

リアノジン受容体結合カルモジュリン制御による心肥大・心不全治療

中村吉秀

山口大学医学部附属病院 第二内科

【研究の背景】

以前より我々は、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ンネルは不安定となり CaM が解離し Ca²⁺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 Ca²⁺漏出を抑制することを報告してきた^{1,2)}。

さらに最近我々は、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成することに成功した。このマウスは、RyR2 からの Ca²⁺ 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を示された³⁾。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確認した⁴⁾。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、本研究に着想した。

【目 的】

本研究は、心筋のリアノジン受容体 (RyR2) 結合カルモジュリン (CaM) が、心不全、心肥大の進行に関する key 分子となることを証明し、心不全、心肥大に対する、これまでに無い治療法を確立することである。RyR2 結合 CaM は RyR2 の Ca²⁺放出の重要な調節因子であるばかりでなく、心筋細胞における CaM の供給源となり、CaMKII や CaN の活性化を介して、心肥大、心不全に重要なシグナル伝達に関与していることがわかった。本研究では申請者の仮説を証明し、これまでにない治療法を確立する。

【方 法】

以下の2つの動物モデルにて研究を行った。

モデル1. Two-hit HFpEF モデルマウス

我々は RyR2 の CaM 結合ドメイン (CaMBD) に1アミノ酸変異を組み込んだ変異ペプチドを多数スクリーニングした結果、CaM の RyR2 に対する結合親和性が著しく高まるアミノ酸変異 (V3599K) を発見、その後 V3599K 変異を組み込んだ knock-in (KI) マウス: (RyR2 V3599K KI マウス) を作成し、遺伝的に CaM の RyR2 に対する結合親和性を特異的に増大させることに成功した³⁾。この RyR2 V3599K マウスでは TAC 術後に CaM の核内移行が起こらず、心筋細胞心肥大も生じず、予後も改善することが明らかになっている⁴⁾。

High fat diet (HFD)+L-Name 内服による two-hit 拡張障害モデルマウスを作成し、ダントロレン慢性 (内服) 投与 WT マウス、および、前述の RyR2 V3599K KI マウスにおいて、心エコーによる左室収縮・拡張機能、単離心筋細胞での心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心筋組織の心肥大シグナル伝達、ER ストレス応答を検証する。

モデル2. ミネラルコルチコイド誘発高血圧ラット

片腎摘出 (UNX) + 塩分負荷およびミネラルコルチコイドタブレット植え込み (DOCA-salt) による高血圧拡張障害ラットモデルを作成する。ダントロレン慢性 (内服) 投与 WT ラット、および、RyR2 V3599K マウスと同一の変異を組み込んだラット (RyR2 V3580K KI ラット: 作成済) において、心エコーによる左室収縮、拡張機能、単離心筋細胞での心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心筋組織の心肥大シグナル伝達、ER ストレス応答を検証する。

【結 果】

モデル1. Two-hit HFpEF モデルマウス

ダントロレン慢性 (内服) 投与 WT マウス、RyR2 V3599K KI マウスともに、コントロールの two-hit 拡張障害WTマウスに比し、心重量の低下、運動耐容能、および E/E' の改善を認めた。さらに、両マウスでは、IRE1- α のニトロシル化は増加しているにも関わらず、GRP78 の応答は改善したことから、ダントロレン、RyR2 V3599K KI により、NOS の uncoupling 改善とは別経路で拡張障害を改善しうる可能性が示唆された。

モデル2. ミネラルコルチコイド誘発高血圧ラット

予備実験の結果、UNX+DOCA-salt WT ラットでは、心重量、肺重量、左室繊維化はいずれも増加し、左室 static compliance は低下した。一方、ダントロレン慢性投与により、心重量、肺重量、左室繊維化はいずれも減少し、左室の static compliance の低下は低減した。

【考 察】

本研究により、リアノジン結合カルモジュリンの制御は、これまで通りの Ca²⁺依存性肥大シグナルすなわち CaN-NFATc, CaMKII-HDAC4 シグナルを抑制し、心肥大を抑制するのみならず、心筋 ER ストレス改善を介した、新しい拡張不全治療につながる可能性が示唆された。他施設からの片腎摘出+ミネラルコルチコイドタブレット植え込み拡張障害ラットモデルを用いた研究報告⁵⁾や、高血圧自然発症ラット (SHR)⁶⁾により、拡張障害の重要な病態として”NO 合成酵素 (NOS) の uncoupling” (NOS が酸化的修飾を受ける結果、NO の代わりに有害なスーパーオキシド O₂⁻を産生する現象) が報告された。さらに、最近、Hill JA らにより、two-hit マウス拡張障害モデルにおいて、NOS の uncoupling の結果、O₂⁻と iNOS が産生した NO から生じた ONOO⁻により IRE1- α のニトロシル化が生じ、XBPI mRNA の splicing 障害に起因する GRP78 などの分子シャペロンの発現低下を誘導し、拡張障害を惹起することをも示された⁷⁾。これらの知見は、ER 不全もまた大きく関わっている可能性を強く示唆する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

RyR2 は心筋 SR のみならず、脳を含め広範な組織でも小胞体 (ER) に分布しているため、ER 内 Ca²⁺枯渇/細胞質内 Ca²⁺上昇に起因して、臓器/組織別に異なる表現型として疾患が発生しているのではないかと仮説を立て、その正当性を各種 ER ストレス関連疾患モデルにおいて検証した。その結果、Ca²⁺漏出→ER 内 Ca²⁺枯渇/細胞質内 Ca²⁺上昇→ER ストレスを介して、①脳ではアルツハイマー病、②肝臓では脂肪肝、③血管平滑筋では動脈硬化症、④免疫細胞では関節リウマチ、⑤腎臓では慢性腎臓病 (CKD)、というように各臓器/組織で表現型の異なる疾患を惹起することが我々の研究により明らかになりつつある。

【参考・引用文献】

- 1) Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Sufu Y, Hamada Y, Maeda T, Nishimura S, Ishiguchi H, Murakami W, Fukuda M, Xu X, Hino A, Ono M, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm*. 2017 Jan;14(1):120-127. doi: 10.1016/j.hrthm.2016.10.019.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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: 10.1038/s42003-020-01443-w
- 5) Silberman GA, Fan TH, Liu H, Jiao Z, Xiao HD, Lovelock JD, Boulden BM, Widder J, Fredd S, Bernstein KE, Wolska BM, Dikalov S, Harrison DG, Dudley SC Jr.
Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation.* 2010 Feb 2;121(4):519-28. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.883777.
- 6) Chang P, Wang Q, Xu H, Yang M, Lin X, Li X, Zhang Z, Zhang X, Zhao F, Zhao X, Bai F, Yu J.
Tetrahydrobiopterin reverse left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction through the PI3K/p-Akt pathway in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Aug 7;463(4):1012-20. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.051.
- 7) Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA.
Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature.* 2019 Apr;568(7752):351-356. doi: 10.1038/s41586-019-1100-z.