

学位論文（博士）

RyR2-targeting therapy prevents left ventricular remodeling and ventricular tachycardia in post-infarction heart failure

（心筋梗塞後心不全においてリアノジン受容体を標的とした治療は左室リモデリングと心室頻拍を抑制する）

氏名 藤井 翔平

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 12 月

目次 (仮)

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	4
第5章 結果	9
第6章 考察	25
第7章 結語	25
第8章 謝辞	25
第9章 参考文献	25

第1章 要旨

背景: ダントロレン (DAN) は、心臓リアノジン受容体 (RyR2) の N 末端ドメインの Leu601-Cys620 に結合する。これは、骨格筋型リアノジン受容体の Leu590-Cys609 に対応し、RyR2 を介した拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制する。

目的: 今回我々は DAN の慢性投与が心筋梗塞後の左室リモデリングと心室頻拍 (VT) を抑制するかどうか、また、RyR2 へのカルモジュリン (CaM) の結合親和性を高めることにより拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制すると特定されている V3599K 遺伝子変異においても同様な結果が得られるかどうかを検討した。

方法と結果: 冠動脈左前下行枝結紮によるマウス心筋梗塞 (MI) モデルを作成した。野生型マウスを、野生型 sham 群 (WT-Sham)、DAN を投与した野生型 sham DAN 群 (WT-Sham-DAN)、野生型 MI 群 (WT-MI)、そして DAN 治療を行った野生型 MI DAN 群 (WT-MI-DAN) の 4 群に分類した。また、ホモタイプ RyR2^{V3599K/+} ノックインマウス (KI マウス) を V3599K Sham 群 (V3599K-Sham)、KI MI 群 (V3599K-MI) の 2 つの群に分類した。これらのマウスを術後 12 週後に評価した。

結果: 生存率では WT-MI 群が 40%であったのに対して WT-MI-DAN 群が 73%、V3599K-MI 群で 70%であり生存率の著明な改善を認めた。また、WT-MI-DAN 群、V3599K-MI 群において心エコー検査、組織の解析で左室リモデリングが抑制され、エピネフリン負荷による心室頻拍誘発試験では VT の誘発が抑制された。単離心筋細胞において WT-MI 群では Ca^{2+} スパーク頻度が増加し、RyR2 への CaM の結合親和性が低下していたが WT-MI-DAN 群、V3599K-MI 群では改善していた。

結語: 薬物的および遺伝子学的に RyR2 を安定化させる治療は心筋梗塞後の左室リモデリングや不整脈の誘発を抑制することが示唆された。

第2章 研究の背景

心筋梗塞 (MI) 後の心不全では、左心室 (LV) のリモデリングと致命的な不整脈が予後に大きな影響を及ぼす[1-3]。いくつかの研究結果が示されているが、心筋梗塞後の細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常が左室リモデリングおよび致死性不整脈に及ぼす影響の正確なメカニズムは解明されていない[4-6]。

心筋型リアノジン受容体 (RyR2) の N 末端ドメイン (1-620 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”) は、RyR2 からカルモジュリン (CaM) の解離を引き起こし、それにより、RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} 漏出が生じる結果、心不全やカテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) を起こす[7-21]。最近、Gong らによりクライオ 3D 電子顕微鏡による高分解能の RyR2 の四量体の立体構造が示された[22]。3D 対称四量体構造イメージングによると、1つのサブユニットの N 末端ドメインと隣接するサブユニットの中央ドメインによりドメイン連関が構成されていることがわかった[22]。最近、我々は RyR2 への CaM の結合親和性を高めることで RyR2

からの拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制する V3599K 遺伝子組み換えマウスについて報告した[20]。ヘテロタイプの V3599K 遺伝子組み換えマウスを CPVT 関連の R2474S/+遺伝子組み換えマウスと掛け合わせることでダブルヘテロタイプの R2474S/V3599K 遺伝子組み換えマウスを作成したところ、R2474S/+遺伝子組み換えマウスではエピネフリンの腹腔内注射により全例で CPVT が誘発されたが、R2474S/V3599K 遺伝子組み換えマウスでは RyR2 への CaM の結合親和性が保たれることで RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} 漏出が抑制され、全例で CPVT が抑制された[20]。さらに、ホモタイプの V3599K 遺伝子組み換えマウスにおける横行大動脈縮窄 (TAC)モデルでは、RyR2 への CaM の結合親和性が保たれることで RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} 漏出が抑制され、心肥大および心不全の進行が抑制された[21]。これらの結果は、RyR2 への CaM の結合親和性が保たれることで RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} 漏出が抑制されることが心不全の進行や致死性不整脈の発症を抑制することに重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

ダントロレン (DAN) は、骨格筋型リアノジン受容体 (RyR1) の単一アミノ酸変異によって引き起こされる疾患である悪性高熱症 (MH) の治療に使用される特効薬である[23]。DAN は RyR1 の N 末端ドメインのアミノ酸 Leu (ロイシン) 590-Cys (システイン) 609 に結合することで、N 末端ドメインと中央ドメイン間のドメイン連関障害を是正する[24,25]。

興味深いことに、DAN は RyR2 における Leu601-Cys620 ドメインにも特異的に結合し、完全に保たれている[26,27]。DAN 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で N 末端ドメインと中央ドメイン間のアンジッピングをジッピングにすることにより、CPVT や心不全における異常 RyR2 からの Ca^{2+} 漏出を抑制する [12-21,27]。

第 3 章 目的

V3599K 遺伝子変異およびダントロレン (DAN) の投与といった心筋型リアノジン受容体 (RyR2) を標的とする治療により心筋梗塞後の左室リモデリングと心室頻拍が抑制されるかを検討した。

第4章 研究方法

4.1 材料

ダントロレン (DAN) は SigmaAldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入した。

4.2 動物モデルと研究プロトコル

本研究はアメリカ国立衛生研究所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(#23-062)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。

モデル作成方法としては、18週齢の C57BL/6N マウスと RyR2 V3599K/+KI マウスに対して、2%イソフルランと 100%酸素を 0.5-1.0L/min で混合したチャンバーで麻酔を行い[21]、心筋梗塞 (MI) モデルを作成するために左冠動脈前下行枝 (LAD) の結紮を行った[28]。Sham 群は LAD の結紮を行わないが同様の手術負荷を与えたものとした。手術後 1 日以内に死亡したマウスは、手術の影響による死亡としてこの研究プロトコルから除外した。

図 1A に示すように野生型マウス (WT) は 4 つのグループに分類した。

(1) sham operation と生理食塩水のみを投与した野生型 sham 群 (WT-Sham)、(2) sham operation と DAN を投与した野生型 sham DAN 群 (WT-Sham-DAN、DAN は 20mg/kg/日を腹腔内投与した)、(3) 生理食塩水のみを投与した野生型 MI 群 (WT-MI)、(4) DAN 治療を行った野生型 MI DAN 群 (WT-MI-DAN)。

また、RyR2 への CaM の結合親和性を高めた遺伝子変異の RyR2^{V3599K/+}マウスを 2 つのグループに分類した。

(5) sham operation と生理食塩水のみを投与した KI Sham 群 (V3599K-Sham)、(6) 生理食塩水のみを投与した KI MI 群 (V3599K-MI)。

生理食塩水または DAN の投与は手術 1 週間前から開始して手術から 12 週間後まで継続的に行った (図 1A)。さらに、V3599K-MI マウスに DAN を慢性的に投与すると心筋細胞や心機能に対して追加効果があるかどうかを検証するために 20mg/kg/日の DAN の投与を行った (V3599K-MI-DAN) (図 1B)。DAN は生理食塩水に溶解して 2mg/ml の濃度として 20mg/kg の量を毎日腹腔内投与した。

12 週間後に、マウスをペントバルビタール (70 mg/kg of body weight, 腹腔内投与) で麻酔して、心臓を約 30 秒以内に取り出し、心筋細胞の単離を行った。心臓を取り出した後に、頸椎脱臼してマウスを安楽死させた[21]。

4.3 経胸壁心エコー

心エコー図は過去の報告と同様に、7.5MHz プローブ (Hitachi,UST 5413) 搭載の F37 超音波装置 (Hitachi medical) で解析した[21]。マウスはまず 2-3%イソフルラン吸入で麻酔導入し 1-2%の濃度で維持した。左室径はMモードで解析した[21]。

4. 4 組織

10%ホルマリンを使用して30週齢の野生型およびKIマウスの心臓を固定した。左室乳頭筋レベルでの断面で形態分析を行い、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で評価した[21]。ImageJ macroを使用して全心内膜径と梗塞部位の内径を計測した。Scar areaは梗塞部位の内径/全心内膜径として計測した。残存心筋の間質の線維化は、20倍のレンズで組織を撮像し、心筋線維化面積/全面積×100として計測した[21]。

4. 5 エピネフリン負荷による心室頻拍誘発試験

心電図はテレメトリー (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) を使用して測定した[19]。心電図は安静状態からエピネフリン 2mg/kg 腹腔内注射後 15 分間の記録を行った。心室頻拍 (VT) は 1 秒以上の持続時間の誘発数を計測した[19]。

4. 6 心筋細胞の単離

心筋細胞は過去の報告と同様に、ペントバルビタール (70 mg/kg, 腹腔内投与) による麻酔を行い挿管後に胸部切開で速やかに心臓を摘出し、大動脈から逆行性にコラゲナーゼ非含有液を還流した。さらに混合ガス (95% O₂/ 5% CO₂) により酸素化されたコラゲナーゼ (0.5mg/mL コラゲナーゼ B、0.5mg/mL コラゲナーゼ D) と 50μmol/L の Ca²⁺、そしてプロテアーゼ 14 を含む MEM (最小必須培養液 Sigma, St Louis, MO, USA) により大動脈から逆行性に還流後に、左室心筋を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。Ca²⁺濃度は 50、100、300、600、そして最終的に 1mmol/L まで濃度を上昇させた。単离心筋細胞はラミニンコーティングされた培養容器に移し、37°C、95% O₂ 5% CO₂ 環境下で培養した[21]。

4. 7 Ca²⁺スパークと筋小胞体内の Ca²⁺貯蔵量の解析

Ca²⁺スパークは過去の報告と同様に、sham 群、MI 群ともにレーザー共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を用いて測定した[20,21]。さらに KI マウスに対する DAN の追加効果があるかどうかを確認するために KI マウスの単离心筋細胞に DAN を投与して Ca²⁺スパークの数を比較した。単离心筋細胞へ 20μM Fluo4-AM(Molecular Probes, OR, USA)を 20 分間室温で培養しながら取り込ませた後、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。Ca²⁺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 Ca²⁺スパークを記録した。Ca²⁺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[11]。Ca²⁺貯蔵量の測定に関しては、既報の通り、10mM カフェインの急速還流を行い評価した[20,21]。

