

筋小胞体 Ca^{2+} ATPase2 Cys674Ser knock-in
マウスにおける心室性不整脈発生に関する検討

いとう けい

伊藤 桂

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

令和2年度

目 次

第 1 章	緒言	1 頁
第 2 章	研究方法	6 頁
	第 1 節 実験動物	6 頁
	第 2 節 研究プロトコール	7 頁
	第 3 節 収縮期血圧と脈拍数の測定	7 頁
	第 4 節 病理組織学的評価	8 頁
	第 5 節 心筋の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake の評価	8 頁
	第 6 節 左室収縮能の評価	10 頁
	第 7 節 体表心電図の解析及び心室性不整脈の誘発性の評価	10 頁
	第 8 節 活動電位持続時間の評価	12 頁
	第 9 節 心筋の mRNA 発現量の評価	13 頁
	第 10 節 心筋細胞の Ca^{2+} 動態の評価	15 頁
	第 11 節 ダントロレン投与が Ca^{2+} ハンドリングと不整脈誘発性に与える影響	18 頁
	第 12 節 統計学的解析	19 頁
第 3 章	研究結果	20 頁
	第 1 節 ANG II 投与による収縮期血圧と脈拍数、心重量の変化	20 頁

第2節	心筋の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake の評価	21頁
第3節	左室収縮能の評価	22頁
第4節	体表心電図の評価	22頁
第5節	心室性不整脈の誘発性の評価	23頁
第6節	活動電位持続時間の評価	24頁
第7節	心室の mRNA 発現量の評価	24頁
第8節	心筋細胞の Ca^{2+} トランジェントの評価	25頁
第9節	筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵の評価	26頁
第10節	心筋細胞の Ca^{2+} スパークの評価	27頁
7		
第11節	ダントロレン投与が Ca^{2+} ハンドリングと不整脈誘発性に与える影響	28頁
第4章	考察	30頁
第5章	結論	39頁
	謝辞	40頁
	略語一覧	41頁
	参考文献	43頁
	図表	52頁

第1章 緒言

日本における死因別死亡総数のうち、心疾患による死亡者数は悪性新生物に次ぎ二番目に多いが、その中でも心不全による死亡数が最も多い (1)。高齢化の進行に伴い全世界的に心不全患者数は増加しており (2)、日本においても心不全患者の総数は推計で 2005 年において約 100 万人、2020 年には約 120 万人に達するとされ (3)、心不全パンデミックと呼ばれる事態が進行している。日本における心不全患者の 1 年死亡率 (全死亡) は 7.3%と報告されているが (4)、その主原因として心室頻拍・心室細動などの致死性心室性不整脈による心突然死が挙げられる (5)。従って心不全における致死性心室性不整脈の予防・治療は極めて重要な課題である。

心室性不整脈の薬物治療としては 1980 年代より I 群抗不整脈薬である Na⁺チャンネル遮断薬が使用されていたが、陰性変力作用や催不整脈作用があり、1991 年に報告された CAST trial では、心筋梗塞後の患者において Na⁺チャンネル遮断薬の使用は予後を改善させないばかりか、死亡率を増加させた (6)。その後 K⁺チャンネル遮断をターゲットとした III 群抗不整脈薬が開発された、アミオダロンについては心筋梗塞後および心不全患者の突然死を減少させたとのメタ解析がある一方 (7)、2005 年に発表された大規模臨床試験ではプラセボ群と比較し予

後に有意差を認めなかった (8)。またアミオダロンは間質性肺炎などの重篤な心外合併症や QT 延長などの副作用があることから、使用が制限される薬剤である。このように、心不全における致死性心室性不整脈に対して有効かつ安全な薬物治療は十分には確立されていない。

Ca^{2+} ハンドリングは心筋細胞における正常な興奮収縮連関に極めて重要であるが、その異常は撃発活動を引き起こすことで不整脈発生にも密接に関わっている (9)。心筋細胞の収縮は、L 型 Ca^{2+} チャネル (LTCC) を介した細胞内への Ca^{2+} 流入を契機として、筋小胞体からリアノジン受容体 (RyR) を介して Ca^{2+} が大量に細胞質内に放出されることで起こる。拡張期には筋小胞体膜タンパクである筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 2 および Na^{+} - Ca^{2+} 交換体 (NCX) により、それぞれ筋小胞体内、細胞外へ Ca^{2+} が汲み出される (図 1 A)。しかし、心不全などの病的状態では Ca^{2+} /カルモジュリン依存性タンパクキナーゼ II

(CaMK II) の活性化や RyR からの Ca^{2+} リークの増大による細胞内 Ca^{2+} 過負荷、またそれによる NCX の活性化が起こり、撃発活動を引き起こすことで致死性不整脈の原因となることが知られている (9、10) (図 1 B)。

SERCA は主に白色骨格筋 (速筋) で発現の多い SERCA1、赤色骨格筋 (遅筋) で発現の多い SERCA2a、平滑筋やその他の多くの細胞に発現している

SERCA2b、神経細胞を始め筋細胞以外で発現を認める SERCA3 のサブタイプに分かれる。心筋細胞は SERCA2a の発現が多く、一部 SERCA2b や SERCA2c の発現も認める。SERCA2 は拡張期の細胞質から筋小胞体への Ca^{2+} 汲み出しの約 70% を担っており、心筋細胞の Ca^{2+} ハンドリング維持に重要なタンパクである (11、12)。動物の心不全モデル (13、14) およびヒト心不全患者 (15、16) で SERCA2 の発現低下が報告されており、また SERCA2 の遺伝子改変マウスでは Ca^{2+} ハンドリング異常や心機能低下が起こることが報告されている (17 - 19)。動物心不全モデルでは、アデノ関連ウイルス (AAV) を用いた SERCA2 遺伝子導入が有効であり、心機能改善のみならず不整脈原性を是正することが報告された (20 - 22)。しかしながら、2016 年に発表された 250 人の心不全患者を対象とした多施設共同二重盲検プラセボ対照無作為化第 II b 相試験である CUPID II 試験において、試験用量の AAV/SERCA2a の遺伝子導入では予後改善を認めなかった。この理由の一つとして、心不全患者では SERCA2 の発現低下のみならず、翻訳後修飾による機能調節異常が影響した可能性が示唆されている (23)。

SERCA2 は多彩な翻訳後修飾によりその活性が制御を受ける。Serine (Ser) 38・Threonine (Thr) 484 のリン酸化や Lysine (Lys) 492 のアセチル化、また

small ubiquitin-like modifier type1 による SUMOylation はいずれも SERCA2 の活性を変化させ、心筋細胞の Ca^{2+} ハンドリングや心機能に影響を与えることが報告されている (24 - 27)。また、SERCA2 は活性酸素種 (ROS) による影響を受けやすく、特に Cysteine (Cys) 674 は酸化修飾によりその機能が変化する。生理的レベルの ROS は Cys674 の S-glutathiolation により可逆的な活性化に働く。一方で、動脈硬化症や心不全マウスでは Cys674 の不可逆的酸化 (亜硫酸化: Sulfenylation) が起こりチオール (SH) 基喪失により反応性を失う (28 - 30)。

非虚血性心筋症患者の心筋生検検体を用いて SERCA2 Cys674 の亜硫酸化および Tyrosine (Tyr) 294/295 のニトロ化部位に特異的な免疫染色を行った Toya ら (31) の報告では、SERCA2 の不可逆的酸化修飾と心室性不整脈・心突然死を含めた心血管イベントに有意な相関を認めた。心不全における SERCA2 Cys674 の亜硫酸化による SH 基喪失は、 Ca^{2+} ハンドリングの調節異常により心機能低下のみならず、心室性不整脈の発生と関連している可能性が想定されるが、それについては過去に検討されていない。

本研究では、心不全患者で認められた SERCA2 Cys674 SH 基の反応性喪失を模した遺伝子改変マウス (SERCA2 Cys674Ser knock-in (SKI) マウス) (32) を用いて、心筋細胞の Ca^{2+} ハンドリング異常及び致死性不整脈の発生について検

討した。予備的検討により、SKI マウスは定常状態において、control マウスを対照として心筋細胞の Ca^{2+} ハンドリング異常を認めたが、評価に十分な心室性不整脈の誘発は認めなかった。そのため、心不全 (33) や心室性不整脈 (34) といった動物心負荷モデルで用いられているアンジオテンシン II (ANG II) 投与を行い、検討を進めた。

第 2 章 研究方法

第 1 節 実験動物

Heterozygous SERCA2 Cys674Ser knock-in (SKI) マウスはボストン大学 Richard A. Cohen 博士より供与された (35)。SKI マウスは C57BL/6J を遺伝的背景とし、SERCA2 Cys674 (TGT) を Ser674 (TCC) に置換されたヘテロノックインマウス (50% Cys674、50% Ser674) であり、対照群として control マウス (100% Cys674) を使用した。Cys674Ser 変異は、polymerase chain reaction 法 (PCR 法) を用い、プライマーとして 5'-CCACAAATGGCTCTCAGGTT - 3' 及び 5'-CAGCTCTAGGCAGAGGCACT - 3' を使用して確認した。飼育は防衛医科大学校動物実験施設にて行い、12 時間毎の明暗の照明のもと行われた。明は 7 時から 19 時、暗は 19 時から 7 時とした。食餌は通常食 (日本クレア、東京、日本) を使用し、食餌飲水共に自由摂取とした。本研究は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号 : 19038)、動物実験規則に基づき実施した。

第2節 研究プロトコール

過去に報告された論文を参考に、control マウス及びSKI マウスそれぞれに対して、vehicle (蒸留水) もしくは angiotensin II (ANG II) 3 mg/kg/日 (和光純薬工業、東京、日本) を、アルゼット浸透圧ポンプ 1007D (室町機械、東京、日本) を用いて7日間持続皮下投与を行い、4群 (control + vehicle 群、control + ANG II 群、SKI + vehicle 群、SKI + ANG II 群) を作成した (36)。アルゼット浸透圧ポンプは塩酸メデトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 4 mg/kg、酒石酸ブトルファール 5 mg/kg) の3種混合麻酔 (37) の腹腔内投与後に、背部皮下に植え込みを行った。

第3節 収縮期血圧と脈拍数の測定

vehicle もしくは ANG II の投与前 (day 0) 及び投与開始から7日目 (day 7) に収縮期血圧と脈拍数を tail cuff 法にて無麻酔下で測定した。測定機器は MK-2000 (室町機械、東京、日本) を使用した。

第4節 病理組織学的評価

イソフルランによる吸入麻酔で痛覚刺激への反応消失を確認後に開胸し、脱血の後クレブス・リンゲル重炭酸バッファー (NaCl 118.3 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、D-glucose 5.5 mmol/L) で灌流した。摘出した心臓は重量測定後に4%パラホルムアルデヒドにて24時間固定し、3 μm でパラフィン切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色及び、心筋の線維化評価のためにマッソン・トリクローム染色を行った。画像はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ - X710 (KEYENCE、大阪、日本) を用いて撮影した。線維化の評価は KEYENCE のソフトを用い、20 倍の倍率で露光時間 1/120 秒で撮影した画像をもとに行った。

第5節 心筋の ⁴⁵Ca²⁺ uptake の評価

過去に報告された論文を参考に、放射線核種 ⁴⁵Ca²⁺ (パーキンエルマージャパン、横浜、日本) を用いて ⁴⁵Ca²⁺ uptake assay を行い心筋の SERCA2 活性を評価した (38)。イソフルランによる麻酔下に痛覚刺激への反応喪失を確認後

に開胸し、血液を回収した後にクレブス・リンゲル重炭酸バッファーで灌流した。摘出した心臓を、20%スクロースバッファー (sucrose 340 mmol/L、phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 mmol/L、dithiothreitol 1.0 mmol/L、pH 7.0) を加え、氷上で用手的にホモジナイズした後に超音波破砕機で組織を破砕した。4°C、1000 rpm で10分間し上清を回収、再度4°C、10000 rpm で10分間遠心し上清を回収した。非特異的な $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake を除外するためにペアサンプルを作成し、片方には SERCA2 阻害薬であるタプシガルギン 10 $\mu\text{mol/L}$ (和光純薬工業、東京、日本) を添加し 37°C で15分間反応させた。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake buffer (Tris-HCL 30 mmol/L、KCl 100 mmol/L、 NaN_3 5.0 mmol/L、 MgCl_2 6.0 mmol/L、EGTA 0.15 mmol/L、 CaCl_2 0.12 mmol/L、oxalate 10 mmol/L、pH 7.0) に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 1 μCi 、ATP 2 mmol/L を添加し 400 μL の溶液を作成した。この溶液に 100 μL のサンプルを加え、37°C での条件下で測定を開始した。サンプル添加後1分、5分後にガラス繊維濾紙 GF/C (GE ヘルスケアジャパン、東京、日本) を用いて溶液 100 μL を濾過し、wash buffer 2.5 ml (imidazole 30 mmol/L、sucrose 250 mmol/L、EGTA 0.5 mmol/L、pH 7.0) で2回洗浄した。ガラスシンチレーションバイアルに Ultima Gold 2 mL (パーキンエルマージャパン、横浜、日本) と濾紙を入れ、液体シンチレーションカウンターを使用し $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定し、

各々のタンパク濃度で除して平均化した。タンパク濃度の測定は Bradford 法を用いた (39)。心筋の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake は、総 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度からタプシガルギン不応の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度 (SERCA 以外の反応) を減じた時間当たりの濃度で評価した。本 assay では、高 Ca^{2+} (0.12 mmol/L)、還元状態下での SERCA activity を示す。

第 6 節 左室収縮能の評価

イソフルランによる吸入麻酔下に心拍数を 450 – 500 /分となるように麻酔深度を調整し、マウスを仰臥位で固定し体温を 37°C に調節し心エコー図評価を行った。測定機器は超音波診断装置 Affiniti70 (フィリップス・ジャパン、東京、日本) を用いた。トランスデューサーは L15-7io (7-15 MHz) を使用し、左室短軸像を描出し M モード法による計測を行った。

第 7 節 体表心電図の解析及び心室性不整脈の誘発性の評価

3 種混合麻酔の腹腔内投与後にマウスを仰臥位で固定し、自発呼吸下で 37°C に体温を調節し、四肢の皮下に挿入した針電極を用いて体表心電図 (I、II、aVF 誘導) の計測を行った。装置は Bard ラボシステム EP ラボラトリー II (ボ

ストン・サイエンティフィックジャパン、東京、日本) を使用し、II 誘導を用いて PQ、QRS、QT 間隔、RR 間隔の測定を行った。QT 間隔は Q 波の始点から T 波が基線に戻るまでの時間とし、補正 QT 間隔 (QTc) は $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$ の式を用いて算出した (40)。次に、食道に挿入した 2Fr の 4 極電極カテーテル及び体表から心外膜表面へ挿入した 24 ゲージの注射針からカーディアックステイミュレータ (日本光電工業、東京、日本) を用いて電気生理検査を行った。心室の刺激閾値を確認後に拡張期閾値の 2 倍の出力でプログラム刺激を行い心室性不整脈の誘発性を評価した。心室頻回刺激法は 600 /分より開始し刺激レートを 50 /分ずつ増加させ、1000/分まで行った。心室期外刺激法は 8 個の基本刺激 (S1S1) 後に単発(S1S2)、2 発 (S1S2S3)、3 発 (S1S2S3S4) の期外刺激を加え、10 ms ずつ連結期を短縮し、最短 30 ms まで行った。基本刺激周期は 200 ms、150 ms、100 ms を用いた。心室性不整脈は 5 連発以上の心室期外収縮と定義した (41)。プログラム刺激により心室性不整脈が誘発されなかった場合は交感神経作動薬として L-イソプレナリン塩酸塩 0.2 mg/kg (興和、東京、日本) の腹腔内投与を行い脈拍数の上昇を確認後、同様のプログラム刺激を行った。

