

200807024A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ
(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北風 政史

(国立循環器病センター)

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ
(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北風政史

(国立循環器病センター)

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 1
北風 政史

II. 分担研究報告

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 5
高島 成二

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 9
南野 哲男

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 12
朝倉 正紀

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 16
金 智隆

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 18
小室 一成

- 大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)
を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発…………… 20
筒井 裕之

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発.....	22
室原 豊明	
大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発.....	24
浅沼 博司	
大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発.....	26
古川秀比古	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts.....	43
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2009,46,452-462	
Identification of a novel substrate for TNF α -induced kinase NUA2.....	54
Biochemical and Biophysical Research Communications 2008,365,541-547	
Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction(J-WIND):two randomised trials	61
Lancet 2007,370,1483-1493	
Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary Syndrome.....	72
Circulation 2007,116,1226-1233	
A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart...	80
The Journal of Clinical Investigation 2007,117,2812-2824	
IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signaling required for cardiogenesis.....	93
Nature 2008,454,345-349	
Overexpression of Mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice.....	99
Circulation 2006,113,1779-1786	

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告書

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ

(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

研究代表者 北風政史 国立循環器病センター 部長

研究要旨

科学研究費補助金事業1年目の本年度は、心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)の心筋における生化学的役割を検討する。この検討をもとに cardiacMLCK そのものあるいはその関連蛋白を標的とした心不全治療の創薬開発を目指す。それとともに、cardiacMLCK の心機能調節因子としての作用をより詳細に明らかにするために in vivo を含めた心不全モデル動物にてその動態を検討する。さらに cardiacMLCK の心機能に及ぼす影響、心不全発症に関わる要因を解明し創薬の標的を探索する動物モデルを確立するために cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を開始する。またヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異や SNP の検索を行い心不全の病態との関連を検索・診断の明確化を計る。

研究分担者

高島成二

大阪大学大学院医学系研究科
准教授

南野哲男

大阪大学大学院医学系研究科
助教

朝倉正紀

国立循環器病センター
医長

金 智隆

国立循環器病センター
客員研究員

小室一成

千葉大学大学院医学研究院
教授

筒井裕之

北海道大学大学院医学研究科
教授

室原豊明

名古屋大学大学院医学系研究科
教授

浅沼博司

近畿大学医学部附属病院
講師

古川秀比古

第一三共株式会社創薬基盤研究所
所長

A. 研究目的

初年度は cardiacMLCK の心筋収縮における役割を明らかにするために cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の生化学的解析を詳細に行った。また in vivo における cardiacMLCK の心機能に及ぼす影響、さらに心不全病態との関わりを明らかにする目的のため、心不全モデル動物における cardiacMLCK の動態を解析し、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を開始した。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索についてもこれを行った。これらの実験を通して、心不全のメカニズムの解明および新規の診断法・治療法の確立をめざす。

B. 研究方法

1. cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の心筋収縮における役割の生化学的解析

我々は cardiacMLCK がそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖のリン酸化を介して心筋細胞およびゼブラフィッシュにおける心筋サルコメア構造形成に関わることを明らかにしている。またこれまでの平滑筋、骨格筋線維を用いた検討では MLCK によるミオシン軽鎖のリン酸化は筋収縮の発生や筋収縮時における Ca 感受性を変化させると報告されている。ところが、ミオシン分子の構造解析の結果からはミオシン-アクチン連関に関わるミオシン頭部のアクチン結合部位とミオシン軽鎖の結合部位であるミオシン頭部の間には物理的距離が存在し、ミオシン軽鎖のリン酸化が直接ミオシン頭部のアクチン結合部位に作用してミオシン-アクチン連関における機能を調節するとは考えにくい。このような背景のもと、我々はリン酸化ミオシン軽鎖とミオシン頭部のアクチン結合部の間に介在し、心筋収縮機能を調節するタンパク分子が存在するとの仮定をたて、その介在タンパクを同定するために以下のスクリーニングを行うこととした。これらの分子の同定は新たな創薬標的となると期待される。