4. 8 心筋細胞の一過性 Ca^{2+} 濃度変化モニタリング

単離心筋細胞へ 20 μM Fluo4-AM (Molecular Probes, OR, USA) を 20 分間室温で培養しながら取り込ませた後、Tyrode 溶液で 2 回洗浄した。すべての実験は 28°C で実施した。電気刺激はフィールドスティムレーター (IonOptix 社、USA 製) で行い、蛍光デジタル顕微鏡 (BZ9000, Keyence, Japan) により細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行い、1,2,3,4,5 Hz 刺激後の自発性 Ca^{2+} 放出を測定した[12,20,21]。

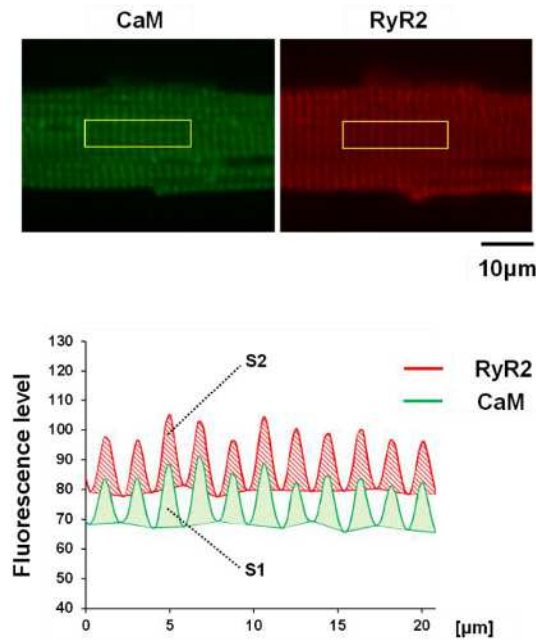
4. 9 心筋細胞酸化ストレスレベル

これまでに、酸化ストレスはドメインアンジッピングによる RyR2 からの Ca^{2+} 漏出を誘発することが報告されている[10]。DAN が Ca^{2+} 漏出を抑制する機序は、DAN が RyR2 に直接結合することで構造的に安定化するからなのか、酸化ストレスそのものを抑制するからなのかを分析するために、心筋細胞の酸化ストレスレベルの測定を行った。酸化ストレスレベルは、蛍光プローブである 2,7-ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA; モレキュラープローブ) を使用して、細胞内活性酸素種 (ROS) の産生を評価した[10]。単離心筋細胞は 2.0 μM の DCFH-DA を 15 分かけて取り込ませたのちに、レーザー共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を用いて測定した。蛍光レベルは WT-Sham 群を基準として比較した。

4. 10 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[15,18,20,21]。次に 1% BSA と 0.5% TritonX-100 で希釈した Anti-CaM 抗体 (EP799Y, Abcam) 及び Anti-RyR 抗体 (Sigma-Aldrich, C3-33) とともに 4°C で一晩反応させた。その後、Alexa488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes) と Alexa633-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes) のそれぞれの 2 次抗体で標識した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した後、Anti-CaM 抗体 (Alexa488; 緑) と Anti-RyR 抗体 (Alexa633; 赤) の局在化を評価するために、LP 650 フィルターと BP 505-530nm とを組み合わせそれぞれ 633nm および 488nm 励起で画像を撮影した。両方の二次抗体は同時に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。局在の一致を解析するにあたって、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。基準値からのサルコメアに分布する Alexa Fluor 633 および Alexa Fluor 488 の蛍光強度の周期的な増加は、約 25 μm の長さの蛍光部分面積を積分し、その値を長さで割った値として評価した (補足図 1)。そして、蛍光強度の平均値を RyR2 に結合した CaM、RyR2 として算出した。二次抗体標識だけでは検出可能な蛍光パターンは示されなかった[15,18,20,21]。

補足図1



補足図1 心筋細胞における内因性 CaM と RyR2 の局在

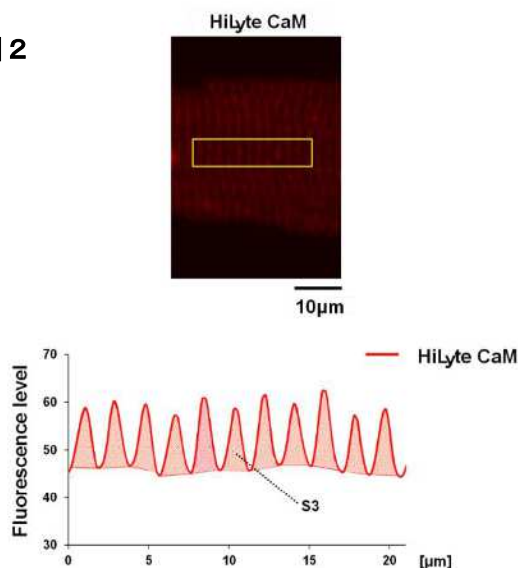
(上図) CaM (緑) と RyR2 (赤) の代表的な免疫染色の写真。CaM と RyR2 はサルコメアに沿って観察されその局在は一致している。

(下図) サルコメアに分布する Alexa Fluor 633 および Alexa Fluor 488 の蛍光強度は基準値から周期的に増加している。その蛍光部分面積 (CaM は S1、RyR2 は S2) を積分し、長さ (約 25μm) で割った値の平均値を Z ライン上に存在する CaM/RyR2 の比として算出した。

4. 11 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., 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を行った心筋細胞に導入した[18,20,21]。簡単に説明すると、心筋細胞を以下の成分で組成した internal solution (300mM K-aspartate, 10mM HEPES at pH 7.2 (120 mM), 2.5 mM Ca²⁺-EGTA, 10 mM HEPES at pH 7.2 (0.5 mM), 0.1M ATP pH 7.2 (3 mM), free Ca²⁺ (10 nM), 0.1 M reduced glutathione (10 mM), creatine phosphokinase (5 U/ml), 0.1 M phosphocreatine (10 mM), and dextran (4%)) 10nM に溶解したサポニン (1.5mg/ml) で 30 秒間浸した後 internal solution 10nM で 5 分間 3 回、40nM internal solution で 5 分間洗浄した。細胞を洗浄後、10nM-3000nM の F-CaM を 30 分間で導入した。そして、局在化した CaM を F-CaM の蛍光強度による濃度測定で評価した。蛍光標識された細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) で撮影 (絞り 1.3、励起 633nm、蛍光 640nm) し、サルコメアに沿った HiLyte Fluor 647 の蛍光強度の周期的な変化を長軸に沿った関心領域 (約 25μm) として加算し、その距離で除して評価した (補足図 2)。蛍光強度の平均値を RyR2 に結合した CaM として算出した [15,18,20,21]。

補足図 2



補足図 2 サポニン処理を行った心筋細胞における外因性 CaM と RyR2 の結合親和性

(上図) CaM (赤) の代表的な免疫染色の写真。

(下図) サルコメアに分布する Alexa Fluor 633 の蛍光強度は基準値から周期的に増加している。その蛍光部分面積 (S3) を積分し、長さ (約 25 μ m) で割った値の平均値を RyR2 に結合する CaM として相対的に定量化した。

4. 12 CaM-SANPAH クロスリンキング法による RyR2 に対する CaM の結合分析

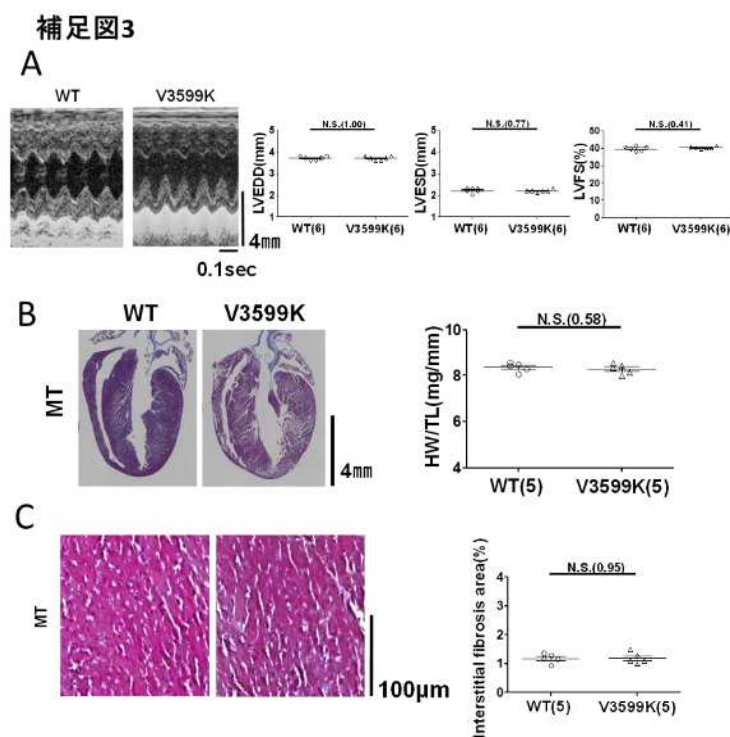
RyR2 への CaM の直接的な結合は光反応性架橋剤のスルホスクシンイミジル-6-4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノヘキササン酸塩 (Sulfo-SANPAH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して評価した[15,18,20,21]。結合バッファー (150 mmol/L KCl, 20 mmol/L MOPS, pH 7.2) で調節した組み換え CaM 50 μ mol/L と sulfo-SANPAH 100 μ mol/L を 30 分間暗室で反応させた後に、リジンを付加、Amicon Ultra フィルター (MWCO 10k) を使用して精製した。均質化した心筋組織を暗室、ガラスチューブの中で 1mg/mL の結合バッファー (150 mmol/L KCl, 10 μ mol/L CaCl₂, 20 mmol/L MES, pH 6.8) と 100nmol/L の CaM-SANPAH で混合した。その後、7 秒間で UV クロスリンクさせ、抗 CaM 抗体 (Merck, Millipore, Darmstadt, Germany) を使用してウェスタンブロット法を行った。CaM-SANPAH とクロスリンクした RyR2 は 550kDa のバンドとして検出された[15,18,20,21]。

4. 13 統計解析

正規分布をもつ 6 つのグループの統計解析には、Post hoc Tukey 検定による一元配置分散分析を使用した。また、正規分布を呈さない 6 つのグループの統計解析には、事後ダネット検定を伴う Kruskal-wallis 検定を使用した。2 群間の差の検定には対応のない T 検定を使用した。生存率に対する DAN の効果を評価するために、各グループに対して Kaplan-Meier 曲線を作成し、ログランク検定を行った。全てのデータは、平均値 \pm 平均値の標準誤差(SEM)として表記した。P<0.05 は統計学的に有意差があるとした。

第5章 結果

5.1 DAN および RyR2V3599K 遺伝子変異は、心筋梗塞後の心筋リモデリングを抑制する
 左前下行枝結紮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 3)。またこれらのデータはこれまで報告してきたデータと一致している[21]。心エコーにおいて WT-MI 群では左室拡張末期径 (LVDD)、左室収縮末期径 (LVESD) の拡大を認め、左室収縮率 (LVFS) が低下していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では抑制されていた (図 1C)。心筋梗塞から 12 週間後では WT-MI 群で心重量体重比は増加し、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では抑制されていた (図 1D)。また、マッソントリクローム染色で青く染まる Scar area には MI 群間で差は見られなかった (図 1E)。間質の線維化は WT-MI 群で増加していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では抑制されていた (図 1F)。



