

学位論文（博士）

Stabilizing cardiac ryanodine receptor with dantrolene treatment prevents left ventricular remodeling in pressure-overloaded heart failure mice

（圧負荷誘発性心不全マウスモデルにおいてダントロレンによるリアノジン受容体の安定化は、左室リモデリングを抑制する）

氏名 矢野 泰健

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5年2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	6
第6章 考察	12
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

ダントロレン(DAN)は RyR2 の N 末端ドメイン Leu⁶⁰¹-Cys⁶²⁰ に直接結合し、RyR2 の 4 量体構造を安定化させることにより、RyR2 からの拡張期 Ca²⁺漏出を防ぐ。以前我々は、RyR2 への CaM 高親和性 KI マウス(V3599K)を用いて、横行大動脈縮窄(TAC)による圧過負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいて RyR2 からの CaM 解離を抑制することで、Ca²⁺漏出を防ぎ、左室リモデリングを抑制することを報告した。そこで本研究では、横行大動脈縮窄(TAC)による圧過負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいてダントロレンの慢性投与が CaM と RyR2 の結合親和性を遺伝的に強化した場合と同様の機序で左室リモデリングを抑制するかを調べた。横行大動脈縮窄 (TAC) による圧過負荷誘発性心肥大マウスモデルを作成した。野生型マウスを、Sham 群、TAC 群、TAC-DAN 群(ダントロレン 20 mg/kg/day 腹腔内投与)の 3 群に割り付けた。Sham または TAC 手術から 8 週後の生存率、心機能および組織評価、単離心筋細胞を用いた Ca²⁺ハンドリング、RyR2-CaM 結合性の評価を行った。TAC-DAN 群は TAC 群と比較し、TAC 手術から 8 週後の生存率は良好であった(TAC 群 49% vs TAC-DAN 群 83%)。また、心エコーと心筋組織においては、TAC 群で認められた左室リモデリングは、TAC-DAN 群で抑制された。TAC 手術から 8 週後の単離心筋細胞では TAC 群で拡張期 Ca²⁺スパーク頻度の増加および RyR2-CaM 結合親和性の低下を認めたが、TAC-DAN 群ではそれが抑制された。我々の研究はダントロレンの慢性投与により RyR2 を安定化させ、RyR2 からの CaM 解離を抑制することで、RyR2 からの拡張期 Ca²⁺漏出を防ぎ、左室リモデリングが抑制され、予後が改善することを示した。

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 (1)。圧過負荷による左室肥大やそれに続く心不全は、RyR2 からの拡張期 Ca²⁺漏出が重要な原因の一つである (2-4)。したがって、RyR2 を治療標的とした、RyR2 安定化治療の開発・臨床応用が望まれる。RyR2 の不安定化の機序の 1 つにドメインスイッチ仮説(zippering/unzippering)があり (5-7)、以下のように考えられている。カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) では、点突然変異の hot domains である RyR2 の N 末端ドメイン(1-619 アミノ酸配列)と中央ドメイン(2000-2500 アミノ酸配列)のどちらかに突然変異が起きても、ドメイン連関障害が起こり (unzippering)、Calmodulin (CaM)が RyR2 から解離し、その結果、拡張期 Ca²⁺漏出を誘発する (5, 6)。さらに、イヌ高頻度右室ペースティングモデルやマウス TAC モデルの後天性心不全モデルにおいても、活性酸素種 (ROS) や RyR2 の過リン酸化により N 末端ドメインと中央ドメインのドメイン連関障害を生じ、CaM の RyR2 からの解離を伴い、拡張期 Ca²⁺漏出が生じる (7-12)。近年、Gong らは high-resolution cryo-EM imaging により、RyR2 の 4 量体構造を明らかにした (13)。その 4 量体構造に基付くと、RyR2 の N 末端ドメイン(1-220)と中央ドメイン(2250-2500)間のインターフェースはサブユニット間でドメイン連関を形成し (zipped)、RyR2 の 4 量体構造を安定化させ、CaM の解離を抑制し、RyR2

からの異常な Ca^{2+} 漏出を防いでいると考えられている (4, 14, 15)。また、我々はホモ接合型 RyR2V3599K / V3599K (V3599K) マウス (RyR2 への CaM 高親和性 KI マウス) は、RyR2 の N 末端ドメインと中央ドメイン間のサブユニット間でドメイン連関を形成することで (zipped)、RyR2 の 4 量体構造を安定化させ、CaM の解離を抑制し、RyR2 からの異常な Ca^{2+} 漏出を防ぐことを示した (16)。さらに、圧過負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいて遺伝的に RyR2 からの CaM 解離を抑制することで、 Ca^{2+} 漏出を防ぎ、それによって心肥大による心不全を抑制し、予後を改善することを示した (4)。

一方、ダントロレンは RyR1 の点突然変異病の悪性高熱症の特効薬である (17)。ダントロレンは RyR1 の N 末端ドメイン Leu⁶⁰¹-Cys⁶²⁰ に結合し、RyR1 の N 末端ドメインと中央ドメインのドメイン連関障害を密にすることで (zipping)、悪性高熱症に対する薬理的効果を示すとされている (18, 19)。さらに、RyR2 の N 末端ドメイン Leu⁶⁰¹-Cys⁶²⁰ に結合し、RyR1 と同様にドメイン連関を密にし (zipping)、RyR2 に対する CaM の結合親和性を高め、 Ca^{2+} 漏出を防ぐことが報告されている (11, 20)。ダントロレンは頻脈誘発性心不全モデルや CPVT モデルにおいて RyR2 からの Ca^{2+} 漏出により誘発される遅延後脱分極 (DAD) によって生じる心室頻拍を抑制することを報告した (11, 21, 22)。直近では、我々は圧負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいてダントロレンは RyR2 への結合親和性を強化し、RyR2 からの Ca^{2+} 漏出を抑制することでエピネフリン誘発性心室頻拍を抑制することを報告した (23, 24)。致死性不整脈に対するダントロレンの急性効果は明らかになっているが、心不全の進行に対するダントロレンの慢性効果は不明である (15)。

第3章 目的

横行大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいてダントロレンの慢性投与が CaM の RyR2 への結合親和性を強化し、 Ca^{2+} 漏出を抑制することで、心不全への進行を抑制し、予後を改善するかを調べた。

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 (14)。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。治療薬の割り付けの盲検化は困難のため非盲検化での実験を行った。圧負荷心肥大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 27 G 針と 7-0 silk を用いて直径 0.4 mm の狭窄を作成した (4)。

マウスは各群 35 匹ずつ、1) 大動脈に狭窄を設ける以外の同様の手術負荷を与え、溶媒のみ連日投与した Sham 群、2) TAC 手術を行い、溶媒のみ連日投与した TAC 群、3) TAC 手術を行い、溶媒とダントロレンを連日投与した TAC-DAN 群、の 3 群に割り付けた。手術後 8 週間の経過を追跡した。TAC-DAN 群は TAC 手術の 1 週間前よりダントロレン(20 mg/kg/day)の腹腔内投与を開始し、TAC 後 8 週まで投与を継続した。ベースラインで心エコーを行い、手術後 8 週で心エコー、組織評価、心筋重量測定、生存率解析、単離心筋細胞での Ca^{2+} ハンドリングの評価、RyR2-CaM 結合性の評価を行った。ダントロレンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) のものを使用した。

