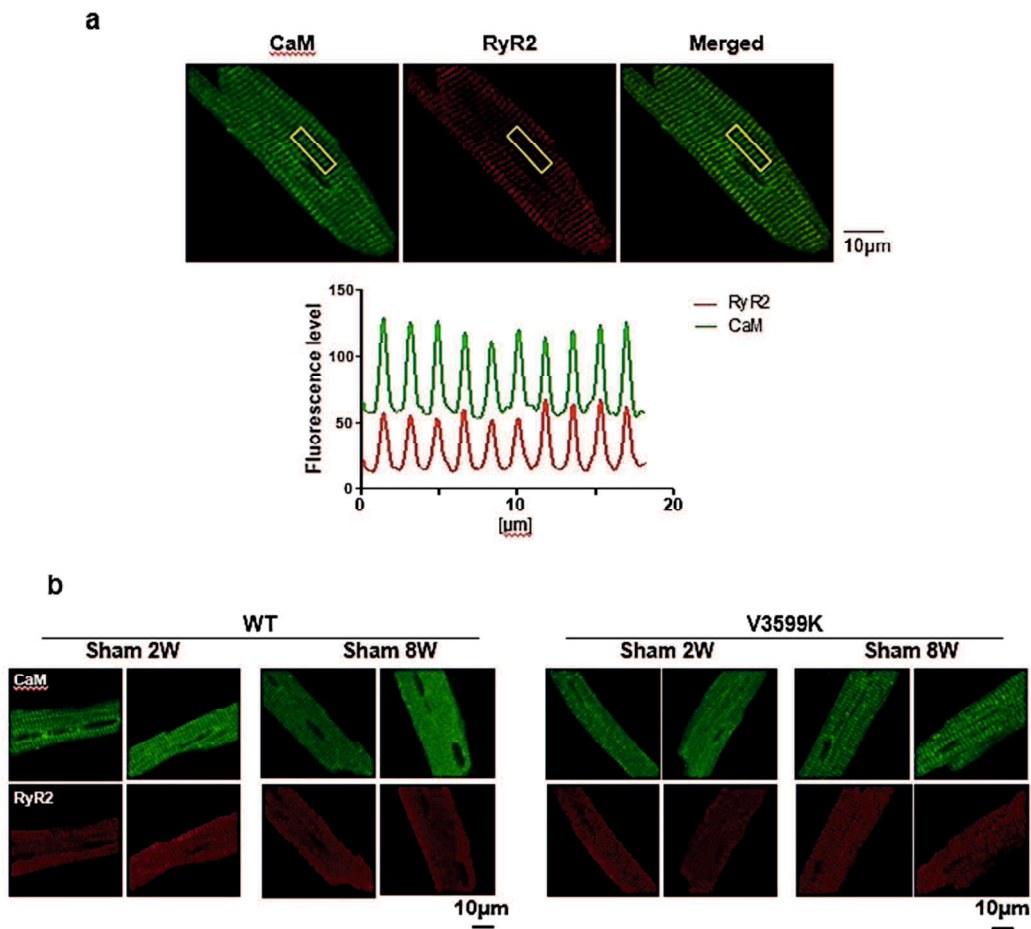
- interactions within the ryanodine receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1993–2005 (2009).
26. Mochizuki, M. et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1722–1732 (2007).
  27. Oda, T. et al. In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding. *Circ. Res.* **112**, 487–497 (2013).
  28. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 387–407 (2018).
  29. Yano, M. et al. FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* **107**, 477–484 (2003).
  30. Yamamoto, T. et al. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation* **117**, 762–772 (2008).
  31. Nanayakkara, S. & Kaye, D.M. Management of heart failure with preserved ejection fraction: a review. *Clin. Ther.* **37**, 2186–2198 (2015).
  32. Picht, E., Zima, A.V., Blatter, L.A., & Bers, D.M. SparkMaster – Automated Calcium Spark Analysis with ImageJ. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C1073–1081 (2007).