- ①ミオシン軽鎖のリン酸化を受けるアミノ酸残基である 15 番目のセリンをアラニンに置換した非リン酸化ミオシン軽鎖もしくはアスパラギン酸に置換したリン酸化模倣ミオシン軽鎖の GST 融合タンパクを作製し、放射性同位元素 ^{35}S にて標識した培養心筋細胞のタンパク抽出液の中からそれら GST 融合タンパクと共沈する新規タンパクの同定を行った。
- ②放射性同位元素 ^{35}S にて標識した培養心筋細胞をミオシン軽鎖リン酸化を引き起こすカテコラミンにて刺激し、そのタンパク抽出液よりミオシン軽

鎖抗体とともに共沈するタンパク質の同定を行った。

2. cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

我々は個体における cardiacMLCK の機能を明らかにするためにゼブラフィッシュをモデル動物として使用していたが、ゼブラフィッシュの実験系では観血的血行動態測定を含めた詳細な心機能の評価や心不全病態類似モデルの作成が困難である。そのため哺乳動物における cardiacMLCK の機能を解析するモデルとして cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスを作製することとした。cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製に関しては以前より行っていたが、cardiacMLCK 遺伝子にはいくつかのスプライシングバリエーションが存在すること、遺伝子のゲノム領域の一部に相同組み換えを阻害すると考えられる繰り返し配列が存在することなどの理由から ES 細胞における相同組み換え体を得ることに難渋していた。そのため今回我々は新たな計画のもとで cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を行うこととした。

3. cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

心筋症症例において様々なサルコメア関連タンパクの変異が報告されている。cardiacMLCK の特異的なリン酸化基質であるミオシン軽鎖もサルコメアの構成タンパクの一つであり、これまで家族性心筋症症例における変異が報告されている。そのため、心筋症を初めとした心疾患症例において cardiacMLCK の変異もしくは SNP の存在する可能性が考えられている。我々は各分担研究者の施設を含め、これまで原因が明らかにされていない心筋症症例を中心に、倫理委員会の承認および患者の承諾を得た上で、その cardiacMLCK および関連分子の変異もしくは SNP の検索を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤や外科的処置によっては、その投与や処置によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与や外科的処置そのものにより、マウスに身体的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合はたとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減を図る。もし復元不可能な重大な障害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮する。新たな分子の機能解析には様々な手法が考えられるが、cardiacMLCK に関しては、生化学的実験手法、培

養細胞を用いた実験手法、小型魚類等の下等生物を用いた実験手法と全ての段階を経てきており、今後の更なる研究の発展には遺伝子改変マウスを用いた実験が必須であると考えられる。遺伝子改変マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスを用いて新たな分子の機能を詳細に解析することは心不全病態の更なる理解やそこから生まれる新たな診断・治療ツールの開発など大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこない今後樹立されるであろう遺伝子改変マウスの詳細な表現型解析を進める予定である。また前述したように本研究課題は所定の段階を経ており、今後は遺伝子改変マウスを用いてその機能解析を行う以外に有用な実験手法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

疫学研究における倫理面への配慮においては、以下の点に留意して十分な注意を払う。

- 1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。
- 2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置：試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

C. 研究結果

1、cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の心筋収縮における役割の生化学的解析

- ①ミオシン軽鎖のGST融合タンパクを用い、³⁵Sにて放射性標識した培養心筋細胞タンパク抽出液からのスクリーニングではミオシン軽鎖リン酸化模倣変異体に特異的に共沈するタンパクをいくつか得ることができた。ただし、非特異的なタンパクバンドも数多く認められるため、現在は細胞の培養条件やタンパクの可溶性条件などの検討を行っている。
- ②放射性標識したラット培養心筋細胞からミオシン軽鎖抗体と共沈するタンパクのスクリーニングの結果、現時点ではカテコラミン刺激によるミオシン

軽鎖リン酸化の誘導とともに特異的に認められるタンパクは同定されていない。現在は細胞の培養条件、細胞の刺激薬剤および刺激条件等を検討している。今回①の結果よりリン酸化ミオシン軽鎖とミオシン頭部のアクチン結合部位間に介在する分子の存在が示唆された。今後本タンパクを同定し、ミオシン-アクチン連関における機能の解析に結びつけ新たな創薬標的の検索を行う予定である。cardiacMLCKそのものに対する阻害剤、促進剤のスクリーニング系の確立も行った。