4.2 経胸壁心エコー

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 4-5% 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、1~2% イソフルランで維持した。左室径は M モードで計測した (4)。

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 (4, 16, 23, 24)。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_2 /5% CO_2) 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 (50 μ M/L Ca^{2+} , 0.5 mg/mL collagenase B, 0.5 mg/mL collagenase D, 0.02 mg/mL protease type XIV) 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。その後、 Ca^{2+} 濃度の異なる培養液に変更し、徐々に Ca^{2+} の濃度を増加させ、最終濃度を1 mMとした (0.05, 0.1, 0.3, 0.6, 最終濃度1 mM)。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_2 5% CO_2 、大気圧中に37度で培養した (4, 16, 23, 24)。

4.4 心筋細胞の Ca^{2+} トランジェント解析

ShamまたはTAC手術から8週後のマウスから心筋細胞を単離し、fluo-4 AM (20 μ M) を20分、24°Cでローディングした後、Tyrode液で2回洗浄した (4)。すべての実験は28°Cの環境下で行われた。細胞内 Ca^{2+} 測定は電気刺激装置 (IonOptix, Milton, MA, USA) で刺激し、Zeiss \times 40油浸Plan-Neofluor対物レンズ (開口数1.3、励起488 nm、蛍光>505 nm) 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) と蛍光デジタル顕微鏡 (BZ9000, Keyence, Japan) を使用して測定した。Sham、TAC、TAC-DANの心筋細胞における1、2、3、4、5 Hzでの電気刺激中止後の自発的な Ca^{2+} トランジェントの頻度を測定した (4, 16, 23, 24)。

4.5 Ca²⁺スパークと筋小胞体のCa²⁺貯蔵解析

ShamまたはTAC手術から8週後のマウスから心筋細胞を単離し、Ca²⁺スパークの測定は従来通り (4, 16, 23, 24) でZeiss×40油浸Plan-Neofluor対物レンズ (開口数1.3、励起488 nm、蛍光>505 nm) 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。Ca²⁺スパーク計測にあたりCa²⁺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Ca²⁺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 (4, 16, 23, 24)。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 (10 mM) を急速に灌流し筋小胞体内のCa²⁺を放出させCa²⁺含有量を評価した (4)。さらに、もう一つの4量体安定化薬であるJTV519 (K201) (Abcam, Cambridge, UK) の存在下ではダントロレンの付加的な効果がないことを明らかにするため、ShamまたはTAC手術後8週のマウスの単離心筋細胞を用いて、ダントロレン (1 μM) またはJTV519 (1 μM)、ダントロレン (1 μM) およびJTV519 (1 μM) の同時投与下でそれぞれCa²⁺スパーク計測とCa²⁺含有量の測定を行った。

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、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 (4, 16, 23, 24)。次に1%BSAと0.5%TritonX-100で希釈したAnti-CaM抗体 (EP799Y, Abcam, Cambridge, UK) 及びAnti-RyR抗体 (C3-33; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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) の一次抗体で標識した。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 505-530 nmと組み合わせそれぞれ633 nmおよび488 nm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 組織

ShamまたはTAC手術から8週 (20週令) の野生型マウスの各群 (Sham, TAC, TAC-DAN) の心臓を10%ホルマリンで固定した。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 (4, 16)。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

各断面に対して行われた (4, 16)。

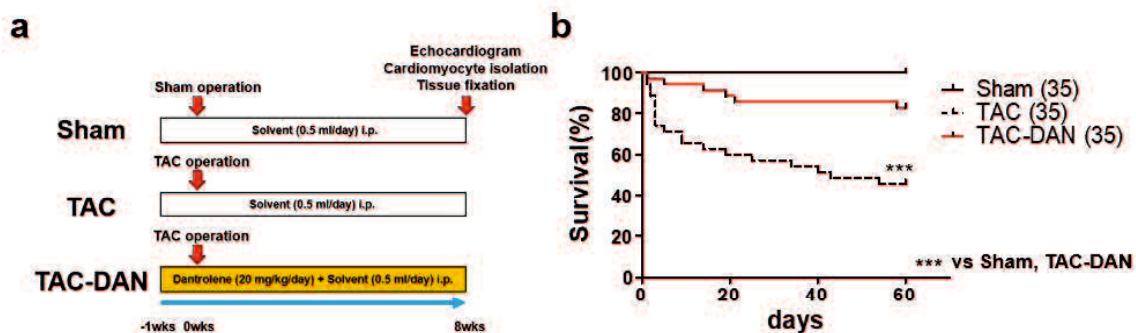
4.8 解析

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。ダントロレンの有効性を評価するため、Kaplan-Meier生存分析を行い、各群でlog-rank test検定を行った。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 ダントロレンは圧負荷誘発性心不全マウスモデルにおいて左室リモデリングを抑制し、予後を改善した

特に興味深いことに、Sham または TAC 手術から 8 週後の生存率は TAC 群に比較し、TAC-DAN 群で有意に高値であった (図 1a、b)。TAC 手術から 8 週後の心筋重量は TAC 群で高値であったが、TAC-DAN 群では心筋重量の増加が有意に抑制された (図 1c、d)。また、間質線維化は TAC 群の心筋で観察されたが、TAC-DAN 群の心筋では観察されなかった (図 1e、f)。左室径 (左室拡張末期径および左室収縮末期径) は左室肥大を反映し TAC 群で著明に拡大し、左室内径短縮率は低下しているのに対し、TAC-DAN 群ではそれが抑制された。