第 8 節 活動電位持続時間の評価

過去に報告された論文を参考に膜電位光学計測を行った (42)。3 種混合麻酔の腹腔内投与後にヘパリンナトリウム 250 単位を腹腔内投与し、痛覚刺激への反応消失を確認後に開胸し、ランゲンドルフ灌流心を作成した。クレブス・リングル重炭酸バッファー (NaCl 128.2 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、CaCl₂ 1.3 mmol/L、MgCl₂ 1.05 mmol/L、KH₂PO₄ 1.19 mmol/L、D-glucose 11.1 mmol/L、NaHCO₃ 5.0 mmol/L、pH 7.4) で灌流し血液を十分に除去した後、拍動によるモーションアーチファクトを除去するために 2,3 -butanedione monoxime 10 mmol/L (Sigma-Aldrich、MO、USA) を添加し心拍動を停止させた。送液ポンプは Master flex (ヤマト科学、東京、日本) を使用し、バッファーは 95% O₂、5% CO₂ の混合ガスを溶存させ、37°C に保った。膜電位感受性色素の RH237 (フナコシ、東京、日本) を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、クレブス・リングル重炭酸バッファーを加え 5 μmol/L の濃度とし、遮光下で約 10 分間灌流して心筋細胞を染色した。計測装置は MiCAM Ultima (ブレインビジョン、東京、日本) を用い、532 nm の波長で励起した。体表心電図 (四肢誘導) および心臓周囲に留置した針電極を用いて心電図の記録および心室の電気刺激を行った。心室電気刺激は Electric Stimulator (日本光電工業、東京、日本) を

用いて刺激レート 300 /分から、心室が 1 : 1 に捕捉するまで 50 /分ずつ刺激レートを増加させ、600 /分まで行った。活動電位持続時間 (APD) の評価として、脱分極開始点から最大振幅の 80%再分極するまでの時間 (APD₈₀) を用いた。心臓の左室自由壁心尖部を測定点とし、解析にはブレインビジョン社の解析ソフトを用いた。

第 9 節 心室の mRNA 発現量の評価

9 - 1. 心筋からの RNA 抽出および定量

イソフルランによる麻酔下に痛覚刺激への反応喪失を確認後に開胸し、血液を回収した後にクレブス・リンゲル重炭酸バッファーで灌流した。摘出した心臓は組織重量 50 – 10 mg に対し TRI Reagent 1 ml (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) を加え、ホモジナイザーを用い溶解した。クロロホルム 500 μ l を加え室温で 3 分間静置後に 4°C、12,000 G で 15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清にイソプロピルアルコール 500 μ l を加え、4°C、12,000 G で 30 分間遠心した。上清を廃棄し、75%エタノールを 1 ml 加え、4°C、7,500 G で 5 分間遠心した。Buffer EB (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を加え、Nano DROP 2000

(Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を用いて 260 nm の吸光度波長を測定し RNA 量を定量した。

9 - 2. cDNA の合成および mRNA の発現解析

RNA 溶液 (600 ng 相当量) と RNase free water を合わせて 20 μ l とし TaqMan Reverse Transcription Reagents (Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を用いて逆転写反応を 25°C 10 分 \rightarrow 37°C 30 分 \rightarrow 95°C 5 分 \rightarrow 4°C の条件で行い、cDNA を得た。これを用いて real-time RT-PCR を行い、心臓の Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)、ryanodine receptor (RyR)、Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX)、L-type Ca²⁺ channel (LTCC)、SERCA2a の発現を評価した。装置は ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems、CA、USA) を使用し、SYBR Green 法 (Power SYBR Green PCR Master Mix ; Applied Biosystems、CA、USA) で行った。使用したプライマーの塩基配列は表 1 に記した。内部標準としてのハウスキーピング遺伝子は Rps18 を使用し、 $\Delta\Delta$ CT 法により目的の mRNA 量を評価した。

第 10 節 心筋細胞の Ca^{2+} 動態の評価

10 - 1. 心筋細胞の単離

過去に報告された方法を参照し心筋細胞の単離を行った (43)。ヘパリンナトリウム 250 単位を腹腔内投与し、イソフルランによる麻酔下に痛覚刺激への反応消失を確認した後に開胸し心臓を摘出した。逆行性に上行大動脈より 22 ゲージの注射針にてカニューレーションを行い、ランゲンドルフ灌流心を作成した。第 8 節と同様の送液ポンプを用い、 Ca^{2+} 添加クレブス・リンゲルバッファー (NaCl 140 mmol/L、KCl 4.0 mmol/L、 CaCl_2 1.8 mmol/L、 MgCl_2 0.5 mmol/L、 KH_2PO_4 1.2 mmol/L、D-glucose 5.5 mmol/L、HEPES 5.0 mmol/L、pH 7.0) で灌流した。次に Ca^{2+} フリーバッファー (NaCl 140 mmol/L、KCl 4.0 mmol/L、 MgCl_2 0.5 mmol/L、 KH_2PO_4 1.2 mmol/L、D-glucose 5.5 mmol/L、HEPES 5.0 mmol/L、pH 7.0) で灌流した後に 1% Collagenase type 2 (Worthington、USA) を添加し、約 10 分間灌流した。バッファーは加温し 37°C に保った。高 K^+ バッファー (KCl 30 mmol/L、 KH_2PO_4 10 mmol/L、EDTA 0.5 mmol/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mmol/L、D-glucose 60 mmol/L、HEPES 5.0 mmol/L、L-Glutamic acid 70 mmol/L、Taurin 15 mmol/L、BSA 0.9%、pH 7.0) 内で心臓組織を細断し愛護的にピペッティングを行った。約 15 分間静置した後に上清を除去し、沈殿した心筋細胞に

バッファー (NaCl 137 mmol/L、KCl 4.9 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L、HEPES 20 mmol/L、BSA 0.1%、pH 7.4) を加え、段階的に CaCl₂ を添加して最終濃度を CaCl₂ 1.0 mmol/L に調整した。

10 - 2. 心筋細胞の Ca²⁺ トランジェントの測定

単離した心筋細胞に Fluo-4 AM 2.5 μmol/L (同仁化学研究所、熊本、日本) を加え室温・遮光下で 20 分間反応させ、室温下で Ca²⁺ トランジェントの測定を行った。Fluo4-AM は DMSO に溶解した後に 1.0 mM Ca²⁺ 添加バッファー (NaCl 140 mmol/L、KCl 5.0 mmol/L、CaCl₂ 1.0 mmol/L、MgCl₂ mmol/L、D-glucose 10 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、pH 7.4) に添加した。Fluo-4 染色後の心筋細胞から得られる Ca²⁺ 蛍光は、Keyence 社の BZ-X710 を用い、488 nm の波長で励起し、543 nm の波長で観察した。染色後の心筋細胞をフィールドステイミューション用イメージングチャンバー (フィジオテック、東京、日本) に入れ、Electric Stimulator (日本光電工業、東京、日本) を用いて 1 Hz の頻度で電気刺激を加えて各細胞の蛍光画像を撮影し、Image J ソフトウェアを用いて解析した。一連の Ca²⁺ トランジェントは、収縮期の筋小胞体からの RyR を介した細胞質への Ca²⁺ 放出による急峻な Ca²⁺ 濃度上昇と、拡張期の SERCA2 及び NCX による細胞質からの Ca²⁺ 汲み出しによる Ca²⁺ 濃度低下で表される (図 1 A)。

RyR 活動を表す Ca^{2+} トランジェントの始点から最大蛍光強度までの時間

(Time-to-peak : TTP)、収縮期の筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量を表す Ca^{2+} の最大振幅 (F/F_0)、拡張期に Ca^{2+} の最大振幅から 50% 減衰するまでの時間 (Time to 50% relaxation : RT50) について解析を行った。RT50 は主に SERCA 機能を反映するとされている (44)。

10 - 3. 筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵の評価

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したラミニン (マウス) (Corning, NY, USA) で表面をコーティングして 4°C で 24 時間静置しラミニンコーティングディッシュを作成した。ディッシュ表面を乾燥後に、単離した心筋細胞を 37°C で 1 時間インキュベートし接着させた。Fluo-4 AM 2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ で染色し、カフェイン 10 mM を添加した 1.0 mM Ca^{2+} タイロード溶液を急速投与し caffeine-induced Ca^{2+} release を惹起させた。10 mM のカフェイン投与は RyR を刺激し筋小胞体内の Ca^{2+} を急激に放出させるとともに、SERCA2 による細胞質からの Ca^{2+} 汲み出しを阻害する。カフェイン投与による Ca^{2+} トランジェントの最大振幅 (F/F_0) は筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵を反映する。また SERCA2 を阻害することにより、細胞質からの Ca^{2+} 汲み出しを表す Ca^{2+} 減少曲線の時定数 (Tau) は NCX の機能を反映しているとされている (45)。

10 - 4. Ca²⁺スパークの測定

単離した心筋細胞を室温下で Fluo-4 AM 2.5 $\mu\text{mol/L}$ で染色後 1 Hz の頻度で電気刺激を行い、刺激後に発生する Ca²⁺スパークを評価した。拡張期の心筋細胞の自発的な発火である Ca²⁺スパークの増加は RyR の Ca²⁺リーク増加を反映し、不整脈の原因となる (43)。観察は Leica 社の TCS SP8 共焦点レーザー顕微鏡を用いてラインスキャンモードで行い、Ca²⁺の蛍光は 488 nm の波長で励起し、543 nm の波長で観察した。観察した心筋細胞のうちで Ca²⁺スパークが起きている細胞の割合を算出し、1 細胞あたりに認める Ca²⁺スパークの頻度は、観察した試料内で 100 μm /秒あたりに観察される自発的な蛍光発火を Ca²⁺スパークと定義し、その数で評価した。

第 11 節 ダントロレン投与が Ca²⁺ハンドリングと不整脈誘発性に与える影響

過去に報告された論文を参考に、SKI + ANG II 群に、RyR からの Ca²⁺リークを抑制するダントロレン 20 mg/kg/日 (富士フイルム和光純薬、大阪、日本) を DMSO に溶解して生理食塩水で希釈し、ANG II の投与開始日 (day 1) から投与開始 7 日目 (day 7) まで連日腹腔内投与を行った (46)。7 日後に第 7 節と

同様の方法で電気生理学検査を行い、心室性不整脈の誘発性を評価した。また、第 10 節と同様の方法で心筋の Ca^{2+} 動態の評価を行った。

第 12 節 統計学的解析

すべてのデータは平均±標準誤差 (mean±SE) で表記した。2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。3 群間以上の比較には Bartlett の等分散検定にて等分散であることを確認し、1-way ANOVA 後、Turkey の多重比較法を用いて post hoc 解析を行った。心室性不整脈の誘発率の比較検討には Fisher の正確検定を用いた。すべての解析は Graphpad Prism Software Ver.7 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) を使用し、すべての検定において $P < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

第3章 研究結果

第1節 ANG II 投与による収縮期血圧と脈拍数、心重量の変化

ANG II 投与による変化を評価するために、tail-cuff 法にて収縮期血圧・脈拍数測定を行った。control マウス、SKI マウスともに ANG II 群は vehicle 群と比較し有意な収縮期血圧の上昇を認めたが、control マウスと SKI マウス間では差を認めなかった (図 2 A、control + vehicle = 97.6 ± 2.1 mmHg [n = 8] 対 control + ANG II = 122.4 ± 3.4 mmHg [n = 7]、 $P < 0.01$ 。SKI + vehicle = 104.8 ± 2.3 mmHg [n = 8] 対 SKI + ANG II = 123.5 ± 3.1 mmHg [n = 8]、 $P < 0.01$)。脈拍数は各群間で差を認めなかった (図 2 B)。心重量/体重比は ANG II 群で vehicle 群と比較し有意な増大を認めたが、control マウスと SKI マウスでは差を認めなかった (図 2 C、control + vehicle = 0.4 ± 0.01 [n = 5] 対 control + ANG II = 0.6 ± 0.04 [n = 6]、 $P < 0.01$ 。SKI + vehicle = 0.5 ± 0.03 [n = 6] 対 SKI + ANG II = 0.7 ± 0.04 [n = 6]、 $P < 0.001$)。マッソン・トリクローム染色で評価した心筋組織の線維化の程度は、ANG II 群で vehicle 群と比較し線維化の増大を認めたが、control マウスと SKI マウスの間で差を認めなかった (図 2 D、E、control + vehicle = $0.4 \pm 0.1\%$ [n = 5] 対 control + ANG II = $5.3 \pm 0.2\%$ [n = 6]、 $P < 0.01$ 。SKI + vehicle = $0.6 \pm 0.2\%$ [n = 6] 対 SKI + ANG II = $5.4 \pm 0.5\%$ [n = 6]、 $P < 0.01$)。これらの結果から、ANG II

投与は control マウス、SKI マウスで同等の血圧上昇、心重量の増加、心筋の線維化を認めることが確認された。

第 2 節 心筋の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake の評価

心筋の SERCA activity を評価するために $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake assay を行った。総 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度は反応開始 1 分から 5 分で経時的に増加し、時間ごとの濃度は 4 群間で差を認めなかった (図 3 A、実線)。タプシガルギンにより SERCA を阻害すると $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加は各群とも同等に抑制された (図 3 A、破線)。この傾きより求めた $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake には 4 群間で有意差を認めなかった (図 3 B、control + vehicle = 1149 ± 89.5 mmol/g protein/min [n = 5]、control + ANG II = 994.2 ± 125.3 mmol/g protein/min [n = 5]、SKI + vehicle = 904.7 ± 140.3 mmol/g protein/min [n = 5]、SKI + ANG II = 740.1 ± 101.7 mmol/g protein/min [n = 5]、有意差なし)。

第3節 左室収縮能の評価

左室収縮能及び左室壁厚の評価を行った（表2）。vehicle群ではcontrolマウスとSKIマウスで各測定値に差を認めなかった。ANG II投与により、controlマウス、SKIマウスともに左室壁厚の増大、左室内腔の狭小化を認めた。左室駆出率は4群間で差を認めなかった（control + vehicle = $62.4 \pm 5.2\%$ [n = 8]、control + ANG II = $66.7 \pm 2.2\%$ [n = 8]、SKI + vehicle = $62.8 \pm 1.5\%$ [n = 8]、SKI + ANG II = 66.3 ± 1.9 [n = 8]、有意差なし）。

第4節 体表心電図の評価

各群の電気生理学的特徴を評価するために、電気生理学検査を行った。RR、PQ間隔は各群間で差を認めなかった（図4A、B）。QRS幅はANG II群でvehicle群と比較し延長していたが、controlマウスとSKIマウス間では差を認めなかった（図4C、control + vehicle = 20.8 ± 0.7 ms [n = 11] 対 control + ANG II = 23.9 ± 0.6 ms [n = 12]、 $P < 0.05$ 。SKI + vehicle = 20.0 ± 0.7 ms [n = 13] 対 SKI + ANG II = 24.3 ± 1.0 ms [n = 13]、 $P < 0.05$ ）。QTcはvehicle群において、SKIマウスでcontrolマウスと比較し延長していた。ANG II群はvehicle群と比較し

control マウス、SKI マウスとも有意な QTc の延長を認めたが、control マウスと SKI マウス間では差を認めなかった (図 4 D、E、control + vehicle = 45.2 ± 0.7 ms [n = 11] 対 SKI + vehicle = 55.2 ± 1.2 ms [n = 12]、 $P < 0.01$ 。control + ANG II = 66.5 ± 2.3 ms [n = 11] 対 SKI + ANG II = 85.9 ± 2.9 ms [n = 12]、有意差なし)。

第 5 節 心室性不整脈の誘発性の評価

心室性不整脈の誘発性を評価するために心室プログラム刺激を行った。

vehicle 群では control マウス、SKI マウスとも不整脈は誘発されなかったが。L-イソプレナリン塩酸塩の腹腔内投与によるカテコラミン急性負荷下のプログラム刺激では、SKI マウスは control マウスと比較し心室性不整脈の誘発性が有意に高かった (図 5 A、control + vehicle = 12.5% [n = 8] 対 SKI + vehicle = 66.7% [n = 15]、 $P < 0.05$)。薬剤負荷なしで各群にプログラム刺激を行うと、ANG II 群の SKI マウスのみ心室性不整脈が誘発された (図 5 B、C、control + vehicle = 0% [n = 11]、SKI + vehicle = 0% [n = 11]、control + ANG II = 0% [n = 14] 対 SKI + ANG II = 57.1% [n = 14]、 $P < 0.01$)。心室性不整脈の誘発性は頻回刺激法、期外刺激法で差は認めなかった。以上より、SKI マウスはカテコラミン急性負荷や

ANG II の持続投与下において、心室性不整脈の誘発性が有意に高いことが確認された。

第 6 節 活動電位持続時間の評価

第 4 節で SKI マウスは QT 間隔が延長していることを確認した。QT 間隔は心室筋の活動電位持続時間 (APD) を反映していることから、次に whole heart を用いて心筋の膜電位の変化を観察するオプティカルマッピング法を行い、心室筋の APD を測定した。vehicle 群において、SKI マウスは control マウスと比較し有意に APD の延長を認めた。(図 6 A、B、control + vehicle = 49.8 ± 0.6 ms [n = 4] 対 SKI + vehicle = 56.7 ± 0.6 ms [n = 5]、 $P < 0.05$)。