## 第10章 補足図

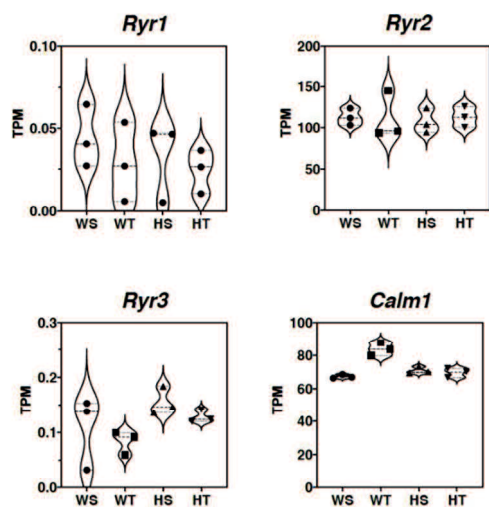


**補足図 1** 心エコー (a) と左室(LV)圧 (b) の代表的な画像。 WT マウスでは、LV は TAC 後 8 週間で壁運動が減少して著しく拡大したが、V3599K マウスではそれは見られなかった。TAC 後、最大左室圧は、WT および V3599K マウスの後で同様に増加した、WT マウスでは V3599K マウスよりも弛緩時間がはるかに延長した。

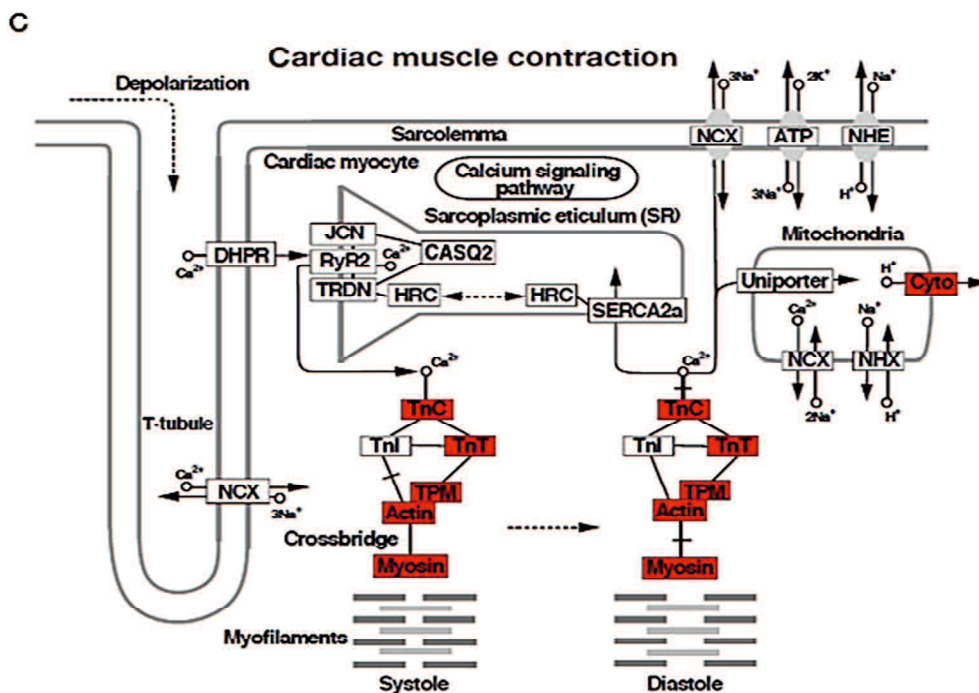
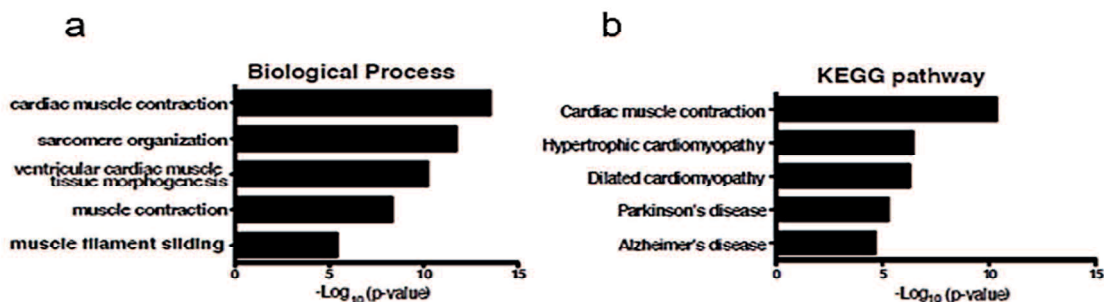




