

学位論文 (博士)

Stabilization of RyR2 maintains right ventricular  
function, reduces the development of ventricular  
arrhythmias, and improves prognosis in  
pulmonary hypertension

(RyR2 の安定化による右室機能の維持、心室性不  
整脈発症の軽減、および肺高血圧症の予後の改善)

氏名 田中 慎二

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態内科科学講座

令和 4 年 6 月

## 目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	2
5. 結果	5
6. 考察	13
7. 結語	18
8. 制限事項	18
9. 謝辞	18
10. 参考文献	18

## 1. 要旨

右心室 (RV) の機能障害とそれに関連する不整脈は、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の予後の重要な決定要因として認識されている。今回心臓リアノジン受容体 (RyR2) の安定剤であるダントロレン (DAN) による右室心筋への直接的な薬理的介入が、モノクロタリン (MCT) 誘発性 PAH ラットモデルにおいて RV 機能障害および不整脈に対する保護効果を有するかどうかを調査することを目的とした。方法として雄の 8 週齢の Sprague-Dawley ラットに、PAH の誘発のために MCT を腹腔内投与した。カテコールアミンによる心室頻拍 (VT) の誘発も、単離された心筋細胞における RyR2 を介した  $Ca^{2+}$  放出特性に関連して評価された。RV の形態と機能に対する慢性的な圧力過負荷の独立した影響を評価するために、肺動脈縮窄モデルも確立した。結果、MCT 誘発 PAH ラットモデルでは、RV 肥大、拡張、および機能低下が観察され、MCT 誘発 2 か月後の生存率は 0% であった。対照的に、慢性 DAN 治療はこれらすべての RV パラメーターを改善し、生存率を 80% に増加させた。慢性的な DAN 治療はまた、RyR2 からのカルモジュリンの解離を防ぎ、それによって MCT によって誘発された肥大した RV 心筋細胞における  $Ca^{2+}$  スパークと自発的な  $Ca^{2+}$  トランジェントを抑制した。エピネフリンは、MCT 誘発性 PAH のラットの 50% 以上で VT を誘発したが、慢性 DAN 治療によって VT の完全に抑制した。以上より DAN による RyR2 の安定化は、PAH に関連する RV 機能障害および致命的な不整脈の発症に対する新しい治療薬としての可能性を秘めている。

## 2. 研究の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は予後不良の疾患であり、その有病率は増加している (1)。近年、ホスホジエステラーゼ-5 阻害剤、エンドセリン拮抗薬、プロスタグランジンからなる 3 剤併用療法により予後は改善したが (2-5)、進行した右室不全の患者の予後は、世界的にも日本においても依然として不良である (6-8)。PAH の予後不良の理由の 1 つは、慢性的な圧力過負荷による RV 機能障害を直接修正する効果的な方法が今のところないことである。

頻脈誘発性のイヌ心不全モデル (9)、横大動脈縮窄 (TAC) マウスモデル (10, 11)、およびカテコールアミン作動性多形性心室頻拍 (CPVT) タイプ R2474S / 1 ノックイン (KI) マウスモデルにおいて (12-14)、 $Ca^{2+}$  漏出はリアノジン受容体 (RyR2) の N 末端ドメインと中央ドメイン間のドメイン間相互作用の欠陥、いわゆるドメイン解糖によって RyR2 に対するカルモジュリン (CaM) の結合親和性が低下することで生じ、その結果心不全や致命的な不整脈を引き起こすことを実証した (12, 15, 16)。最近では、RyR2 の CaM 結合ドメイン (3584-3603) で 25 の変異ペプチドをスクリーニングし、RyR2 に対する CaM の結合親和性を大幅に高める単一のアミノ酸変異 (V3599K) を発見し、RyR2 V3599K KI マウスを開発した (17)。これらのマウスを R2474S CPVT 関連マウスと交配させると、カテ

コールアミン刺激性 CaM 解離が抑制され、運動誘発性心室頻拍 (VT) が抑制された (17)。さらに、この V3599K KI マウスでは、TAC マウスモデルでは左室肥大および心不全を誘発しなかった。これは RyR2 からの CaM の解離とそれに続く Ca<sup>2+</sup> 漏出は、圧力過負荷によって誘発される肥大と心不全の発症に不可欠であることを示唆している(18)。

したがって、心臓肥大自体は初期のいわゆる代償期からでさえ、圧力過負荷によって誘発される心不全の予後不良因子である。圧力過負荷の発生から細胞レベルで心肥大を抑制することは、血管拡張のみに依存することなく、圧力過負荷によって誘発される心不全の予後を改善する可能性がある。この点について、悪性高熱症の治療薬であるダントロレン (DAN) は、N 末端領域 (アミノ酸[a.a.] 601-620) に直接結合することによって、RyR2 に対する CaM の結合親和性を高め、Ca<sup>2+</sup>の漏出を抑制し(16, 19)、圧力過負荷によって誘発される心臓肥大(18, 20)および不整脈につながる細胞内シグナル伝達を防止することを示した(11)。

### 3. 目的

本研究では DAN による圧力過負荷誘発性肥大の抑制が RV 機能を改善し、致命的な不整脈を減少させ、モノクロタリン (MCT) 誘発性 PAH のラットの予後を改善するかどうかを調査した。

### 4. 方法

#### 4. 1 実験動物

この研究は、米国国立衛生研究所が発行した実験動物の管理と使用に関するガイド (NIH Publication No. 85-23、1996 年改訂) に準拠している。すべての実験プロトコルは、山口大学医学部の動物倫理委員会によって承認された。動物の世話と使用されたプロトコルは、山口大学医学部の動物倫理委員会からのガイドラインに従った。

すべての実験は、8 週齢のオスの Sprague-Dawley ラット (体重 200~240 g) で実施された。PAH は、MCT の腹腔内投与によって誘発された (60 mg/kg body weight、1.0 N 塩酸に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.4 に調整) (21)。ラットはランダムに 12 匹ずつ 4 つのグループに分けられた：①溶媒のみを注射したラット (Sham グループ)、②溶媒と MCT を注射したラット (MCT グループ)、③MCT を注射して DAN を与えたラット (MCT+DAN グループ)、④溶媒を注射して DAN を与えたラット (DAN グループ)。

DAN (富士フィルム和光純薬、東京、日本) は、給餌装置 (Rodent CAFE、オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本) を使用して 100mg / (kg · d) で経口投与された。

次に、肺動脈縮窄 (PAB) ラットはランダムにそれぞれ 8 匹ずつの 2 つのグループに分けられた：①PAB ラット (PAB グループ) と②100 mg / (kg · d) の DAN を与えた PAB ラット (PAB+DAN グループ)。

#### 4. 2 心エコー図

心機能は、7.5 MHz プローブ (UST-5413) 搭載の F37 超音波装置 (Hitachi Medical、オランダ) を使用して分析した。ラットを 0.2mg/kg のメデトミジン、1.0mg / kg のミダゾラム、および 1.25mg/kg のブトルファノールで麻酔した。

#### 4. 3 RV 圧力測定

圧力測定中、ラットを 0.2mg / kg のメデトミジン、1.0mg / kg のミダゾラム、および 1.25mg/kg のブトルファノールで麻酔した。Millar Mikro-tip カテーテル (2Fr) を右頸静脈から挿入した後、PowerLab および LabChart ソフトウェア (v7.3.8; AD Instruments) を使用して 1kHz で RV 圧をサンプリングした。

#### 4. 4 不整脈誘発テスト

心電図送信機 (Data Sciences International、ミネソタ州セントポール) は、皮下電極と共に背部に埋め込んだ。心電図は、ベースライン時とエピネフリン (1 mg / kg body weight、腹腔内) の注射後に記録し、30 分間モニターした。600 ビート/分以上で 3 ビート以上続いた場合 VT エピソードとしてカウントした。