第 7 節 心室の mRNA 発現量の評価

心筋の Ca^{2+} 調節に関連する遺伝子の発現を確認するために real-time RT-PCR 法により検証した。vehicle 群において、SKI マウスは control マウスと比較し CaMK II の発現が有意に増加していた (図 7 A、control + vehicle = 1.5 ± 0.3 [n = 9] 対 SKI + vehicle = 7.0 ± 0.8 [n = 8]、 $P < 0.05$)。ANG II 群では CaMK II、RyR、

NCX の遺伝子発現が vehicle 群と比較し有意に増加していたが、control + ANG II 群と SKI + ANG II 群の間では差を認めなかった (図 7 A - C)。SERCA2 および LTCC の発現は各群間で有意差を認めなかった (図 7 D、E)。

第 8 節 心筋細胞の Ca^{2+} トランジェントの評価

第 5 節で SKI マウスは control マウスと比較し心室性不整脈の誘発性が有意に高いことを確認した。SKI マウスでは SERCA2 の異常により心筋細胞内の Ca^{2+} ハンドリング異常が起こっていることが想定されたため、次に単離心筋細胞を用いて Ca^{2+} トランジェントの測定を行った。RyR の活動を反映する Time-to-peak は各群間で差を認めなかった (図 8 A、B)。vehicle 群において SKI マウスは control マウスと比較し、収縮期の筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を表すピークの F/F_0 が低下していた (図 8 A、C、control + vehicle = 3.1 ± 0.1 [n = 35] 対 SKI + vehicle = 1.9 ± 0.04 [n = 37]、 $P < 0.001$)。また、SERCA2 の機能を反映するとされる Time to 50% relaxation (RT50) は、SKI マウスにおいて control マウスと比較し延長していた (図 8 A、D、control + vehicle = 140.6 ± 3.2 ms [n = 36] 対 SKI + vehicle = 191.3 ± 5.0 ms [n = 37]、 $P < 0.001$)。ANG II 投与により control マウスでは有意に F/F_0 が低下したが (図 8 A、C、control + vehicle = 3.1 ± 0.1 [n =

35] 対 control + ANG II = 2.0 ± 0.06 [n = 38]、 $P < 0.001$)、RT50 は vehicle 群と比較し差を認めなかった (図 8 A、D、control + vehicle = 140.6 ± 3.1 ms [n = 36] 対 control + ANG II = 148.4 ± 3.8 ms [n = 38]、有意差なし)。

第 9 節 筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵の評価

第 8 節で SKI マウスにおいて拡張期の Ca^{2+} の細胞質外への汲み出し時間を反映する RT50 の延長を認めたことから、SKI マウスは SERCA2 の変異により細胞質から筋小胞体内への Ca^{2+} 取り込みが低下し、結果的に筋小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵が低下している可能性が想定された。そこでカフェイン投与により筋小胞体から Ca^{2+} を放出させ、筋小胞体内の Ca^{2+} 貯蔵量を評価した。vehicle 群において、SKI マウスは control マウスと比較してカフェイン投与による Ca^{2+} 放出を表す F/F_0 が著明に低下していた (図 9 A、B、control + vehicle = 4.9 ± 0.2 [n = 35] 対 SKI + vehicle = 2.6 ± 0.09 [n = 30]、 $P < 0.001$)。また、ANG II 投与により control マウスの F/F_0 は低下した (図 9 A、B、control + vehicle = 4.9 ± 0.2 [n = 35] 対 control + ANG II = 2.2 ± 0.07 [n = 29]、 $P < 0.001$)。これらの結果から、SKI マウスもしくは ANG II 負荷により筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵が低下することが確認された。カフェイン投与により SERCA をブロックした状態での細胞質外への

Ca²⁺汲み出しは主に NCX が担うが、Ca²⁺汲み出しにかかる時間を反映する Tau は、SKI + ANG II 群で SKI + vehicle 群と比較して短縮していた (図 9 C、SKI + vehicle = 2.1 ± 0.1 ms [n = 30] 対 SKI + ANG II = 1.7 ± 0.1 ms [n = 32]、*P* < 0.01)。

第 10 節 心筋細胞の Ca²⁺スパークの評価

第 8 節で SKI マウスは収縮期の筋小胞体からの Ca²⁺放出が低下し、第 9 節では筋小胞体の Ca²⁺貯蔵が減少している可能性が示唆された。そこで、RyR からの Ca²⁺リークを評価するために Ca²⁺スパークの測定を行った (図 10 A)。ANG II 投与により、control マウス、SKI マウスとも Ca²⁺スパークを認める細胞の割合は増加した (図 10 B、control + vehicle = 36.3% [n = 55] 対 control + ANG II = 69.0% [n = 55]、*P* < 0.001。SKI + vehicle = 41.1% [n = 56] 対 SKI + ANG II = 75.0% [n = 52]、*P* < 0.001)。1 細胞あたりの Ca²⁺スパークの頻度 (100 μm/秒あたりの Ca²⁺スパーク数) は vehicle 群の SKI マウスで増加しており、ANG II 群においても control マウスと比較し SKI マウスで Ca²⁺スパークの頻度は増加していた (図 10 A、C、control + vehicle = 2.4 ± 0.4 [n = 19] 対 SKI + vehicle = 5.9 ± 1.1 [n = 19]、*P* < 0.05。control + ANG II = 4.8 ± 0.7 [n = 38] 対 SKI + ANG II =

10.0 ± 1.7 [n = 35]、 $P < 0.05$)。以上より、ANG II 投与により control マウス、SKI マウスとも Ca^{2+} スパークを認める細胞の割合は増加し、また SKI マウスは control マウスと比較し 1 細胞あたりの Ca^{2+} スパーク頻度も増加していることが確認された。

第 11 節 ダントロレン投与が Ca^{2+} ハンドリングと不整脈誘発性に与える影響

第 5 節で心室性不整脈の誘発性は SKI + ANG II 群で有意に高い結果であった。第 7 節で ANG II 群において CaMK II、RyR、NCX の遺伝子発現が亢進していること、また第 8 - 10 節では SKI マウスは拡張期の筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みが低下し、筋小胞体内 Ca^{2+} 貯蔵が低下していること、RyR からの Ca^{2+} リークが増大していることを確認した。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇による NCX の亢進、活性酸素種による CaMK II の亢進や RyR からの Ca^{2+} リークは撃発活動により心室性不整脈の原因となることが知られている (9、10、43)。そこで次に、悪性高熱症治療薬であり、RyR からの Ca^{2+} リークを抑制するダントロレンを SKI + ANG II 群に長期投与し検討を行った。ダントロレン投与は SKI + ANG II 群で認めた高い心室性不整脈誘発性を低下させた (図 11 A、SKI + ANG II = 57.1% [n = 14] 対 SKI + ANG II + DAN = 15.4% [n = 13]、 $P < 0.05$)。次に Ca^{2+} トラン

ジェントの評価を行った。ダントロレン投与により SKI + ANG II 群で低下した Ca^{2+} トランジェントの振幅 (F/F_0) は改善し (図 11 B、SKI + ANG II = 1.8 ± 0.05 [n = 40] 対 SKI + ANG II + DAN = 2.2 ± 0.06 [n = 40]、 $P < 0.01$)、延長した RT50 は短縮した (図 11 C、SKI + ANG II = 187.9 ± 5.3 ms [n = 40] 対 SKI + ANG II + DAN = 169.6 ± 3.4 ms [n = 39]、 $P < 0.05$)。また SKI + ANG 群で低下した筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵は増加した (図 12A、SKI + ANG II = 2.0 ± 0.5 [n = 32] 対 SKI + ANG II + DAN = 2.9 ± 0.2 [n = 24]、 $P < 0.001$)。 Ca^{2+} スパークについても、 Ca^{2+} スパークを認める細胞の割合はダントロレン投与で減少し (図 12 B、SKI + ANG II = 75.0% [n = 55] 対 SKI + ANG II + DAN = 33.9% [n = 59]、 $P < 0.001$)、1 細胞あたりの Ca^{2+} スパークの頻度も低下した (図 12 C、SKI + ANG II = 9.96 ± 1.7 [n = 35] 対 SKI + ANG II + DAN = 4.6 ± 0.9 [n = 20]、 $P < 0.05$)。これらの結果から、ダントロレン投与により ANG II 群の SKI マウスで認めた筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵低下が改善し、心室性不整脈の誘発が抑制されたと考えられた。

第4章 考察

本研究では心不全患者で認められた SERCA2 Cys674 の不可逆的酸化による SH 基喪失と心筋の Ca^{2+} ハンドリング及び不整脈原生との関連について、SERCA2 Cys674 の 50%を Ser674 に変異させた SKI マウスをモデルとして検討を行った。このような Cys 変異を用いた Redox 研究としては Eaton ら (47) の Protein Kinase G1 α Cys42Ser knock-in マウスの研究が挙げられる。ANG II 投与下で、SKI マウスは左室収縮能については control マウスと差はなかったが、有意に高い心室性不整脈の誘発性を認めた。ANG II は筋小胞体内の Ca^{2+} リークを増大させ、筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵を低下させたが、control + ANG II 群では心室性不整脈の誘発は認めなかった。一方で、SKI マウスは拡張期の筋小胞体への Ca^{2+} 取り込み時間が延長しており、SERCA2 の機能低下が起きていると考えられた。これらの結果から、ANG II 投与に SKI マウスにおける SERCA2 の機能低下が加わることで、更なる Ca^{2+} リークを増大と細胞内 Ca^{2+} 過負荷を来し、心室性不整脈の原因となっていると考えられた。ダントロレンの長期投与による RyR からの Ca^{2+} リークの抑制は、ANG II 負荷下の SKI マウスにおける心筋細胞 Ca^{2+} ハンドリング異常を改善させ、心室性不整脈の誘発性を低下させることが判明した (図 13 A、B)。

生理的濃度の一酸化窒素 (NO) /活性酸素種 (ROS) は SERCA2 の Cys674 を S-glutathiolation 修飾することで活性を約 50%上昇させるが、一方で病的状態における過剰な NO/ROS は Cys674 を不可逆的に亜硫酸化修飾することで SERCA2 の redox による調節を破綻させる事が報告されている (28 - 30)。Toya ら (31) は心不全患者の心筋生検検体で SERCA2 Cys674 の亜硫酸化修飾が亢進していることを報告した。また、老齢マウスや *Gαq* を過剰発現させた心不全マウスモデルにおいて、心筋の SERCA2 Cys674 の亜硫酸化修飾が増加し、細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常が起こることが報告されており (48、49)、加齢や心不全といった病的酸化ストレスにより引き起こされる SERCA2 Cys674 の不可逆的酸化修飾が SERCA2 の機能低下に関与する事が示唆された。しかし、動物心不全 (収縮不全) モデルでは SERCA2 の酸化修飾と同時にタンパク発現低下を伴うため (18 - 22)、Cys674 の SH 基を介した調節障害と Ca^{2+} ハンドリングや催不整脈性との関連については未だ不明であることから、SKI マウスを用いて研究を行った。In vivo における心筋内の SERCA2 Cys674 SH 基修飾については検討が困難なために本研究では詳細には行なえておらず、これについては今後の検討課題と考えられた。心筋ホモジェネートにおける dithiothreitol (DTT) 存在下での $^{45}Ca^{2+}$ uptake は、SKI マウスと control マウスで同等であ

り、これは過去の培養細胞や平滑筋細胞を用いた Cys674 SH 基修飾の研究と一致する結果であった (28、50)。

本研究は SKI マウスを用いた初めての不整脈研究である。vehicle 群において、SKI マウスは control マウスと比較し心エコー指標に違いはなく、SERCA2 の遺伝子発現量に差はなく、高 Ca^{2+} ・還元状態下での $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake にも変化を認めなかった。しかし vehicle 群で SKI マウスは control マウスと比較し APD の延長、QT 間隔の延長を認め、電気生理学検査ではカテコラミン急性負荷下で心室性不整脈を認めた。Terracciano ら (51) は SERCA2 の過剰発現ウサギモデルでは、SERCA2 活性亢進により細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下し APD が短縮することを報告している。これと対照的に SKI マウスでは SERCA2 による筋小胞体への Ca^{2+} 取り込み低下により細胞内 Ca^{2+} 過負荷が起こり NCX のフォワードモードが活性化して細胞内への Na^{+} 流入が増加して APD が延長した可能性が考えられた (52 - 55)。

過去には SKI マウスを用いて血管内皮細胞、平滑筋細胞での Ca^{2+} ハンドリング異常の検討が報告されている (28、35)。心筋細胞において Ca^{2+} ハンドリング異常は不整脈発生に極めて重要であり (56)、我々は SKI マウスの心筋細胞内 Ca^{2+} 動態について検討を進めた。単離心筋細胞において、SKI + vehicle 群で

収縮期の Ca^{2+} 放出 (F/F_0) が低下し SERCA2 機能を反映する RT50 が延長し、カフェインによる筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が低下していた。このことから SKI では SERCA2 による筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みが低下し、筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵が低下していることが示唆された。また Ca^{2+} スパークの頻度が軽度増加していることから Ca^{2+} リークの増大も考えられた。SKI マウスでは vehicle 群で CaMK II の遺伝子発現が亢進していることから、これを介した RyR からの Ca^{2+} リークが増大し、カテコラミン負荷時の不整脈誘発に関与している可能性が考えられた。

ANG II 投与後も control マウスと SKI マウスで SERCA2 の遺伝子発現や $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake に有意な変化を認めず、心重量の増加や心筋線維化の程度も同等であった。心エコー指標でも ANG II 投与後の壁肥厚や左室収縮に違いはなかった。これらの所見は、SERCA2 の発現と機能低下を伴い、心負荷時に心肥大増悪と左室収縮能低下が進行する SERCA2 ヘテロノックアウトマウスを用いた Schultz ら (18) や Andersson ら (57) の報告とは対照的であった。ANG II 投与は control マウス、SKI マウスとも QT 間隔を延長させ、結果的に同等の QT 延長となった。過去の報告では、ANG II 過剰発現マウスモデルは QT 延長を来すと報告されており (58 - 60)、本研究の結果はそれと合致した。QT 延長は早期

後脱分極による撃発活動により致死性不整脈の原因となることが知られている (61、62)。control マウスでは ANG II 負荷で QT 延長を認めたにも関わらず、心室性不整脈は誘発されなかった。一方で、ANG II 投与下 SKI マウスでは約 60% で心室性不整脈が誘発された。単離心筋細胞での Ca^{2+} 動態については ANG II 投与により、vehicle 群と比較し control マウスの収縮期の F/F_0 は低下し、カフェイン投与による Ca^{2+} 放出も低下した。また、 Ca^{2+} スパークを起こす細胞の割合も増加していた。このことから ANGII 投与が Ca^{2+} リーク、筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵低下を引き起こした可能性が考えられた。一方で、RT50 は control + vehicle 群と control + ANG II 群との間で差を認めなかった。SERCA2 の遺伝子発現や $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake にも有意な変化はなかった。このことから、control + ANG II 群では SERCA2 による筋小胞体 Ca^{2+} 取り込みは保持されていることが示唆された。ANG II 投与群では CaMKII、RyR の遺伝子発現が増加していたことから、control + ANG II 群での筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵低下は、CaMKII/RyR 活性化を介した Ca^{2+} リークの増大が関与した可能性が考えられた。SKI + ANG II 群は control + ANG II 群と比較し F/F_0 には差がないものの RT50 は有意に延長しており、また Ca^{2+} スパークの頻度も有意に増加していた。これらの Ca^{2+} 動態の結果から、SKI + ANG II 群では ANG II による筋小胞体からの Ca^{2+} リークの増大・

Ca²⁺貯蔵の低下に加えて、SERCA2 機能低下による Ca²⁺再取り込みの低下と Ca²⁺スパークの頻度の増加が加わり、細胞内 Ca²⁺過負荷による撃発活動から致死性不整脈誘発性が起こった可能性が想定された (図 14)。