2、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

これまでの経験から cardiacMLCK 遺伝子周囲のゲノム領域が相同組み換えの起こりにくい部位であると考え、まずターゲティングベクター作製においてLoxP システムを導入したコンディショナルノックダウンベクターを元に、選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子を挟んだ長腕、短腕を一般的なターゲティングベクターのそれよりも約 2 倍程度長くとした構造のベクターを作製した。また遺伝子の相同組み換えを阻害する可能性のある周囲のゲノムイントロン部位のくり返し配列に着目し、それら繰り返し配列を出来る限り含まない部分に対してベクターの設計を行った。それにより ES 細胞の相同組み替え体の選択効率を上げることができ、結果としてこれまで 1000 クローン以上の ES 細胞のスクリーニングにても得られなかった相同組み換え体を高率に得ることに成功した(約 200 クローンスクリーニング中、6 陽性クローンを同定した)。その後のキメラマウス作製にても良好なキメラ率の個体を得ることができ、現時点では F1 マウス作製の段階に到達しており、本研究は予定どおりに進行している。

3、cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

我々の施設および各分担研究者の施設において原因の特定されていない心筋症を中心とした心疾患症例が認められたときには随時それらの症例の cardiacMLCK もしくはその関連分子の変異もしくは SNP 検索を行っている。現時点では明らかな変異は同定されなかったが複数の SNP は同定されている。さらに症例数を増加させ変異検索を行う予定である。

D. 考察

2007年になり、我々により始めて同定された cardiacMLCK は特許関係も早期から押さえているうえ、心臓における特異性、病態におけるかかわりなどから考慮してもわが国独自の創薬標的として先駆性のある分子である。本年度の研究により、cardiacMLCK の

心機能に及ぼす影響および心不全病態時の cardiacMLCK の役割などの研究に対する下地を組み立てることができた。上記研究以外にも特許に抵触するため公表できない研究成果が得られており同時に進める予定である。

E. 結論

リン酸化ミオシン軽鎖とミオシン-アクチン連関の作用点であるミオシン頭部の間に介在する分子の同定により、cardiacMLCK によるミオシン軽鎖リン酸化の心機能に対する役割の解析がさらに進むものと考えられる。また cardiacMLCK そのものあるいはその作用に関係する分子をあらたな創薬対象として薬物スクリーニング系の確立を行った。また cardiacMLCK 遺伝子改変マウスの樹立にほぼ成功し、今後 in vivo における cardiacMLCK の心機能における役割を検討して心不全のモデル動物として使用する。さらにはこれらを利用して心不全病態における機能解析が進むものと期待される。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK および関連分子の変異・SNP 検索については今後も検討を進めていく。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asai, M., Tsukamoto, O., Minamino, T., Asanuma, H., (5人略) Asakura, M., (1人略) Kitakaze, M. (2008). PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 46, 452-462.
2. Fu, H.Y., Minamino, T., (6人略) Takashima, S. (1人略) Kitakaze, M. (2008). Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res* 79, 600-610.
3. Fujita, M., Asakura, M., (4人略) Asanuma, H., (3人略) Kitakaze, M. (2008). Activation of ecto-5'-nucleotidase in the blood and hearts of patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 14, 426-430.
4. Liao, Y., Zhao, H., (2人略) Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Minamino, T., Takashima, S., Kitakaze, M. (2008). Atorvastatin slows the progression of cardiac remodeling in mice with pressure overload and inhibits epidermal growth factor receptor activation. *Hypertens Res* 31, 335-344.