**補足図 2** WT および V3599K 心筋細胞における内因性 CaM の局在および結合特性。(a) (左) WT 心筋細胞で RyR2 と共局在する内因性 CaM の代表的な画像。CaM の免疫染色 (緑) ; 中; RyR2 の免疫染色 (赤)。(右) マージされた画像。(下) CaM (緑) または RyR (赤) の、Alexa 蛍光 (Alexa Fluor 488-結合ヤギ抗ウサギ (A11008、Thermo Fisher Scientific、東京、日本) および Alexa Fluor 633-結合ヤギ抗マウス (A21052、Thermo Fisher Scientific、東京、日本) を用いて蛍光の 2 重免疫染色を行った。CaM はサルコメアとともに検出され、RyR2 とよく共局在を示す。(b) コントロール間 (TAC 前)、およびネガティブコントロールとしての Sham2W、および Sham8W で、RyR2 と共局在した内因性 CaM の代表的な画像を示す。WT および V3599K 間には違いは見られなかった。

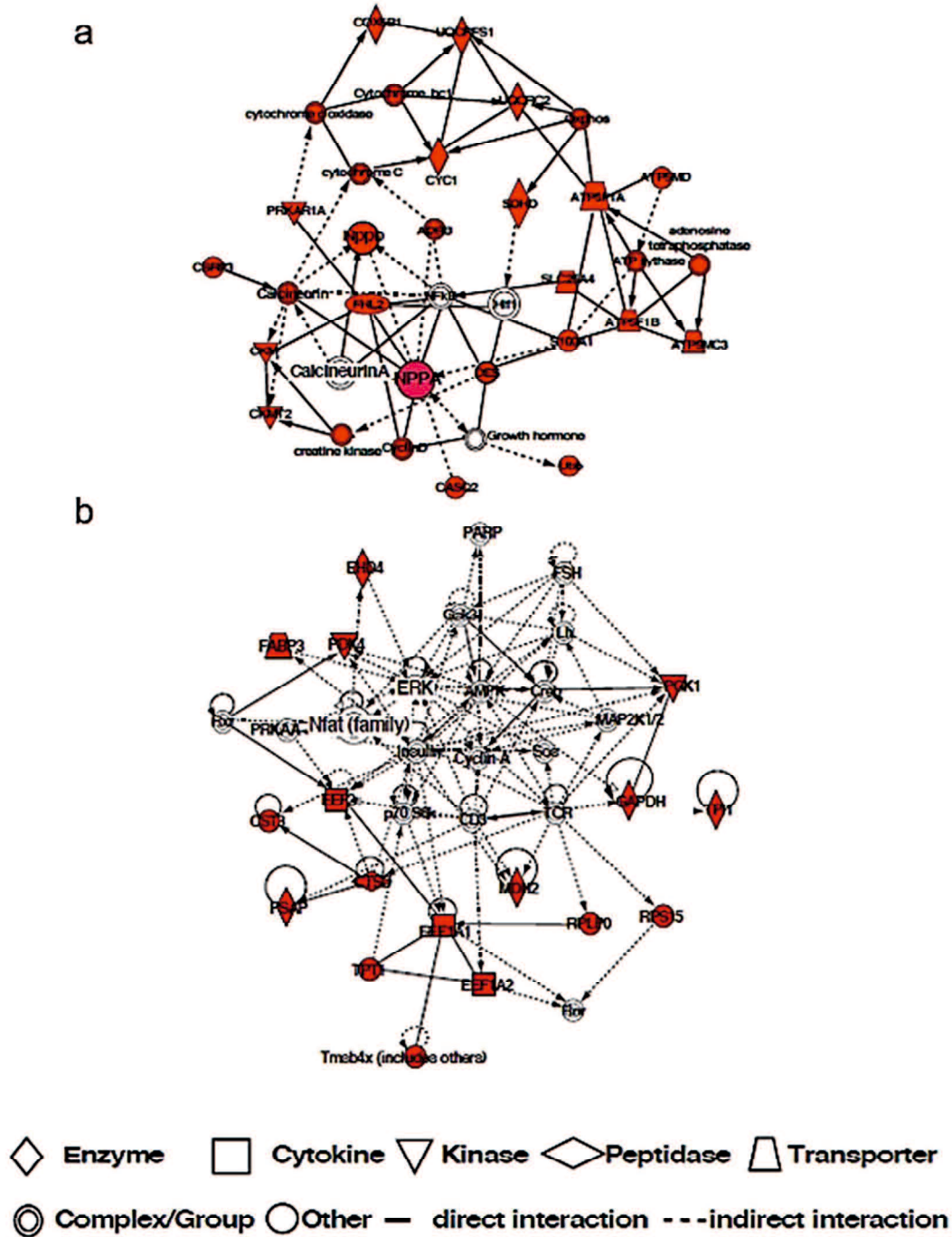