悪性高熱症の治療薬であるダントロレンは、骨格筋に発現している RyR1 のみならず、心筋細胞での RyR2 にも結合し、RyR 内の N 末端ドメインとセントラルドメインの接触を強固にすることで RyR からの Ca²⁺リークを減少させることが明らかとなっている。ダントロレンはカテコラミン誘発性多形性心室頻拍症 (46) や心不全 (63) の動物モデルで Ca²⁺リークを低下させることが報告されており、Ca²⁺リーク増大による致死性不整脈に対しても有効である可能性が示唆されている (64、65)。ANG II 群の SKI マウスに 1 週間のダントロレン投与を行ったところ、収縮期の Ca²⁺振幅は改善し、筋小胞体の Ca²⁺貯蔵も改善した。このことはダントロレン投与が RyR に作用し Ca²⁺リークを抑制したことを示唆する。その結果、ダントロレン投与は Ca²⁺ハンドリングを補正し、心室性不整脈の誘発性を低下させたと考えられた。興味深いことに、ダントロレンは SKI マウスで延長した RT50 も短縮させており、SERCA2 による Ca²⁺の再取り込みも改善した可能性がある。Meissner ら (66) はラットの心筋細胞において

ダントロレンが拡張期の Ca^{2+} 取り込みを増加させたと報告している。またイヌ心不全モデルを用いた Kobayashi ら (63) の報告でも、心不全で延長した Ca^{2+} 減衰時間がダントロレン投与により短縮したが、その機序は明らかにはなっていない。Santulli ら (67) は Ca^{2+} リークの増大によりミトコンドリア内が Ca^{2+} 過負荷となり、ミトコンドリアの機能不全により活性酸素種が増加することを報告しており、RyR からの Ca^{2+} リークの抑制による慢性の心筋細胞内 Ca^{2+} ハンドリングの改善が、二次的に SERCA2 機能改善に寄与した可能性も考えられた。本モデルにおける催不整脈性がダントロレンで著明に改善した機序、特に SERCA2 による Ca^{2+} ハンドリング機能改善が加わった可能性とその機序については今後の検討課題である。

RyR を介した筋小胞体からの Ca^{2+} リークによる Ca^{2+} ハンドリング異常、細胞内 Ca^{2+} 負荷と心室性不整脈の関連については臨床的にも多くの報告がある

(11、68)。カテコラミン誘発性多形性心室頻拍症 (CPVT) は交感神経活性化などカテコラミン負荷により筋小胞体からの Ca^{2+} リークが増大し、DAD を契機として致死性心室性不整脈を引き起こす疾患である。RyR2 遺伝子の異常による CPVT 1 が 50 - 60% を占めるが、約 3 - 5% に認める CPVT 3 は、心筋および骨格筋の小胞体に発現する trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like protein を発現さ

せる TRCEL 遺伝子の異常により、RyR の Ca^{2+} リークと SERCA2 の機能低下を来し、カテコラミン誘発性の心室性不整脈に QT 延長を伴うことが報告されている (11、69)。本研究で用いたモデルは ANG II 負荷による RyR の Ca^{2+} リークと、SERCA2 変異による SERCA2 機能低下を来しており、CPVT 3 と類似した細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常を来している可能性がある。CPVT に対する治療薬として、本研究で用いたダントロレンの他、 β 遮断薬のカルベジロールやそのアナログ (70)、I 群抗不整脈薬のフレカイニド (71) などが有用な可能性が報告されており、いずれも RyR からの Ca^{2+} リーク減少による DAD の頻度を低下させることで致死性不整脈抑制効果を発揮する。ダントロレンは近年、筋小胞体からの Ca^{2+} リークの減少を目的に心不全治療薬としても期待されており、本邦においても臨床試験が開始された (72)。筋小胞体の Ca^{2+} ハンドリング異常に対する介入は、今後の心不全時の致死性心室性不整脈に対する治療法として有望であり、RyR からの Ca^{2+} リーク減少のみでなく、SERCA2 の機能改善も有用である可能性がある。

これまでの研究から、心不全では SERCA2 の発現が低下していることが報告されており、遺伝子導入による SERCA2 の発現増加が治療ターゲットとして着目されて来た (13–16、20、22)。一方で、SERCA2 は翻訳後修飾により調節

されており、その変化が病態に関与することが多数報告されている。Quan ら (25) は SERCA2 Thr-484 をリン酸化する striated muscle preferentially expressed protein kinase (SPEG) 遺伝子のノックアウトマウスでは SERCA2 の活性が低下し、Ca²⁺ハンドリング異常により心不全となることを報告している。同様に、Kho ら (27, 73) は small ubiquitin-related modifier 1 (SUMO-1) が SERCA2 Lysine-480, 585 の SUMOylation により SERCA2 を活性化させており、心不全では SUMO1 の発現や SERCA2 の SUMOylation が低下し、SUMO1 を活性化することにより動物モデルにおいて心不全が改善することを報告している。

今後、SERCA2 の翻訳後修飾を直接ターゲットとし、酸化ストレスの調節を含む治療戦略が筋小胞体の Ca²⁺ハンドリングを改善し、心不全患者における致死性不整脈の治療戦略となりうる可能性が考案された。

第5章 結論

SERCA2 Cys674Ser knock-in マウスは、SERCA2 の機能調節異常により心筋細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常を来し、ANG II による心負荷下で高い心室性不整脈の誘発性を示した。筋小胞体の Ca^{2+} リークの抑制は Ca^{2+} ハンドリングを改善させ、本モデルにおける心室性不整脈を抑制した。心室性不整脈に対して筋小胞体への介入は有効であると考えられ、今後、SERCA2 を含めた筋小胞体の Ca^{2+} ハンドリングを標的とした薬物開発は新たな不整脈治療戦略になりうるものと考えられた。

謝辞

本論文作成にあたり、直接御指導を賜りました防衛医科大学校内科学 1 講座循環器内科学教授 足立 健先生、同准教授 矢田 浩崇先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にご支援いただきました多くの先生方、研究科学生、実験技官、秘書の皆様にも深く御礼申し上げます。

実験動物の飼育、管理に御尽力賜りました防衛医科大学校 動物実験施設職員の皆様方、並びにご支援をいただきました防衛医科大学校 共同利用研究施設職員の皆様方に深謝申し上げます。

略語一覧

AAV	adeno associated virus
ANG II	angiotensin II
APD	action potential duration
CaMK II	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CPVT	catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
DAD	delayed after depolarization
EAD	early after depolarization
LTCC	L-type calcium channel
NCX	sodium-calcium exchanger
NO	nitric oxide
ROS	reactive oxygen species
RyR	ryanodine receptor

SERCA2	sarcoplasmic reticulum ATPase2
RT50	time to 50% relaxation
TTP	time to peak
VA	ventricular arrhythmia

参考文献

1. 厚生労働省. 平成 30 年 (2018) 人口動態統計 (各定数) の概況.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei18/index.html>.
Accessed Nov 29, 2019.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al: Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 29: e28-e292.
3. Okura Y, Ramadan MM, Ohno Y, et al. Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J*. 2008; 72: 489-491.
4. Tsuchihashi-Makaya M, Hamaguchi S, Kinugawa S, et al. JCARECARDInvestigators. Characteristics and outcomes of hospitalized patients with heart failure and reduced vs preserved ejection fraction. Report from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Circ J*. 2009; 73: 1893-1900.
5. Carson P, Anand I, O'Connor C, Jaski B, Steinberg J, Bristow MR, et al. Mode of death in advanced heart failure: the comparison of Medical, Pacing, and Defibrillation Therapies in Heart Failure (COMPANION) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 2329-34.
6. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Greene HL, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med*. 1991; 324: 781-8.
7. Amiodarone Trials Meta-Analysis Investigators. Effect of prophylactic amiodarone on mortality after acute myocardial infarction and in congestive heart failure: meta-analysis of individual data from 6500 patients in randomised trials. *Lancet*. 1997; 350: 1417-24.
8. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Ip JH et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial (SCD-HeFT) Investigators. *N Engl J Med*. 2005; 352: 225-37.

9. Houser SR. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias. *Circ Res.* 2014; 114: 1320-7.
10. Kato T, Yamamoto T, Nakamura Y, Nanno T, Fukui G, Yano M, 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.
11. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res.* 2017; 120: 1969-1993.
12. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 566-77.
13. Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM. Elevated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res.* 2003; 93: 592–594.
14. Igarashi-Saito K, Tsutsui H, Yamamoto S, Takahashi M, Kinugawa S, Takeshita H A, et al. Role of SR Ca^{2+} -ATPase in Contractile Dysfunction of Myocytes in Tachycardia-Induced Heart Failure. *Am J Physiol.* 1998; 275: H31-40.
15. Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Schwartz K, et al. Altered sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest.* 1990; 85: 305–309.
16. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Drexler H, et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 1994; 75: 434–442.
17. Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Shull GE, et al. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem.* 1999; 274: 2556–2562.

18. Schultz Joel J, Glascock BJ, Witt SA, Nieman ML, Nattamai KJ, Periasamy M, et al. Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1146.
19. Stokke MK, Hougen K, Sjaastad I, Louch WE, Briston SJ, Trafford AW, et al. Reduced SERCA2 abundance decreases the propensity for Ca²⁺ wave development in ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 2010; 86: 63-71.
20. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hajjar RJ, et al. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 1112-1119.
21. Cutler MJ, Wan X, Plummer BN, Liu H, Hajjar RJ, Rosenbaum DS, et al. Targeted sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2a gene delivery to restore electrical stability in the failing heart. *Circulation.* 2012; 126: 2095-104.
22. Lyon AR1, Bannister ML, Collins T, Pearce E, Sepehripour AH, Harding SE et al. SERCA2a Gene Transfer Decreases Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak and Reduces Ventricular Arrhythmias in a Model of Chronic Heart Failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2011; 4: 362-72.
23. Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Zsebo KM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet.* 2016; 387: 1178-1186.
24. Toyofuku T, Curotto Kurzydowski K, Narayanan N, MacLennan DH. Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase that is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 26492-6.
25. Quan C, Li M, Du Q, Chen Q, Wang H, Chen S, et al. SPEG Controls Calcium Reuptake Into the Sarcoplasmic Reticulum Through Regulating SERCA2a by Its Second Kinase-Domain. *Circ Res.* 2019; 124:712-726.

26. Gorski PA, Jang SP, Jeong D, Lee A, Lee P, Kho C, et al. Role of SIRT1 in Modulating Acetylation of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Heart Failure. *Circ Res*. 2019; 9: e63-e80.
27. Kho C, Lee A, Jeong D, Oh JG, Chaanine AH, Hajjar RJ et al. SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure. *Nature*. 2011; 477: 601-5.
28. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Cohen RA, et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*. 2004; 10:1200-7.
29. Adachi T. Modulation of vascular sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in cardiovascular pathophysiology. *Advance in Pharmacology*. 2010; 59: 165-195.
30. Qin F, Siwik DA, Pimentel DR, Morgan RJ, Biolo A, Colucci WS et al. Cytosolic H₂O₂ mediates hypertrophy, apoptosis, and decreased SERCA activity in mice with chronic hemodynamic overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 306: 1453–1463.
31. Toya T, Ito K, Kagami K, Osaki A, Yada H, Adachi T et al. 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; 26: 100437.
32. Goodman JB, Qin F, Morgan RJ, Chambers JM, Croteau D, Cohen RA, Colucci WS. Redox-Resistant SERCA [Sarco(endoplasmic Reticulum Calcium ATPase] Attenuates Oxidant-Stimulated Mitochondrial Calcium and Apoptosis in Cardiac Myocytes and Pressure Overload–Induced Myocardial Failure in Mice. *Circulation*. 2020; 142: 2459–2469.
33. Su SA, Yang D, Wu Y, Xie Y, Zhu W, Xiang M. et al. EphrinB2 Regulates Cardiac Fibrosis Through Modulating the Interaction of Stat3 and TGF-β/Smad3 Signaling. *Circ Res*. 2017; 121: 617-627
34. Weng CH, Chung FP, Chen YC, Lin SF, Huang PH, Hu YF et al. Pleiotropic Effects of Myocardial MMP-9 Inhibition to Prevent Ventricular Arrhythmia. *Sci Rep*. 2016; 14: 38894.

35. Thompson MD, Mei Y, Weisbrod RM, Bolotina VM, Cohen RA, Tong X, et al. Glutathione adducts on sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase Cys-674 regulate endothelial cell calcium stores and angiogenic function as well as promote ischemic blood flow recovery. *J Biol Chem*. 2014; 289: 19907-16.
36. Wang HD, Xu S, Johns DG, Du Y, Quinn MT, Cohen RA, et al. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ Res*. 2001; 88: 947-53.
37. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of Three Types of Mixed Anesthetic Agents Alternate to Ketamine in Mice. *Exp Anim*. 2011;60:481-487.
38. Adachi T, Matsui R, Xu S, Kirber M, Lazar HL, Cohen RA et al. Antioxidant improves smooth muscle sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function and lowers tyrosine nitration in hypercholesterolemia and improves nitric oxide-induced relaxation. *Circ Res*. 2002; 90: 1114-21.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
40. Roussel J, Champeroux P, Roy J, Richard S, Fauconnier J, Thireau J et al. The Complex QT/RR Relationship in Mice. *Sci Rep*. 2016; 6: 25388.
41. Maguire CT, Wakimoto H, Patel VV, Hammer PE, Gauvreau K, Berul CI. Implications of Ventricular Arrhythmia Vulnerability During Murine Electrophysiology Studies. *Physiol Genomics*. 2003; 15: 84-91.
42. Chou CC, Chang PC, Wei YC, Lee KY. Optical Mapping Approaches on Muscleblind-Like Compound Knockout Mice for Understanding Mechanistic Insights Into Ventricular Arrhythmias in Myotonic Dystrophy. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6: e005191.
43. Yamakawa H, Murata M, Suzuki T, Yada H, Ishida H, Fukuda K, et al. Suppression of Rad leads to arrhythmogenesis via PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor activity in the heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 452: 701-7.

44. Jaimes R 3rd, Walton RD, Pasdois P, Bernus O, Efimov IR, Kay MW. A technical review of optical mapping of intracellular calcium within myocardial tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310: H1388-401.
45. Willis BC, Pandit SV, Ponce-Balbuena D, Zarzoso M, Guerrero-Serna G, Jalife J et al. Constitutive Intracellular Na⁺ Excess in Purkinje Cells Promotes Arrhythmogenesis at Lower Levels of Stress Than Ventricular Myocytes From Mice with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*. 2016; 133: 2348-59.
46. Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, Suetomi T, Susa T, Ono M, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2(R2474S/+) knock-in mouse model. *Circ J*. 2010; 74: 2579-84.
47. Prysyzhna O, Rudyk O, Eaton P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med*. 2012; 18: 286–290.
48. Qin F, Siwik DA, Lancel S, Zhang J, Cohen RA, Colucci WS, et al. Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2: e000184.
49. Lancel S, Qin F, Lennon SL, Zhang J, Tong X, Colucci WS, et al. Oxidative posttranslational modifications mediate decreased SERCA activity and myocyte dysfunction in Galphaq-overexpressing mice. *Circ Res*. 2010; 107: 228-32.
50. Ying J, Tong XY, Pimentel DR, Weisbrod RM, Trucillo MR, Adachi T, Cohen RA. Cysteine-674 of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase is required for the inhibition of cell migration by nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 4: 783-90.
51. Terracciano CMN 1, Hajjar RJ, Harding SE. Overexpression of SERCA2a Accelerates Repolarisation in Rabbit Ventricular Myocytes. *Cell Calcium*. 2002; 31: 299-305.

52. Cho JH, Zhang R, Kilfoil PJ, Gallet R, de Couto G, Cingolani E, et al. Delayed Repolarization Underlies Ventricular Arrhythmias in Rats With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2017; 136: 2037-2050.
53. Moreno JD, Clancy CE. Pathophysiology of the cardiac late Na current and its potential as a drug target. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 52: 608-19.
54. Sipido KR, Varro A, Eisner D. Sodium calcium exchange as a target for antiarrhythmic therapy. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 171: 159-199.
55. Wang J, Chan TO, Zhang XQ, Gao E, Song J, Cheung JY, et al. Induced overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger transgene: altered myocyte contractility, [Ca²⁺]_i transients, SR Ca²⁺ contents, and action potential duration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H590-601.
56. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*. 2017; 120:1969-1993.
57. Andersson KB, Birkeland JA, Finsen AV, Louch WE, Sjaastad I, Christensen G, et al. Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the *Serca2* gene. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 47: 180-7.
58. Zhao Z, Fefelova N, Shanmugam M, Bishara P, Babu GJ, Xie LH. Angiotensin II induces afterdepolarizations via reactive oxygen species and calmodulin kinase II signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 50:128-36.
59. Domenighetti AA, Boixel C, Cefai D, Abriel H, Pedrazzini T. Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42:63-70.
60. Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res*. 2008; 78:53-62.
61. 日本循環器学会. QT 延長症候群（先天性・二次性）と Brugada 症候群の診療に関するガイドライン（2012 年改訂版）.

62. Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Anderson ME, et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*. 2005; 11:409–417.
63. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Matsuzaki M. 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
64. Hartmann N, Pabel S, Herting J, Schatter F, Renner A, Sossalla S, et al. Antiarrhythmic effects of dantrolene in human diseased cardiomyocytes. *Heart Rhythm*. 2017; 14: 412-419.
65. Wiesmann T, Freitag D, Dersch W, Eschbach D, Iqrsusi M, Feldmann C, et al. Dantrolene versus amiodarone for cardiopulmonary resuscitation: a randomized, double-blinded experimental study. *Sci Rep*. 2017; 7: 40875.
66. Meissner A, Szymanska G, Morgan JP. Effects of dantrolene sodium on intracellular Ca^{2+} -handling in normal and Ca^{2+} -overloaded cardiac muscle. *Eur J Pharmacol*. 1996; 316:333-42.
67. Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:11389-94.
68. Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc Res*. 2008; 77: 285-92.
69. Devalla HD, Gélinas R, Aburawi EH, Beqqali A, Goyette P, Passier R et al. TECRL, a new life-threatening inherited arrhythmia gene associated with overlapping clinical features of both LQTS and CPVT. *EMBO Mol Med*. 2016; 8: 1390-1408.
70. Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Chen SR, et al. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca^{2+} release. *Nat Med*. 2011; 17: 1003-9.

71. Van der Werf C, Kannankeril PJ, Sacher F, Krahn AD, Viskin S, Wilde AA et al. Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57: 2244-54.
72. Kobayashi S, Wakeyama T, Ono S, Ikeda Y, Omura M, Yano M, 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.
73. Kho C, Lee A, Jeong D, Oh JG, Gorski PA, Hajjar RJ, et al. Small-molecule activation of SERCA2a SUMOylation for the treatment of heart failure. *Nat Commun.* 2015;6:7229.

Gene		sense
Atp2a	forward	TTGTGGCCCGAAACTACCTG
	reverse	CTAACAACGCACATGCACGC
Ryr2	forward	GAAGGATCAGGGGAGAAGGT
	reverse	TGTTGTTGCCGGTCTGAGTT
Camk2a	forward	GCCTGGACTTTCATCGATTCT
	reverse	CTGACTCGTCACCCATCAGGT
Slc8a1	forward	GGTCGGTTTTCATCCAGCC
	reverse	AAGAGAGCCACCAGAGCTACC
Cacna1c	forward	CTCACTGGCTCACAGAAGTGC
	reverse	AAGCGGTTGAAGAGGGACACA
Rps18	forward	CGATGGGCGGCGGAAAATAG
	reverse	TGATCACTCGCTCCACCTCA

表 1. 定量 PCR に用いたプライマーの一覧

Atp2a : SERCA2、Cacna1c : LTCC、Camk2a : CaMK II 、Ryr2 : RyR、
Slc8a1 : NCX、Rps18 : S18

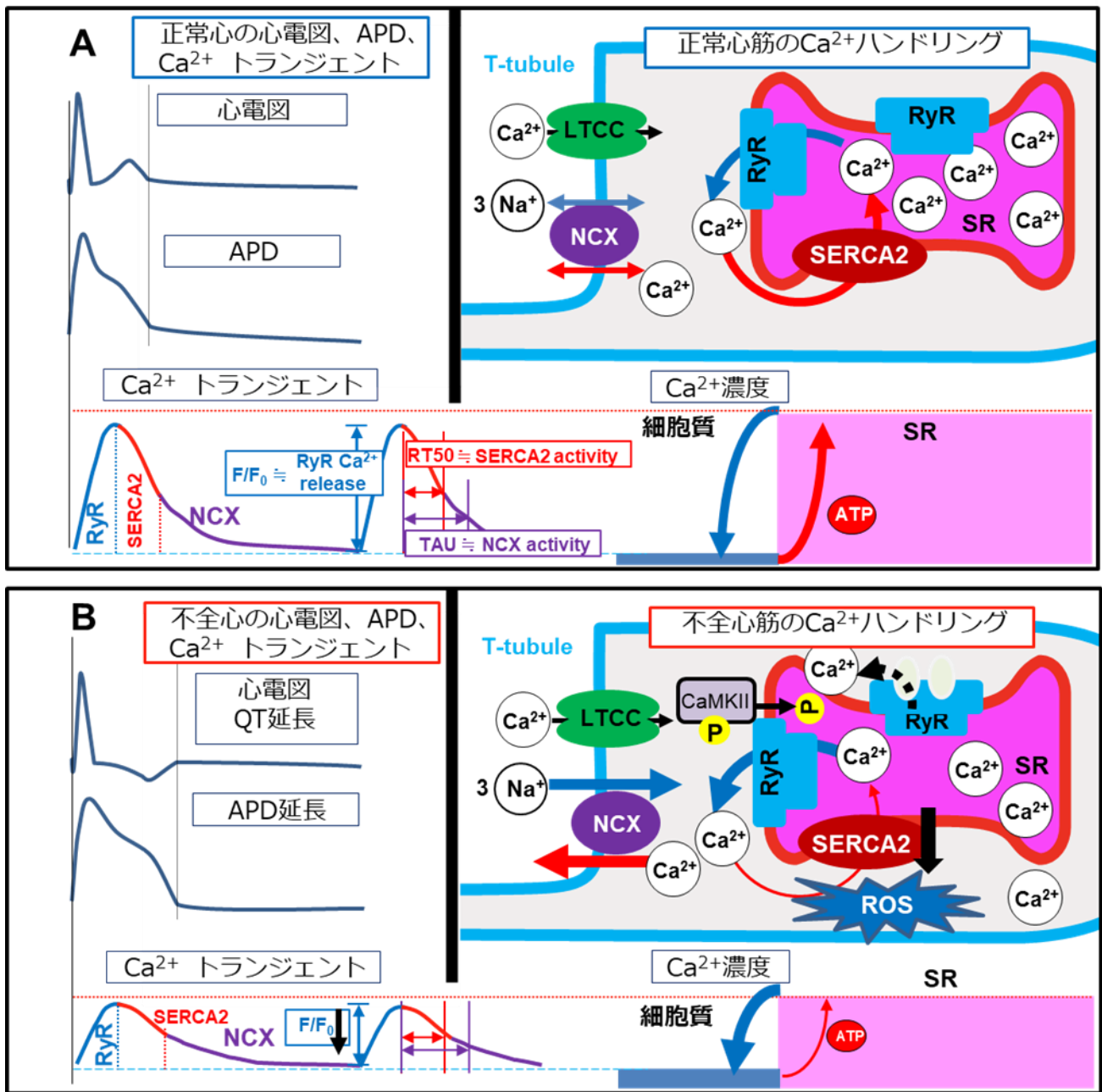
	Vehicle		ANGII	
	Control (n = 8)	SKI (n = 8)	Control (n = 7)	SKI (n = 7)
SWT (mm)	0.73 ± 0.05	0.72 ± 0.04	0.96 ± 0.02 *	1.03 ± 0.03 ***
PWT (mm)	0.85 ± 0.03	0.79 ± 0.03	1.00 ± 0.03 *	1.07 ± 0.05 **
LVED (mm)	2.83 ± 0.12	2.86 ± 0.04	2.36 ± 0.08 *	2.27 ± 0.11 *
LVES (mm)	1.99 ± 0.10	2.03 ± 0.15	1.61 ± 0.13 *	1.53 ± 0.08 **
SV (μl)	38.0 ± 4.7	38.3 ± 1.4	23.6 ± 2.7	20.1 ± 2.9 *
LVEF (%)	62.4 ± 5.2	62.8 ± 1.5	66.7 ± 2.2	66.3 ± 1.9
FS (%)	30.2 ± 1.8	29.3 ± 1.1	31.4 ± 1.5	31.6 ± 1.5
HR (bpm)	481.6 ± 9.1	474.3 ± 8.1	491.3 ± 9.9	500.6 ± 15.3

表 2. 心エコー図による左室収縮能の評価

vehicle 群において、control マウスと SKI マウスで各計測値に有意差を認めなかった。ANG II 投与により両群とも左室壁厚の増大、左室内腔の狭小化を認めた。左室駆出率は各群間で差を認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001 vs control + vehicle 群。

SWT : 中隔壁厚、PWT : 後壁厚、LVED : 左室拡張末期径、LVES : 左室収縮末期径、SV : 1 回拍出量、LVEF : 駆出率、FS : 左室内径短縮率、HR : 心拍数



APD : 活動電位持続時間

CaMK II : Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ

LTCC : L型 Ca²⁺チャネル、NCX : Na⁺-Ca²⁺交換体、ROS : 活性酸素種

RT50 : Time to 50% relaxation、RyR : リアノジン受容体

SR : 筋小胞体、SERCA2 : 筋小胞体 Ca²⁺ ATPase2

図 1. 心筋細胞の電気生理と Ca^{2+} ハンドリング

正常心筋では LTCC からの Ca^{2+} 細胞内流入が契機となり、RyR による筋小胞体からの細胞質内への Ca^{2+} 放出 が心筋収縮を起こす。拡張期に Ca^{2+} は SERCA2 により筋小胞体へ取り込まれ、一部は NCX により細胞質外へ放出される。

Ca^{2+} トランジェントの peak F/F_0 は筋小胞体からの Ca^{2+} 放出、RT50 は SERCA2 機能、Tau は NCX 機能を反映している (A)。

不全心では CaMK II の活性や RyR からの Ca^{2+} リーク、SERCA2 機能の低下により筋小胞体内の Ca^{2+} 濃度が低下し、 Ca^{2+} トランジェントの peak F/F_0 は低下する。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は更なる CaMK II の活性を引き起こし、また NCX の亢進による Na^+ の流入により APD は延長し QT 延長を来す (B)。

略語は略語一覧参照。

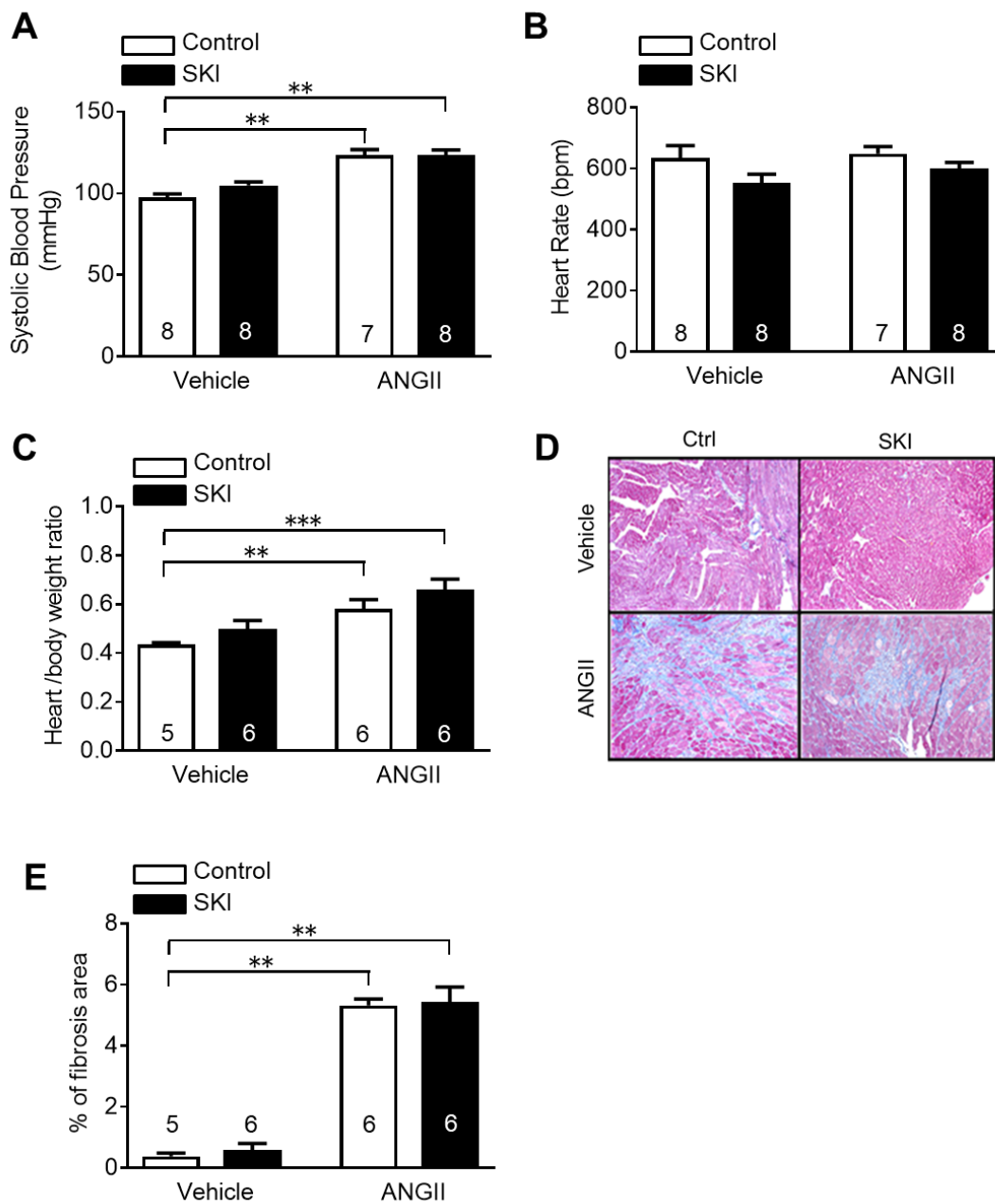


図 2. 7 日間の **ANG II** 負荷後の血圧、脈拍数、心重量および心筋線維化の評価

A : 収縮期血圧値、B : 脈拍数、C : 心重量/体重比
 D : マッソン・トリクローム染色、E : 線維化の程度

ANG II 負荷により control マウス、SKI マウスとも同等に収縮期血圧が上昇し、心重量の増大・心筋の線維化の増大を認めた。データは平均値±標準誤差で示した。
 ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs control + vehicle 群。

各棒グラフの下部の数字は例数 n を表す。以下の図についても同様。

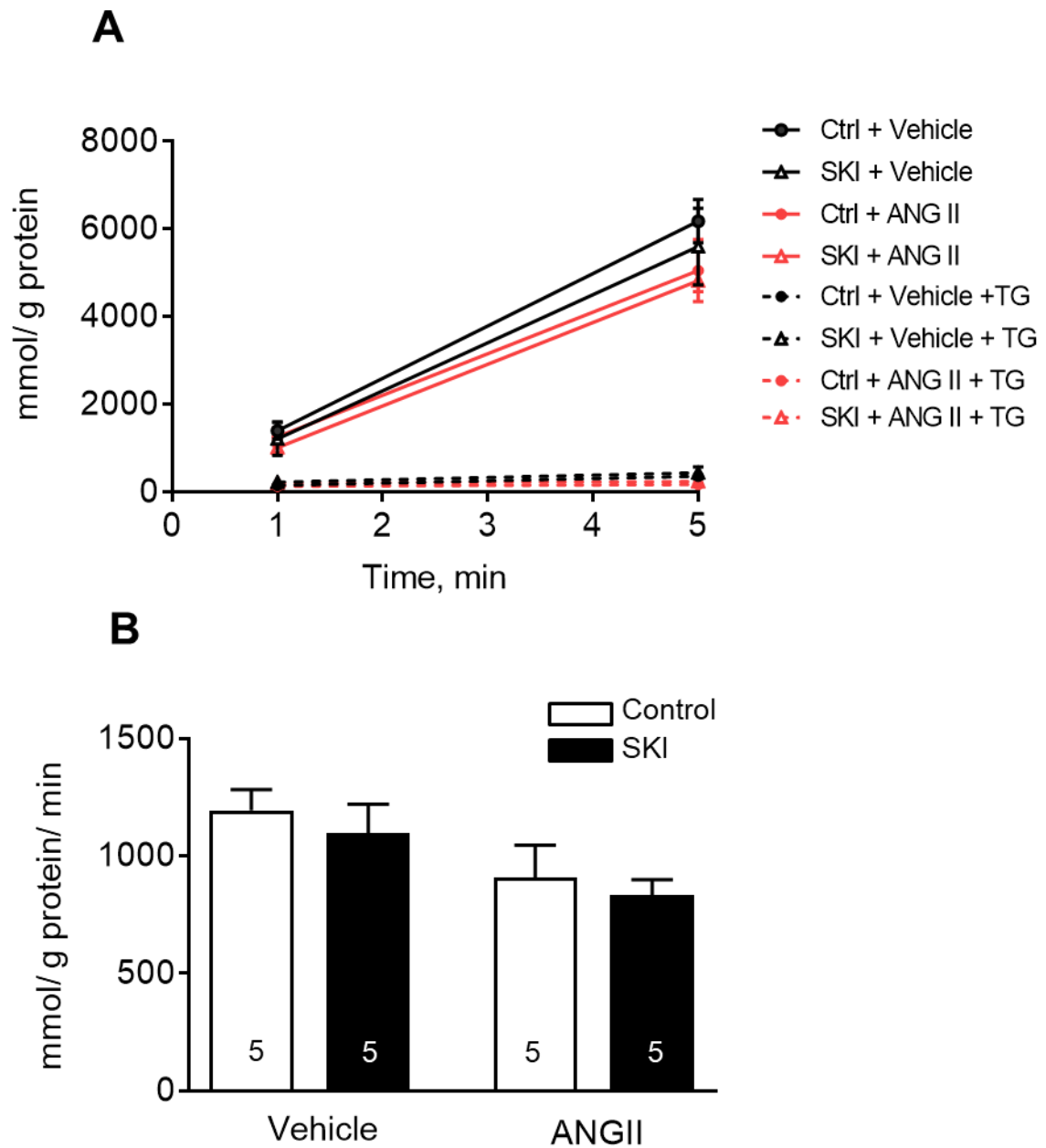


図 3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake の評価

A : $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度の経時的変化、B : 時間あたりの $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake