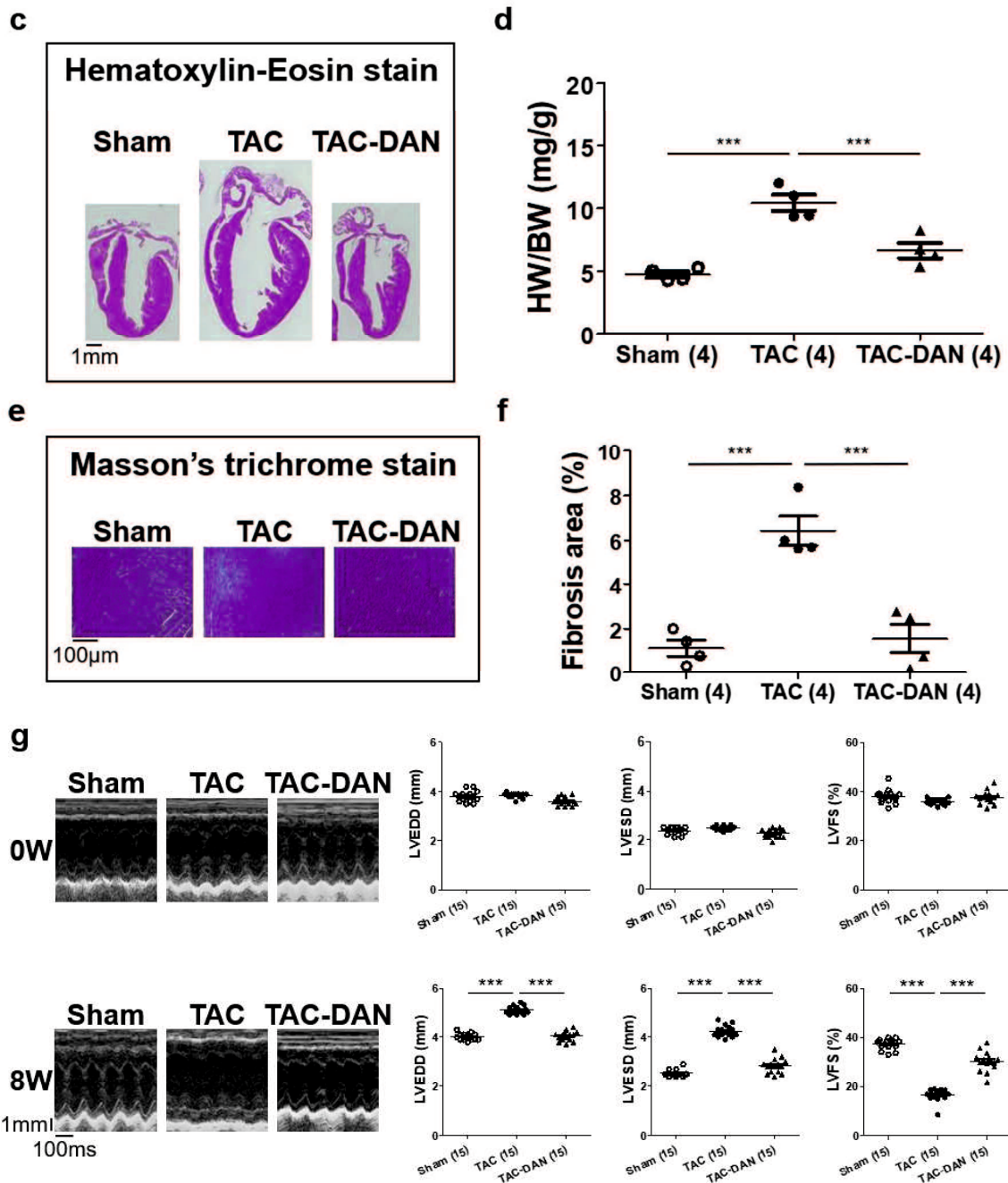


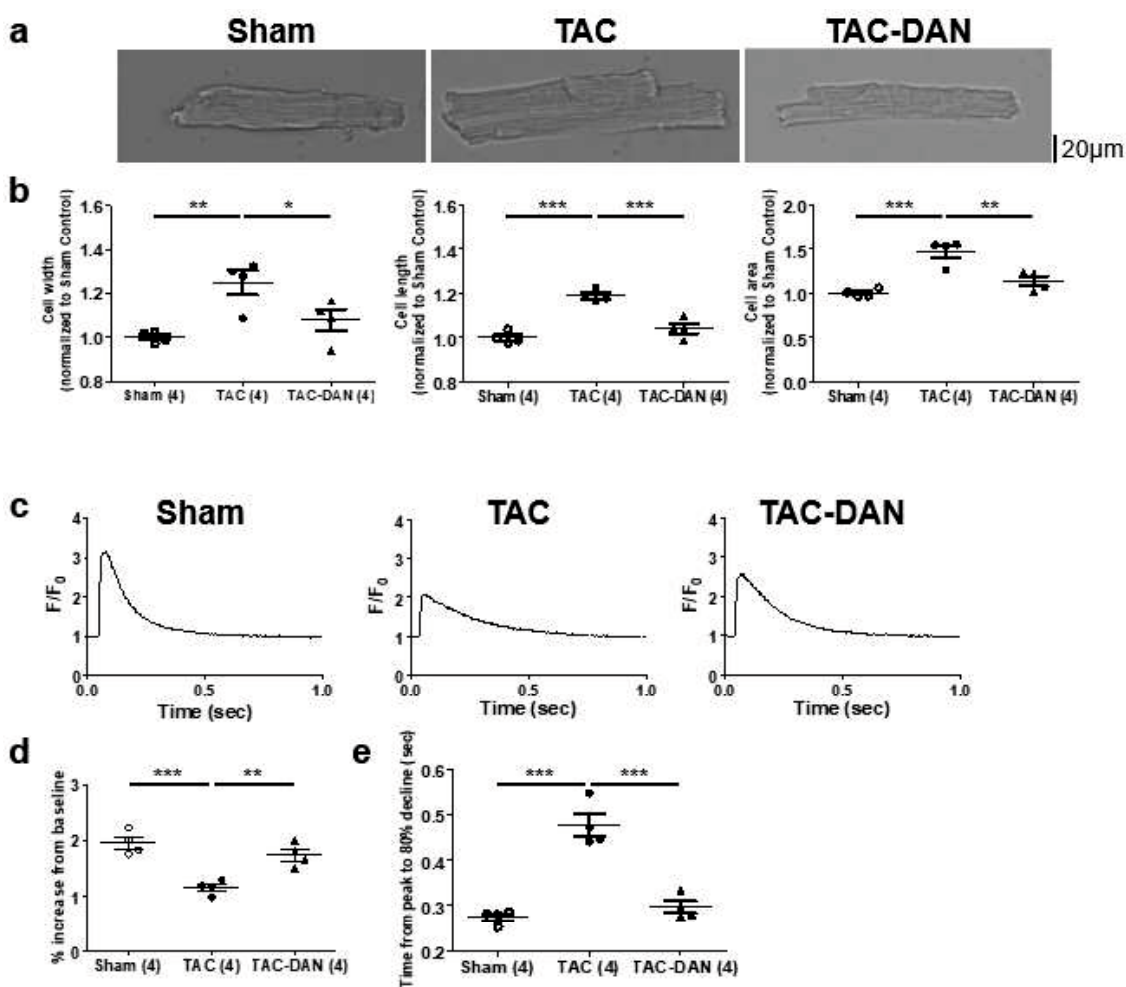
図1 研究デザインと Sham、TAC、TAC-DAN の予後および構造的・機能的特徴。(a) TAC マウスモデルの研究デザイン。(b) カプランマイヤー生存分析。(c) 心臓の長軸切片、およびヘマトキシリン・エオジン染色された左室組織の代表的な画像。(d) 左室心筋重量/体重比。(e) マッソン・トリクローム染色された左室組織の代表的な画像と、(f) 左室間質線維化の割合。(g) 心エコーの代表的な画像と左室拡張末期径 (LVEDD)、左室収縮末期径 (LVESD)、左室内径短縮率 (%FS = LVEDD-LVESD) / LVEDD × 100)。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロット。括弧はマウスの匹数。*** P < 0.001 (カプランマイヤー生存分析は log-rank test 検定、その他は事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。