#### 4. 5 心筋細胞の単離

心筋細胞は、ほぼ従来通りに(12)、MCT 注射後 4 週間でラット心臓から単離培養された。ラットをペントバルビタールナトリウム (100mg / kg 体重、i.p.) で麻酔し、挿管し、空気で換気した。胸部を切開し、心臓を素早く摘出し、コラゲナーゼを含まない緩衝液で逆行的に定常流で灌流した。50 $\mu$ mol/ LCa<sup>2+</sup>、0.5 mg / mL コラゲナーゼ B、0.5 mg / mL コラゲナーゼ D、および 0.02 mg/mL プロテアーゼタイプ XIV を含む 95%O<sub>2</sub> および 5%CO<sub>2</sub> でバブルした培養液 (Sigma、セントルイス、MO、USA) で逆行性に灌流し、LV および RV 心筋を新鮮なコラゲナーゼ含有バッファー中ではさみで細かく切り刻み、ロッド形状の心筋細胞を調製した。培養液を交換し、Ca<sup>2+</sup>濃度を最終濃度 1 mmol / L まで徐々に増加させた (50 $\mu$ mol/ L、100 $\mu$ mol/ L、300 $\mu$ mol/ L、600 $\mu$ mol/ L、そして最終的には 1 mmol / L)。単離された心筋細胞をラミニンでコーティングされたガラス培養皿に移し、5%CO<sub>2</sub>、95%O<sub>2</sub>、37°C で数時間培養した。

#### 4. 6 内因性 RyR2 結合 CaM の蛍光抗体分析

単離された心筋細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した。その後、心筋細胞を 1%ウシ血清アルブミンおよび 0.5%Triton X-100 で希釈した抗 CaM 抗体 (EP799Y、abCaM) および抗 RyR 抗体 (C3-33、Sigma-Aldrich) で 4°C で一晩反応させた。次に Alexa488 結合ヤギ抗ウサギおよび Alexa633 結合ヤギ抗マウス二次抗体で標識しました。Alexa633 および Alexa488 蛍光強度のサルコメアに関連した周期的増加は、長軸方向に

25 $\mu$ m ほど選択されベースラインからの立ち上がりで積算し距離で割り、1 サルコメアあたりの平均値となるように計算し、RyR 蛋白量および RyR 結合 CaM の蛋白量とした。

#### 4. 7 Ca<sup>2+</sup>スパークと筋小胞体 (SR) の Ca<sup>2+</sup>含有量の分析

Ca<sup>2+</sup>スパークは従来通り(12)、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM-510、カールツァイス) を使用して観察した。心筋細胞に、24°Cで 20 分間、fluo-4 AM (20 $\mu$ M) をローディングした。ラインスキャンモードを使用し核以外の部分で、縦軸方向に単一の心筋細胞を繰り返しスキャンした。Ca<sup>2+</sup>スパークを評価するために、Ca<sup>2+</sup>トランジェントが定常状態に達するまで 30 秒間 1Hz で心筋細胞を刺激した。刺激を停止し、その後の約 10 秒間の Ca<sup>2+</sup>スパークを記録した。データは、迅速で信頼性の高いスパーク分析を可能にする自動分析プログラムである SparkMaster を使用して分析された(23)。分析された変数には検出されたスパークの数や頻度など、一般的な画像パラメータが含まれていた。SR Ca<sup>2+</sup>含有量を評価するために、カフェイン (10 mM) を急速に灌流して、筋小胞体内の Ca<sup>2+</sup>を放出させた。

#### 4. 8 心筋細胞における Ca<sup>2+</sup>トランジェントのモニタリング

単離された心室心筋細胞は、20 $\mu$ M の Fluo4 AM とともに室温で 20 分間反応され、従来通り(12)、タイロッド液で 2 回洗浄された。すべての実験は 24°Cで実施された。電場電気刺激装置 (IonOptix、マサチューセッツ州、米国) によって刺激された細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>測定値は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM-510、CarlZeiss) および蛍光デジタル顕微鏡 (BZ9000、キーエンス、日本) を使用して取得した。1、2、3、4、および 5Hz で刺激を停止したときの自発的な Ca<sup>2+</sup>放出の発生を測定した(10,14,24)。

#### 4. 9 組織学的分析

研究開始から 4 週間で心臓を 10%ホルマリンで固定した。形態計測分析のために、4 腔の断面が選択された。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を各断面で実施した。

#### 4. 10 統計分析

正規分布の 4 つのグループでは事後 Tukey's 検定による一元配置分散分析を使用して統計的比較を行った。正規分布でない 4 つのグループでは事後 Dunn's 検定による Kruskal-wallis 検定を使用して統計的比較を行った。4 つのグループのイベント発生率データを評価するために、事後ライアンの方法による  $\chi^2$  検定が使用された。生存率に対する DAN の影響を調査するために、 Kaplan-Meier プロットが各グループに対して生成され、ログランク検定が実行された。

## 5. 結果

### 5. 1 DAN は MCT 誘発性 PAH のラットにおける RV 機能障害の予防による予後の改善する

すべての MCT 群は、MCT 投与後 2 か月以内に死亡した。しかし、MCT+DAN 群では予後は改善された (図 1A および 1B)。死亡直後に 5 匹の MCT 治療ラットを解剖し、すべてのラットに胸水を認めた。これは、死因が右心不全である可能性を示唆している。MCT 群では RV は LV の減少とともに拡大したが、MCT+DAN グループでは防止された (図 1C)。RV 圧は、MCT 群で増加したが、MCT+DAN 群では適度に減少した (図 1D)。RV 重量は MCT 群で増加したが、DAN 治療はその増加を抑制した。LV 重量はすべての群で同様であった (図 1E)。RV 壁のコラーゲン量は、MCT 群の方が sham 群よりも有意に多かったが、MCT+DAN 群では抑制されていた (図 1E)。DAN は、測定されたパラメータのいずれについても、Sham に影響を与えなかった。