補足図 3 TAC モデルマウスの心臓における RyR スーパーファミリーおよび Calm1 の遺伝子発現のバイオリン図。WT マウスの TAC なし (WS : n = 3) または TAC あり (WT : n = 3) および V3599K マウスの TAC なし (HS : n = 3) または TAC あり (HT : n = 3) の心臓における遺伝子発現は、示された遺伝子のリードカウントから計算し、100 万あたりの転写産物 (TPM) によって正規化した。



補足図 4 TAC モデルマウスにおける心臓の慢性的な圧力過負荷後の遺伝子オントロジー (GO) および KEGG 経路の分析。

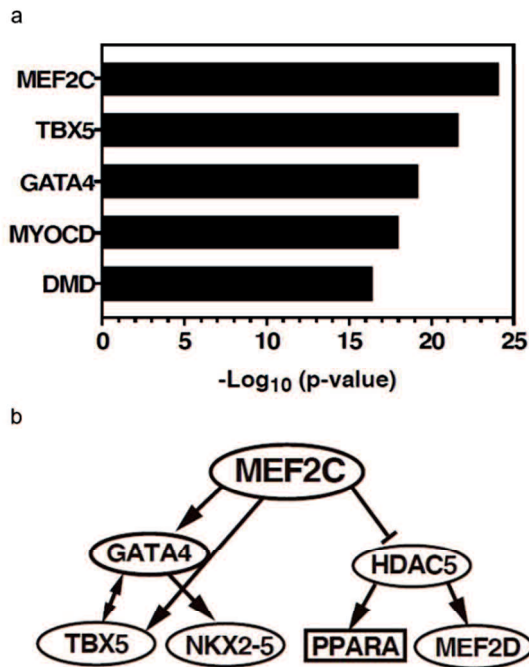
WT マウス {TAC なし (WS : n = 3) または TAC あり (WT : n = 3) } および V3599K マウス {TAC なし (HS : n = 3) または TAC あり (HT : n = 3) } での遺伝子発現を使用して、PCA の PC3 で検出された因子負荷の上位 100 遺伝子を GO (a) および KEGG (b) ソフトウェアで分析し、心筋収縮の経路を KEGG 分析のトップスコア (c) として示した。