5.2 ダントロレンの慢性投与は圧負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいて心筋細胞の肥大を抑制し、細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常を改善した

上記の *in vivo* のデータと一致し、TAC 心筋細胞では TAC 後 8 週で心筋細胞の肥大（細胞の幅、細胞長、細胞面積）が観察されたが、TAC-DAN 心筋細胞では観察されなかった（図 2a, b）。TAC 8 週後、TAC 心筋細胞では Ca^{2+} トランジェントの振幅が減少し、ピークから Ca^{2+} トランジェントの 80% 低下までの時間の延長が見られたが、TAC-DAN 心筋細胞ではこれらのパラメーターが改善した（図 2c, d, e）。

Ca^{2+} スパーク頻度は TAC 後 8 週で増加しており、これが Ca^{2+} トランジェントにおける振幅の減少とピークから Ca^{2+} トランジェントの 80% 低下までの時間の延長を起し得るが、これらの異常は TAC-DAN 心筋細胞で改善した（図 2f, g）。筋小胞体（SR）内の Ca^{2+} 含有量は、TAC 後 8 週の心筋細胞で減少したが、TAC-DAN 心筋細胞では減少は見られなかった（図 2h）。

自発的な Ca^{2+} トランジェント（SCaT）は TAC 後 8 週で増加していたが、TAC-DAN ではそれが抑制された（図 2i, j）。



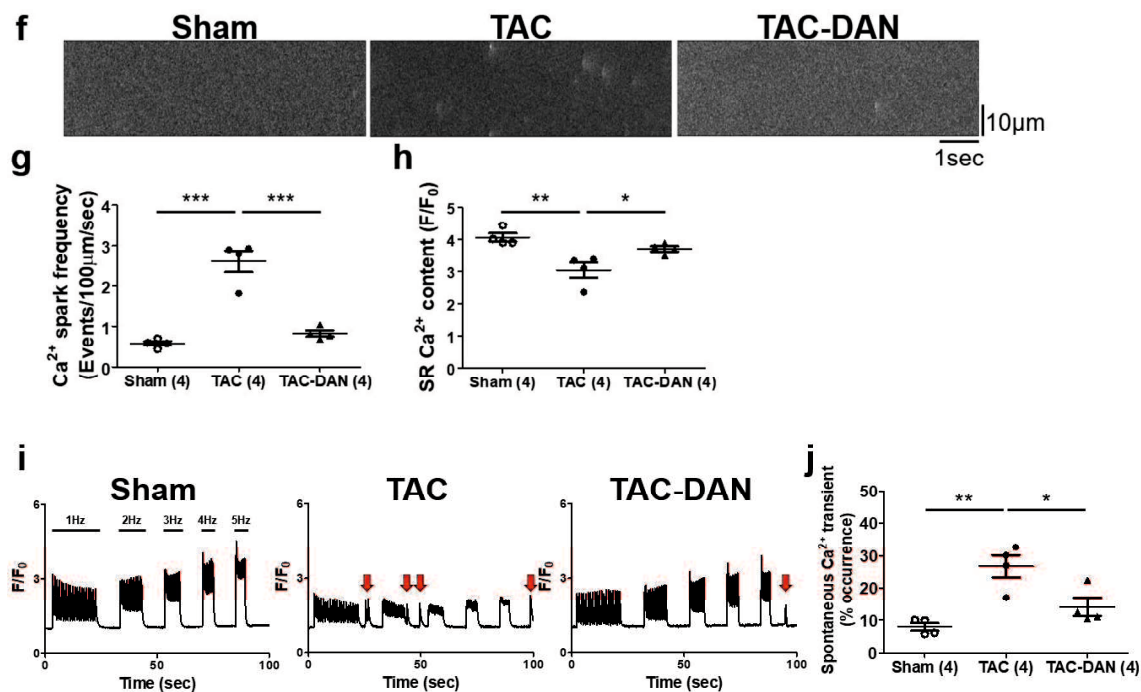


図2 正常心筋細胞における形態およびCa²⁺トランジェント、Ca²⁺スパーク、SR Ca²⁺含有量、SCaT。(a) 心筋細胞の代表的な画像。(b) 単離心筋細胞における細胞の幅、細胞長、および細胞面積の要約データ。N = 4個の心臓からの400~500個の細胞。(c) 1Hzのペースングレートでのfluo-4AM蛍光シグナルの代表的な記録。(d) ピークCa²⁺トランジェント、(e) ピークからCa²⁺トランジェントの80%低下までの時間の要約データ。N = 4個の心臓からの40個の細胞。(f) 自発的なCa²⁺スパークの代表的な記録。(g) 自発的なCa²⁺スパーク頻度の要約データ。N = 4個の心臓からの70~96個の細胞。(h) カフェイン誘発Ca²⁺トランジェントから測定されたSR Ca²⁺含有量の要約データ。N = 4個の心臓からの350-450個の細胞。(i) 自発的なCa²⁺トランジェント (SCaT) の代表的な記録。(j) 自発的なCa²⁺トランジェント (SCaT) の出現頻度の要約データ。N = 4個の心臓からの400-600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。括弧はマウスの数を示す。* 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)。

5.3 TACによる慢性的な圧力過負荷は、内因性CaMのRyR2からの解離を引き起こすが、ダントロレンの慢性投与ではそれが抑制された

内因性CaMのRyR2への結合性を免疫染色で評価した。Zライン上でRyR2と共局在する内因性CaMは、TAC心筋細胞において減少したが、TAC-DAN心筋細胞では正常なレベルで保持されていた(図3a, b)。

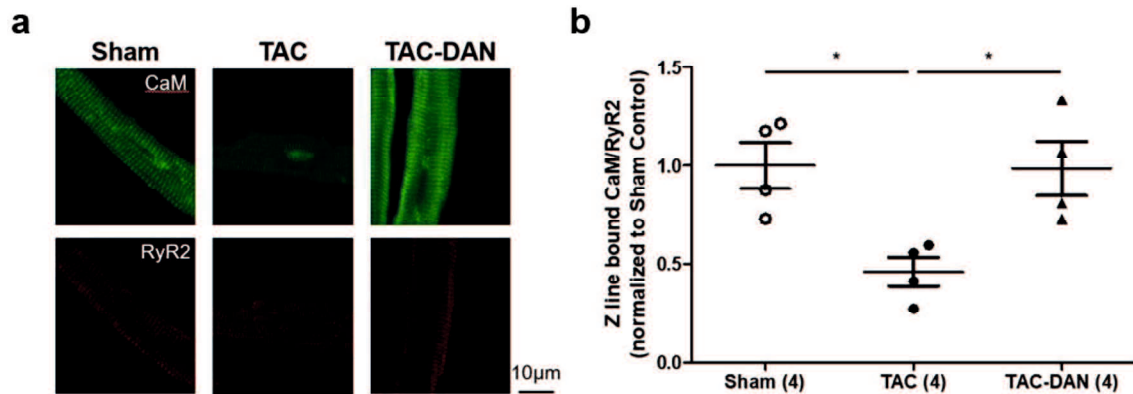


図3 Sham、TAC、TAC-DAN 心筋細胞における内因性 CaM の局在および結合特性。(a) 心筋細胞で RyR2 と共局在する内因性 CaM の代表的な画像。CaM の免疫染色 (緑)、RyR2 の免疫染色 (赤)。(b) Z 線結合 CaM の要約データ。Z 線に結合した CaM の免疫蛍光シグナルを RyR2 のシグナルで割って、コントロール (Sham) に対して正規化し、比率として表した。N = 4 個の心臓からの 42~52 個の細胞。個々のマウスの値は、平均±SEM とともにプロットした。括弧はマウスの数を示す。* P < 0.05 (事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。