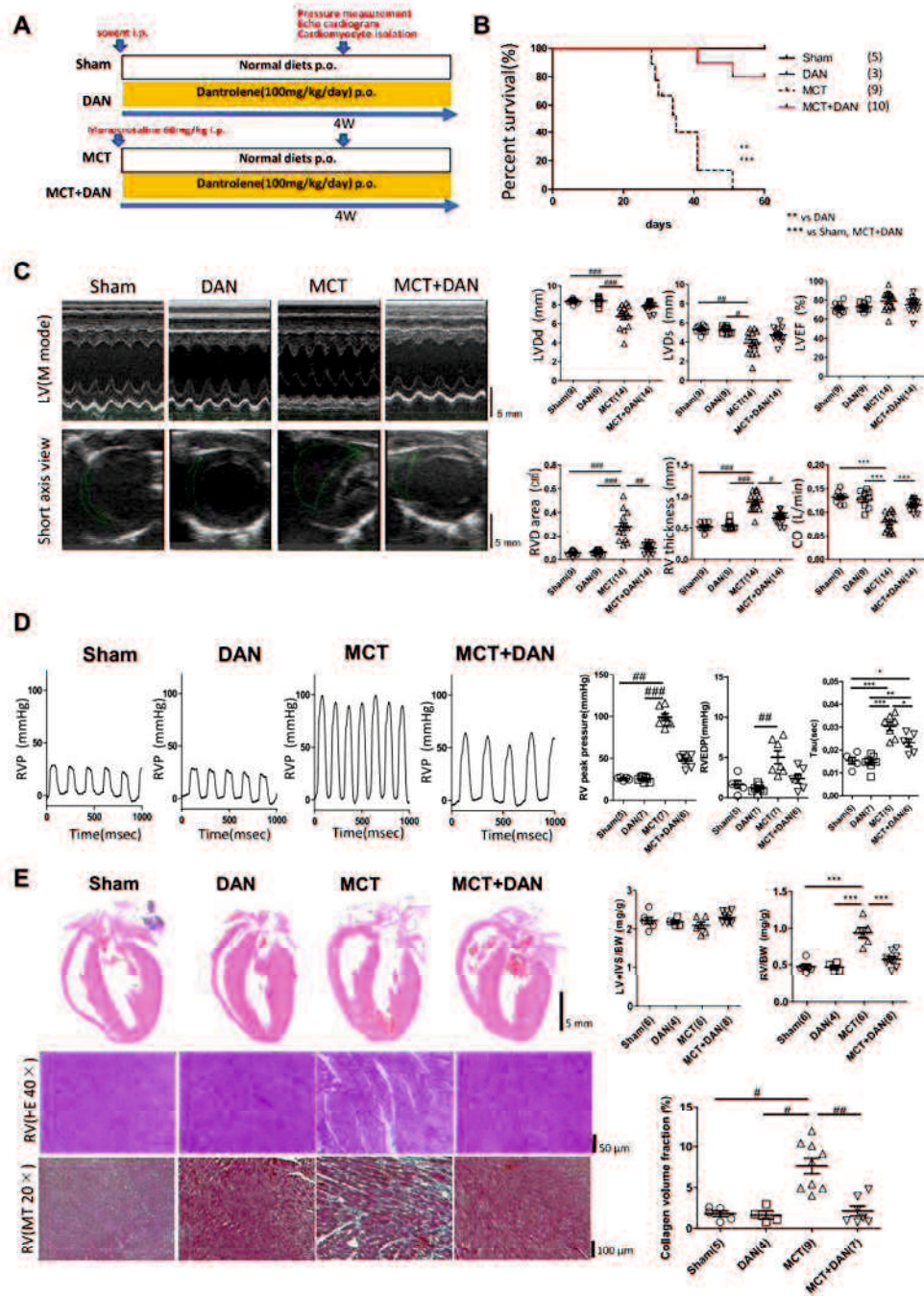


図1 研究デザイン、生存分析、心エコー図、RV 圧力曲線、および組織。

A: MCT 誘発 PAH ラットモデルの研究デザイン。B: カプランマイヤー生存曲線。括弧内の値はラットの数を示す。C: 代表的な心エコー図と要約データ (n=9-14)。D: 代表的な RV 圧力曲線と要約データ (n=5-7)。E: 心臓の長軸切片と HE または MT で染色された RV 組織の代表的な画像。要約された RV および LV 重量データ (n=4-8) を右上のパネルに表示。MT 染色された RV 組織から得られた RV 自由壁の線維性領域を右下のパネルに表示 (n=4-9;各ラットから対物レンズ 20 倍の 3 つの画像が分析されている)。

\*\* P<.01, \*\*\* P<.001 (ログランク検定) パネル B。 \*\* P<.01, \*\*\* P<.001 (分散分析と事後 Tukey 検定による) パネル C、D、および E。 # P<.05, ## P<.01, ### P<.001 (Kruskal-Wallis 検定と事後 Dunn's 検定による) パネル C、D、および E。



## 5. 2 DAN は MCT 誘発性 PAH のラットの誘発性 VT を予防する

カフェインとエピネフリンの注射は、MCT 群では頻繁に持続する二段脈と VT を誘発したが、MCT+DAN 群では誘発しなかった (図 2A)。観察された不整脈発生エピソードは図 2B に要約されている。

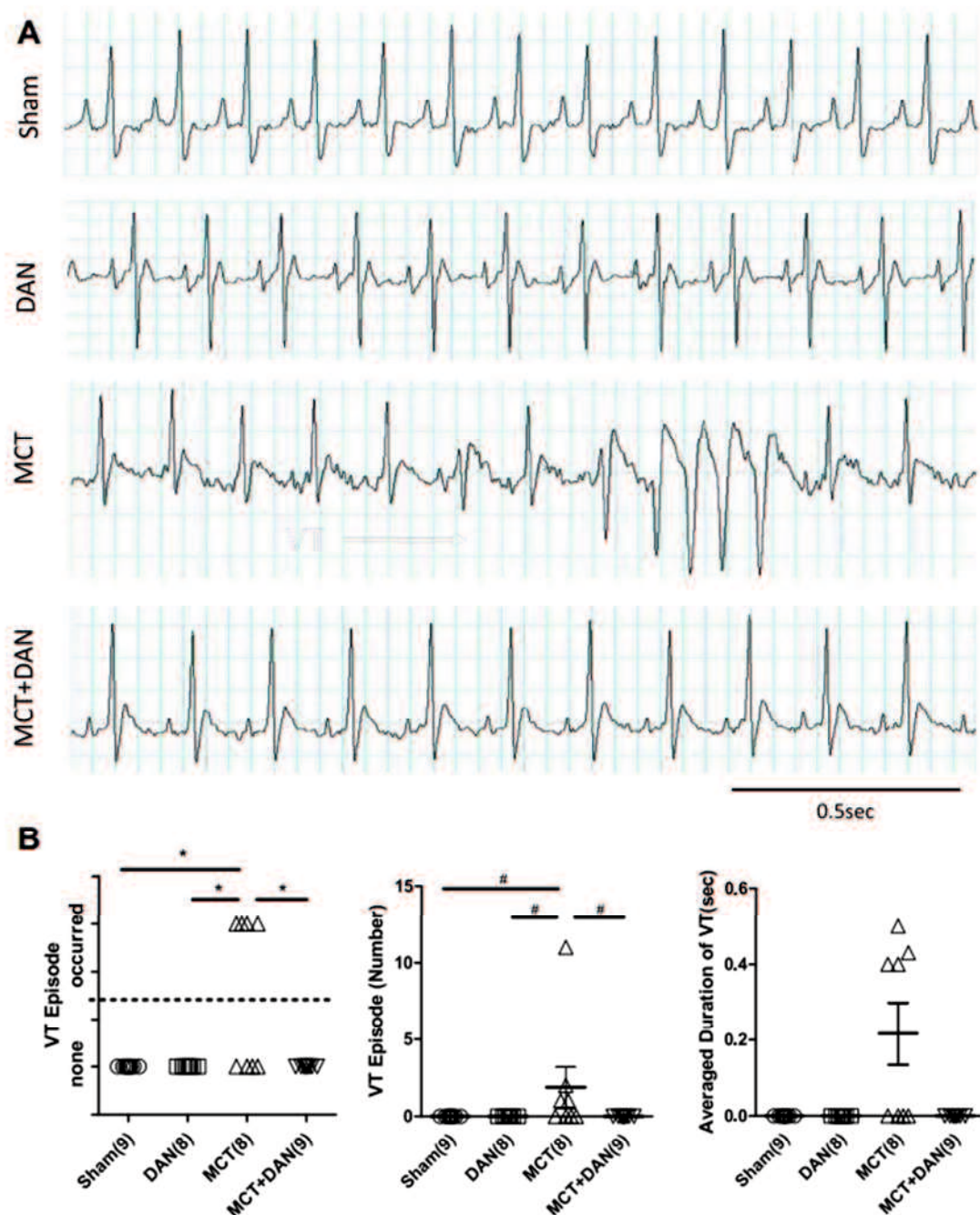


図 2 MCT 誘発性 PAH のラットにおけるエピネフリン誘発性心室性不整脈に対する DAN の抑制効果。

A : エピネフリン (1 mg / kg 体重、腹腔内) による刺激時の代表的な心電図。 B : 8~9 匹のラットの要約データ。 \* P<.05 (事後ライアンの方法による  $\chi^2$  検定)。 #P<.05 (Kruskal-Wallis 検定と事後 Dunn's 検定による)

