

## 心血管病における NO 標的 SERCA2 の障害

足立 健

防衛医科大学校 循環器内科

### 【研究の背景】

申請者は心血管病共通の Molecular Target として筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA2) の障害を研究し、一酸化窒素 (NO) が SERCA2 Cys674 の SH 基を受容体として活性化することを発見した<sup>4,6)</sup>。また、動脈硬化・糖尿病の心血管で、この Cys674 が亜硫酸化 (sulfenylation) して、この機構が破綻することを発見した<sup>8,9)</sup>。近年、この研究を発展させ、A) Cys674 酸化修飾 SERCA2 を検出する抗体 (Cys674 Sulfenylated SERCA2 antibody (**SO<sub>3</sub>-SERCA2 Ab**)) を開発した。これにより動物・人の病理検体で免疫染色やウエスタンブロットを用いて Cys674 Sulfenylated SERCA2 の検出が可能となった<sup>7)</sup>。B) NO/SERCA2 経路を遮断する SKI (SERCA Cys674Ser mutant Knock In) マウスをボストン大学と共同開発した。このマウスにおいては血管障害が増悪したが、心臓における解析は十分に行っていない。

### 【目 的】

本研究の目的は心筋障害における SERCA2 障害を評価し、臨床的疾患マーカーと薬物標的を探索することである。また基礎研究では、心筋障害時の心筋細胞電気学的特性変化と不整脈発症への SERCA2 Cys674 の関与を検討する。

### 【方 法】

- A) 心筋症患者の心筋生検検体を SERCA2 Ab、SO<sub>3</sub>-SERCA2 Ab で免疫染色を行う。SO<sub>3</sub>-SERCA2 の染色強度を判定量して、SERCA2 発現で標準化する。各患者の臨床背景と、MACE (死亡、悪化、入院) を調査し、SO<sub>3</sub>-SERCA2/SERCA2 と比較する。
- B) SKI マウスを用いた心不全における不整脈、細胞内カルシウム動態の検討  
SKI マウスと野生型 (WT) マウスにアンジオテンシン II (ANGII) を一週間ミニポンプで持続皮下注射を行い、心肥大モデルを作成する。このモデルを用いて、心不全時の SERCA2 Cys674 の役割を検討する。マウスの血圧、肥大、心電図、mRNA 発現を評価する。電気生理学検査 (EPS) のプログラム刺激により、心室性不整脈の誘発を試みる。細胞内カルシウム測定及びオプテカルマッピング法でカルシウム動態を検討する。SERCA2 活性を調節するカルモジュリンキナーゼ (CaMK II) 阻害剤、リアノジン受容体 (RYP) 阻害剤 (ダントロレン、カルベジロール) NO 合成酵素阻害剤の効果を検討する。

### 【結 果】

- A) 心筋症患者 SO<sub>3</sub>-SERCA2 は 65 歳以上で染色が著増を認め、MACE に差を認めなかった。一方、65 歳以下の検討では、BNP、MACE と正の相関を認めた。心事故の内、2 名に不整脈イベントを認めた<sup>1)</sup>。
- B) SKI-ANGII と WT-ANGII では血圧、肥大、繊維化に違いは認めなかった。心電図では QT 延長を認め、EPS において WT-ANGII では心室性頻拍 (VT) を認めなかったのに対して、AKI-ANGII では約 55% に VT を認めた。RT-PCR では SKI-ANGII で CaMK II と RYP の発現上昇を認めた。カルシウム測定では、Ca<sup>2+</sup> Transient に明らかな異常を認め、小胞

体での SERCA2 と RYR の障害が考えられた。CaMK II 阻害剤と RYR を安定化するダントロレンを投与したところ、Ca<sup>2+</sup> Transient が補正され、VT の発現が著減した。