2. 学会発表

1. 瀬口 理、高島 成二、北風 政史
第12回 Molecular Cardiovascular Conference
(平成20年9月5-7日、北海道)

一般演題

"A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart"

2. Asano, Y., Takashima, S., Liao, Y.L., Kitakaze, M., American Heart Association, Scientific Session 2008 (Nov. 9, 2008, New Orleans, USA)
Young Investigator Award Lecture
"Paradigm Shift to Epigenetic Memory for the Pathological Understanding of Chronic Heart Failure"

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

特許出願中1件
特許出願準備中1件

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ

(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

研究分担者 高島 成二 大阪大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

本年度は、研究代表者と共同で、心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)の心筋における生化学的役割を検討する。この検討をもとに cardiacMLCK そのものあるいはその関連蛋白を標的とした心不全治療の創薬開発を目指す。それとともに、cardiacMLCK の心機能調節因子としての作用をより詳細に明らかにするために in vivo を含めた心不全モデル動物にてその動態を検討する。さらに cardiacMLCK の心機能に及ぼす影響、心不全発症に関わる要因を解明し創薬の標的を探索する動物モデルを確立するために cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を開始する。またヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異や SNP の検索を行い心不全の病態との関連を検索・診断の明確化を計る。

A. 研究目的

初年度は研究代表者と協力して cardiacMLCK の心筋収縮における役割を明らかにするために cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の生化学的解析を詳細に行った。また in vivo における cardiacMLCK の心機能に及ぼす影響、さらに心不全病態との関わりを明らかにする目的のため、心不全モデル動物における cardiacMLCK の動態を解析し、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を開始した。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索についてもこれを行った。これらの実験を通して、心不全のメカニズムの解明および新規の診断法・治療法の確立をめざすことを目的とした。

B. 研究方法

1、cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の心筋収縮における役割の生化学的解析

研究代表者と共同して cardiacMLCK がそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖のリン酸化を介して心筋細胞およびゼブラフィッシュにおける心筋サルコメア構造形成に関わることを明らかにしている。またこれまでの平滑筋、骨格筋線維を用いた検討で

は MLCKによるミオシン軽鎖のリン酸化は筋収縮の発生や筋収縮時における Ca 感受性を変化させると報告されている。ところが、ミオシン分子の構造解析の結果からはミオシン-アクチン連関に関わるミオシン頭部のアクチン結合部位とミオシン軽鎖の結合部位であるミオシン頭部の間には物理的距離が存在し、ミオシン軽鎖のリン酸化が直接ミオシン頭部のアクチン結合部位に作用してミオシン-アクチン連関における機能を調節するとは考えにくい。このような背景のもと、我々はリン酸化ミオシン軽鎖とミオシン頭部のアクチン結合部の間に介在し、心筋収縮機能を調節するタンパク分子が存在するとの仮定をたて、その介在タンパクを同定するために以下のスクリーニングを行うこととした。これらの分子の同定は新たな創薬標的となると期待される。

①ミオシン軽鎖のリン酸化を受けるアミノ酸残基である 15 番目のセリンをアラニンに置換した非リン酸化ミオシン軽鎖もしくはアスパラギン酸に置換したリン酸化模倣ミオシン軽鎖の GST 融合タンパクを作製し、放射性同位元素 ^{35}S にて標識した培養心筋細胞のタンパク抽出液の中からそれら GST 融合タンパクと共沈する新規タンパクの同定を行った。

②放射性同位元素 ^{35}S にて標識した培養心筋細胞

をミオシン軽鎖リン酸化を引き起こすカテコラミンにて刺激し、そのタンパク抽出液よりミオシン軽鎖抗体とともに共沈するタンパク質の同定を行った抽出液の中からそれらGST融合タンパクと共沈する新規タンパクの同定を行った。

2. cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

我々は個体における cardiacMLCK の機能を明らかにするためにゼブラフィッシュをモデル動物として使用していたが、ゼブラフィッシュの実験系では観血的血行動態測定を含めた詳細な心機能の評価や心不全病態類似モデルの作成が困難である。そのため哺乳動物における cardiacMLCK の機能を解析するモデルとして cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスを作製することとした。cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製に関しては以前より行っていたが、cardiacMLCK 遺伝子にはいくつかのスプライシングバリエーションが存在すること、遺伝子のゲノム領域の一部に相同組み換えを阻害すると考えられる繰り返し配列が存在することなどの理由からES細胞における相同組み換え体を得ることに難渋していた。そのため今回我々は新たな計画のもとで cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を行うこととした。研究分担者はおもにベクターデザイン作成、ES細胞のスクリーニングを担当した。

3. cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

心筋症症例において様々なサルコメア関連タンパクの変異が報告されている。cardiacMLCK の特異的なリン酸化基質であるミオシン軽鎖もサルコメアの構成タンパクの一つであり、これまで家族性心筋症症例における変異が報告されている。そのため、心筋症を初めとした心疾患症例において cardiacMLCK の変異もしくは SNP の存在する可能性が考えられている。我々は各分担研究者の施設を含め、これまで原因が明らかにされていない心筋症症例を中心に、倫理委員会の承認および患者の承諾を得た上で、その cardiacMLCK および関連分子の変異もしくは SNP の検索を行うこととした。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤や外科的処置によっては、その投与や処置によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与や外科的処置そのものにより、マウスに身体的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合は、たとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減を図る。もし復元不可能な重大な障

害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮する。新たな分子の機能解析には様々な手法が考えられるが、cardiacMLCK に関しては、生化学的実験手法、培養細胞を用いた実験手法、小型魚類等の下等生物を用いた実験手法と全ての段階を経てきており、今後の更なる研究の発展には遺伝子改変マウスを用いた実験が必須であると考えられる。遺伝子改変マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスを用いて新たな分子の機能を詳細に解析することは心不全病態の更なる理解やそこから生まれる新たな診断・治療ツールの開発など大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこない今後樹立されるであろう遺伝子改変マウスの詳細な表現型解析を進める予定である。また前述したように本研究課題は所定の段階を経ており、今後は遺伝子改変マウスを用いてその機能解析を行う以外に有用な実験手法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

疫学研究における倫理面への配慮においては、以下の点に留意して十分な注意を払う。

- 1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護：診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。
- 2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置：試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

C. 研究結果

1. cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の心筋収縮における役割の生化学的解析

- ① ミオシン軽鎖の GST 融合タンパクを用い、³⁵Sにて放射性標識した培養心筋細胞タンパク抽出液からのスクリーニングではミオシン軽鎖リン酸化模倣変異体に特異的に共沈するタンパクをいくつか得ることができた。ただし、非特異的なタンパクバンドも数多く認められるため、現在は細胞の培

養条件やタンパクの可溶化条件などの検討を行っている。

- ②放射性標識したラット培養心筋細胞からミオシン軽鎖抗体と共沈するタンパクのスクリーニングの結果、現時点ではカテコラミン刺激によるミオシン軽鎖リン酸化の誘導とともに特異的に認められるタンパクは同定されていない。現在は細胞の培養条件、細胞の刺激薬剤および刺激条件等を検討している。今回①の結果よりリン酸化ミオシン軽鎖とミオシン頭部のアクチン結合部位間に介在する分子の存在が示唆された。今後本タンパクを同定し、ミオシン-アクチン連関における機能の解析に結びつけ新たな創薬標的の検索を行う予定である。cardiacMLCKそのものに対する阻害剤、促進剤のスクリーニング系の確立も研究代表者と共同で行った。

2. cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

これまでの経験から cardiacMLCK 遺伝子周囲のゲノム領域が相同組み換えの起こりにくい部位であると考え、まずターゲティングベクター作製において LoxP システムを導入したコンディショナルノックダウンベクターを元に、選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子を挟んだ長腕、短腕を一般的なターゲティングベクターのそれよりも約 2 倍程度長くとった構造のベクターを作製した。また遺伝子の相同組み換えを阻害する可能性のある周囲のゲノムイントロン部位のくり返し配列に着目し、それら繰返し配列を出来る限り含まない部分に対してベクターの設計を行った。それにより ES 細胞の相同組み替え体の選択効率を上げることができ、結果としてこれまで 1000 クローン以上の ES 細胞のスクリーニングにでも得られなかった相同組み換え体を高率に得ることに成功した(約 200 クローンスクリーニング中、6 陽性クローンを同定した)。その後のキメラマウス作製にても良好なキメラ率の個体を得ることができ、現時点では F1 マウス作製の段階に到達しており、本研究は予定どおりに進行している。研究分担者は主に ES のスクリーニングに関与した。

3. cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

研究分担者の施設においては数例の重症心不全患者における cardiacMLCK の変異検索を行ったが commonSNP 以外の変異は同定できなかった。

D. 考察

2007 年になり、我々により始めて同定された cardiacMLCK は特許関係も早期から押さえているうえ、心臓における特異性、病態におけるかわりなどから

考慮してもわが国独自の創薬標的として先駆性のある分子である。本年度の研究により、cardiacMLCK の心機能に及ぼす影響および心不全病態時の cardiacMLCK の役割などの研究に対する下地を組み立てることができた。上記研究以外にも特許に抵触するため公表できない研究成果が得られており研究代表者と共にこれらの研究も同時に進める予定である。

E. 結論

リン酸化ミオシン軽鎖とミオシン-アクチン連関の作用点であるミオシン頭部の間に介在する分子の同定により、cardiacMLCK によるミオシン軽鎖リン酸化の心機能に対する役割の解析がさらに進むものと考えられる。また cardiacMLCK そのものあるいはその作用に関係する分子をあらたな創薬対象として薬物スクリーニング系の確立を行った。また cardiacMLCK 遺伝子改変マウスの樹立にほぼ成功し、今後 in vivo における cardiacMLCK の心機能における役割を検討して心不全のモデル動物として使用する。さらにはこれらを利用して心不全病態における機能解析が進むものと期待される。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK および関連分子の変異・SNP 検索については今後も検討を進めていく。研究分担者は主に生化学的解析を中心に研究代表者と共同で本研究を遂行していく予定である。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Zhao, H., Liao, Y., Minamino, T., Asano, Y., Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Takashima, S., Hori, M., Kitakaze, M., (2008). Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. *Hypertens Res.* 31, 1977-87.
- 2.Liao, Y., Zhao, H., (2 人略) Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Minamino, T., Takashima, S., Kitakaze, M., (2008). Atorvastatin slows the progression of cardiac remodeling in mice with pressure overload and inhibits epidermal growth factor receptor activation. *Hypertens Res* 31, 335-344.
- 3.Li, F., Zhao, H., Liao, Y., Takashima, S., (3 人略) Kitakaze, M., (2008). Higher mortality in heterozygous neuropilin-1 mice after cardiac pressure overload. *Biochem Biophys Res Commun.* 370, 317-21.
- 4.Ito, K., Kawasaki, T., Takashima, S., (3 人略) (2008) Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. *J Neurosci.* 28,

4414-22.

5. Fujita, M., Asakura, M., (4人略) Asanuma, H., (3人略) Kitakaze, M. (2008) Activation of ecto-5'-nucleotidase in the blood and hearts of patients with chronic heart failure. J Card Fail 14, 426-430.
6. Bahrudin, U., Morisaki, (5人略) Takashima, S., (4人略) Kitakaze, M., Carrier, L., Hisatome, I., (2008). Ubiquitin-proteasome system impairment caused by a missense cardiac myosin-binding protein C mutation and associated with cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Biol. 384, 896-907.

2、学会発表

1. 瀬口 理、高島 成二、北風 政史
第12回 Molecular Cardiovascular Conference
(平成20年9月5-7日、北海道)
一般演題
"A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart"
2. Asano, Y., Takashima, S., Liao, Y.L., Kitakaze, M.,
American Heart Association, Scientific Session
2008
(Nov. 9, 2008, New Orleans, USA)
Young Investigator Award Lecture
"Paradigm Shift to Epigenetic Memory for the Pathological Understanding of Chronic Heart Failure"

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

- 1、特許取得
特許出願中1件
特許出願準備中1件
- 2、実用新案登録
現在のところなし
- 3、その他
特記すべき事項なし

分担研究報告書

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ

(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

研究分担者 南野哲男 大阪大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

本研究は、心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)の心筋における生化学的役割を検討し cardiacMLCK そのものあるいはその関連蛋白を標的とした心不全治療の創薬開発を目指すものである。それとともに、cardiacMLCKの心機能調節因子としての作用をより詳細に明らかにするためにin vivoを含めた心不全モデル動物にてその動態を検討する。cardiacMLCKの遺伝子改変マウスの作成、変異検索も行う。研究分担者はこれらの解析のうち主として cardiacMLCKの蛋白量調整をつかさどるユビキチンプロテアソーム系に注目し心不全の病態との関連を検討する。