補足図3 基準となる野生型マウス (WT) と V3599K KI マウスの特徴

(A) 代表的な心エコー図と要約データ。WT と V3599K KI マウスの間に左室拡張末期径 (LVEDD)、左室収縮末期径 (LVESD)、左室内径短縮率 (LVFS%) ($(LVEDD-LVESD) / LVEDD \times 100$) に差は認めない。

(B) 心臓の長軸切片 (マッソン・トリクローム染色) と心重量 (HW) と脛骨長 (TL) 比の要約データ。WT と V3599K KI マウスの中で HW/TL 比に差は認めない。(C) マッソン・トリクローム染色された心筋組織 (左室) の線維化領域の要約データ。WT と V3599K KI マウスの中で線維化領域に差は認めない。個々のマウスの値は、平均 \pm SEM とともにプロット。括弧はマウスの匹数。* $P < 0.05$ (対応のない T 検定)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、WT 野生型、N.S. 有意差なし

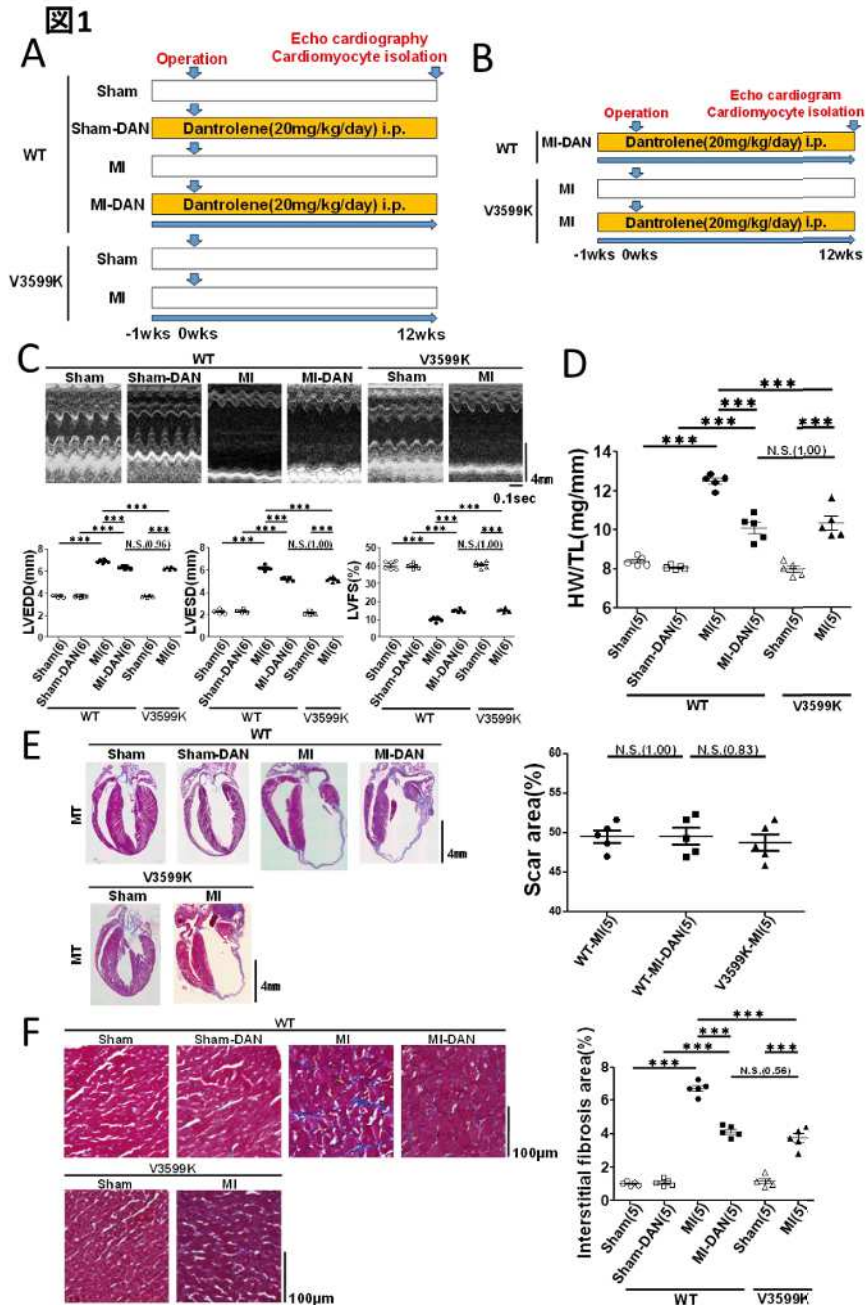


図1 構造的および機能的特徴、および WT、DAN、V3599K マウスにおける心筋梗塞(MI)後の予後。

(A)心筋梗塞後の心筋型リノジン受容体 (RyR2) を標的とする治療に対する効果を評価するための研究デザイン

(B)V3599K KI-MI に対するダントロレンの慢性投与による追加効果を評価するための研究デザイン

(C)心エコー図と計測値。左室拡張末期径 (LVEDD)、左室収縮末期径 (LVESD)、左室内径短縮率(LVFS%) (LVEDD-LVESD) / LVEDD×100)。(D)心重量 (HW) と脛骨長 (TL) 比の計測値。

(E) 心臓の長軸切片 (マッソン・トリクローム染色) と心筋梗塞後の Scar area の計測値。

(F) マッソン・トリクローム染色された心筋組織の間質の線維化領域の計測値。

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 < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001 (事後 Tukey 多重比較検定と一元配置分散分析)。i.p. 腹腔内注射、LAD 左冠動脈前下行枝、V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、N.S. 有意差なし

5. 2 DAN および V3599K 変異遺伝子変異はエピネフリン誘発性心室頻拍を抑制する

エピネフリン (2mg/kg) の腹腔内注射による心室頻拍誘発試験では、心筋梗塞から 12 週間後の全ての WT-MI 群で心室頻拍が観察されたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では著明に減少した (図 2A)。

5. 3 DAN および V3599K 遺伝子変異は心筋梗塞後の生存率を改善する

Kaplan-Meier 生存曲線では心筋梗塞後 12 週間の時点で WT-MI 群の生存率は 40%、WT-MI-DAN 群は 73%、KI-MI 群は 70%と WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群で WT-MI 群より生存率の改善を認めた (Log rank test; WT-MI vs. WT-MI-DAN, $P < 0.05$; WT-MI vs. KI-MI, $P < 0.05$) (図 2B)。

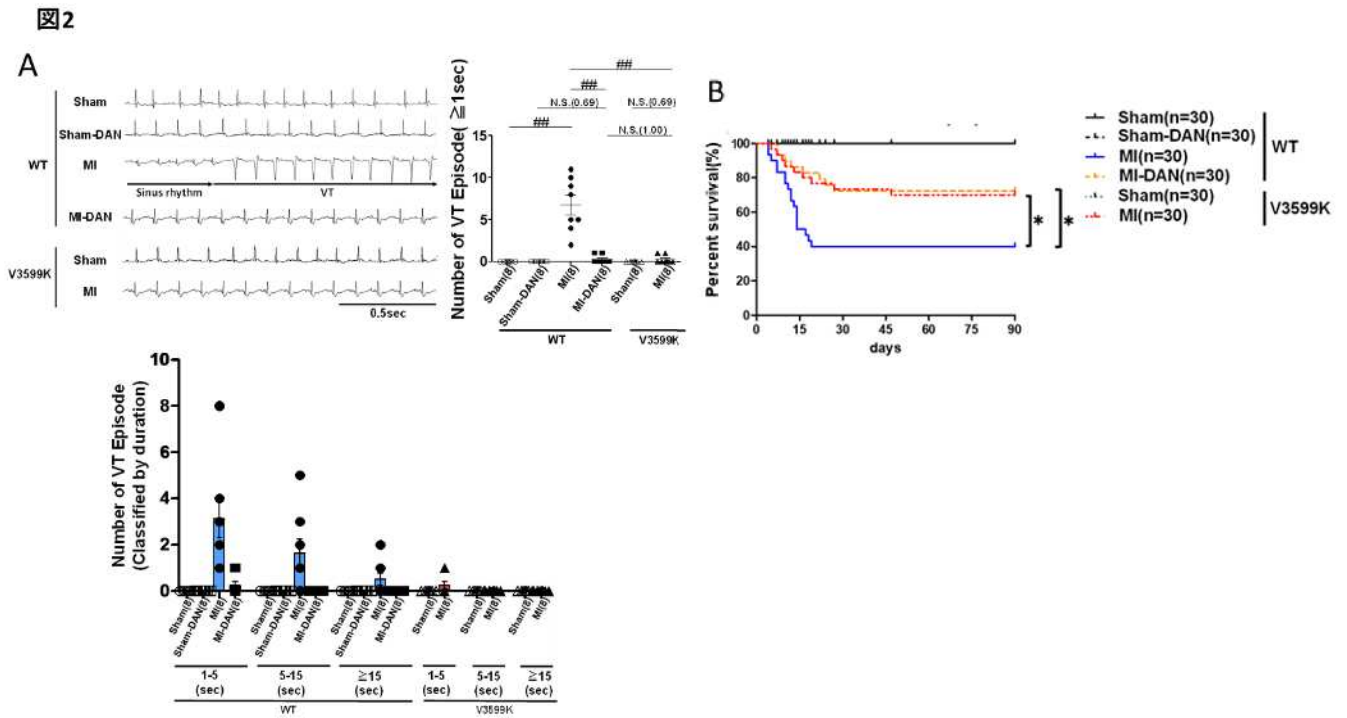


図 2 エピネフリン負荷による心室頻拍 (VT) 誘発試験と Kaplan-Meier 生存分析

エピネフリン負荷 (2.0mg/kg 腹腔内注射) による代表的な心電図 (左) と計測値 (右の図は 1 秒以上の VT の出現回数、下の図は VT の持続時間で分類した VT の出現回数とエピネフリン投与から 15 分間の VT の発生頻度と持続時間)。VT の頻度は、平均±SEM とともにプロット。## $P < 0.01$ (事後ダネット検定を伴う Kruskal-wallis 検定)

(B) Kaplan-Meier 生存分析。

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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし

5. 4 DAN および RyR2 V3599K 遺伝子変異は心筋梗塞後の心筋細胞の肥大を抑制し、心筋細胞の機能を改善する

ベースラインとしての WT-Sham 群、WT-Sham-DAN 群、V3599K-Sham 群では細胞長に差は認めなかった。心筋梗塞から 12 週間後の WT-MI 群では心筋細胞の肥大が観察されたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では心筋細胞の肥大が抑制されていた (図 3A)。

