

リアノジン受容体結合カルモジュリン制御による新しい肺高血圧治療

山本 健

山口大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 病態検査学

【研究の背景】

以前より申請者らは、RyR2 に点突然変異・酸化ストレス・過剰な交感神経刺激などの負荷が加わると RyR2 内の N-terminal と central 間のドメイン連関障害からチャネルは不安定となり CaM が解離し Ca^{2+} 漏出を生じ心不全や致死的不整脈を発症するが、RyR1 の点突然変異病である悪性高熱症の特効薬であるダントロレンは N 末側 601-620a.a. に結合することで、ドメイン連関を是正し CaM 解離を抑制し Ca^{2+} 漏出を抑制することを報告してきた (Heart Rhythm. 14(1):120-127. 2017, J Mol Cell Cardiol. 125:87-97. 2018) (図 3、図 4)。

さらに最近申請者らは、RyR2 内 CaM 結合ドメイン内で遺伝的に 1 アミノ酸変異 (V3599K) を加えて RyR2 への CaM 結合を強固にしたマウスを作製することに成功した。このマウスは、RyR2 からの Ca^{2+} leak に起因した不整脈を必発する CPVT 型マウスと交配で完全に不整脈を止めうることが示された (JCI Insight. 4(11):e126112. 2019) (図 4)。さらに申請者はこのマウスは大動脈縮窄 (TAC) により慢性左室圧負荷が持続するにも関わらず、心肥大・心筋細胞肥大が完全に抑制され左室機能は改善し生命予後が改善することを示した (Commun Biol 26;3(1):714. 2020.) (図 5)。ダントロレンでも V3599K 同様の心肥大抑制、予後改善効果を認めている (未発表データ)。これらの研究成果に基づき、PAH においても、RyR2 に対する CaM 親和性の増強により右室肥大と不整脈を降圧とは独立して直接抑制すれば、心機能保持、予後改善が図れると考え、本研究を着想した。

【目 的】

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺血管拡張薬の登場により予後は改善しているが、右心不全を併発すると血管拡張薬による治療効果にも限界がある。本研究の目的は、PAH に対して、心筋筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR2) の修飾蛋白であるカルモジュリン (CaM) の RyR2 への結合を薬理学的に強固にすることにより、RyR2 の 4 量体構造を安定化させて Ca^{2+} 漏出を阻止し、慢性的に圧負荷がかかる状況下でも右室肥大から右心不全への進展を抑制し予後を改善させるという全く新しい発想に基づいた治療法を確立することである

【方 法】

〔MCT 誘発性ラットモデル〕

モノクロタリン (MCT、60mg/kg、単回皮下注) にて PAH モデルを作成し、ダントロレン慢性投与 (DAN、100mg/kg/day, p.o.) の右室肥大・拡大抑制効果、予後改善効果を検証する。予後改善効果における不整脈抑制の関与についてもマウステレメトリー植え込みにより詳細な検討を行う予定である。

〔肺動脈縮窄 (PAB) ラットモデル〕

純粋に右室の圧負荷が右室肥大・拡大、生命予後に及ぼす影響と、RyR2 からの CaM 解離→ Ca^{2+} 漏出抑制の rescue 効果を評価する目的で、肺動脈縮窄 (PAB) モデルを作製する。

【結 果】

〔MCT 誘発性ラットモデル〕

MCT 群において収縮期圧が著明に増加したが、MCT-DAN 群では若干低下しており、DAN が肺血管抵抗も若干減少させている可能性が示唆された。MCT 群では、肺動脈周囲の炎症に加えて右室の肥大・拡大を認め、さらに 42 日間で 8 割近くが死亡した。一方、DAN 投与群では肺動脈周囲の炎症は軽減し、右室の肥大・拡大は抑制され、死亡率も著明に低下した。左室心筋細胞のサイズは各群で差はなかったが、右室心筋細胞サイズは MCT 群で大きく心肥大が示唆された。一方、MCT+DAN 群では右室心筋細胞サイズは正常にとどまっていた。また蛍光免疫染色法により、MCT 群では z-line 上の CaM の減少(RyR2 からの CaM 解離)と核内 CaM の増加が示されたが、MCT-DAN 群では CaM の移行が抑制されていた。ここで心筋 Z-line 上の CaM の 90%以上は RyR2 結合型 CaM であることが知られており、RyR2 は心肥大シグナル(CaMKII-HDAC 系と Ca^{2+} -calcinulin 系)に対する重要な CaM の供給源となっている。

〔肺動脈縮窄(PAB)ラットモデル〕

右室収縮期圧は DAN 慢性投与の有無に関わらず PAB により同程度まで上昇していたが、DAN 慢性投与(DAN 100mg/kg/day p.o.)により右室の肥大・拡大は抑制され、右室心筋細胞サイズも縮小した。