### 5. 3 DANはMCT誘発性PAHのラットの心筋細胞肥大と弛緩障害を予防する

インビボデータと一致して、RV心筋細胞肥大はMCT群で観察されたが、MCT+DAN群では観察されなかった(図3A)。サルコメア短縮とピークCa<sup>2+</sup>トランジェントは、MCTとMCT+DAN心筋細胞の間で同等であった。ただし、サルコメア短縮とCa<sup>2+</sup>トランジェントの両方で、ピークから80%の低下までの時間は、MCT心筋細胞では延長されたが、MCT+DAN心筋細胞では改善された(図3B)。これらの結果は、肥大によって誘発された心筋細胞弛緩の悪化が、DANによって改善され得ることを示唆している。

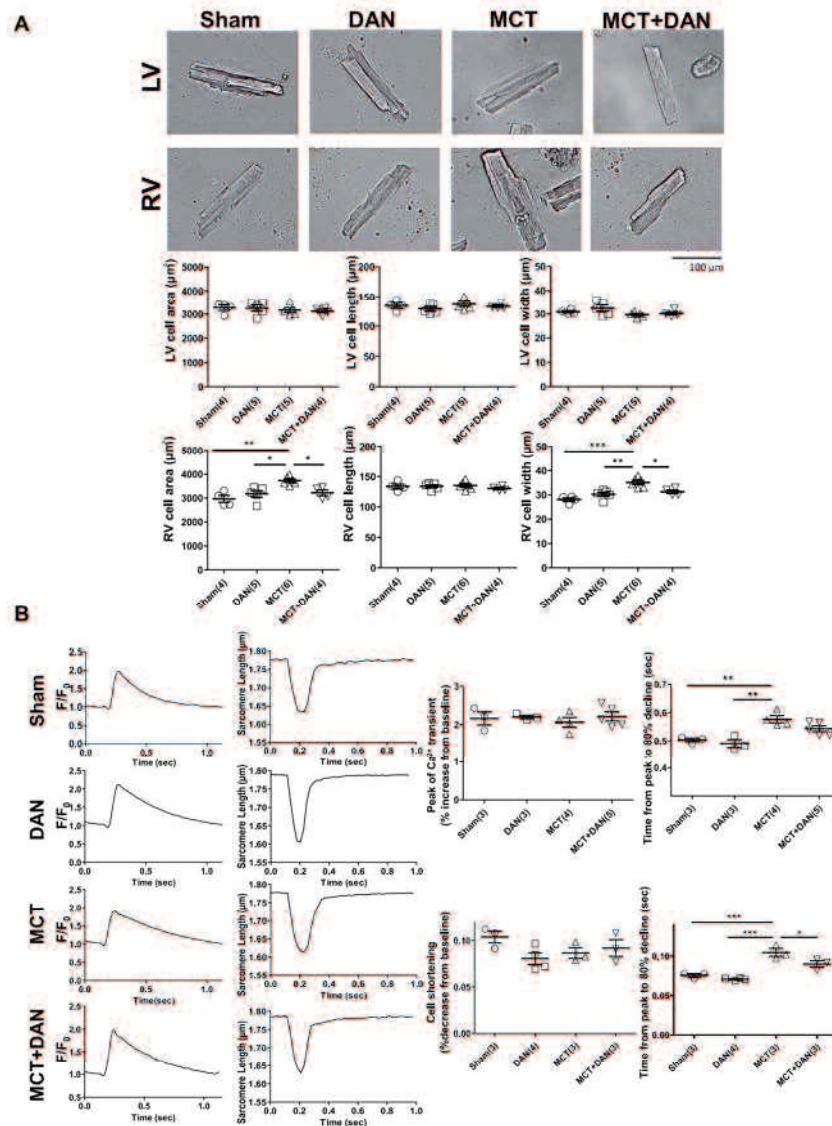


図3 心筋細胞の形態、Ca<sup>2+</sup>トランジェント、および細胞収縮。

A: 単離細胞の代表的な画像と、細胞幅、細胞長、および細胞面積の要約データ (4~6個の心臓からのn=219~823の細胞)。B: 1HzのペーシングレートでのFluo-4 AM (Dojindo、熊本、日本) 蛍光シグナルとサルコメア長の代表的な記録と要約データ (Fluo-4 AM 蛍光シグナル: n=30~100の細胞(3~5個の心臓);サルコメアの長さ: n=18~37個の細胞 (3~4個の心臓))。\* P<.05, \*\* P<.01, \*\*\* P<.001 (分散分析と事後Tukey検定による)。

5. 4 DANはMCT誘発性PAHのラットから単離された心筋細胞の異常なCa<sup>2+</sup>放出と自発的なCa<sup>2+</sup>トランジェントを抑制する

MCT心筋細胞ではCa<sup>2+</sup>スパーク頻度が増加し、Ca<sup>2+</sup>トランジェントが延長されたが、これらの異常はMCT+DAN心筋細胞では観察されなかった(図4A)。筋小胞体のCa<sup>2+</sup>含有量は、MCT心筋細胞では減少したが、MCT+DAN心筋細胞では減少しなかった(図4A)。自発的なCa<sup>2+</sup>トランジェントは、MCT心筋細胞では増加したが、MCT+DAN心筋細胞では抑制された(図4B)。