A. 研究目的

cardiacMLCKの心筋収縮における役割を明らかにするために cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の生化学的解析を特に蛋白分解系を中心に検討をおこなう。また心不全モデル動物における cardiacMLCKの動態を解析し、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を開始する。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索についてもこれを行う。これらの実験を通して、心不全の発症におけるプロテアソーム系の役割を明らかにする。

B. 研究方法

1、cardiacMLCK 及びその関連蛋白の同定とその発現にかかわるユビキチン・プロテアソーム系の確立

不全心筋においてはミオシン軽鎖蛋白レベルでの発現低下が報告されている。近年特異的な蛋白分解系としてユビキチン・プロテアソーム系の重要性が報告されている。さらに研究代表者が同定を進めている cardiacMLCK 関連分子について、ミオシン軽鎖を基質としたユビキチン活性の有無を確認する。

2、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

我々は個体における cardiacMLCK の機能を明らかにするためにゼブラフィッシュをモデル動物として使用していたが、ゼブラフィッシュの実験系では観血

的血行動態測定を含めた詳細な心機能の評価や心不全病態類似モデルの作成が困難である。そのため哺乳動物における cardiacMLCK の機能を解析するモデルとして cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスを作製することとした。cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製に関しては以前より行っていたが、cardiacMLCK 遺伝子にはいくつかのスプライシングバリエーションが存在すること、遺伝子のゲノム領域の一部に相同組み換えを阻害すると考えられる繰り返し配列が存在することなどの理由からES細胞における相同組み換え体を得ることに難渋していた。そのため今回我々は新たな計画のもとで cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を行うこととした。研究分担者は、このマウスの作成におもにヴェクター作成面で貢献し、また作成されたマウスにおけるプロテアソーム系の役割を検討する。

3、cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

心筋症症例において様々なサルコメア関連タンパクの変異が報告されている。cardiacMLCK の特異的なリン酸化基質であるミオシン軽鎖もサルコメアの構成タンパクの一つであり、これまで家族性心筋症症例における変異が報告されている。そのため、心筋症を初めとした心疾患症例において cardiacMLCK の変異もしくは SNP の存在する可能性が考えられている。我々は各研究分担者の施設

を含め、これまで原因が明らかにされていない心筋症例を中心に、倫理委員会の承認および患者の承諾を得た上で、その cardiacMLCK および関連分子の変異もしくは SNP の検索を行うこととした。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤や外科的処置によっては、その投与や処置によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与や外科的処置そのものにより、マウスに身体的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合はたとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減を図る。もし復元不可能な重大な障害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮する。新たな分子の機能解析には様々な手法が考えられるが、cardiacMLCK に関しては、生化学的実験手法、培養細胞を用いた実験手法、小型魚類等の下等生物を用いた実験手法と全ての段階を経てきており、今後の更なる研究の発展には遺伝子改変マウスを用いた実験が必須であると考えられる。遺伝子改変マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスを用いて新たな分子の機能を詳細に解析することは心不全病態の更なる理解やそこから生まれる新たな診断・治療ツールの開発など大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこない今後樹立されるであろう遺伝子改変マウスの詳細な表現型解析を進める予定である。また前述したように本研究課題は所定の段階を経ており、今後は遺伝子改変マウスを用いてその機能解析を行う以外に有用な実験手法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

疫学研究における倫理面への配慮においては、以下の点に留意して十分な注意を払う。

- 1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。
- 2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同

管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報に厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

C. 研究結果

1、cardiacMLCK 及びその関連蛋白の同定とその発現にかかわるプロテアゾーム系の確立

cardiacMLCK の結合蛋白の同定とユビキチン活性との役割を検討し、心不全における cardiacMLCK の発現低下にもプロテアゾーム系が関与することが明らかとなった。