総 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度は各群とも同等に経時的な増加を認めた。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake は各群間で差を認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。

TG : タプシガルギン

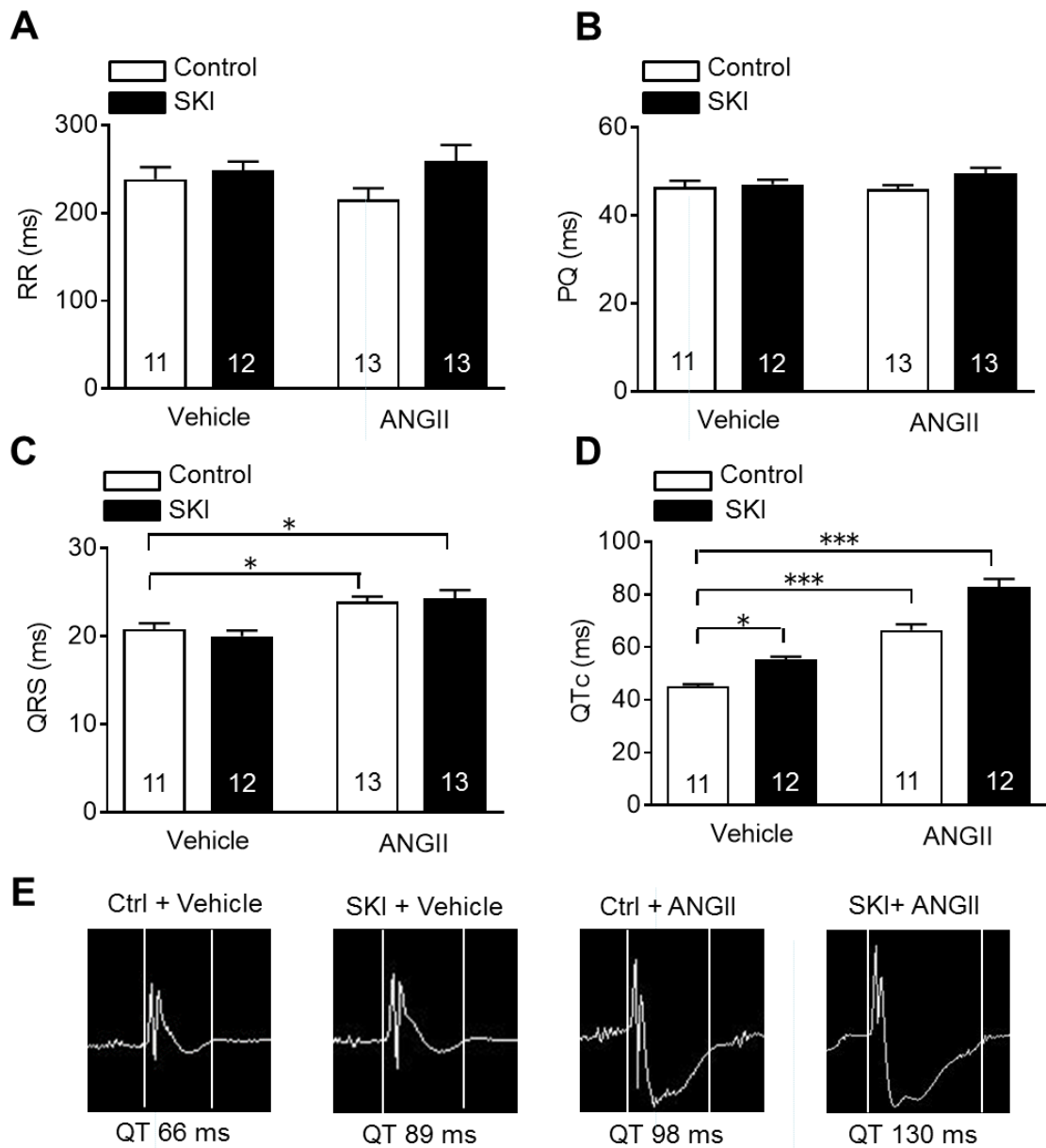


図 4. 体表心電図の評価

A : RR 間隔、B : PQ 間隔、C : QRS 幅、D : QTc
 E : 各群での代表的な心電図と QT 間隔 (下段)

QRS 幅は ANG II 投与群で vehicle 投与群と比較し延長していた。QTc は SKI マウスで control マウスと比較し延長していた。ANG II 投与により control マウス、SKI マウスともに QTc の延長を認めた。データは平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ vs control + vehicle 群

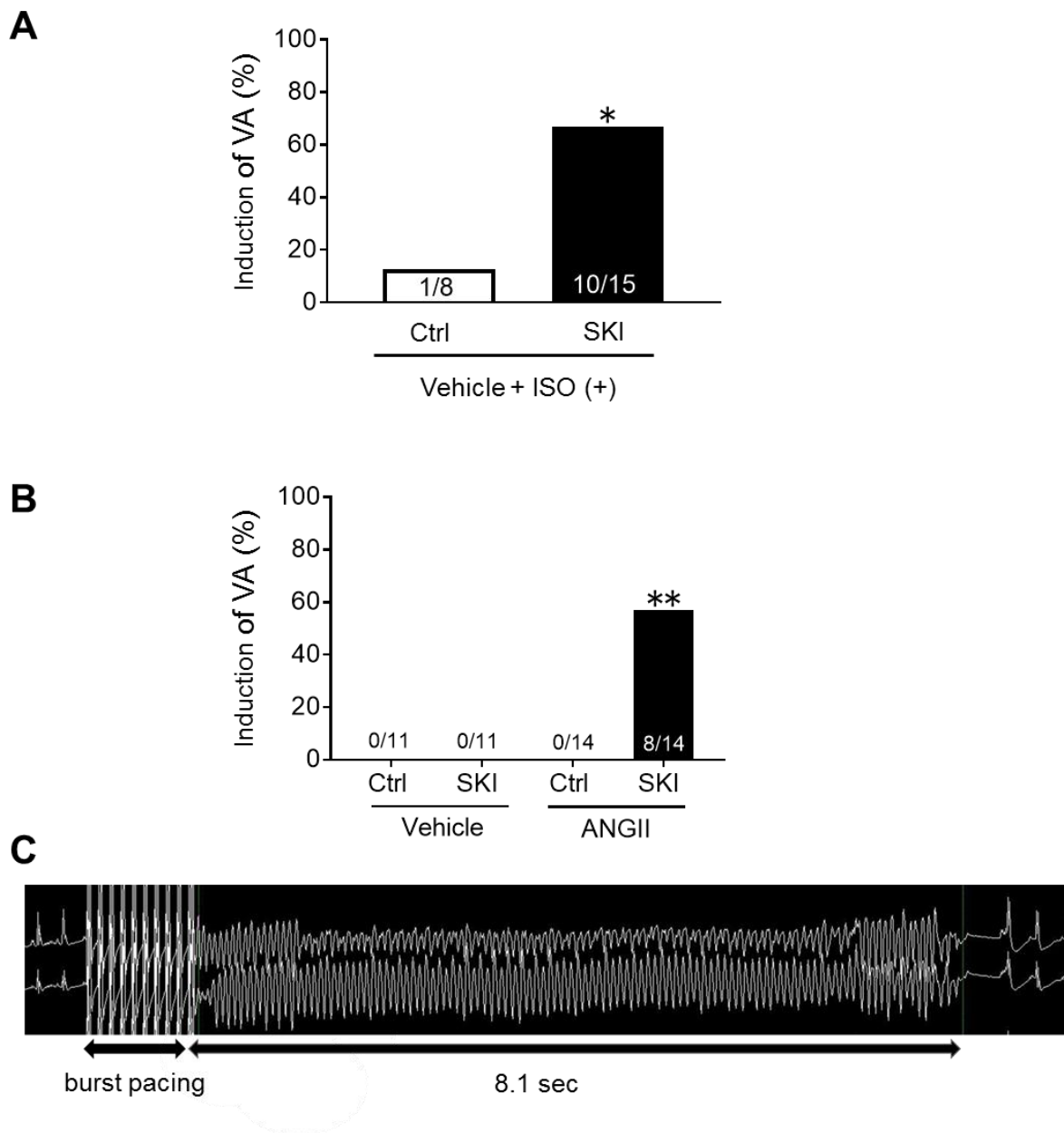


図 5. 心室性不整脈の誘発

A : L-イソプレナリン塩酸塩 (ISO) 投与下の不整脈誘発率

B : 薬剤投与なしの不整脈誘発率

C : SKI + ANG II 群で誘発された心室性不整脈

カテコラミン投与や ANG II 負荷群において、SKI マウスは control マウスと比較し心室性不整脈誘発性が有意に高かった。データは平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs control 群または control + vehicle 群。

VA : 心室性不整脈

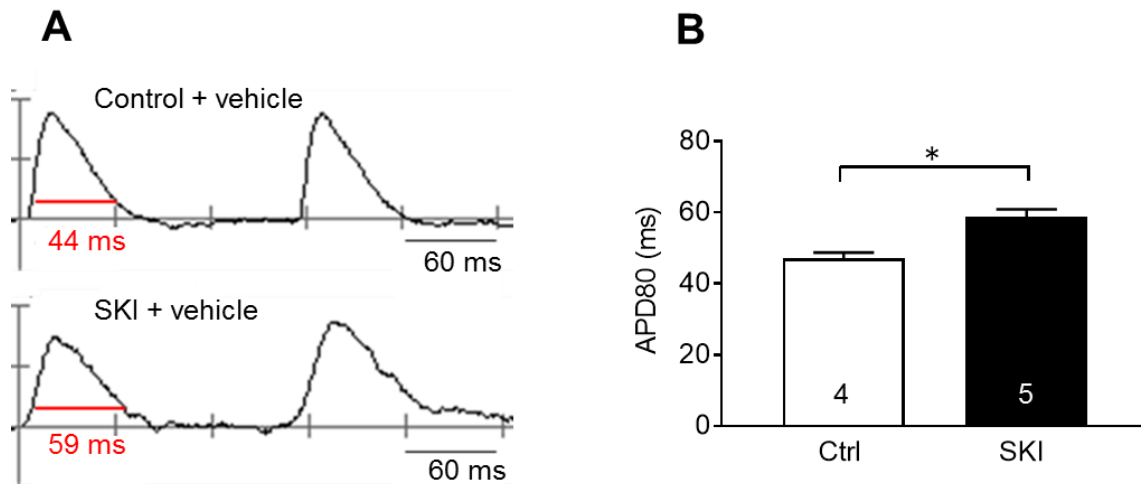


図 6. 活動電位持続時間の評価

A : Vehicle 投与群の control マウス、SKI マウスの心室筋活動電位

B : 各群での活動電位持続時間

Vehicle 投与群において、SKI マウスは control マウスと比較し活動電位持続時間の延長を認めた。データは平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ vs control + vehicle 群。

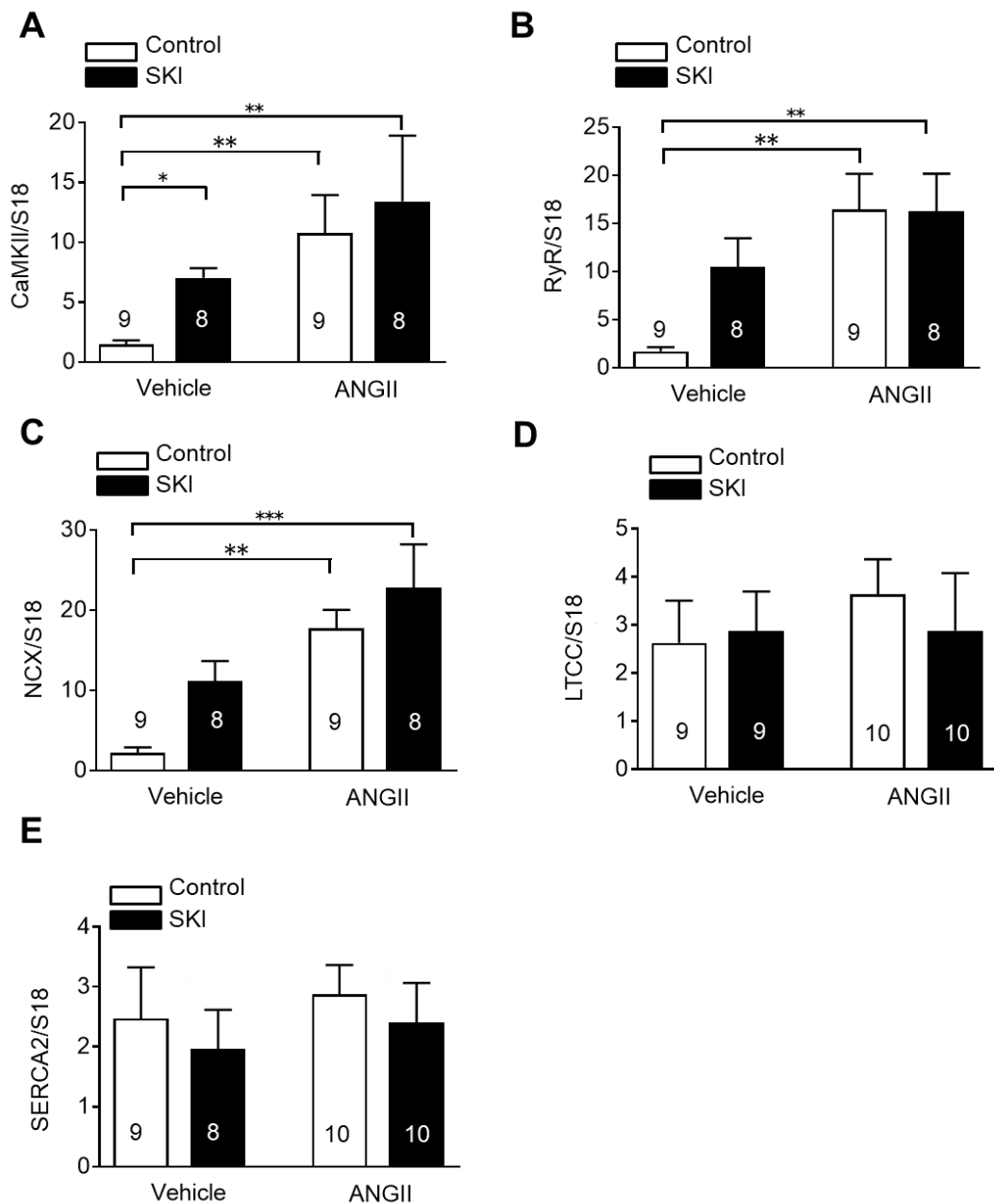


図 7. 心臓の遺伝子発現の検討

A : CaMK II の発現、B : RyR の発現、C : NCX の発現
 D : LTCC 遺伝子の発現、E : SERCA2 の発現

Vehicle 群において、SKI マウスは CaMK II の発現が増加していた。ANGII 投与群では CaMK II、RyR、NCX の発現が増加していた。LTCC、SERCA2 の発現は各群で差を認めなかった。データは平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs control + vehicle 群。