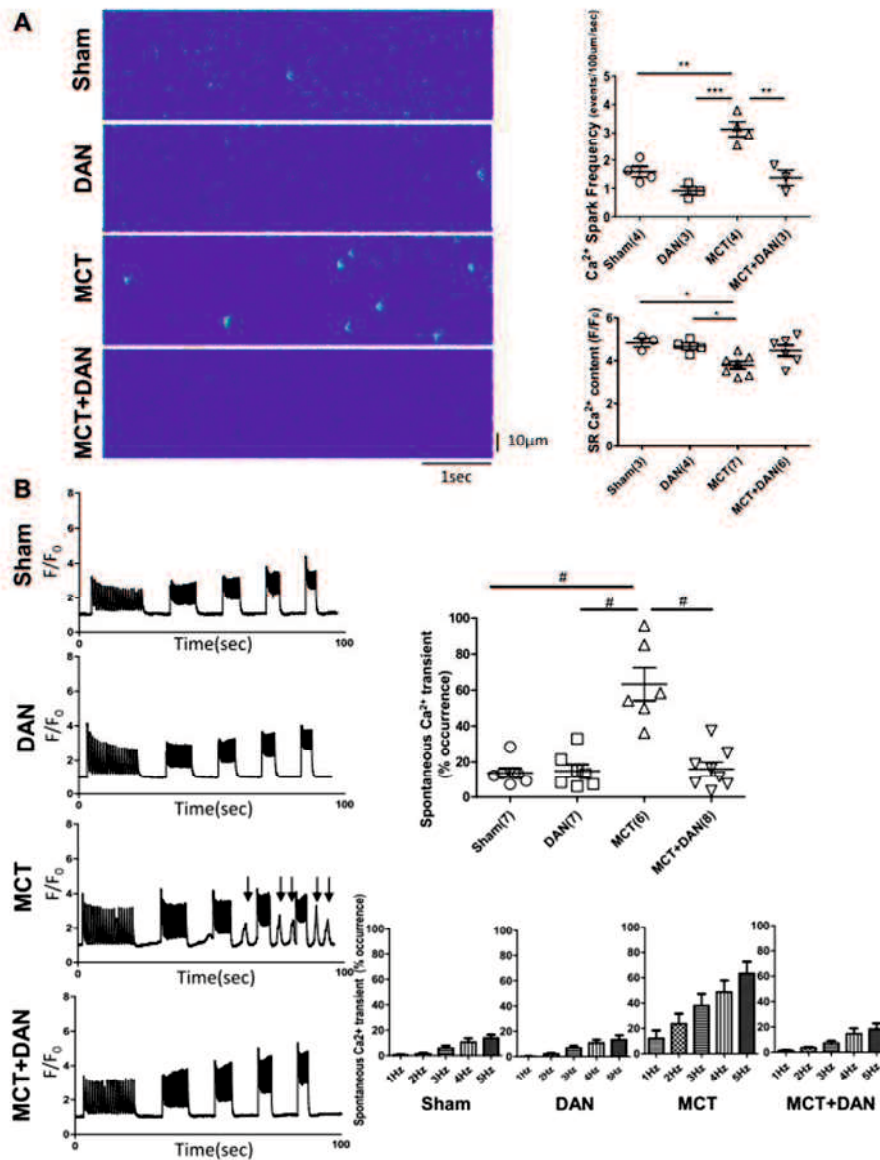


図4 心筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>スパーク、SR Ca<sup>2+</sup>含有量、およびSCaT。

A: 自発的なCa<sup>2+</sup>スパークの代表的な記録。左側は、心筋細胞におけるFluo-4AM蛍光のラインスキャン画像の記録。右側の要約データ(3~4個の心臓からのn=16~25個の細胞)。SR Ca<sup>2+</sup>含有量は、次のように測定された。カフェインによって誘発されるCa<sup>2+</sup>トランジェントは、最初に2 Hzで刺激し、次に灌流溶液から20 mMカフェインを含む溶

液に 5~6 秒間ですばやく切り替えることによって測定された。要約されたデータは、右下のパネルに示されている (3~7 個の心臓からの n=67~129 個の細胞)。 B : 左側、SCaT の代表的なトレース。右側は SCaT の発生率を要約したデータ (6~8 個の心臓からの n=220~276 個の細胞)。矢印は SCaT を示す。SCaT は、1、2、3、4、および 5Hz の刺激でペーシングを停止した後誘導された。個々のラットの値は、平均の標準誤差としてプロットされる。パネル A \* P<.05, \*\* P<.01, \*\*\* P<.001 (分散分析と事後 Tukey 検定による)。パネル B #P<.05, ## P<.01, ### P<.001 (Kruskal-Wallis 検定と事後 Dunn's 検定による)。

## 5. 5 MCT 誘発 PAH のラットから単離された心筋細胞における RyR2 に結合した内因性 CaM の減少

RyR2 に結合した内因性 CaM は、免疫蛍光染色によって測定された。 RyR2 に結合した CaM の量は、MCT 心筋細胞では大幅に減少したが、MCT+DAN 心筋細胞では回復した (図 5)。

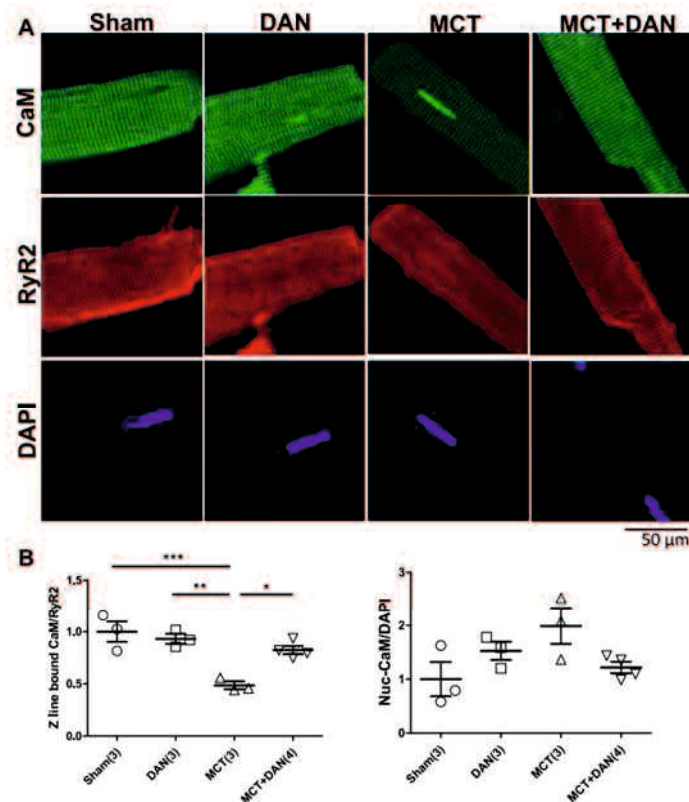


図 5 心筋細胞における内因性 CaM の局在と結合特性。

A : 単離心筋での 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) ; RyR2 の免疫染色

(赤)。 B : Z ライン結合および核 CaM の要約データ。 Z ラインに結合した CaM の免疫蛍光シグナルを RyR2 のシグナルで除算し、コントロール (sham のベースライン) に対して正規化し、比率として表した。核内の CaM の免疫蛍光シグナルを DAPI のシグナルで除算し、コントロール (sham のベースライン) に対して正規化し、比率として表した。データは 3~4 個の心臓の平均±標準誤差として表示される (各プロットは 15~20 個のセルの平均)。 \*

P<.05, \*\* P<.01, \*\*\* P<.001 (分散分析と事後 Tukey 検定による)。

#### 5. 6 DANによるPAバンドラットのRV肥大と異常なCa<sup>2+</sup>放出の抑制

MCT+DANラットのRV収縮期圧はMCTラットよりも有意に低かったため(図1D)、DANによるRV機能の改善がRVへの直接的な影響によるものなのか血管拡張および/または抗炎症などのMCT治療に関連した間接的な影響によるものなのかを明らかにする必要があります。この目的のために、PA縮窄を行い、RVの形態と機能に対する純粋に慢性的な圧力過負荷を調査した。

DANは収縮期ピーク圧を変化させることなくRV拡張末期圧を低下させ、RV圧減衰の時定数(Tau)を短縮した(図6B)。RV心筋細胞肥大は、PAB+DAN単離心筋細胞においてCa<sup>2+</sup>スパーク頻度の低下(図6D)および自発的Ca<sup>2+</sup>トランジェント(図6F)に関連して抑制された。