【考 察】

本研究は、RyR2 に対する CaM の結合親和性増強→CaM 解離、 Ca^{2+} 漏出抑制→右心肥大抑制→右心不全の阻止、という明確な機序に基づき、従来の肺血管抵抗でなく、右室機能保持、不整脈抑制を治療ターゲットとして新規の肺高血圧治療法の開発を目指す点で学術的かつ臨床的意義がある。特に、本研究が新規肺高血圧治療薬としてのダントロレンの前臨床試験としての意味あいがあることは極めて重要と考えている。また、リアノジン受容体内のカルモジュリン結合ドメイン内の特定の 1 アミノ酸のみに変異を加えてカルモジュリン結合を強固にしたという KI ラットを用いた点は独創的である。このラットは、われわれが 2019 年に作成した CaM 高親和性 KI マウスをラットに導入したものである。このマウスは以下の方法で作製した。申請者らは CaMBD のペプチドに点突然変異を組み込んだペプチドを 28 種類作製した。作製する際には CaMBD と CaM の PDB file から 3 次元構造を描出しながら、作製した突然変異が新たな共有結合を生み出すように設計を試みた。作成した多数の CaMBD の変異ペプチドの中から CaM への結合が最も強いものをスクリーニングした。この方法で選んだ変異を組み込んだ CaM 高親和性 RyR2 変異を組み込んだ KI マウス作製した。このマウスでは RyR2 と CaM の親和性が非常に高いが、CaM の RyR2 以外の蛋白への結合親和性が変わっていない。このマウスには強い不整脈抑制効果があることを確認している(JCI Insight. 4(11):e126112. 2019)。さらに心筋内の CaM のほとんどが RyR2 結合 CaM として存在することから、申請者らは、CaM の RyR2 への結合親和性の増強は心肥大を抑制しうると考え、TAC モデルで証明した。本研究はそれを右室へ応用するものである。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ダントロレンの肺高血圧症に対する治療効果が本研究により確認されれば、ダントロレンはすでに臨床で幅広く安全に使用されている薬であるため、肺高血圧患者の予後改善薬として、早期の臨床応用を展開することが可能となる。特に、ダントロレンは、これまでの血管拡張療法と全く異なり RyR2 の 4 量体構造の安定化により細胞内 Ca^{2+} 過負荷を抑制することで右室機能を保持し、さらに(RyR からの Ca^{2+} 漏出抑制→遅延後脱分極(DaD)抑制→心室頻拍抑制により)突然死抑制効果をも有する可能性があるため、血管拡張療法との併用による相乗効果が期待できる。

さらに本研究は、肺高血圧治療の新規の分子ターゲットとしてのリアノジン受容体結合カルモジュリンを提唱することにつながることから、今後新たなリアノジン受容体安定化薬の開発にも貢献しうる。

【参考・引用文献】

Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T, Yoshitomi R, Kajii T, Fujii S, Nakamura Y, MD, Kato T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda

S, Watanabe K, Mizukami Y, Yano M*. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol.* 2020 Nov 26;3(1):714. doi.org/10.1038/s42003-020-01443-w.

Tamitani M, Yamamoto T*, Yamamoto N, Fujisawa K, Tanaka S, Nakamura Y, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Takami T, Kobayashi S, Sakaida I, Yano M. Dantrolene prevents hepatic steatosis by reducing cytoplasmic Ca^{2+} level and ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jul 21;23:100787. doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100787.

Sufu-Shimizu Y, Okuda S*, Kato T, Nishimura S, Uchinoumi H, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Yano M. Stabilizing cardiac ryanodine receptor prevents the development of cardiac dysfunction and lethal arrhythmia in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II δ c transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Apr 2;524(2):431-438. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.107.

Hamada Y, Yamamoto T*, Nakamura Y, Sufu-Shimizu Y, Nanno T, Fukuda M, Ono M, Oda T, Okuda S, Ueyama T, Kobayashi S, Yano M. G790del mutation in DSC2 alone is insufficient to develop the pathogenesis of ARVC in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Nov 29;21:100711. doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100711. eCollection 2020 Mar. (correspondence author)

Kajii T, Kobayashi S*, Shiba S, Fujii S, Tamitani M, Kohno M, Nakamura Y, Nanno T, Kato T, Okuda S, Uchinoumi H, Oda T, Yamamoto T, Yano M. Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure-overload induced failing hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jan 1;521(1):57-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.071.

Nakamura Y, Yamamoto T*, Kobayashi S, Tamitani M, Hamada Y, Fukui G, Xu X, Nishimura S, Kato T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Yano M. Ryanodine receptor bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight.* 2019 Jun 6;4(11). pii: 126112. doi: 10.1172/jci.insight.126112.

Oda T*, Yamamoto T, Kato T, Uchinoumi H, Fukui G, Hamada Y, Nanno T, Ishiguchi H, Nakamura Y, Okamoto Y, Kono M, Okuda S, Kobayashi S, Bers DM, Yano M. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Dec;125:87-97. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.10.011.