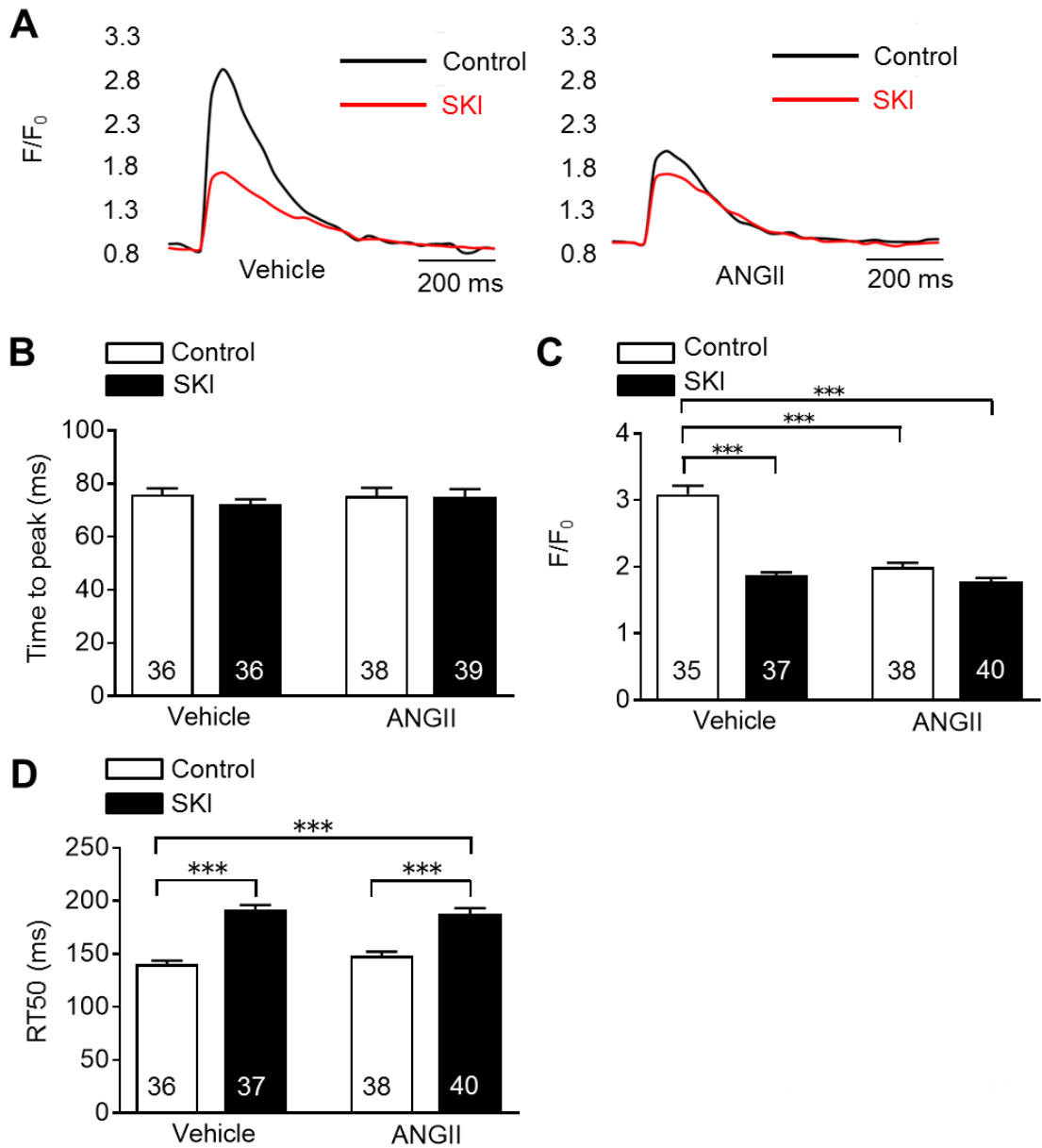


図 8. 心筋細胞の Ca^{2+} トランジェントの評価

A : 各群の Ca^{2+} トランジェント、B : Time to peak (TTP)

C : Ca^{2+} トランジェントの振幅 (F/F_0)、D : Time to 50% relaxation (RT50)

SKI マウスは control マウスと比較し F/F_0 が低下し、RT50 が延長した。

ANG II 投与により control マウスで F/F_0 は低下したが、RT50 は変化しなかった。

データは平均値±標準誤差で示した。

*** $p < 0.001$ vs control + vehicle 群もしくは control + ANG II 群。

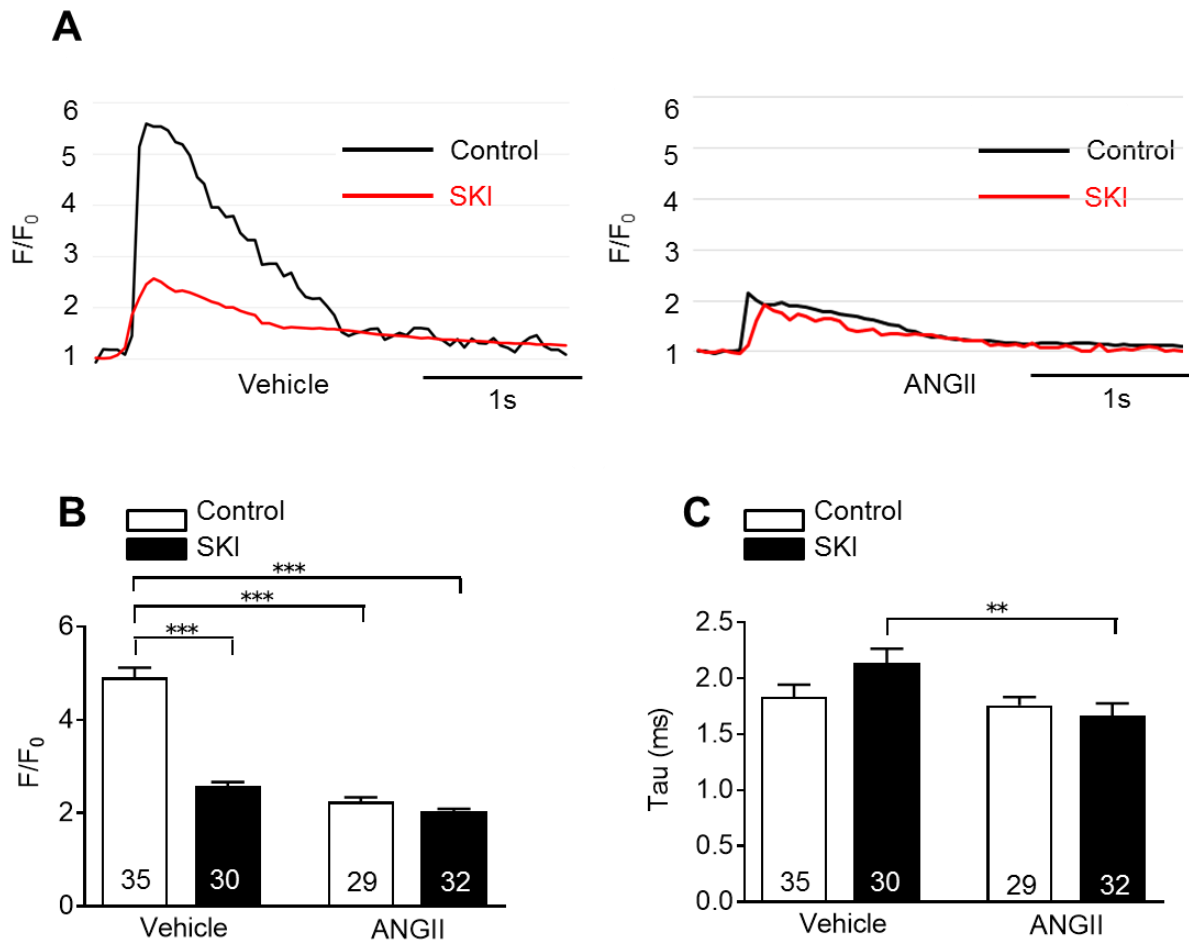


図 9. 筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵の評価

A : カフェイン急速投与で観察各群の Ca^{2+} トランジェント

B : Ca^{2+} トランジェントの振幅 (F/F_0)

C : 細胞質内 Ca^{2+} 減衰時間 (Tau)

Vehicle 群で SKI マウスは control マウスと比較し有意に F/F_0 が低下していた。

ANG II 投与により control マウスで F/F_0 が低下した。細胞質の Ca^{2+} 減衰時間を表す Tau は、SKI マウスにおいて vehicle 群と比較し ANG II 群で短縮した。

データは平均値±標準誤差で示した。

** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ vs control + vehicle 群もしくは SKI + vehicle 群。

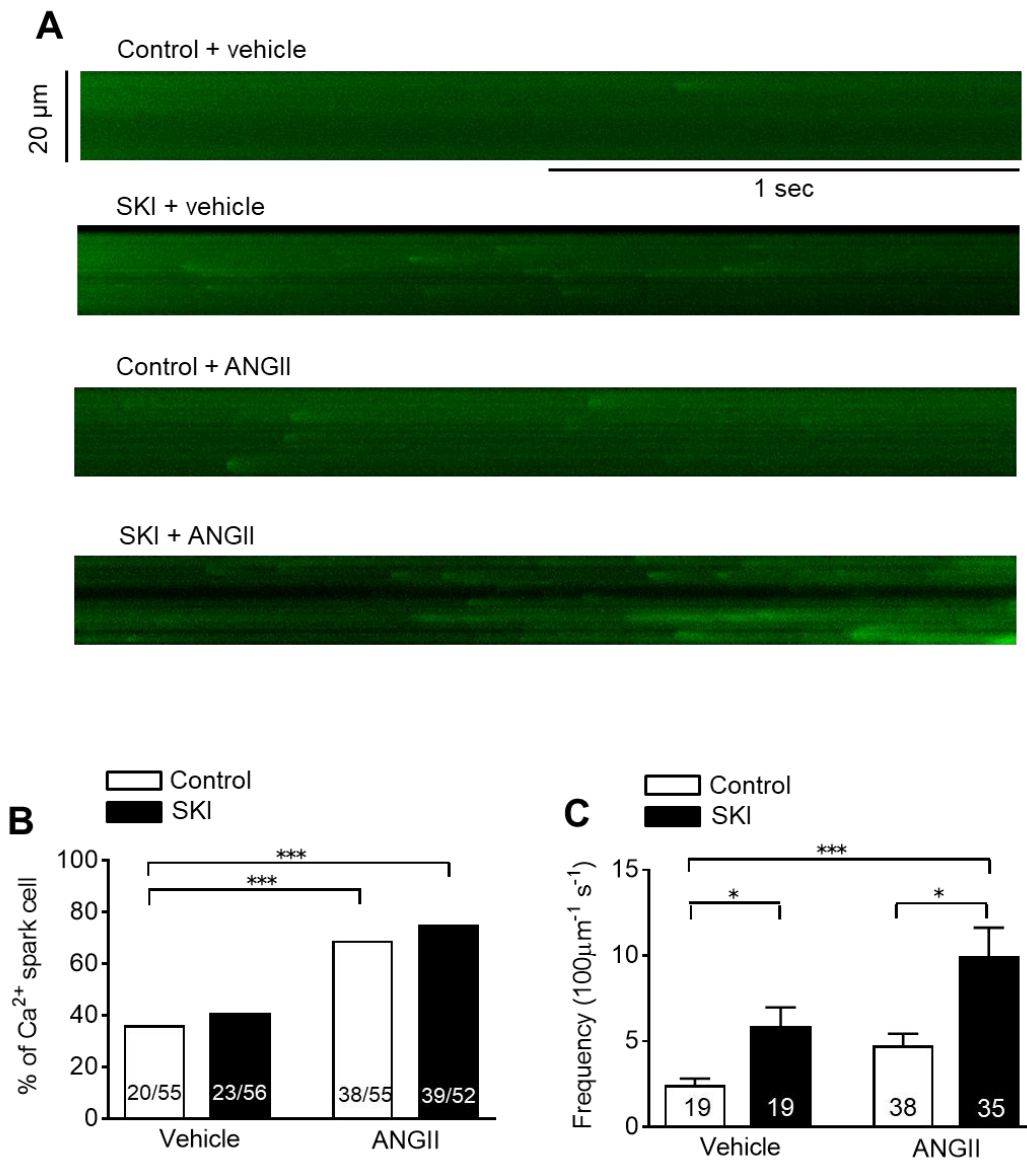


図 10. 心筋細胞の Ca^{2+} スパークの評価

- A : 各群で観察された Ca^{2+} スパーク
 B : Ca^{2+} スパークを認めた細胞の割合 (%)
 C : 時間・面積当たりの Ca^{2+} スパークの頻度

ANG II 群は vehicle 群と比較し Ca^{2+} スパークを認める細胞の割合が増加していた。1 細胞当たりの Ca^{2+} スパークの頻度は、vehicle 群・ANG II 群ともに SKI マウスで control マウスと比較し有意に高かった。データは平均値±標準誤差で示した。
 $*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$ vs control + vehicle 群もしくは control + ANG II 群。

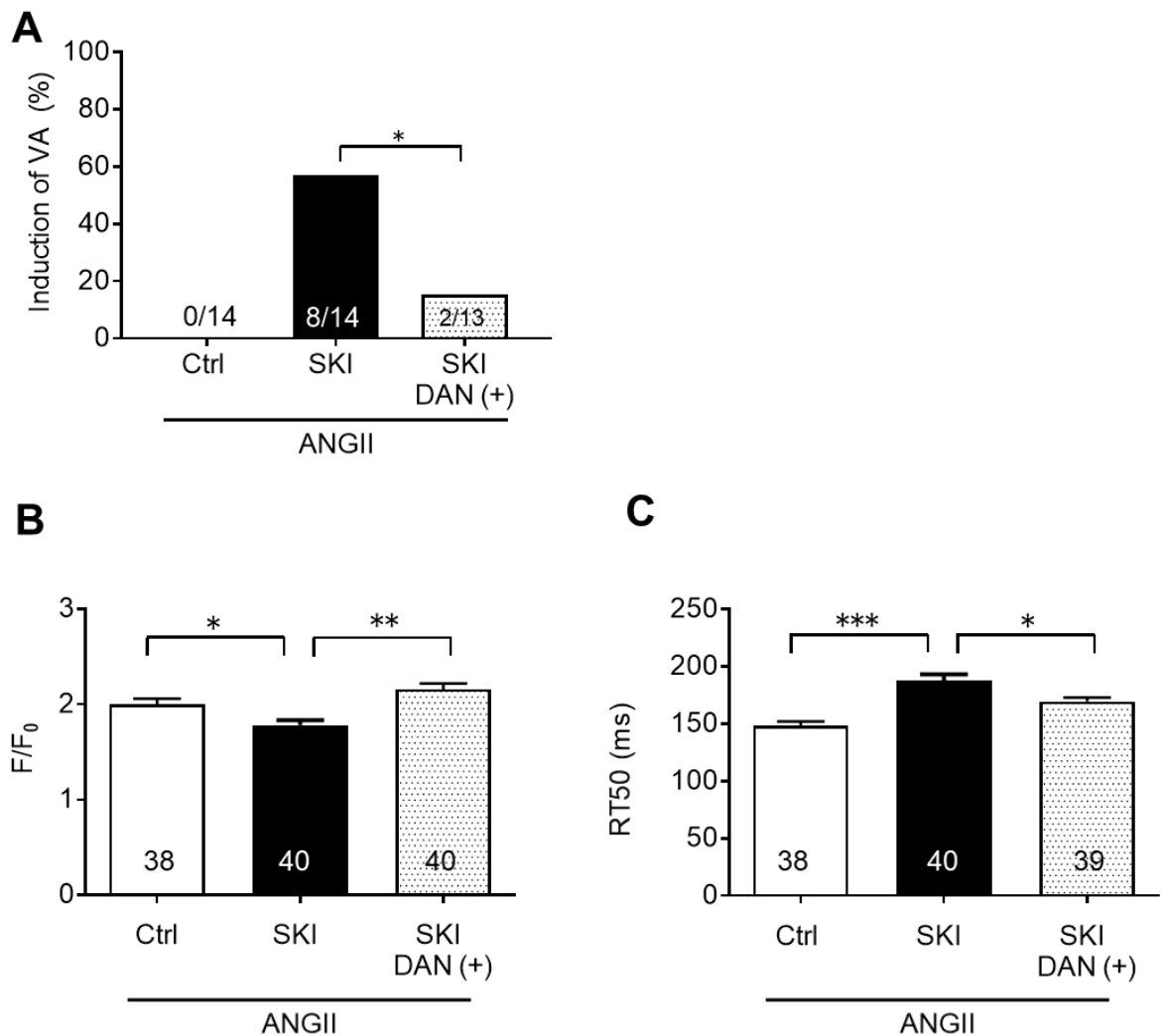


図 11. ダントロレン投与による不整脈誘発性および Ca^{2+} トランジェントへの影響

A : 心室性プログラム刺激での不整脈誘発率

B : Ca^{2+} トランジェントの振幅 (F/F₀)