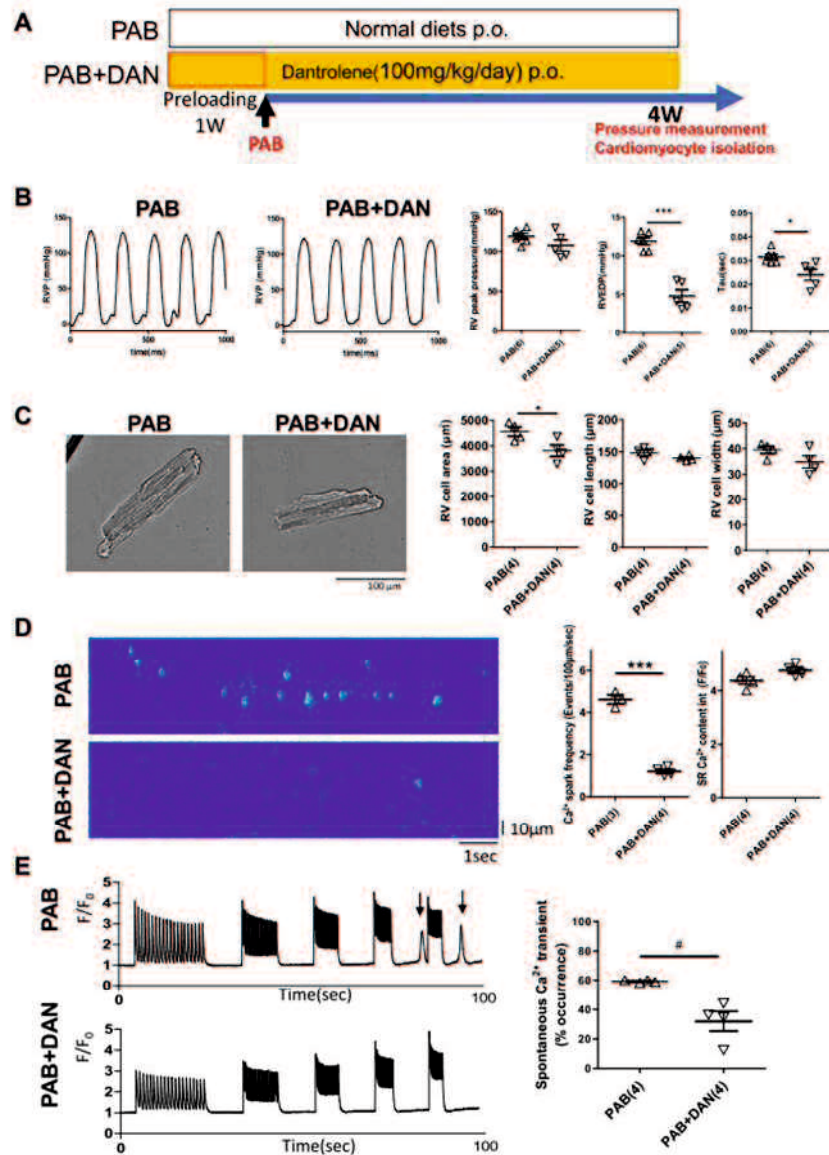


図6 PABラットのRV収縮期圧、形態、Ca<sup>2+</sup>スパーク、およびSCaTに対するダントロレンの効果。

A: PABラットモデルの研究デザイン。B: 代表的なRV圧力曲線と要約データ (n=5-6)。

C: 単離心筋細胞の代表的な画像と、細胞幅、細胞長、および細胞面積の要約データ (4つの心臓からのn=510~1326の細胞)。D: 自発的なCa<sup>2+</sup>スパークの代表的な記録。左側は、心筋細胞におけるFluo-4AM蛍光のラインスキャン画像の記録。右側の要約データ (3~4個の心臓からのn=33~46個の細胞)。SR Ca<sup>2+</sup>含有量は、次のように測定された。

カフェインによって誘発されるCa<sup>2+</sup>トランジェントは、最初に2 Hzで刺激し、次に灌流溶液から20 mMカフェインを含む溶液に5~6秒間ですばやく切り替えることによって測定された。要約されたデータは、右下のパネルに示す (3~4個の心臓からのn=94~106個の細胞)。E: 左側、SCaTの代表的なトレース。右側には、SCaTの発生率として要約されたデータ (4つの心臓の単離心筋からのn=106~125の細胞)。矢印はSCaTを示す。SCaTは、1、2、3、4、および5 Hzの刺激でペーシングを停止した後に誘導された。個々のラットの値は、平均±標準誤差としてプロットされる。

\* P<.05, \*\*\* P<.001 (対応のないt検定)、および#P<.05 (マンホイットニー-U検定)。

## 6. 考察

本研究の最も重要な側面は、DANによるRyR2からのCa<sup>2+</sup>漏出の防止が心肥大を抑制し、心筋細胞機能を正常に保ち、RV機能障害と誘導性VTを防止し、PAHによる圧力負荷が継続してRVにかかった場合でも死亡率を低下させることである。

PAHは、肺動脈圧の上昇と肺小動脈の進行性閉塞を特徴とするまれな疾患であり、RV不全を引き起こす。内皮機能障害を標的とする効果的な治療法（エポプロステノールおよび誘導体、エンドセリン受容体拮抗薬、およびホスホジエステラーゼ5型阻害薬）が開発されている。これらの薬剤は臨床的、機能的、および血行力学的改善を可能にするが、PAHの根本的な治療法はなく、予後は依然として不良である(25)。現在のすべての治療オプションは、主にPAH患者の肺血管緊張の不均衡を緩和するように作用する。PAH患者の予後は、RV機能および後負荷の漸増に適応するRVの能力と密接に関連しているが、RV心筋への治療的介入はまだ調査されていない。Huangら(26)は最近、DANがCa<sup>2+</sup>の漏出を防ぐ正確なメカニズムは不明であるが、DANがRyR2からのCa<sup>2+</sup>の漏出を抑制し、MCT誘発性PAHのラットの予後を改善することを示した。

### 心筋細胞に対するDANの抗肥大効果

最近、我々は、アンジオテンシンII、フェニレフリン、過負荷による単離された心筋細胞の刺激が、RyR2結合CaMの減少、核CaMの増加、およびヒストンデアセチラーゼ5の核/細胞質ゾル比の減少をもたらすこと、およびこれらの応答がDANによって逆転することを発見した(18,20)。特に興味深いことに、これらの研究から、RyR2の圧力過負荷を介した不安定化が、2つの主要な肥大性シグナル伝達経路（Ca<sup>2+</sup>/CaM依存性プロテインキナーゼII-ヒストンデアセチラーゼ経路と活性化T細胞経路のカルシニューリンA核因子）に必要な2つの重要な要因であるCaMとCa<sup>2+</sup>の拡張期の増加を提供することを示した。さらに、心臓収縮機能が維持されている時点のTACによるLV圧過負荷誘発性心肥大のごく初期段階で、活性酸素種を介したRyR2不安定化が弛緩機能障害に関連してすでに発生していることを示した。CaMのRyR2への結合親和性を遺伝的に増強することによるRyR2の安定化（V3599K）は、CaMの核移行を抑制し、肥大シグナル伝達を完全に阻害し、生存率を改善した(18)。現在の発見と合わせて、心臓肥大は確かに最初から不適応反応であり、圧力過負荷がLVまたはRV心筋のいずれかに適用された後、できるだけ早くより良い予後のために修正されるべきであることが強く示唆される。

### RyR2に対するDAN安定化効果のメカニズム

近年、極低温電子顕微鏡法が目覚ましく進歩し、RyR2の3次元構造を原子分解能に近い状態で解析できるようになった(27,28)。その結果、N末端ドメインと中央ドメイン間の結合部分（ジッピングインターフェース）が異なるサブユニット間に3次的に存在し、ドメイン結合が比較的狭い範囲にあることが判明した（N末端ドメイン：1-220;中央ドメ

イン：2250–2500)。このドメインの相互作用は CaM 結合部位 (3583–3603) の近くであり、ドメインの解凍は周囲の構造変化のために CaM を解離し、その逆も同様であることを示唆している。ここで、N 末端-中央ドメイン相互作用インターフェースは 4 箇所ヒンジを形成し、生理学的開閉中に空間距離はわずかに変化する(28)。これは、この部分が四量体構造を安定化するためのまさに「キーポイント」であることを示唆している。明らかに、これらのドメイン相互作用インターフェースが解凍されている場合、四量体構造が緩み、続いて中央チャンネルの細孔が拡張し、Ca<sup>2+</sup>リークが発生していると推測するのは容易である。DAN の結合部位 (a.a. 601–620) は、ジッピングインターフェイスと CaM 結合領域の両方の近くに三次元的に配置されており、DAN が CaM-RyR2 結合とドメインジッピングを構造的に安定させ(9, 12, 16)、それによってチャンネルを安定化させる可能性がある。興味深いことに、DAN (a.a. 601–620) の結合部位は K201 (JTV519) の結合部位に隣接している。これは、RyR2 に安定化効果があることが最初に発見され(29)、後に RyR2 の残基 2114–2149 に結合することが確認された(30)。どちらの薬も同様に、病気の心臓における欠陥のある CaM-RyR2 相互作用を修正する可能性がある (図 7)。