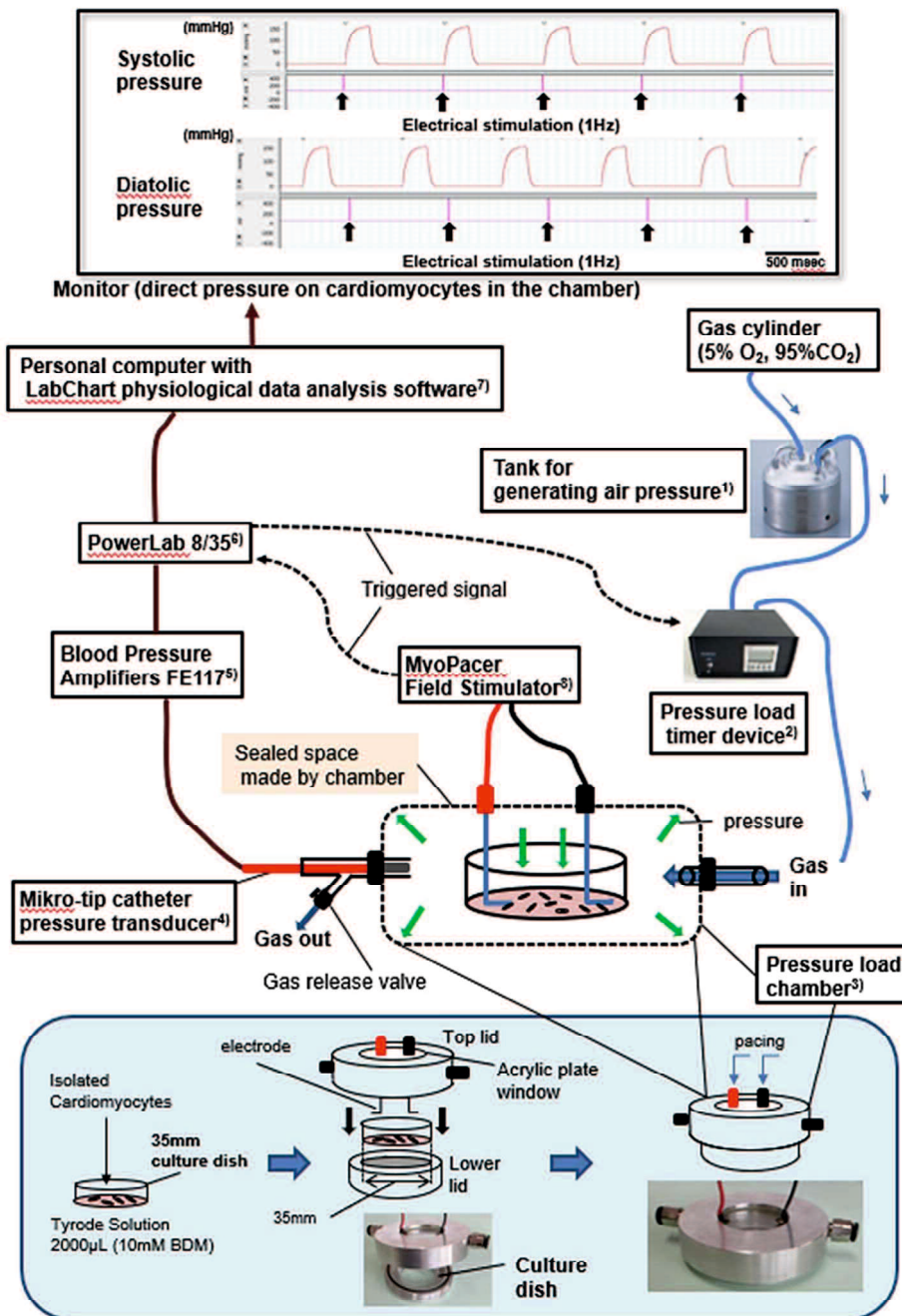
補足図 5 TAC モデルマウスにおける心臓の慢性的な圧力過負荷後の IPA ネットワーク経路の分析。

WT マウス {TAC なし (WS : n = 3) または TAC あり (WT : n = 3) } および V3599K マウス {TAC なし (HS : n = 3) または TAC

あり (HT : n = 3) } ) の遺伝子発現を使用して PCA の PC3 で検出された因子負荷の上位 100 遺伝子を使用して IPA 経路分析を行なった。トップスコア (a) とサードスコア (b) として検出されたネットワーク経路を示した。



**補足図 6** TAC モデルマウスの心臓における慢性的な圧力過負荷後の IPA ネットワーク分析における上流分子。 WT マウス {TAC なし (WS : n = 3) または TAC あり (WT : n = 3) } および V3599K マウス {TAC なし (HS : n = 3) または TAC あり (HT : n = 3) } での遺伝子発現を使用して PCA の PC3 で検出された因子負荷の上位 100 遺伝子を使用して IPA 経路分析を行なった。上流の分子は遺伝子発現のデータから示された (a)。上流分子のトップスコアとして検出された MEF2C のシグナル伝達経路が示された (b)。