## 【考 察】

SERCA2 Cys674 障害は若年性拡張型心筋症の予後と相関する。今まで、SERCA2 の発現低下が心不全の病態の Key Molecule であることはよく知られていた。しかし AAV を用いた重症心不全患者遺伝子治療は CUPID2 Trial では遺伝子導入のみでは有効性を見出せなかった。今後は SERCA2 の酸化修飾による障害についての解析が治療戦略に重要かもしれない。また、SERCA2 Cys674 の酸化修飾を模倣した SKI マウスでは、小胞体の Ca<sup>2+</sup>ハンドリング異常から QT 延長、VT につながる事が判明し、小胞体を標的とした VT 治療の可能性も見出した。このモデルは今後の不整脈電気生理の解析と治療戦略開発に非常に有用であると考えられた。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

若年心筋症で SERCA2 の酸化障害が BNP と予後に相関するデータが得られた。今後 SERCA2 発現、Activity Assay に SERCA2 の酸化障害の評価を加えることにより、心血管病に対する臨床的意義が明快となりうる。SERCA2 Cys674 の障害は細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態を障害して、致死性不整脈の原因になりうる事が示唆された。小胞体の SERCA2 酸化修飾、CaMKII、RYR を標的とした新規治療法は、今後の心筋症患者の不整脈治療標的となる可能性が示唆された。

## 【参考・引用文献】

本研究の一部は、日本循環器学会、日本循環器学会 BCVR、日本不整脈学会 YIA、米国心臓病学会、欧州心臓病学会で発表を行った。また、欧州心臓病学会不整脈部門 YIA で発表予定である。

- 1) Toya T, Ito K, Kagami K, Osaki A, Sato A, Kimura T, Horii S, Yasuda R, Namba T, Ido Y, Nagatomo Y, Hayashi K, Masaki N, Yada H, Adachi T. Impact of oxidative posttranslational modifications of SERCA2 on heart failure exacerbation in young patients with non-ischemic cardiomyopathy: A pilot study. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2019 Nov 14;26: 100437.
- 2) Toya T, Nagatomo Y, Kagami K, Adachi T. Dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension complicated with scleroderma: a case report. *Eur Heart J Case Rep.* 2019 Mar 15;3(1)
- 3) Toya T, Nagatomo Y, Kagami K, Yukino M, Yasuda R, Namba T, Ido Y, Kobayashi S, Masaki N, Yada H, Kimura F, Adachi T. Computed tomography-measured pulmonary artery to aorta ratio and EUTOS score for detecting dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2019 Feb 4. in press
- 4) 足立健、木村豊和、東谷卓美、伊藤桂、長友祐司、矢田浩崇; 心血管病における SERCA2 の障害 総説 最新医学 2018 年 第 73 卷 12 号
- 5) *Eur Heart J Case Rep.* 2019 Aug 28;3(3)Toya T, Hakuno D, Shiraishi Y, Kujiraoka T, **Adachi T.**; Arginase inhibition augments nitric oxide production and facilitates left ventricular systolic function in doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Physiol Rep.* 2014 Sep 28;2(9).
- 6) T. Adachi Modulation of vascular sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in cardiovascular pathophysiology. *Advance in Pharmacology* 59: p.165-195, 2010.07
- 7) S. Xu, J. Ying, B. Jiang, W. Guo, **T. Adachi**, V.S. Sharov, H.L. Lazar, J. Menzoian, T.V. Knyushko, D. Bigelow. C. Schöneich, R.A. Cohen; Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(6): H2220-2227, 2006.

- 8) **T. Adachi**, R.M. Weisbrod, D Pimentel, J. Ying, V.S. Sharov, C. Schöneich, R.A. Cohen; S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*, 10(11): 1200-1207, 2004.
- 9) **T. Adachi**, R. Matsui, S. Xu, M. Kirber, H.L. Lazar, V.S. Sharov, C. Schöneich, R.A. Cohen; Antioxidant improves smooth muscle sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase function and lowers tyrosine nitration in hypercholesterolemia and improves nitric oxide-induced relaxation. *Circ Res*, 90 (10): 1114-1121, 2002.