また、WT-MI 群ではサルコメアショートニングと Ca^{2+} トランジェントのピークの低下を認めたが、WT-MI-DAN 群および KI-MI 群では改善を認めていた。サルコメアショートニングと Ca^{2+} トランジェントのピークからベースラインの 80% に戻るまでの時間は WT-MI 群で延長していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では改善していた。ベースラインとしての WT-Sham 群、WT-Sham-DAN 群、V3599K-Sham 群の間に差は認めなかった (図 3B,C)。

5. 5 DAN および RyR2 V3599K 遺伝子変異は心筋梗塞後の異常細胞内 Ca^{2+} ハンドリングを改善する

ベースラインとしての WT-Sham 群、WT-Sham-DAN 群、V3599K-Sham 群では Ca^{2+} スパーク頻度の増加はなく、群間で差は認めなかった。一方で WT-MI 群では Ca^{2+} スパーク頻度が増加していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では改善を認めていた (図 4A)。

筋小胞体 (SR) 内の Ca^{2+} 含有量は、WT-MI 群では低下していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では改善を認めていた (図 4B)。1-5 Hz のプログラムペーシングにおいて WT-MI 群では自発性 Ca^{2+} 放出 (SCaT) を増加させたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群で改善していた。WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群で差は認めなかった (図 4C)。

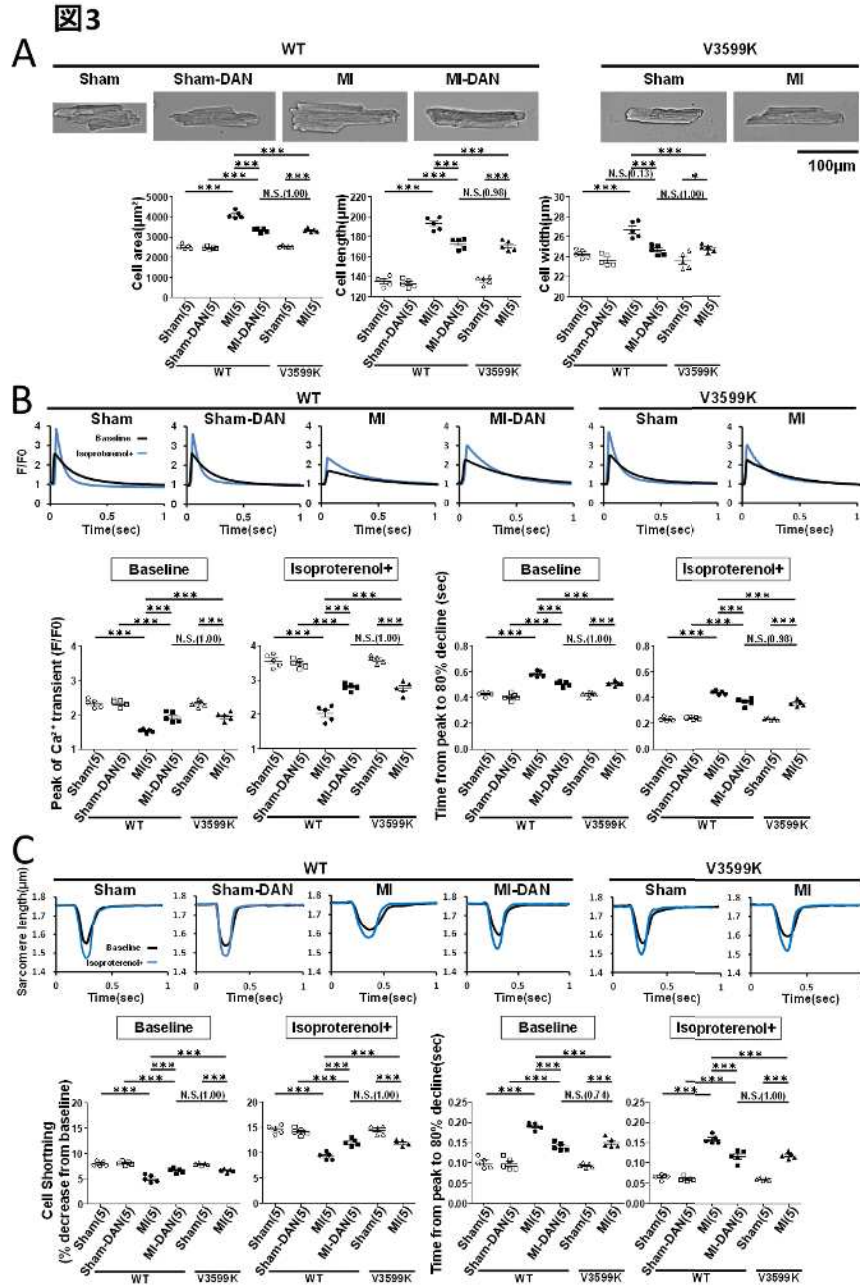


図3 心筋細胞の形態、サルコメアショートニングおよび Ca^{2+} トランジェント

(A)単離心筋細胞の代表的な画像と細胞長、細胞幅、および細胞面積の要約データ。5つの心臓からの250~400個の細胞を計測。

(B)代表的な Ca^{2+} トランジェントの波形と要約データ。Fluo-4AM 蛍光シグナルにより1Hzのペーシングレート中のデータを計測した。5つの心臓からの20~30個の細胞を計測。個々のマウスの値は、平均 \pm SEMとともにプロット。括弧はマウスの匹数。

(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の代表的な波形と要約データ。5つの心臓からの20~30個の細胞を計測。個々のマウスの値は、平均 \pm SEMとともにプロット。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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし

図4

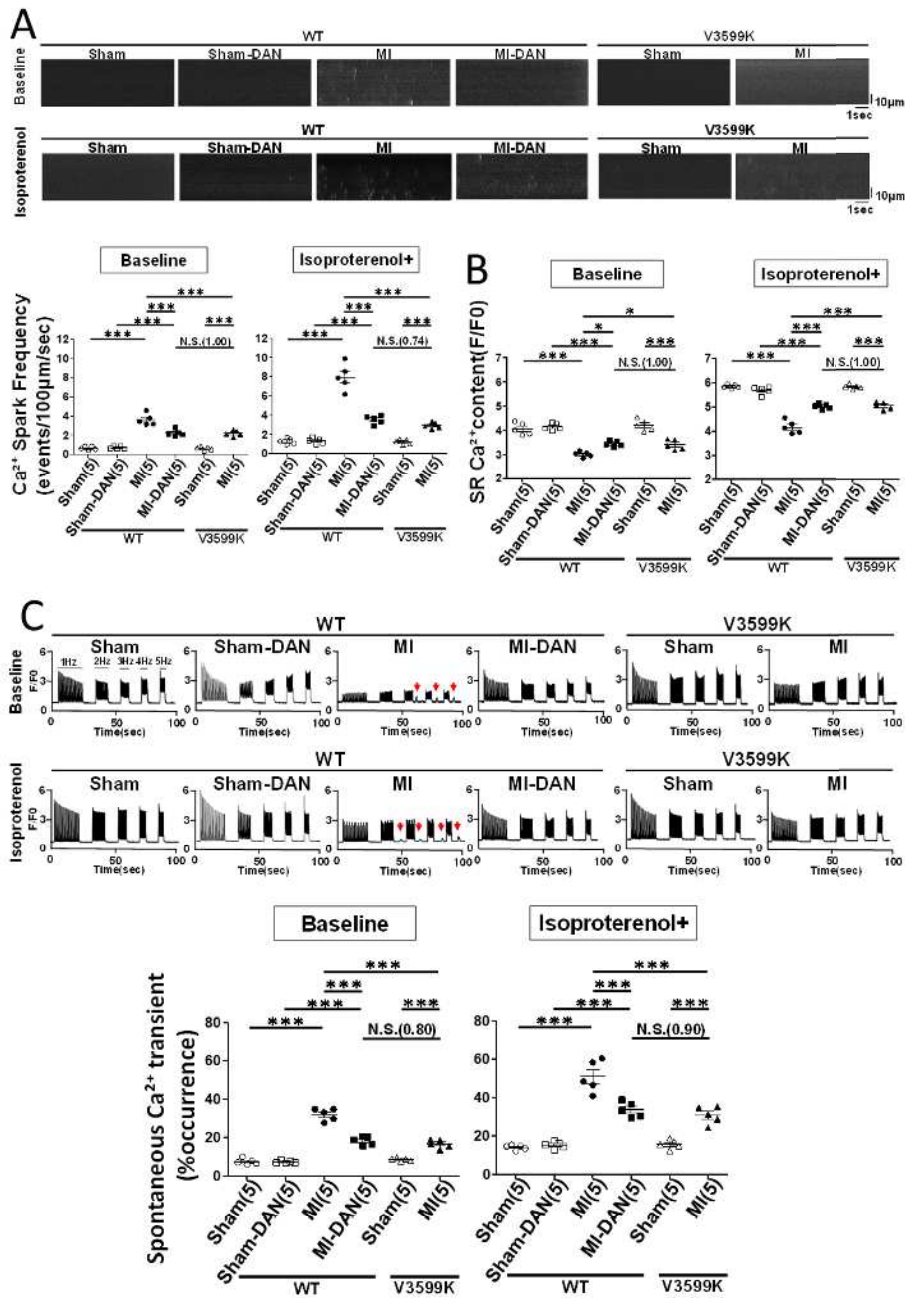


図4 心筋梗塞後の、Ca²⁺スパーク、1-5 Hz ペーシングでの自発性 Ca²⁺放出 (ScaT)、筋小胞体 (SR) 内の Ca²⁺含有量

(A) Ca²⁺スパークの代表的な画像と要約データ。上図は Fluo-4AM 蛍光シグナルにより観察された Ca²⁺スパーク。下図は要約データ(5つの心臓から 15-25個の細胞を計測)。(B) 筋小胞体内の Ca²⁺含有量と要約データ。筋小胞体内の Ca²⁺含有量はカフェイン誘発 Ca²⁺トランジェントとして 2Hz のペーシングレート後に 20mM のカフェインを投与し、5、6秒間で計測した。要約データは右下図に示す(5つの心臓から 20-30個の細胞を計測)。(C) 自発性 Ca²⁺放出 (ScaT) の代表的な画像と要約データ。右図は ScaT の出現率を示した要約データである (5つの心臓から 80-100個の細胞を計測)。↓は ScaT を示している。ScaT は 1、2、3、4、5Hz のプログラム刺激を加えて誘発している。平均±SEM とともにプロット。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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし

5. 6 DAN および RyR2 V3599K 遺伝子変異は心筋梗塞後の酸化ストレスに影響しない

酸化ストレスを DCFH-DA による染色で評価した。ベースラインとしての WT-Sham 群、WT-Sham-DAN 群、V3599K-Sham 群では酸化ストレスの増加はなく、群間で差は認めなかった。一方で、WT-MI 群、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では酸化ストレスが増加していた。このことは、ダントロレンが酸化ストレスを減少するのではなく、リアノジン受容体へのカルモジュリンの親和性を改善することで異常 Ca^{2+} 漏出を抑制することを示している (図 5A,B)。