5.4 Sham および TAC 単離心筋細胞におけるダントロレンまたは JTV519、ダントロレンと JTV519 同時投与の急性効果

Sham 心筋細胞においてはダントロレンまたは JTV519、ダントロレンと JTV519 の同時投与のいずれも Ca^{2+} スパークは出現せず、筋小胞体 (SR) 内の Ca^{2+} 含有量は不変であった (図 4a、b、c)。TAC 後 8 週の心筋細胞においては Ca^{2+} スパークの増加と筋小胞体 (SR) 内の Ca^{2+} 含有量の減少が見られたが、ダントロレンまたは JTV519 の投与でそれらが抑制された。しかし、ダントロレンと JTV519 同時投与した TAC 心筋細胞では付加的な効果は観察されなかった (図 4d、e、f)。

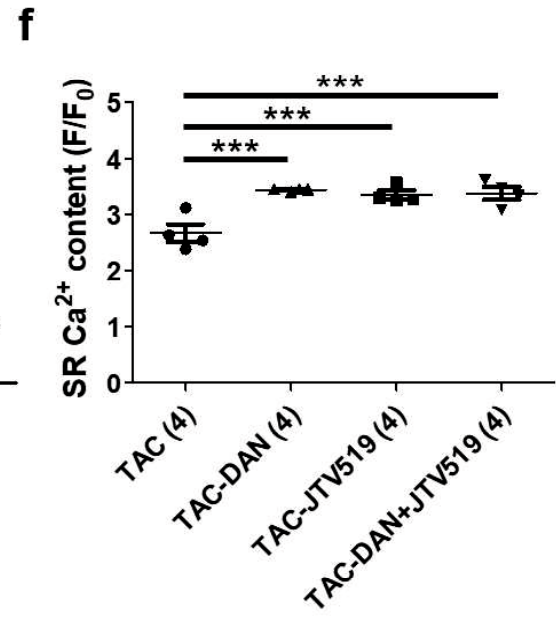
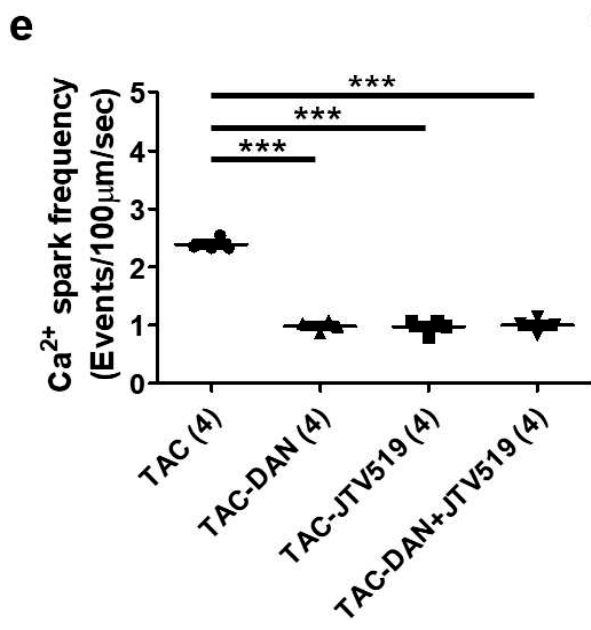
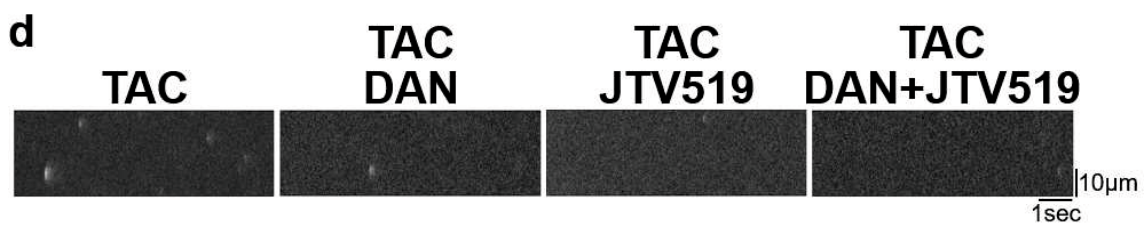
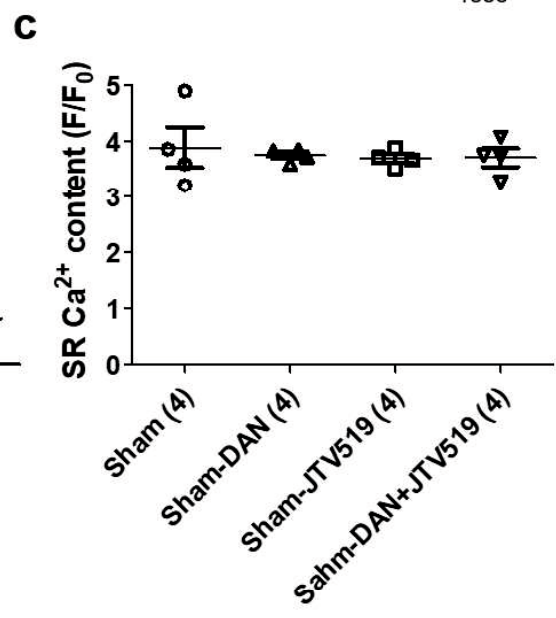
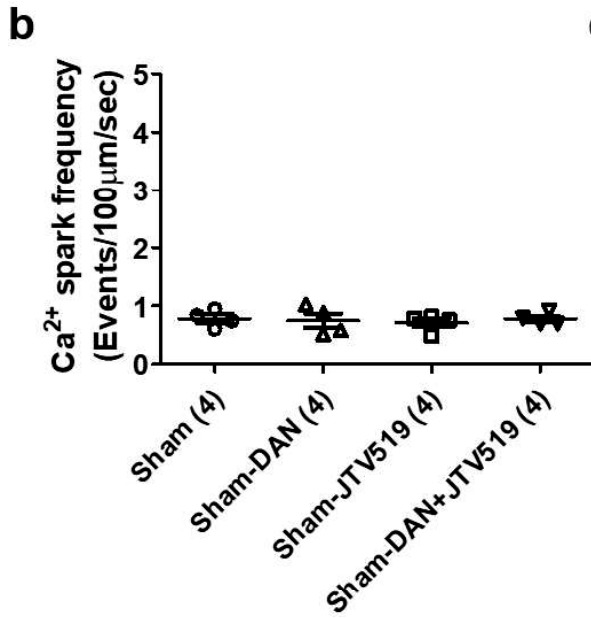
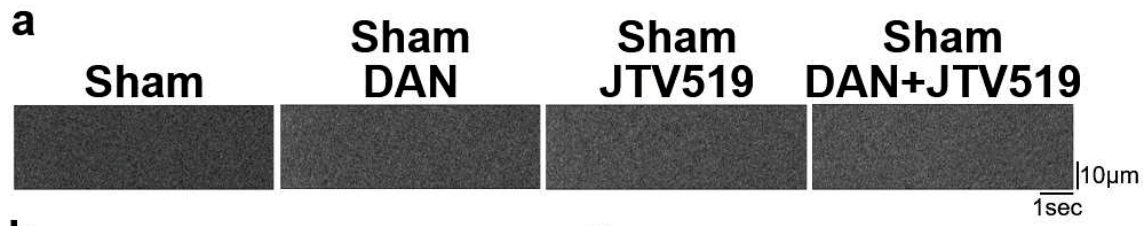