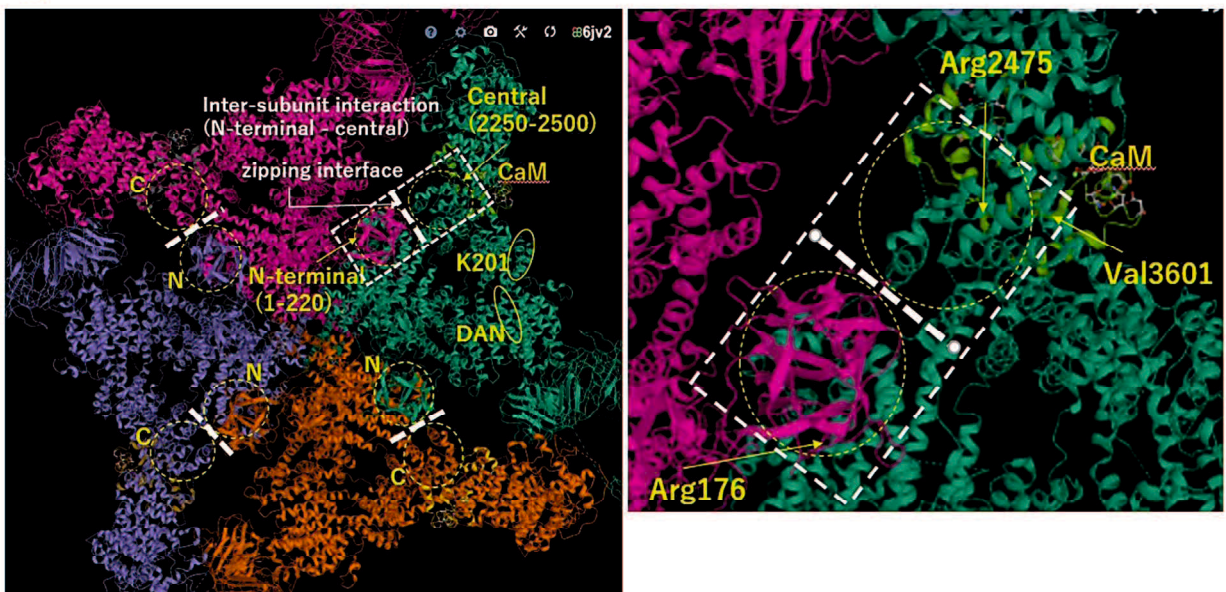
補足図7 単離心筋細胞に課した、空気圧縮を用いた急性圧力過負荷システム。

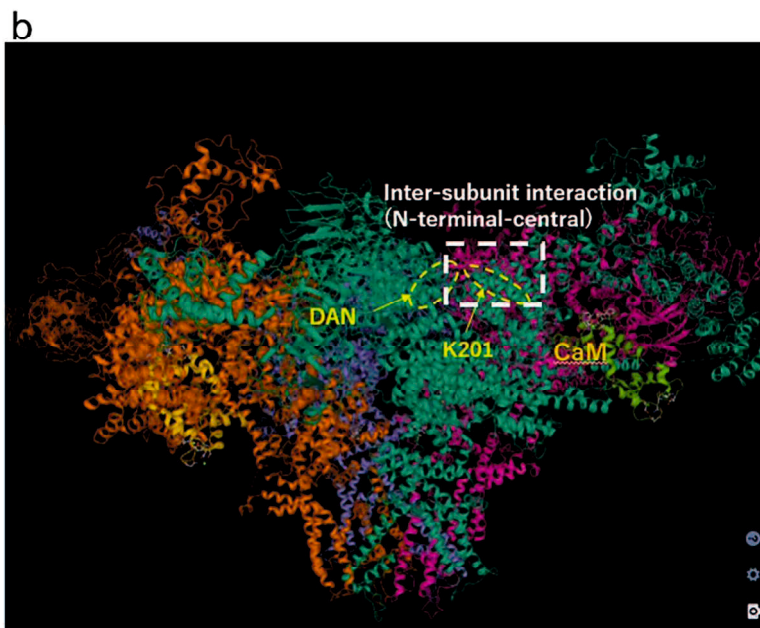
モニターには、電気刺激（1Hz）によってトリガーされた収縮期圧負荷（上）と拡張期圧負荷（下）に対応する代表的な圧力波形を示す。心筋細胞に対する混合ガス（5%O<sub>2</sub>、95%CO<sub>2</sub>）圧縮システムは、1) 空気圧を生成するためのステンレス鋼製のタンク（SKBT-5L、LABTEC、福岡、日本）2) 圧力負荷タイマーデバイス（SKPTC-H5CZ、LABTEC、福岡、日本）3) 培養心筋細胞に直接圧力負荷をかけるためのステンレス鋼チャンバー（SKPTC-35、LABTEC、福岡、日本）4) Mikro-Tip Catherer圧力変換器（Millar Instruments、Inc、ヒューストン、米国）5) 血圧アンプ（FE117 AD Instruments、コロラドスプリングス、米国）6) PowerLab 8/35（AD Instruments、コロラドスプリングス、米国）7) LabChart 生理学的データ分析ソフトウェアを備えたパーソナルコンピューター（AD Instruments、コロラドスプリ