図5

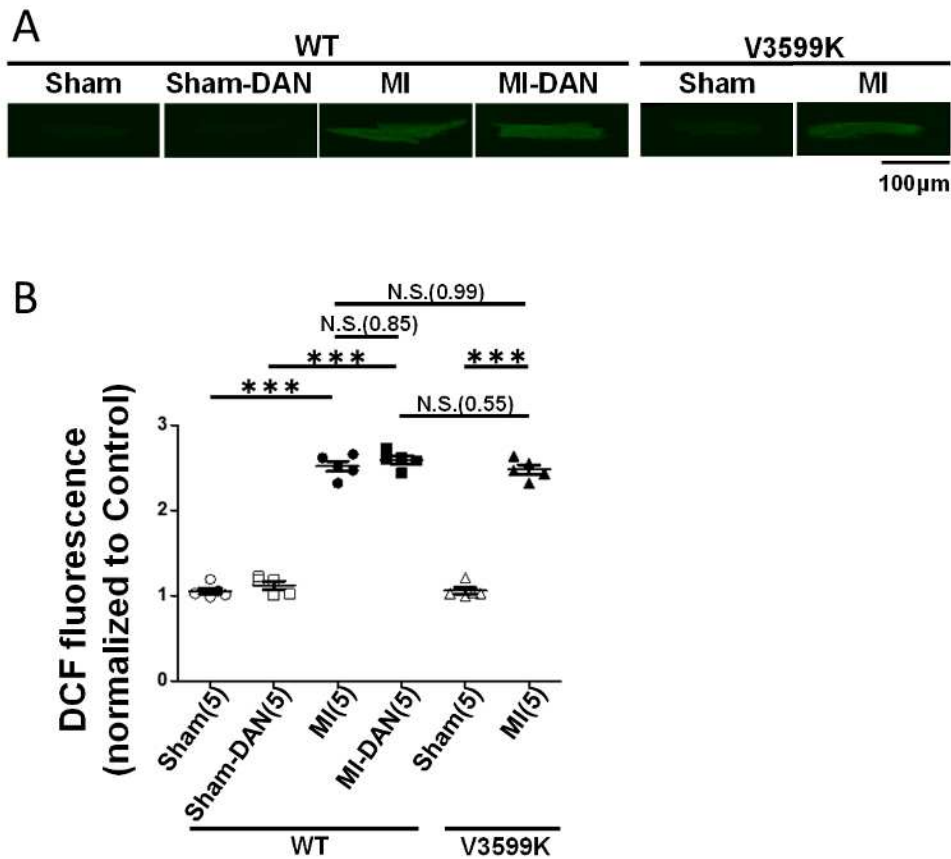


図5 心筋細胞の酸化ストレスレベルの評価

2、7-ジクロロフルオロセイン二酢酸(DCF)染色で標識した代表的な画像。(B)DCF染色の要約データ。平均±SEMとともにプロット。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)。

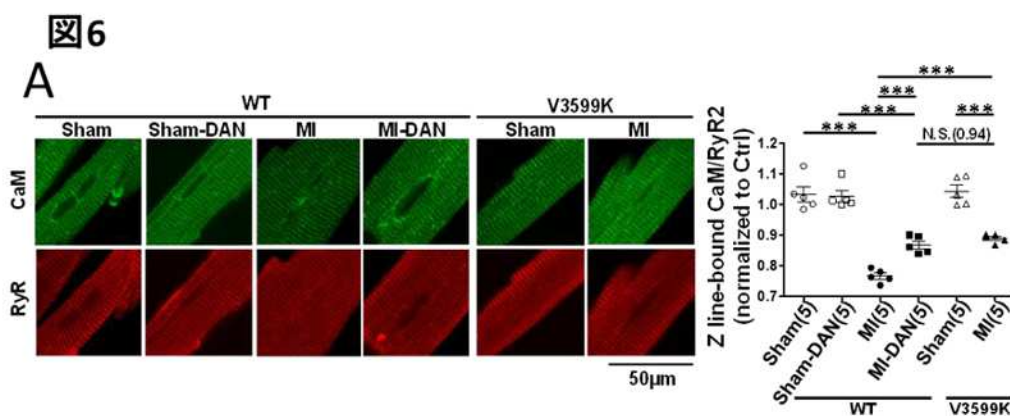
V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし

5. 7 DAN および RyR2 V3599K 遺伝子変異は RyR2 に対する CaM の結合能を改善させる

MI モデルマウスにおいて DAN が RyR2 に対する CaM の結合親和性の低下を改善させるか評価した。定常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[19]。WT-MI 群では Z line 上の内因性 CaM は減少していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では Z line 上の内因性 CaM の結合は保たれていた (図 6A)。

また、RyR2 に結合する CaM の動態に対する DAN の効果を検討するために、心筋梗塞から 12 週間後の心筋細胞へサポニンによる細胞膜透過処理を施した後に、HiLyte Fluor 647 により蛍光標識した CaM (F-CaM) を導入し、F-CaM の濃度ごとに評価した。外因性に導入した F-CaM の蛍光がサルコメアに沿った周期的なパターンを取っていることから、この方法を利用して、RyR2 に対する CaM の結合親和性を評価した。WT-MI 群では WT-Sham 群と比較して Z line 上の CaM は濃度依存性に高濃度側へシフトしていたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では改善し、Kd 値も低下していた (図 6B)。比較した 6 群間で Bmax(A.U.) に差は認めなかった (WT-Sham 12.87 ± 0.5574 、WT-Sham-DAN 13.01 ± 0.8514 、WT-MI 11.57 ± 0.4506 、WT-MI-DAN 11.49 ± 0.6618 、V3599K-Sham 13.05 ± 0.5456 、V3599K-MI 12.21 ± 0.5823) (図 6B)。

RyR2 への外因性 CaM の直接的な結合は UV crosslinker での結合によっても評価を行った。WT-MI 群では RyR2 に対する CaM の結合親和性が低下していたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では保たれていた (図 6C)。CaM-SANPHA クロスリンキング法によって算出された Kd 値は外因性 F-CaM 結合により得られた結果と一致していた (図 6B,C)。スラミン(10 μ M)は CaM に代わって RyR に結合することにより [20,21]、RyR2 へ結合する CaM の特異性を証明することができる (図 6C)。



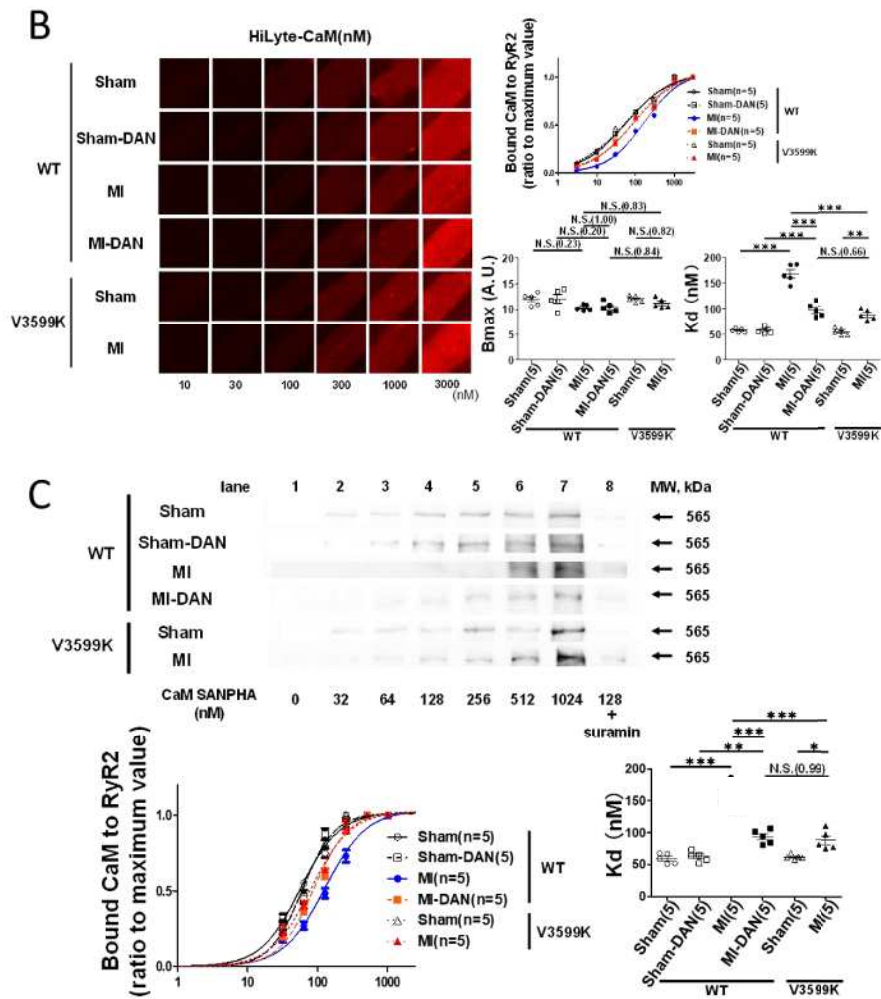


図6 心筋梗塞から12週間後の心筋細胞におけるCaM結合のRyR2に対する効果

(A) 抗CaM抗体を使用してRyR2に結合する内因性CaMを評価した代表的な画像と要約データ。CaMは緑色、RyR2は赤色で標識している。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。5つの心臓から10-15個の細胞を計測している。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)。