図4 Sham および TAC 心筋細胞におけるダントロレンまたは JTV519、ダントロレンと JTV519 同時投与での Ca^{2+} スパークと SR Ca^{2+} 含有量の急性効果。(a) Sham における自発的な Ca^{2+} スパークの代表的な記録。(b) Sham、Sham-DAN、Sham-JTV519、Sham-DAN+JTV519 における自発的な Ca^{2+} スパーク頻度の要約データ。N = 4 個の心臓からの 43~46 個の細胞。(c) Sham、Sham-DAN、Sham-JTV519、Sham-DAN+JTV519 におけるカフェイン誘発 Ca^{2+} トランジェントから測定された SR Ca^{2+} 含有量の要約データ。N = 4 個の心臓からの 10-13 個の細胞。(d) TAC における自発的な Ca^{2+} スパークの代表的な記録。(e) TAC、TAC-DAN、TAC-JTV519、TAC-DAN+JTV519 における自発的な Ca^{2+} スパーク頻度の要約データ。N = 4 個の心臓からの 46~48 個の細胞。(f) TAC、TAC-DAN、TAC-JTV519、TAC-DAN+JTV519 におけるカフェイン誘発 Ca^{2+} トランジェントから測定された SR Ca^{2+} 含有量の要約データ。N = 4 個の心臓からの 10-15 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。括弧はマウスの数を示す。*** P < 0.001 (事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。

第 6 章 考察

6.1 総括

この研究の主な発見は、圧負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいてダントロレンの慢性投与は、RyR2 からの CaM 解離と拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制し、左室リモデリングの進展を予防し、予後を改善したことである。これは、以下の所見によって支持されている。TAC の単離心筋細胞では、TAC による圧負荷心肥大が、ダントロレンの慢性投与により、明らかに抑制された。さらに、TAC 群の RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} の増加が、TAC-DAN 群では、有意に抑制され、TAC 群の筋小胞体内 Ca^{2+} 含有量の減少が、TAC-DAN 群で正常化していた。その結果、細胞内 Ca^{2+} ハンドリングの機能を示す TAC 群の異常 Ca^{2+} トランジェントは、TAC-DAN 群において正常化していた。抗 CaM 抗体と抗 RyR2 抗体を用いた心筋細胞の二重免疫染色実験は、TAC 群では内因性 CaM が RyR2 から解離していたが、TAC-DAN 群では、CaM の RyR2 からの解離が抑制されていることを示した。心エコー検査では、TAC 群では、左室拡大と左室収縮能の低下を示したが、TAC-DAN 群では、左室拡大と左室収縮能の低下は有意に抑制されていることを示した。TAC 群で観察された心筋重量の増大と間質線維化は、TAC-DAN 群で明らかに抑制されることを示した。 Kaplan-Meier 解析では TAC 手術から 8 週後の生存率は、TAC 群で 49%であったが、TAC-DAN 群では 83%まで改善した。われわれの知る限りでは、圧負荷誘発性心肥大マウスモデルにおいて、in vivo でダントロレンの慢性投与が、左室リモデリングと生存率を改善させることを示した最初の所見であり、この研究は、圧負荷肥大心におけるダントロレンの臨床応用に重要な情報を与えてくれるものと考えられる。

6.2 ダントロレンが TAC マウスにおいて心不全の進行を抑制し、生存率を改善するメカニズム

我々は最近、CaM の RyR2 への結合親和性を強化したノックインマウス (V3599K RyR2 KI) では、WT マウスで TAC 手術を行った場合と比較して TAC 手術後の RyR2 からの CaM の解離が抑制され、拡張期 Ca²⁺漏出が完全に抑制されることを報告した (4)。TAC 後 8 週では、KI マウスは WT マウスと比較して、左室リモデリングの著明な抑制と生存率の有意な改善が得られた (4)。さらに、KI マウスと WT マウスにおける圧負荷に対する遺伝子シグナルの違いを比較したところ、WT マウスにおいて、2 系統の肥大シグナル伝達 (CaM の解離による CaMKII-HDAC-MEF2, 拡張期 Ca²⁺漏出による calcineurin-NFATc4-GATA4) が亢進していたが、KI マウスでは、抑制されていた。本研究でも、KI マウスと同様に、ダントロレンが、TAC マウスにおいて、RyR2 からの拡張期 Ca²⁺漏出の抑制と CaM の解離を抑制したことから、ダントロレンによる左室肥大および左室リモデリングの抑制には、この 2 系統の肥大シグナル伝達の抑制が寄与していると考えられる。ダントロレンの TAC モデルの左室線維化抑制の機序に関しては、心筋細胞肥大の抑制にともなう心筋虚血の軽減や細胞質の Ca²⁺過負荷の抑制が関与している可能性があると考えられる (3, 4)。TAC モデルにおいて、ダントロレンが生命予後を改善する機序としては、左室リモデリングの抑制による心不全死の予防と致死性不整脈の予防が寄与しているものと考えられる。この点について、以前我々は、TAC 後 8 週の心不全モデルにおいて、*in vivo* で、エピネフリンによる心室頻拍誘発試験を行ったところ、ダントロレン投与にて心室頻拍の誘発は明らかに抑制された (23)。