C : Time to 50% relaxation (RT50)

ダントロレン投与で SKI + ANG II における心室性不整脈誘発率が低下した。
 Ca^{2+} トランジェントでは SKI + ANG II において低下した F/F₀ が改善し、延長した RT50 が短縮した。データは平均値±標準誤差で示した。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001 vs SKI + ANG II 群。

DAN : ダントロレン、VA : 心室性不整脈

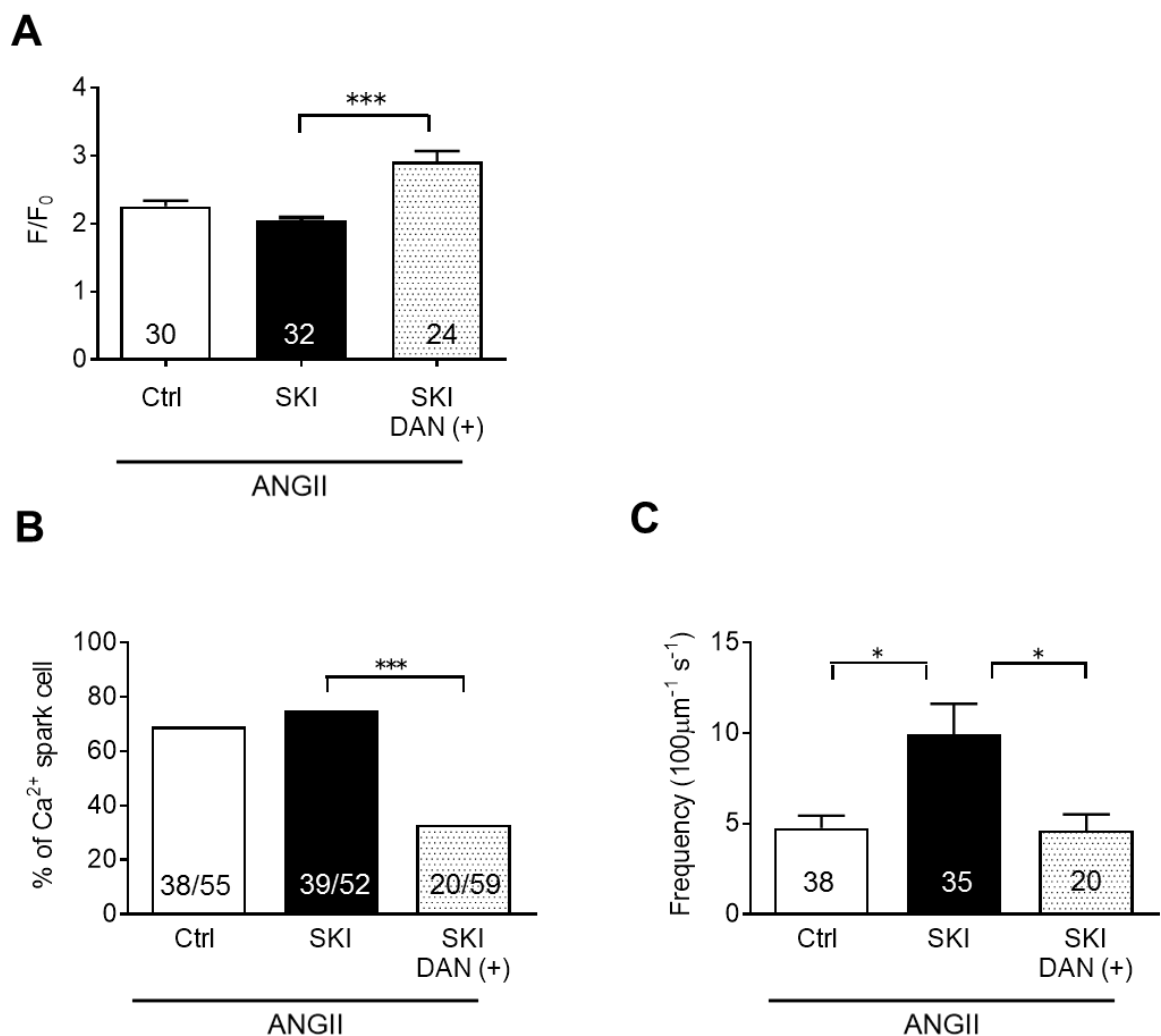


図 12. ダントロレン投与による筋小胞体の Ca²⁺貯蔵および Ca²⁺スパークへの影響

A : カフェイン 10 mM 急速投与で観察された各群の Ca²⁺トランジェントの振幅

B : Ca²⁺スパークを認める細胞の割合 (%)

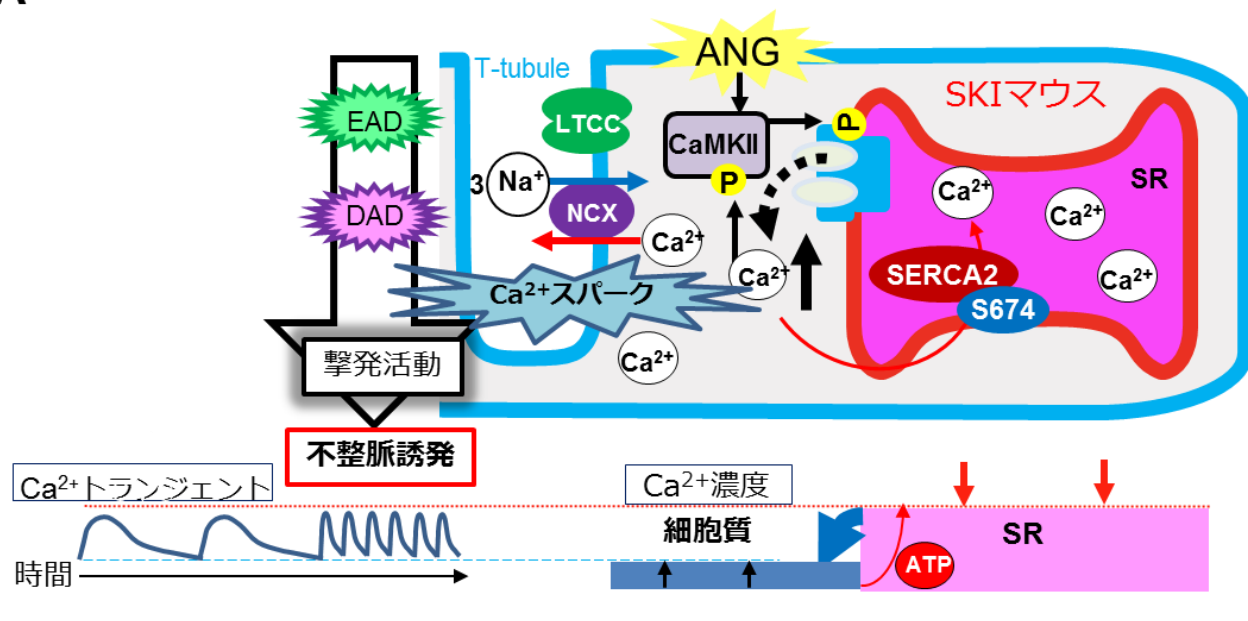
C : 時間・面積当たりの Ca²⁺スパークの頻度

DAN : ダントロレン

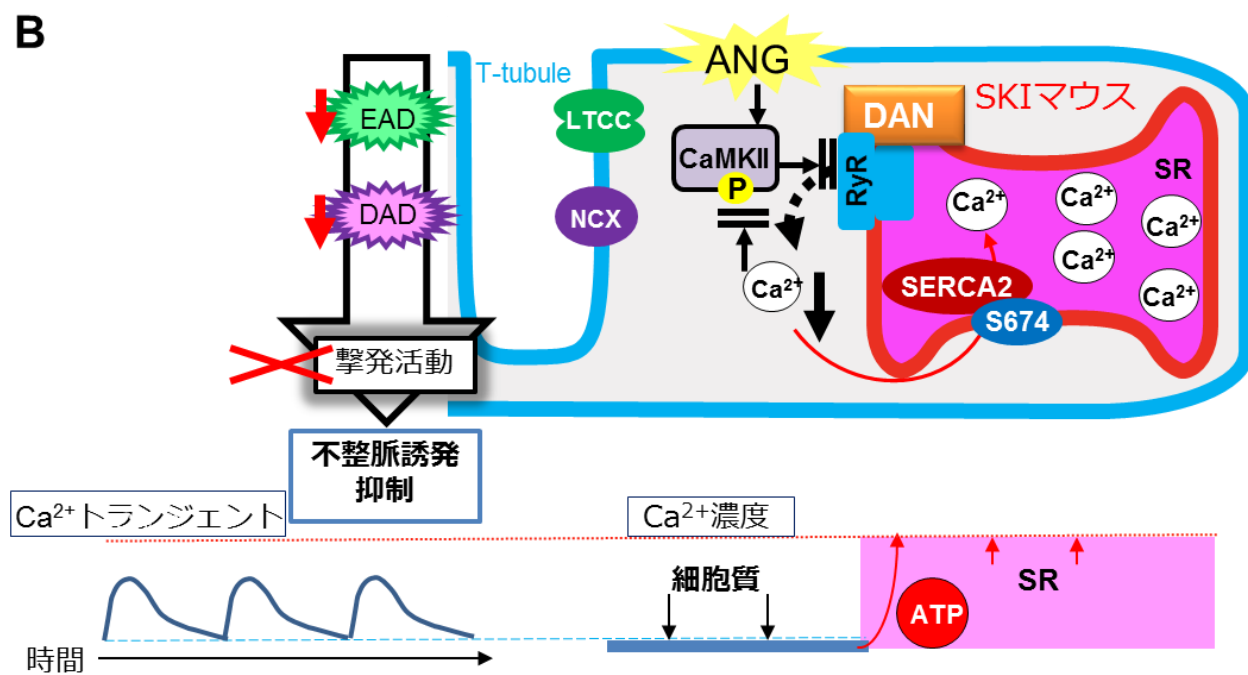
ダントロレン投与により SKI + ANG II で低下した筋小胞体の Ca²⁺貯蔵は増加した。また、Ca²⁺スパークを認める細胞の割合は減少し、1 細胞あたりの Ca²⁺スパークの頻度も低下した。データは平均値±標準誤差で示した。

*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001 vs SKI + ANG II 群。

A



B



ATP : アデノシン 3 リン酸

CaMK II : Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ

DAD : 遅延後脱分極、 DAN : ダントロレン

EAD : 早期後脱分極、 LTCC : L 型 Ca²⁺チャネル、

NCX : Na⁺-Ca²⁺交換体、 RyR : リアノジン受容体、

SR : 筋小胞体、 SERCA2 : 筋小胞体 Ca²⁺ ATPase2

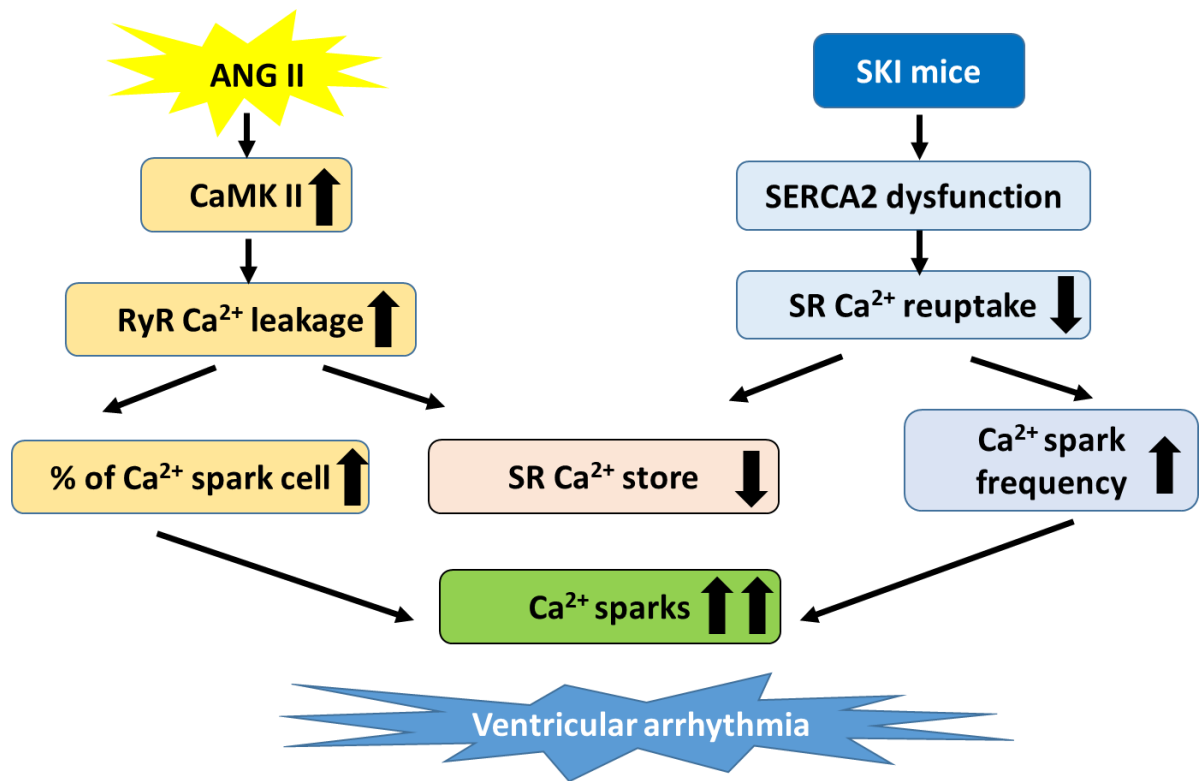
図 13. ダントロレンを用いた RyR 安定化、Ca²⁺のハンドリング回復による不整脈抑制効果

A : ANG II 群の SKI マウスで予想された Ca²⁺ハンドリング

B : ダントロレンの効果

SKI + ANG II 群では、①ANG II 負荷による CaMK II の発現亢進、RyR からの Ca²⁺リークが増大に、②SKI マウスの SERCA2 Cys674 変異による SERCA 機能の低下で小胞体への Ca²⁺取り込みが低下することで、細胞質内 Ca²⁺濃度が上昇し、小胞体の Ca²⁺貯蔵が低下したと考えられた。細胞内 Ca²⁺過負荷は CaMK II の更なる活性化や二次的な NCX の亢進が撃発活動を引き起こし、ANG II 投与群の SKI マウスで心室性不整脈を起こした機序が推察された (A)。

ダントロレンによる RyR からの Ca²⁺リークの抑制により、ANG II 投与群の SKI マウスで上昇していた細胞内 Ca²⁺濃度を低下させ、撃発活動の抑制、心室性不整脈抑制効果を示した可能性が示唆された (B)。



ANG : アンギオテンシン、CaMK II : Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ
 RyR : リアノジン受容体、SR : 筋小胞体、SERCA2 : 筋小胞体 Ca²⁺ ATPase2

図 14. ANG II 群の SKI マウスで予想された心室性不整脈発生の機序

ANG II 群の SKI マウスでは ANG II による筋小胞体の Ca²⁺リークの増大・ Ca²⁺貯蔵の低下に加えて、SERCA2 の機能低下による筋小胞体への Ca²⁺取り込みの低下と Ca²⁺スパークの頻度の増加が重なることで高い不整脈誘発性につながった可能性が示唆された。