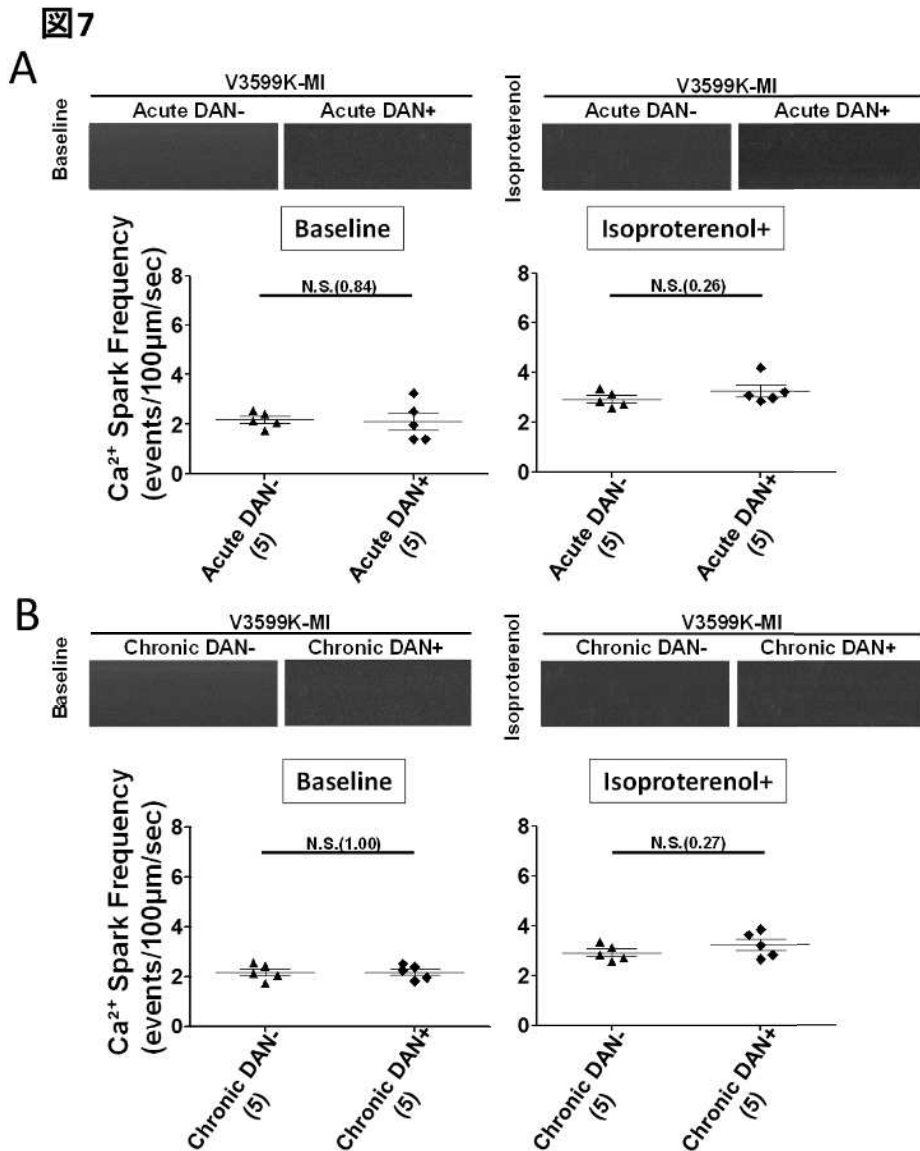
(B) 心筋細胞を外因性のCaM(HiLyte-CaM)で標識した代表的な図(左)と結合親和性曲線の要約データ(右)と最大結合部位数(Bmax)、受容体への結合親和性(Kd)を示した。HiLyte-CaMの蛍光強度を計測し、結合親和性曲線はHillの曲線を用いて作成した。5つの心臓から6-10個の細胞を計測している。個々のマウスの値は、平均±SEMとともにプロット。括弧はマウスの匹数。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001(事後Tukey多重比較検定と一元配置分散分析)。

(C)CaM-SANPAHクロスリンキング法によるRyR2へのCaMの直接結合の評価。

RyR2に結合したCaM-SANPAHの代表的なイムノブロットと光反応性架橋剤のスルホスクシンイミジル-6-4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノヘキサン酸塩(上図)。RyR2へのCaMの結合は抗CaM抗体で検出されるRyR2に結合したCaMとしてイムノプロットで評価した。RyR2へのCaMの結合機能はCaM-SANPAHの濃度で評価した(左下図)。CaMの結合はCaMの最大結合(1024nM)に対する比率として表現した。Kd値は右下図に示した。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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし。

5. 8 V3599K-MI の心筋細胞に DAN の投与を行っても追加効果はなかった

V3599K-MI の単離心筋細胞に $1\mu\text{M}$ の DAN の投与を行い、急性の追加効果があるかどうかを Ca^{2+} スパークで検証した。結果としては、V3599K-MI の単離心筋細胞に DAN を投与の有無にかかわらず Ca^{2+} スパークの頻度は変わらなかった(図 7A)。さらに、V3599K-MI マウスに DAN を慢性的に投与し、DAN の慢性投与による追加効果があるかどうかを単離心筋細胞における Ca^{2+} スパークで検証した。結果としては、DAN を慢性的に投与した群 (V3599K-MI-DAN) と、DAN を投与していない群(V3599K-MI)で Ca^{2+} スパークの頻度は変わらなかった(図 7B)。また、心エコーによる心機能も比較したが、DAN を慢性的に投与した群 (V3599K-MI-DAN) と、DAN を投与していない群(V3599K-MI)で差は認めなかった(図 7C)。これらの結果から、DAN による薬物的な治療と V3599K による遺伝学的な治療は RyR2 を介した Ca^{2+} 漏出の抑制という共通のメカニズムをもっていることが示唆された。



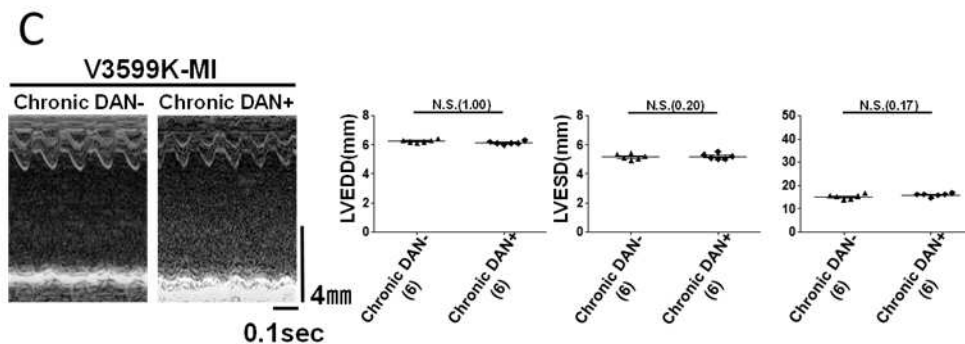


図 7 V3599K-MI 単離心筋細胞の Ca^{2+} リークに対する DAN の急性効果と V3599K-MI マウスの Ca^{2+} リークと心機能に対する DAN の慢性効果の評価

(A)V3599K-MI マウスから単離した心筋細胞における DAN ($1\mu\text{M}$) の急性効果を Ca^{2+} スパークで評価した。上図は Fluo-4AM 蛍光シグナルにより観察された Ca^{2+} スパーク。下図は要約データ (5つの心臓から 15-25 個の細胞を計測)。個々のマウスの値は、平均 \pm SEM とともにプロットした。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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし。

(B)腹腔内注射による DAN の慢性投与を施した V3599K-MI マウス単離心筋細胞の Ca^{2+} リーク評価 (DAN の慢性効果)。上図は Fluo-4AM 蛍光シグナルにより観察された Ca^{2+} スパーク。下図は要約データ (5つの心臓から 15-25 個の細胞を計測)。個々のマウスの値は、平均 \pm SEM とともにプロットした。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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし。

(C)V3599K KI-MI マウスに DAN の慢性投与を行っても左室リモデリング抑制の追加効果は認めない。代表的なエコー図と要約データ。左室拡張末期径 (LVEDD)、左室収縮末期径 (LVESD)、左室内径短縮率 (LVFS%) (LVEDD-LVESD) / LVEDD $\times 100$)。個々のマウスの値は、平均 \pm SEM とともにプロットした。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)。V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、DAN ダントロレン、WT 野生型、MI 心筋梗塞、N.S. 有意差なし。

第 6 章 考察

6. 1 総括

本研究の最も重要な発見は、*in vivo* の心筋梗塞モデルにおいて DAN が V3599K RyR2 遺伝子変異と共通の作用メカニズムで致死性不整脈と左室リモデリングを抑制したことである。左室前下行枝結紮から 12 週間後のエピネフリン負荷による心室頻拍誘発試験では、WT-MI 群で 100%心室頻拍が誘発されたが、WT-MI-DAN 群および V3599K-MI 群では顕著に抑制された。DAN の慢性投与は V3599K RyR2 遺伝子変異と一致して心筋梗塞後の肥大を抑制した。心筋梗塞後の生存率は DAN による薬物学的治療により顕著に改善した。最近の報告では V3599K 遺伝子組み換えマウスと野生型マウスのベースラインの特徴には差がないとい

う前提で、V3599K RyR2 による遺伝子治療はストレス下（横行大動脈縮窄による圧負荷モデル）における RyR2 からの Ca^{2+} 漏出と CaM の解離を抑制することにより左室肥大と心不全への移行を抑制することが示されている[21]。DAN は野生型心筋梗塞モデルの心筋細胞における CaM と RyR2 の結合親和性を高める(図 6A-C)。DANによる薬物的治療と V3599K 遺伝子変異による遺伝学的治療が致死性不整脈と左室肥大の抑制に対する共通の作用メカニズムを有していることを証明するために、本研究では内因性の CaM の結合 (図 6A) と外因性の CaM の結合 (図 6B) の評価のみではなく、CaM-SANPAH クロスリンキング法による CaM と RyR2 の直接的な結合を評価した。これらの実験は、V3599K 遺伝子変異と同様に、野生型心筋梗塞心不全モデルマウスにおいて DAN が RyR2 に対する CaM の結合親和性を保つことを示した(図 6C)。また、V3599K 遺伝子組み換え心筋梗塞モデルにおいて DAN の急性・慢性投与は左室リモデリングや Ca^{2+} 漏出に対する追加効果は認めなかった (図 7A-C)。これらの結果から、DAN による薬物的治療と V3599K 遺伝子変異による遺伝学的治療がリアノジン受容体からの CaM の解離と Ca^{2+} 漏出の抑制による共通の作用メカニズムを有していることが示された。DAN と V3599K 遺伝子組み換えマウス心筋細胞の機能や左室リモデリングを完全には改善できない理由としては、左室肥大や心不全の進行に Unzipping 仮説 (RyR2 からの Ca^{2+} 漏出と CaM の解離) 以外の細胞内 Ca^{2+} ハンドリングが関与している可能性が考えられる。

6. 2 DAN が左室リモデリングと致死性不整脈を抑制するメカニズム

左室リモデリングの原因となる心筋梗塞後の左室肥大と線維化は DAN と V3599K 遺伝子組み換えマウスにおいて抑制された。DAN と V3599K 遺伝子変異による心筋梗塞後の左室肥大と心筋線維化の抑制メカニズムは解明されていない。最近、我々は野生型横行大動脈縮窄モデルにおいて肥大のシグナル伝達が亢進しているが、V3599K 遺伝子変異モデルでは亢進していないことを報告した (RyR2 からの CaM 解離を介する CaMKII-HDAC 経路、カルシニューリン NFAT 経路[21])。このように RyR2 からの CaM の解離と Ca^{2+} 漏出は左室肥大の進行に重要な役割を果たしていることがわかる。本研究では、DAN の慢性投与が RyR2 からの CaM の解離と拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制することを示したが、左室リモデリングの抑制機序としてはこれらの 2 つの肥大のシグナル伝達を抑制したのではないかと考えている。また、心筋線維化の抑制機序としては細胞内 Ca^{2+} 過負荷や細胞肥大の抑制による相対的虚血の緩和が関与しているのではないかと考えている[21]。Scar area に関しては野生型心筋梗塞群、DAN 投与心筋梗塞群、V3599K 遺伝子変異心筋梗塞群と比較して差は認めなかったことは DAN や V3599K が心筋壊死の伸展には影響しないことを示唆している。DAN は不安定化した RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} 漏出によるトリガードアクティビティを機序とした心室性致死性不整脈を抑制した[12,13,18,19,20,21]。本研究では DAN の慢性投与および V3599K 遺伝子変異が拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制することによりエピネフリン誘発性心室頻拍を抑制した。Marks らは RyR2 に超特異的に結合する rycals (JTV-519) が RyR2 を安定