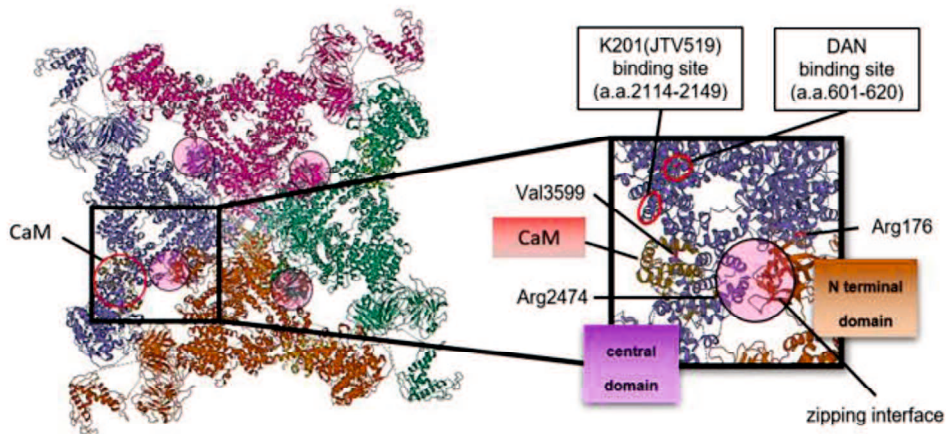
6.3 ダントロレンは RyR2 の 4 量体構造を安定化させる

近年、high-resolution cryo-EM imaging により、RyR2 の 4 量体構造が明らかになった (13)。その 4 量体構造に基づくと、RyR2 の N 末端ドメイン(1-220)と中央ドメイン(2250-2500)間のインターフェースはサブユニット間で相互作用を形成し、CaM 結合ドメイン(3583-3603)に近接している (4, 14)。興味深いことに、ダントロレンの結合部位(N-terminal:601-620)は (11)、JTV519 (K201) の結合部位(central:2114-2149) (10) に近接している (図 5a)。われわれは、ダントロレンも JTV519 も、N 末端ドメインと中央ドメインにそれぞれ結合し、ドメイン連関を強固にして、拡張期 Ca²⁺漏出を抑制することを初めて報告した (10, 11)。さらに、本研究で、TAC 後 8 週に単離された不全心筋細胞において、ダントロレンと JTV519 の拡張期 Ca²⁺漏出抑制効果は、単独では同程度で、ダントロレンと JTV519 の同時投与でも、付加的な効果がみられなかったことより、共通の機序で、Ca²⁺漏出の抑制が起きることが示唆された。

図 5b に本研究のまとめを示す。正常 RyR2 では、RyR2 の隣り合うサブユニットで形成される N 末端ドメイン(1-220)と中央ドメイン(2250-2500)のドメイン連関は強固 (zipping) であり、CaM は各サブユニットに結合している。RyR2 の 4 量体構造は安定しており、4 量体で形成されているチャンネルは閉じており、拡張期 Ca²⁺漏出はない。しかし、TAC により心不全になると、そのドメイン連関は粗 (unzipping) になり、4 量体構造が不安定化し、チ

チャンネルが開口し、拡張期 Ca^{2+} 漏出が生じる。ダントロレンの存在下では、ドメイン連関は強固（zipping）になり、4量体構造が安定化し、CaMがRyR2に結合し、 Ca^{2+} 漏出は消失する。その結果、左室リモデリングや致死性不整脈は抑制され、予後が改善する。

a



b

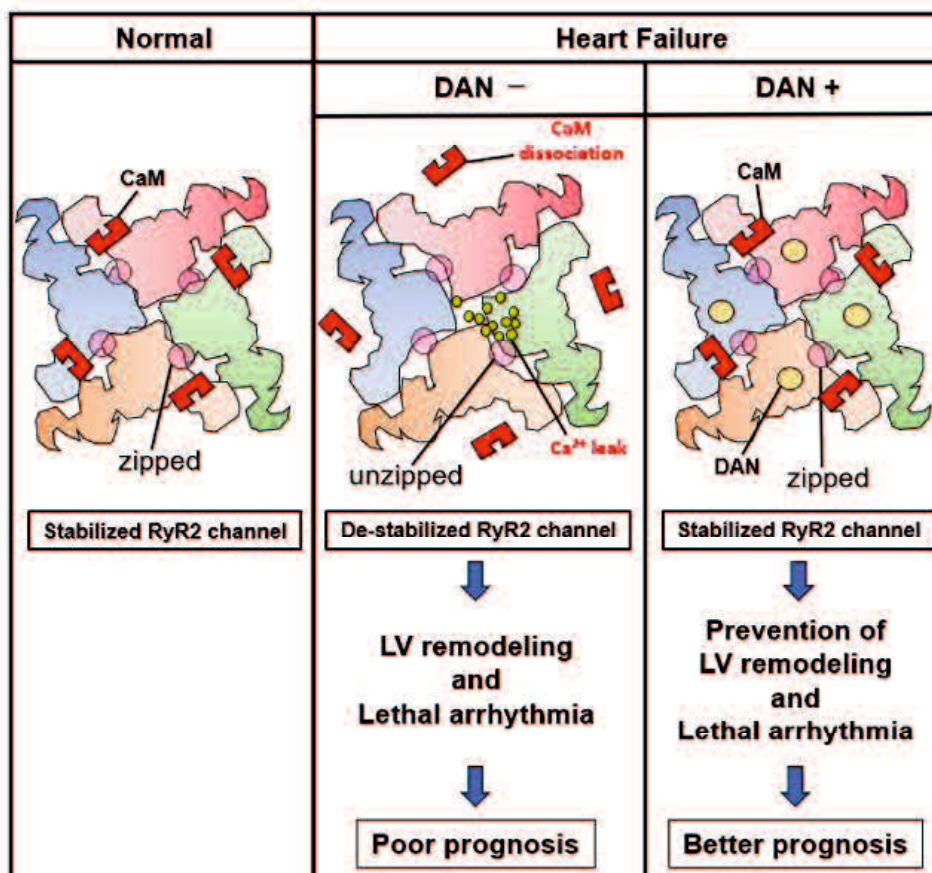


図5 圧負荷誘発性心肥大マウスモデルにおけるダントロレンの分子メカニズム。(a) ダントロレンの結合部位(N-terminal:601-620)はもう1つの4量体安定化薬であるK201(JTV519)の結合部位(central:2114-2149)に近接しており、ともに不全心筋においてCaM-RyR2相互作用の異常を改善することを示唆している。(b) 心臓の圧負荷によりCaMの解離とCa²⁺漏出が誘発され、それによって左室リモデリングが進行し、致死性不整脈が誘発される。しかしながら、ダントロレンはRyR2へのCaM結合親和性を強化し、それによってCaM解離とCa²⁺漏出を防ぎ、左室リモデリングと致死性不整脈を抑制する。

6.4 臨床的意義

RyR2安定化薬としてのダントロレンは、全く新しいタイプの抗心不全、抗不整脈治療薬である。ダントロレンは悪性高熱症、全身こむら返りに対してすでに使用されており(25)、臨床応用する上での安全性は高いと考えられる。さらに、我々は最近、心不全患者における持続性心室頻拍やVT stormなどの致死性不整脈に対して、ダントロレンの静脈注射は心抑制やQT延長を伴わず、不整脈の停止に有効であったことを報告した(15)。以上より、ダントロレンの慢性投与は心不全患者において心機能や予後の改善に有用である可能性がある。ダントロレン慢性投与の安全性と有効性を明らかにするため、我々はSHO-IN試験を現在進行中である(26)。