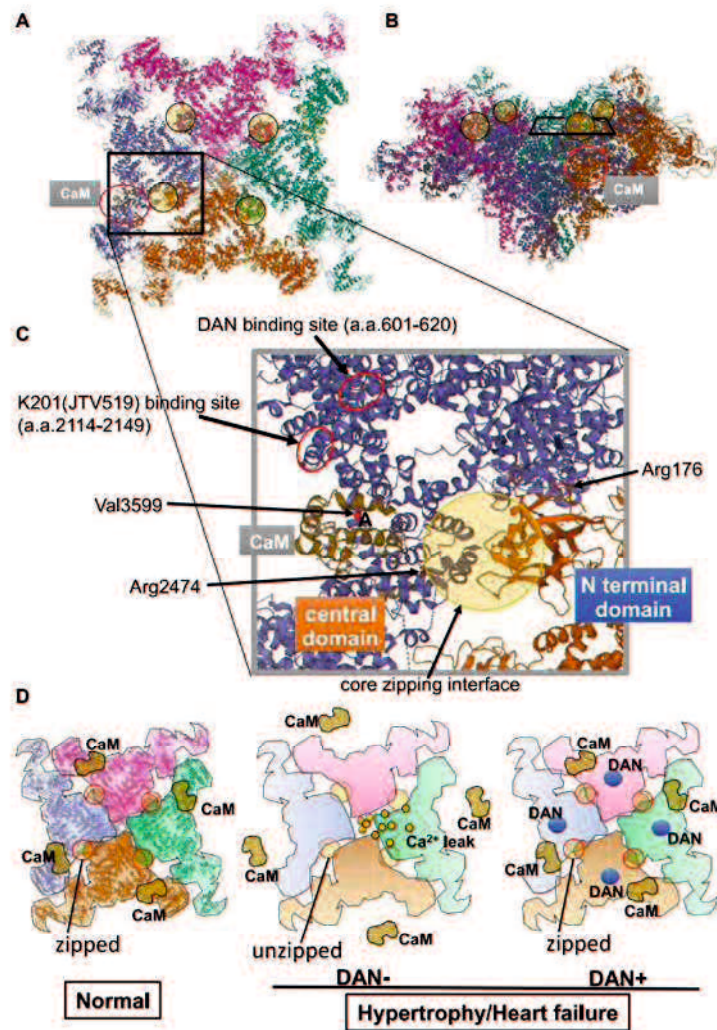


図7 コアジッピングインターフェースでの緊密なサブユニット間相互作用と CaM 結合は、RyR2 の安定性を維持するために不可欠である (3次元構造は PDBID : 6JV2 27 参照)。

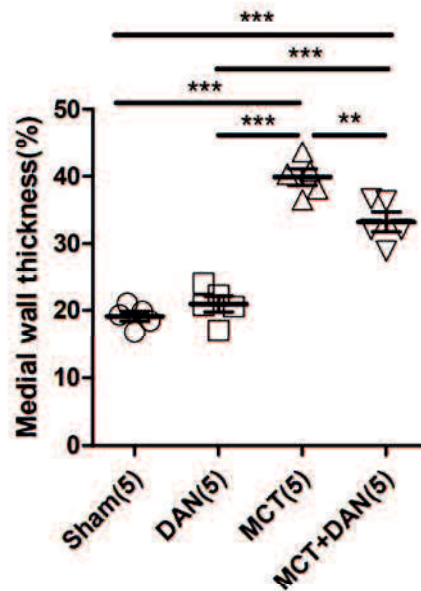
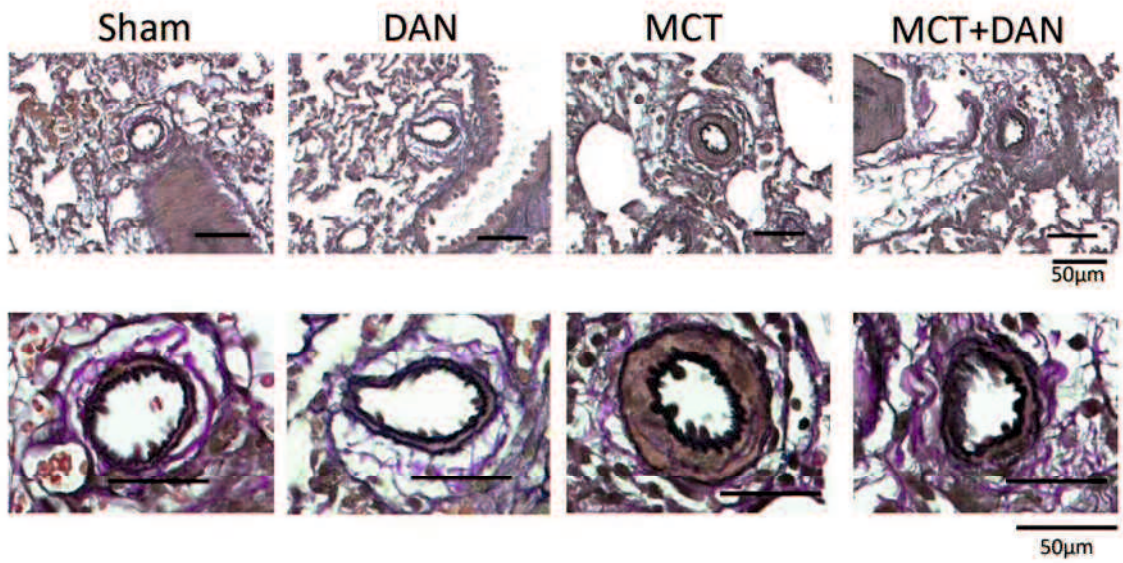
A : RyR2 四量体の平面図。 B : 側面図。 C : コアジッピングインターフェース付近の拡大画像。 N 末端 (a.a. 1-220; オレンジ) ドメインと中央 (a.a. 2250-2500;青) ドメイン間のインターフェースは、サブユニット間の相互作用を形成する。 CaM 結合ドメイン (a.a. 3583-3603) は、このジッピングコアの近くにある。 DAN の結合部位 (a.a. 601-620) は、ジッピングインターフェイスと CaM 結合領域の両方の近くに位置する。興味深いことに、DAN の結合部位 (a.a. 601-620) は、別の RyR2 安定剤である K201 (JTV519) (a.a. 2114-2149) の結合部位に隣接している。 D : 高次構造解析に基づく修正された「圧縮-解凍」仮説。正常な心筋細胞では、コアの圧縮界面でのサブユニット間相互作用が圧縮されるため、CaM は RyR2 から解離せず、チャネルの四量体構造を維持し、Ca<sup>2+</sup>の漏出を防ぐ。ただし、肥大および/または心不全の心筋細胞では、ドメインの解凍がコアの圧縮インターフェースで発生し、続いて CaM の解離と Ca<sup>2+</sup>の漏出が発生する。DAN は、コアの圧縮インターフェースの近くで結合することによってサブユニット間の相互作用を強化し (「解凍」から「圧縮」)、CaM の解離を防ぎ、心疾患での Ca<sup>2+</sup>の漏出を抑制する(9,12,16)。興味深いことに、DAN の結合部位は別の RyR2 安定剤である K201 (JTV519) に隣接している(29,30)。両方の薬剤が同じメカニズムを通じて RyR2 の四量体構造を安定化させることを示唆している。