化させることにより拡張期 Ca^{2+} 漏出を抑制して CPVT やデュシェンヌ型重症筋無力症関連心筋症のマウスモデルで心室頻拍や突然死を抑制することを報告した[29,30]。心筋梗塞後の持続性心室頻拍の発症機序にはさまざまな機序があるが、RyR2 安定化治療は心不全における致死性不整脈に対する治療として期待されるものになるかもしれない。図 5 に示すように心筋の酸化ストレスは sham 群と比較して DAN や V3599K 遺伝子変異を含むすべての心筋梗塞群で上昇していたが、このことはどの治療群においても直接的な抗酸化作用がない可能性を示唆している。

6. 3 RyR2 四量体構造を安定化する DAN の分子メカニズムの改訂

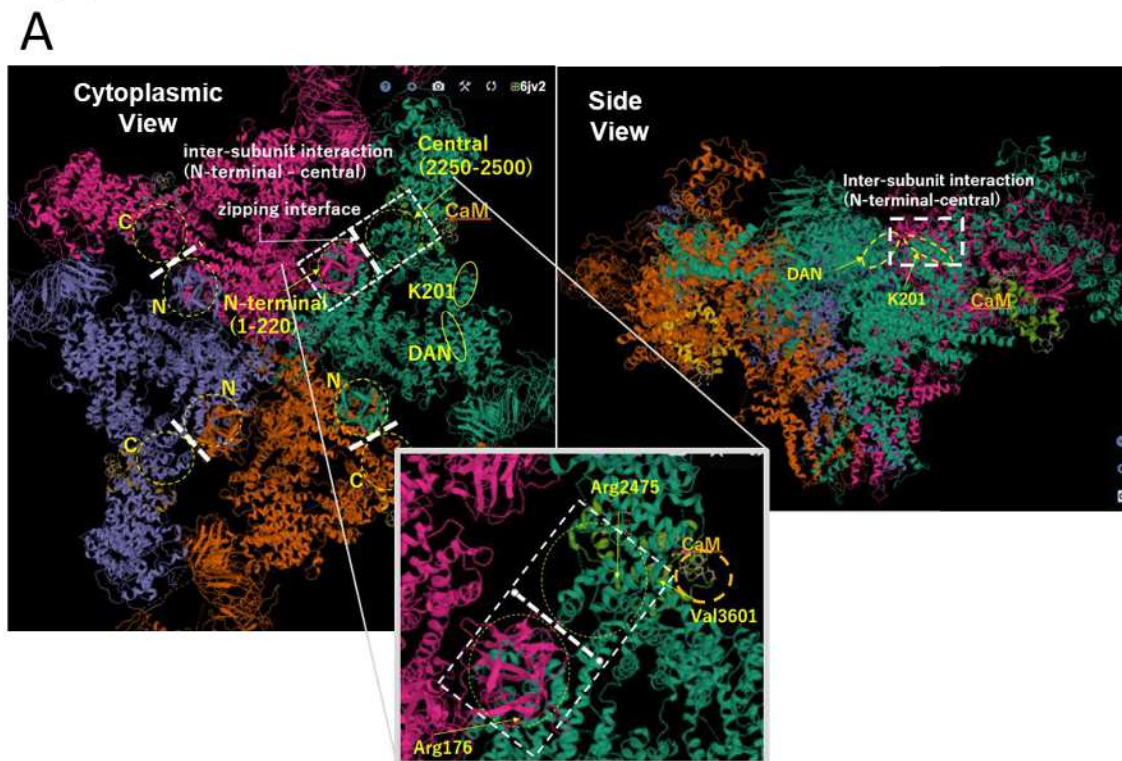
ドメインペプチドアプローチ[7-21、25、27]および蛍光共鳴エネルギー移動法[31]は、RyR2 内の N 末端 (1~600 アミノ酸) と中央ドメイン (2000~2500 アミノ酸) 間のドメイン連関障害 (RyR2 から CaM が解離するドメイン unzipping 仮説) を証明した [31]。ドメイン unzipping と CaM の解離は RyR2 からの拡張期 Ca^{2+} 漏出を起こす。近年、クライオ電子顕微鏡法が目覚ましい進歩を遂げ、高分子複合体である RyR2 の近原子分解能での立体構造解析が可能となった[22,32]。PDB ID : 6JV2 [22]から参照される RyR2 の立体構造からは、N 末端 (1~220 アミノ酸 : 赤) ドメインと中央 (2250~2500 アミノ酸 : 緑) ドメイン間の連関部は 4 か所でヒンジを形成し、生理的開閉では空間的距離がわずかしか変化しておらず[32]、この部分が四量体構造を安定化するための「要」をなしていることが示唆される (図 8A)。3D 電子顕微鏡像では N 末端ドメイン(1-620 アミノ酸)と中央ドメイン(2000-2500 アミノ酸)は同一サブユニット間だけでなく隣接するサブユニット間で連関している[21,22]。DAN の結合部位[601-620 アミノ酸]と別の RyR2 安定剤 K201 (JTV519) の結合部位 (2114-2149 アミノ酸) は N 末端ドメインとセントラルドメイン内に位置している (図 8A)。さらに、N 末端ドメイン (1-620 アミノ酸) は 3593-4207 と接するとともに[22]、CaM の結合部位 (3583-3603 アミノ酸) と V3599K 変異部位とも非常に近接している (図 8A)。これらの証拠はダントロレン結合部位 (601-620 アミノ酸) が zipping 部位と CaM 結合部位と非常に近接しており[21,22]、DAN が構造的に CaM の解離と unzipping を抑制し、チャンネルを安定していることが示唆される。興味深いことに、DAN の結合部位[601-620 アミノ酸]と別の RyR2 安定剤 K201 (JTV519) の結合部位 (2114-2149 アミノ酸) は結合部位が隣接しているため [11、21、22]、これらの薬剤は RyR2 を安定化させる共通の作用メカニズムをもっていることが推測される。最近、我々は横行大動脈縮窄モデルの不全心筋細胞における拡張期 Ca^{2+} 漏出に関して DAN と K201 が同様な効果をもつが、DAN と K201 を同時に投与しても追加効果がないことを報告した。この結果は、DAN と K201 が共通の作用メカニズムを有している可能性を示唆している。

心筋梗塞後において DAN や V3599K 遺伝子変異が RyR2 から CaM の結合を保つメカニズムに関しては一部しか解明されていない。CaM と RyR2 の binding curve において野生型 sham 群、DAN 投与を行った野生型 sham 群、V3599K 遺伝子変異 sham 群間で Kd と Bmax

に差はなかった (図 6B)。WT-MI 群では CaM の binding curve が右方向にシフトしていたが、WT-MI-DAN 群と V3599K-MI 群では CaM の結合が比較的保たれており、binding curve は正常に近い位置に存在していた (図 6B,C)。DAN や V3599K により CaM の結合親和性が高まるのは RyR2 のドメイン連関障害がおきたときだけなのかもしれない。

心不全に対する **zipping-unzipping** 仮説とダントロレンの作用メカニズムはまとめると以下のとおりである。心筋梗塞後の不全心筋細胞において、過剰な交感神経刺激や酸化ストレスがドメイン **unzipping** を起こし、CaM の解離と Ca^{2+} 漏出を起こすことで、左室リモデリングや致死性不整脈が誘発される (図 8B)。カテコラミンなどの強いストレスを受けると、SR での Ca^{2+} 貯蔵量が増加し、RyR2 からの Ca^{2+} 漏出が増加する。DAN が隣接するサブユニット間の結合を保つことにより (**unzipping** から **zipping** へ)、心筋梗塞後であっても CaM の解離が抑制されるとともに Ca^{2+} 漏出が抑制される。V3599K 遺伝子変異も同様に、心筋梗塞後の RyR2 への CaM の結合親和性を保つことにより RyR2 からの Ca^{2+} 漏出を抑制する。その結果、DAN と V3599K 遺伝子変異は左室リモデリングと致死性不整脈を抑制し、予後を改善させる (図 8B)。

図8



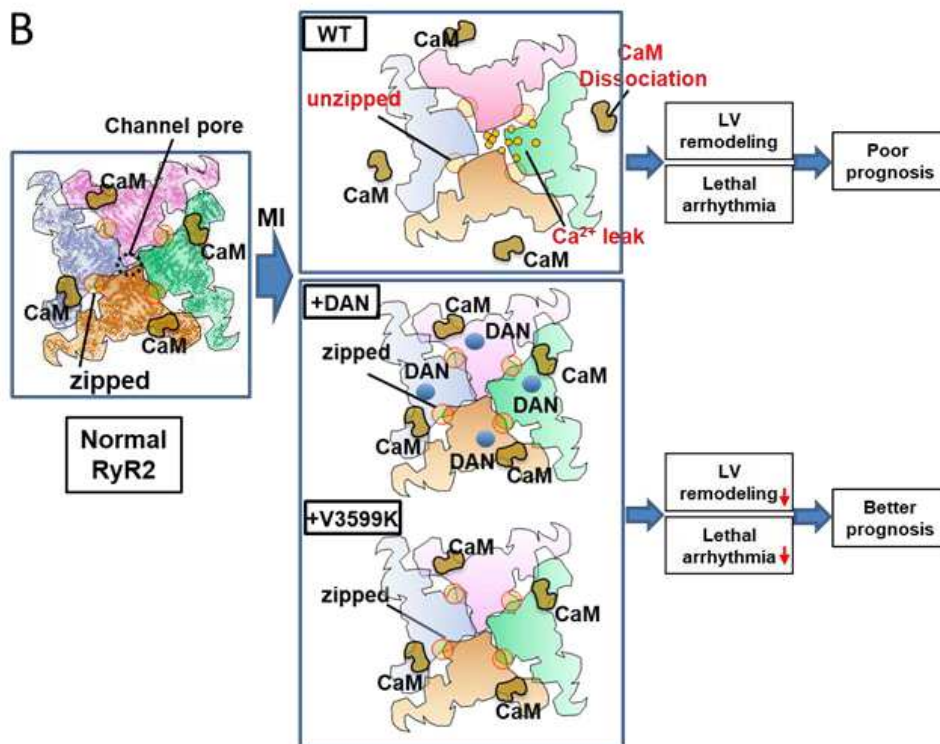


図8 (PDB ID: 6JV2、参考文献[21] [22]から示唆される3次元構造をもとにした)心筋梗塞後の左室リモデリングに対するDANの作用メカニズムと改定ジッピング/アンジッピング仮説