6.5 研究の限界

本研究はダントロレンがTACによる圧負荷誘発性心肥大およびそれに伴う心不全を予防できるかを検討することを目的とした。そのため、ダントロレンがすでに進行した左室リモデリングを改善するかは不明であり、さらなる研究が必要である。

第7章 結語

ダントロレンの慢性投与によるRyR2安定化は、CaMとRyR2の結合親和性を強化することで、圧負荷誘発性の心肥大と心不全への進展を抑制し、予後を改善した。この研究にて、圧負荷肥好心や心不全に対するダントロレン慢性投与の作用機序や効果が明らかになったが、臨床応用のためには、心不全患者に対する臨床試験の結果が必要と考えられる。

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、山口大学高齢者心不全治療学 小林茂樹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. E. Bisping, P. Wakula, M. Poteser, F.R. Heinzel, Targeting cardiac hypertrophy: toward a causal heart failure therapy, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64 (2014) 293–305.
2. H. Ling, T. Zhang, L. Pereira, C.K. Means, H. Cheng, Y. Gu, N.D. Dalton, K.L. Peterson, J. Chen, D. Bers, J.H. Brown, Requirement for Ca²⁺/calmodulindependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1230–1240.
3. S. Sedej, A. Schmidt, M. Denegri, et al., Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload, *J. Am. Coll. Cardiol.* 63 (2014) 1569–1579.
4. M. Kohno, S. Kobayashi, T. Yamamoto, R. Yoshitomi, T. Kajii, S. Fujii, Y. Nakamura, T. Kato, H. Uchinoumi, T. Oda, S. Okuda, K. Watanabe, Y. Mizukami, M. Yano, Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling, *Commun. Biol.* 3 (2020) 714.
5. N. Ikemoto, T. Yamamoto, Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors, *Front. Biosci.* 7 (2002) d671–d683.
6. M. Yano, T. Yamamoto, Y. Ikeda, M. Matsuzaki, Mechanisms of disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 (2006) 43–52.
7. M. Cerrone, C. Napolitano, S.G. Priori, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: a paradigm to understand mechanisms of arrhythmias associated to impaired Ca²⁺ regulation, *Heart Rhythm* 6 (2009) 1652–1659.
8. T. Oda, M. Yano, T. Yamamoto, T. Tokuhisa, S. Okuda, M. Doi, T. Ohkusa, Y. Ikeda, S. Kobayashi, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure, *Circulation* 111 (2005) 3400–3410.
9. M. Yano, S. Okuda, T. Oda, T. Tokuhisa, H. Tateishi, M. Mochizuki, T. Noma, M. Doi, S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Ikeda, T. Ohkusa, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure, *Circulation* 112 (2005) 3633–3643.
10. T. Yamamoto, M. Yano, X. Xu, H. Uchinoumi, H. Tateishi, M. Mochizuki, T. Oda, S. Kobayashi, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts, *Circulation* 117 (2008) 762–772.

11. S. Kobayashi, M. Yano, T. Suetomi, M. Ono, H. Tateishi, M. Mochizuki, X. Xu, H. Uchinoumi, S. Okuda, T. Yamamoto, N. Koseki, H. Kyushiki, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, 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 (2009) 1993–2005.
12. H. Uchinoumi, Y. Yang, T. Oda, N. Li, K.M. Alsina, J.L. Puglisi, Y. Chen-Izu, R.L. Cornea, X.H.T. Wehrens, D.M. Bers, CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 98 (2016) 62–72.
13. D. Gong, X. Chi, J. Wei, G. Zhou, G. Huang, L. Zhang, R. Wang, J. Lei, S.R.W. Chen, N. Yan, Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin, *Nature* 572 (2019) 347–351.
14. S. Tanaka, T. Yamamoto, M. Mikawa, et al., Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, reduces the development of ventricular arrhythmias, and improves prognosis in pulmonary hypertension, *Heart Rhythm* 19 (2022) 986–997.
15. S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Yoshiga, T. Okamura, R. Kawano, M. Yano, Stabilizing tetrameric structure of ryanodine receptor cures lethal arrhythmia in heart failure, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 15 (2022) e011220.
16. Y. Nakamura, T. Yamamoto, S. Kobayashi, M. Tamitani, Y. Hamada, G. Fukui, X. Xu, S. Nishimura, T. Kato, H. Uchinoumi, T. Oda, S. Okuda, M. Yano, Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *JCI Insight* 4 (2019) e126112.
17. J.R. Mickelson, C.F. Louis, Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects, *Physiol. Rev.* 76 (1996) 537–592.
18. S. Kobayashi, M.L. Bannister, J.P. Gangopadhyay, T. Hamada, J. Parness, N. Ikemoto, Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 6580–6587.
19. K. Paul-Pletzer, T. Yamamoto, M.B. Bhat, J. Ma, N. Ikemoto, L.S. Jimenez, H. Morimoto, P.G. Williams, J. Parness, Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 34918–34923.
20. K. Paul-Pletzer, T. Yamamoto, N. Ikemoto, L.S. Jimenez, H. Morimoto, P.G. Williams, J. Ma, J. Parness, Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor, *Biochem. J.* 387 (2005) 905–909.

21. S. Kobayashi, M. Yano, H. Uchinoumi, T. Suetomi, T. Susa, M. Ono, X. Xu, H. Tateishi, T. Oda, S. Okuda, M. Doi, T. Yamamoto, M. Matsuzaki, Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2R2474S/+ knockin mouse model, *Circ. J.* 74 (2010) 2579–2584.
22. H. Uchinoumi, M. Yano, T. Suetomi, et al., Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor, *Circ. Res.* 106 (2010) 1413–1424.
23. T. Kajii, S. Kobayashi, S. Shiba, S. Fujii, M. Tamitani, M. Kohno, Y. Nakamura, T. Nanno, T. Kato, S. Okuda, H. Uchinoumi, T. Oda, T. Yamamoto, M. Yano, Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521 (2020) 57–63.
24. T. Kato, T. Yamamoto, Y. Nakamura, et al., Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressureoverloaded heart failure, *Heart Rhythm* 14 (2017) 120–127.
25. T. Krause, M.U. Gerbershagen, M. Fiege, R. Weisshorn, F. Wappler, Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments, *Anaesthesia* 59 (2004) 364–373.
26. S. Kobayashi, T. Wakeyama, S. Ono, Y. Ikeda, M. Omura, T. Oda, Y. Hisamatsu, K. Seki, A. Satoh, M. Hiromoto, S. Akashi, K. Uchida, M. Harada, Y. Furutani, Y. Nakamura, M. Kohno, S. Kawamura, M. Obayashi, H. Michishige, M. Yano, A multicenter, randomized, double-blind, controlled study to evaluate the efficacy and safety of dantrolene on ventricular arrhythmia as well as mortality and morbidity in patients with chronic heart failure (SHO-IN trial): rationale and design, *J. Cardiol.* 75 (4) (2020) 454–461.