グス、米国) 8) MyoPacer フィールドスティミュレーター (ION Optix、ウェストウッド、米国) で構成される。高圧ガスボンベ (5%O<sub>2</sub>、95%CO<sub>2</sub>) に接続されたタンクは、チャンパー内の心筋細胞に対する圧力負荷の大きさを自由に制御でき、圧力負荷タイマーデバイスは、MyoPacer フィールド刺激装置からの電気刺激によってトリガーされるバルブを有しており、そのバルブ開閉により圧負荷の持続時間とタイミングを自由に制御可能である。制御空気圧は、圧力負荷チャンパーの1つの入口から送られる。下部のパネルに示されているように、方法のセクションで述べたように心臓から心室筋細胞を分離した後、直径 35mm のラミニンコーティングされたガラス培養皿の底に 100~200 個の単離心筋細胞を培養し、2000  $\mu$ l のタイロッドソリューションでインキュベーションした。次に、肥大シグナル伝達に対する収縮の影響を除くために、すべての実験は、2,3-ブタンジオンモノキシム (BDM) の存在下で施行された。カスタムオーダーの圧力負荷チャンパーは、ステンレス鋼製の上蓋と下蓋で構成される。直径 35mm の皿を下蓋に正確に入れ、上蓋をしっかりと固定した。ガラス培養皿内の心筋細胞はステンレス鋼チャンパーによって密閉されているため、圧力は心筋細胞全体で均一に課される。心筋細胞への急性圧力過負荷の間、心筋細胞の動きはなかった。Mikro-Tip Catherer 圧力トランスデューサー (Millar Instruments、Inc、ヒューストン、米国) は、圧力負荷チャンパーで作られた密閉空間に設置されている。したがって、チャンパー内の心筋細胞への圧力負荷の大きさは、確立されたカテーテルチップマノメーター法によって正確に測定され、血圧増幅器 PE117 および PowerLab8 / 35 を介してパーソナルコンピュータによりモニターされる。LabChart (生理学的データ分析ソフトウェア) により、データの取得と分析が行われた。

a





**補足図 8** RyR2 のジッピングインターフェースと CaM 結合部位間のドメイン間クロストーク (3D 構造は PDB ID: 6JV2、参考文献 15 から参照)。四量体としての RyR2 の平面図 (a) と側面図 (b)。N 末端ドメイン (1-220: 赤) と中央ドメイン (2250-2500: 緑) 間のインターフェース (RyR2 のジッピングインターフェース) はサブユニット間相互作用を形成し、CaM 結合ドメイン (3583-3603: 黄緑) に近接している。興味深いことに、ダントロレンの結合部位 (601-620)<sup>25</sup> や別の RyR2 安定剤である K201 (JTV519) (2114-2149)<sup>30</sup> の結合部位は、RyR2 のジッピングインターフェースに隣接している。

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Target molecules in dataset
MEF2C	transcription regulator	7.70E-25	ACTA1, ACTC1, ACTN2, CASQ2, CKM, COL1A1, COL3A1, DES, HSPB7, LMOD2, MYH6, MYH7, MYL2, MYOM1, NPPA, POSTN, TNNC1, TNNT2, VIM
TBX5	transcription regulator	2.22E-22	ACTC1, ACTN2, ANKRD1, CASQ2, COL1A1, COL3A1, DES, HSPB7, MYH6, MYL2, NPPA, POSTN, TNNC1, TNNT2, VIM
GATA4	transcription regulator	6.03E-20	ACTA1, ACTC1, ACTN2, ANKRD1, CASQ2, COL1A1, COL3A1, DES, HSPB7, MYH6, MYH7, MYL2, NPPA, Nppb, POSTN, TNNC1, TNNT2, VIM
MYOCD	transcription regulator	9.55E-19	ACTA1, ACTC1, ACTN2, CASQ2, COL1A1, COL3A1, DES, HSPB7, MYH6, MYH7, MYL2, NPPA, TNNC1, TNNT2
DMD	other	3.68E-17	ACTG1, ANKRD1, BGN, CKMT2, COL3A1, EEF1A1, FTH1, HSPA8, HSPB6, LYZ, MYBPC3, MYH7, PDK4, POSTN, Tmsb4x (includes others), TPI1, VIM

**補足表 1** TAC を用いたマウス心臓における PC3 の因子負荷における上位 100 遺伝子の上流分析。