(A) N末端(1~220アミノ酸:赤)ドメインと中央(2250~2500アミノ酸:青)ドメイン間は異なるサブユニット間で連関している。CaM結合部位(3583~3603アミノ酸)は連関部の近傍に位置している。DANの結合部位(601~620アミノ酸)はCaM結合部位とドメイン連関部の近傍に位置している。興味深いことに、DANの結合部位は別のRyR2安定剤K201(JTV519)の結合部位(2114~2149アミノ酸)と極めて近接している。この改定“ジッピング/アンジッピング”仮説は高次構造分析に基づいている。CPVTにおいてアルギニン176はN末端ドメイン(R176Q)の変異であり、アルギニン2474は中央ドメイン(R2474S)の変異部位である。バリン3601はRyR2のCaMの結合部位(3583-3603アミノ酸)のアミノ酸を示している。

CaM カルモジュリン、CPVT カテコラミン誘発性多形性心室頻拍、DAN ダントロレン。

(B)正常な心筋細胞においてドメイン連関部はジッピングの状態となっており、RyR2からCaMは解離していない。したがって、チャンネルの4量体構造は維持されCa²⁺漏出が抑制される(左図)。しかし、心筋梗塞後の不全心筋細胞ではドメインアンジッピングにより連関障害がおこり、CaMが解離してCa²⁺漏出が生じる。DANはドメイン連関部近傍に結合してドメイン連関をアンジッピングからジッピングの状態に高めることで、CaMの解離を抑制し、Ca²⁺漏出を抑制する。興味深いことにダントロレンの結合部位はジッピング/アンジッピングドメイン連関部位とカルモジュリンの結合部位と極めて近接しているため、DANが4量体構造を安定化させ、RyR2に対するCaMの結合親和性を保つことが示唆される(右中央図)。同様にRyR2 V3599K遺伝子変異は心筋梗塞後においてもRyR2に対するCaMの結合親和性を保つことによってRyR2からのCa²⁺漏出を抑制する(右下図)。したがって、DANによる薬物的治療とRyR2 V3599K遺伝子変異による遺伝子治療は共通の作用機序で左室リモデリングや致死性不整脈を抑制し、生存率を改善する。

CaM カルモジュリン、C 中央、DAN ダントロレン、LV 左室、MI 心筋梗塞、NN末端ドメイン、RyR2 心筋型リアノジン受容体、V3599K RyR2 V3599K 遺伝子変異、WT 野生型。

6. 4 臨床的意義

左室リモデリングと致命性不整脈の予防は心筋梗塞後の予後を改善するために重要である。本研究では、リアノジン受容体安定化治療が心筋梗塞後の心不全において左室リモデリングや致死性不整脈を抑制する効果があることが実験的に示された。さらに、リアノジン受容体安定化治療は心抑制を来さないことから心筋梗塞後の心不全治療に有利に働く[27、34]。現在、慢性心不全および左室駆出率低下例における心血管死、心不全の増悪、致死性不整脈に対するダントロレンの慢性投与の効果を見ることを目的とした他施設共同二重盲検試験が進行中である[35]。本研究は *in vivo* と *in vitro* とともに DAN によるリアノジン受容体安定化治療が細胞内 Ca^{2+} ハンドリングに関連した左室リモデリングの抑制と抗不整脈効果により心筋梗塞後の予後を改善することを示した最初の報告である。もし、上記の臨床試験 DAN の効果を証明できれば、心筋梗塞後の心不全の予後改善に貢献すると考えられる。もう一つの注目すべきポイントは DAN がトリガードアクティビティによる心室性不整脈を抑制することにおいて強い効果があることである[13、19、27]。最近、我々は、DAN の静注が心不全患者における持続性心室頻拍、VT ストームを止める効果があることを報告した[34]。本研究においても DAN の慢性投与が心室頻拍のような致死性不整脈を抑制することを示している。

6. 5 限界

本研究にはいくつかの限界があった。第一に、主に細胞内 Ca^{2+} ハンドリングや RyR2 に焦点をあてたが、炎症、神経液性因子、酸化ストレスなど、心筋梗塞後の心筋細胞の機能や左室リモデリングに影響を与える要因は他にも複数存在することである。今回は遺伝子治療との比較により、左室リモデリングに対する DAN の分子メカニズムを明らかにすることができた。第二に、本研究では DAN の慢性投与 (20 mg/kg/day、腹腔内注射) を行ったが、心筋梗塞後の治療に最適な DAN の投与量は正確には不明である。この投与量は過去の報告[13,19]に基づいており、実際に心筋梗塞後の左室リモデリングと心室頻拍の予防に効果的であった。第三に、ジッピング/アンジッピング仮説は単純化した仮説であることである。それゆえに、不全心における RyR2 を介した Ca^{2+} 漏出の詳細なメカニズムを解明するにはさらなる実験が必要と考えられる。第四に、心筋細胞における DAN や V3599K 遺伝子変異が RyR2 に対する内因性 CaM の結合親和性を改善しているかを評価する従来の免疫沈降実験は技術的に難しかったことである。正常心筋細胞においてほとんどの CaM が Z ライン上の RyR2 に結合しているという事実に基づき[36,37]、本研究では CaM の蛍光実験を行った。しかし、外因性カルモジュリン(F-CaM、CaM-SANPHA)だけではなく、内因性の CaM も細胞内に存在しているため、RyR2 への結合性の評価は調節された結果の可能性もある。それゆえに、根底にあるメカニズムを証明するために代替実験が必要な可能性も考えられる。

第7章 結語

遺伝学および薬物学的にリアノジン受容体を安定化することは心筋梗塞後の左室リモデリングや致死性不整脈を抑制し予後を改善する可能性がある。

第8章 謝辞

本研究の遂行および論文を作成するにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました山口大学名誉教授矢野雅文先生に感謝を申し上げます。また、指導教官の山口大学高齢者心不全講座教授小林茂樹先生をはじめ、これまでの研究の礎を築いてこられた器官病態内科学の諸先生方、スタッフの方々にはこの場を借りて深く感謝申し上げます。

本学位論文の主要部分は、Shohei Fujii et al. RyR2-targeting therapy prevents left ventricular remodeling and ventricular tachycardia in post-infarction heart failure, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 178 巻 36-50 ページ 2023 年に原著論文として発表したものです。

第9章 参考文献

1. St John Sutton M, Lee D, Rouleau JL, Goldman S, Plappert T, Braunwald E, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2577–2582
doi: 10.1161/01.CIR.0000070420.51787.A8
2. Verma A, Meris A, Skali H, et al. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction: The VALIANT (valsartan in acute myocardial infarction) echocardiographic study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2008; 1:582–591
doi:10.1016/j.jcmg.2008.05.012
3. Dridi H, Kushnir A, Zalk R, et al. Intracellular calcium leak: a unifying mechanism and therapeutic target for heart failure and atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17:732–747.
doi: 10.1038/s41569-020-0394-8
4. Høydal MA, Kirkeby-Garstad I, Karevold A, et al. Human cardiomyocyte calcium handling and transverse tubules in mid-stage of post-myocardial-infarction heart failure. *ESC Heart Fail* 2018; 5:332–342
doi:10.1002/ehf2.12271

5. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 98:62–72
doi:10.1016/j.yjmcc.2016.06.007
6. Njagic A, Wilson C, Cartwright EJ. Targeting Ca²⁺ handling protein S for the treatment of heart failure and arrhythmias. *Front Physiol* 2020;11:1068
doi:10.3389/fphys.2020.01068
7. Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci* 2002;7:d671–d683
doi:10.2741/A803
8. Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mechanisms of disease: Ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:43–52
doi:10.1038/ncpcardio0419
9. Oda T, Yano M, Yamamoto T, et al. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation* 2005;111:3400–3410
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.507921
10. Yano M, Okuda S, Oda T, et al. Correction of defective inter-domain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 2005;112:3633–3643
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.555623
11. 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
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.718957
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
doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209312
13. Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2R2474S/+ knockin mouse model. *Circ J* 2010;74:2579–2584
doi:10.1253/circj.CJ-10-0680
14. 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
doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.046
15. Ono M, Yano M, Hino A, et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca²⁺ release in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010;87:609–617
doi:10.1093/cvr/cvq108
 16. Hino A, Yano M, Kato T, et al. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res* 2012;96:433–443
doi:10.1093/cvr/cvs271
 17. 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
doi:10.1016/j.bbrc.2014.03.152
 18. 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
doi:10.1016/j.hrthm.2016.10.019
 19. Kajii T, Kobayashi S, Shiba S, et al. 2. Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;521:57–63
doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.071
 20. 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
doi:10.1172/jci.insight.126112
 21. 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
doi:10.1038/s42003-020-01443-w
 22. Gong D, Chi X, Wei J, et al. Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin. *Nature* 2019;572:347–351
doi:10.1038/s41586-019-1377-y
 23. Mickelson JR, Louis CF. Malignant hyperthermia: Excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects. *Physiol Rev* 1996;76:537–592
doi:10.1152/physrev.1996.76.2.537

24. Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Bhat MB, et al. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2002; 277:34918–34923
doi:10.1074/jbc.M205487200
25. Kobayashi S, Bannister ML, Gangopadhyay JP, Hamada T, Parness J, Ikemoto N. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2005;280:6580–6587
doi:10.1074/jbc.M408375200
26. 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
doi:10.1042/BJ20041336
27. 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
doi:10.1016/j.jacc.2009.01.065
28. Okada H, Takemura G, Kosai K, et al. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor- β signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 2005;111:2430–2437
doi:10.1161/01.CIR.0000165066.71481.8E
29. Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, et al. Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest* 2008;118(6):2230–2245.
doi: 10.1172/JCI35346
30. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, et al. Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(4):1559–1564.
doi: 10.1073/pnas.0908540107
31. Oda T, Yang Y, Nitu FR, et al. In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding. *Circ Res* 2013;112:487–497
doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300290
32. 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
doi:10.1126/science.aah5324
33. Yano Y, Kobayashi S, Uchida T, et al. Stabilizing cardiac ryanodine receptor with dantrolene treatment prevents left ventricular remodeling in pressure-overloaded heart

- failure mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;642:175-184
doi: 10.1016/j.bbrc.2022.12.063.
34. Kobayashi S, Yamamoto T, Yoshiga Y, et al. Stabilizing Tetrameric Structure of ryanodine receptor Cures Lethal Arrhythmia in heart Failure, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol* 2022; 15: e011220
doi.org/10.1161/CIRCEP.122.011220.
35. Kobayashi S, Wakeyama T, Ono S, et al. 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* 2020;75:454–461
doi:10.1016/j.jjcc.2019.08.020
36. Yang Y, Guo T, Oda T, et al. Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure. *Circ Res.* 2014;114(2):295–306.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302857.
37. Wu X, Bers DM. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes. *Cell Calcium.* 2007;41(4):353–364.
doi: 10.1016/j.ceca.2006.07.011.