### PAHにおける心臓突然死の潜在的な原因としての致死性不整脈

現在、心臓突然死は PAH の患者でより頻繁に発生するが、PAH に関連する心臓突然死のメカニズムはあまりよく理解されていない。左主冠動脈圧迫症候群、肺動脈解離、肺動脈破裂、および重度の喀血は、PAH 患者の心臓突然死につながる合併症として報告されている(31)。Hoepfer らによると、心停止を来した 132 人の PAH 患者では、心室細動が 8% の症例で見られた(32)。左心疾患による肺高血圧症の患者と比較して、PAH の患者は、VT や心室細動などの悪性心室性不整脈の発生頻度が低いと考えられているが、無視することはできない。MCT 誘発性 PAH ラットモデルにおいて、Umar らは、PAH 誘発性 RV 細動は、triggered activity による RV から生じる自発的心室細動を特徴とする死亡率増加の明確な段階と関連していると報告した(33)。これらのデータは、RyR2 からの異常な  $Ca^{2+}$  放出によって引き起こされる VT などの致死性不整脈が、PAH の患者の心臓突然死につながる可能性があるという考えを裏付けている。

### オフターゲット効果により PAH の予後を改善する DAN の可能性

肺動脈圧は MCT グループよりも MCT+DAN グループの方が低いことがわかったため、血管拡張や抗炎症作用など、PAH に対する DAN の他の影響を考慮する必要がある(補足図 1)。したがって、PA 縮窄を使用して、別の RV 圧力過負荷モデルに対する DAN の影響を評価した。その結果、DAN は、RV 収縮期圧を変えることなく、 $Ca^{2+}$  スパーク、自発的な  $Ca^{2+}$  トランジェント、および RV 肥大を抑制した。したがって、PAH の予後と RV 機能に対する DAN の有益な効果は、RV 心筋に対する RyR2 を介した直接効果によって引き起こされる可能性が最も高いが、MCT によって誘発された PAH のラットで DAN が RV 収縮期圧を低下させた理由はまだ不明である。



補足図 MCT 治療ラットの肺動脈に対するダントロレンの慢性効果

上のパネルは肺動脈の代表的な画像である。下のパネルは、内壁の厚さ（媒体/断面積）の要約データを示している。4週間のダントロレン投与はMCT誘発性PAHラットの肺血管の内壁肥厚を軽減する。

## 7. 結語

結語として、PAHのRV圧負荷はRyR2からのCa<sup>2+</sup>漏出を引き起こし、これが心肥大を誘発し、RV機能障害および致命的な不整脈に関連する不良な予後を引き起こす。DANはRyR2に直接結合し、チャンネルを構造的に安定化するため、不良な予後を引き起こすすべての病理学的イベントを抑制する。したがって、DANはPAH患者のための新しく強力な治療薬としての可能性を秘めている。

## 8. 制限事項

この実験で使用されたDANの高用量のため、人間が使用するためのDANの用量に関する考慮事項はまだ解決されていない。DANがMCT誘発性PAHによる死亡を防ぐ根本的なメカニズムのいくつかは未解決のままであり、さらなる研究が必要である。

## 9. 謝辞

本研究の遂行および論文作成に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りまし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申し上げます。また、指導教官として終始ご指導いただいた山口大学大学院医学系研究科 病態検査学 山本健教授に深謝の意を表します。本研究では多くの先生方や実験助手の方々にデータ収集にご協力いただきました。ここに改めて感謝いたします。

## 10. 参考文献

1. Rich S, Haworth SG, Hassoun PM, Yacoub MH. Pulmonary hypertension: the unaddressed global health burden. *Lancet Respir Med* 2018;6:577–579.
2. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* 2018;360:j5492.
3. Mandras SA, Mehta HS, Vaidya A. Pulmonary hypertension: a brief guide for clinicians. *Mayo Clin Proc* 2020;95:1978–1988.
4. Yaghi S, Novikov A, Trandafirescu T. Clinical update on pulmonary hypertension. *J Investig Med* 2020;8:821–827.
5. Bissierier M, Pradhan N, Hadri L. Current and emerging therapeutic approaches to pulmonary hypertension. *Rev Cardiovasc Med* 2020;21:163–179.
6. Hurdman J, Condliffe R, Elliot CA, et al. ASPIRE registry: Assessing the Spectrum of Pulmonary hypertension Identified at a REferral centre. *Eur Respir J* 2012;39:945–955.
7. Heresi GA, Rao Y. Follow-up functional class and 6-minute walk distance identify long-term survival in pulmonary arterial hypertension. *Lung* 2020;198:933–938.
8. Kozu K, Sugimura K, Ito M, et al. Japanese Pulmonary Circulation Study Group.

- Current status of long-term prognosis among all subtypes of pulmonary hypertension in Japan. *Int J Cardiol* 2020;300:228–235.
9. Ono M, Yano M, Hino A, et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca<sup>2+</sup> release in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010; 87:609–617.
  10. Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, et al. 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. Kajii T, Kobayashi S, Shiba S, et al. Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;521:57–63.
  12. Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, 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. Xu X, Yano M, Uchinoumi H, et al. 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.
  14. Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, et al. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;448:1–7.
  15. Ikemoto N, Yamamoto T. Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca<sup>2+</sup> channel regulation. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10:310–316.
  16. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, 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.
  17. Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, et al. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight* 2019;4:e126112.
  18. Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T, et al. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol* 2020;3:714.
  19. Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Ikemoto N, et al. Probing a putative dantrolene binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem J* 2005; 387:905–909.
  20. Oda T, Yamamoto T, Kato T, et al. Nuclear translocation of calmodulin in

- pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol* 2018;125:87–97.
21. Yang PS, Kim DH, Lee YJ, et al. Glycyrrhizin, inhibitor of high mobility group box-1, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. *Respir Res* 2014;15:148.
  22. Sufu-Shimizu Y, Okuda S, Kato T, et al. Stabilizing cardiac ryanodine receptor prevents the development of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia in Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase II $\alpha$  transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;524:431–438.
  23. Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1073–C1081.
  24. Nishimura S, Yamamoto T, Nakamura Y, et al. Mutation-linked, excessively tight interaction between the calmodulin binding domain and the C-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm* 2018;15:905–914.
  25. Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, et al. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther* 2014;141:172–191.
  26. Huang Y, Lei C, Xie W, et al. Oxidation of ryanodine receptors promotes Ca<sup>2+</sup> leakage and contributes to right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *Hypertension* 2021;77:59–71.
  27. Gong D, Chi X, Wei J, et al. Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin. *Nature* 2019;572:347–351.
  28. Peng W, Shen H, Wu J, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science* 2016;354:aah5324.
  29. Yano M, Kobayashi S, Kohno M, et al. FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 2003;107:477–484.
  30. Yamamoto T, Yano M, Xu X, et al. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation* 2008;117:762–772.
  31. Demerouti EA, Manginas AN, Athanassopoulos GD, Karatasakis GT. Complications leading to sudden cardiac death in pulmonary arterial hypertension. *Respir Care* 2013;58:1246–1254.
  32. Hoepfer MM, Galié N, Murali S, et al. Outcome after cardiopulmonary resuscitation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:341–344.

33. Umar S, Lee JH, de Lange E, et al. Spontaneous ventricular fibrillation in right ventricular failure secondary to chronic pulmonary hypertension. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:181–190.

この学位論文は

Shinji Tanaka, Yamamoto T, et al. Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, reduces the development of ventricular arrhythmias, and improves prognosis in pulmonary hypertension. *Heart Rhythm*. 2022 Feb 5;S1547-5271(22)00119-9. doi: 10.1016/j.hrthm.2022.02.003.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た。