2、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

これまでの経験から cardiacMLCK 遺伝子周囲のゲノム領域が相同組み換えの起こりにくい部位であると考え、まずターゲティングベクター作製において LoXP システムを導入したコンディショナルノックダウンベクターを元に、選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子を挟んだ長腕、短腕を一般的なターゲティングベクターのそれよりも約 2 倍程度長くした構造のベクターを作製した。また遺伝子の相同組み換えを阻害する可能性のある周囲のゲノムイントロン部位のくり返し配列に着目し、それら繰り返し配列を出来る限り含まない部分に対してベクターの設計を行った。それにより ES 細胞の相同組み換え体の選択効率を上げることができ、結果としてこれまで 1000 クローン以上の ES 細胞のスクリーニングにても得られなかった相同組み換え体を高率に得ることに成功した(約 200 クローンスクリーニング中、6 陽性クローンを同定した)。その後のキメラマウス作製にても良好なキメラ率の個体を得ることができ、現時点では F1 マウス作製の段階に到達しており、本研究は予定どおりに進行している。研究分担者は主に ES のスクリーニングに関与した。

3、cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

研究分担者の施設においては数例の重症心不全患者における cardiacMLCK の変異検索を行ったが commonSNP 以外の変異は同定できなかった。

D. 考察

2007 年になり、我々により始めて同定された cardiacMLCK は特許関係も早期から押さえているうえ、心臓における特異性、病態におけるかわりなどから考慮してもわが国独自の創薬標的として先駆性のある分子である。研究分担者はプロテアゾーム系の解析をとおして cardiacMLCK を中心とした機能解析を今後とも進めていく予定である。

E. 結論

リン酸化ミオシン軽鎖とミオシン-アクチン連関の作用点であるミオシン頭部の間に介在する分子の同定により、cardiacMLCKによるミオシン軽鎖リン酸化の心機能に対する役割の解析がさらに進むものと考えられる。研究分担者は引き続きこれらの系におけるユビキチンプロテアソーム系の関与を検討していく。さらに今後はin vivoにおけるcardiacMLCKの心機能における役割を検討するため心不全のモデル動物としてcardiacMLCK遺伝子欠損マウスを使用し、これらの心臓においてユビキチンプロテアソーム系の関与の検討を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Asai,M.,Tsukamoto, O., Minamino, T., Asanuma, H., (5人略)Asakura, M.,(1人略) Kitakaze, M. (2008).PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. J Mol Cell Cardiol. 46,452-462.
- 2.Fu,H.Y., Minamino,T.,(6人略) Takashima, S. (1人略) Kitakaze, M. (2008).Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. Cardiovasc Res 79, 600-610.
- 3.Zhao, H., Liao, Y., Minamino, T., Asano, Y., Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Takashima, S., Hori, M.Kitakaze, M., (2008). Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. Hypertens Res. 31, 1977-87.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

以上、特記すべき事項なし

分担研究報告書

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ

(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

研究分担者 朝倉正紀 国立循環器病センター 医長

研究要旨

研究分担者は発見当初から心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)の研究に従事してきた。本研究は cardiacMLCK の心筋における生化学的役割を検討し cardiacMLCK そのものあるいはその関連蛋白を標的とした心不全治療の創薬開発を目指すものである。それとともに、cardiacMLCK の心機能調節因子としての作用をより詳細に明らかにするために in vivo を含めた心不全モデル動物にてその動態を検討する。cardiacMLCK の遺伝子改変マウスの作成、変異検索も行う。研究分担者は特に cardiacMLCK の生化学的解析を研究代表者と共同でおこないさらにヒトサンプルでの cardiacMLCK の検討に焦点をあてた研究をすすめた。

A. 研究目的

初年度は研究代表者と協力して cardiacMLCK の心筋収縮における役割を明らかにするために cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の生化学的解析を詳細に行った。また in vivo における cardiacMLCK の心機能に及ぼす影響、さらに心不全病態との関わりを明らかにする目的のため、心不全モデル動物における cardiacMLCK の動態を解析し、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を開始した。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索についてもこれを行った。これらの実験を通して、心不全のメカニズムの解明および新規の診断法・治療法の確立をめざすことを目的とした。

B. 研究方法

1、cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の心筋収縮における役割の生化学的解析

研究代表者と共同して cardiacMLCK がそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖のリン酸化を介して心筋細胞およびゼブラフィッシュにおける心筋サルコメア構造形成に関わることを明らかにしている。またこれまでの平滑筋、骨格筋線維を用いた検討では MLCK によるミオシン軽鎖のリン酸化は筋収縮の

発生や筋収縮時における Ca 感受性を変化させると報告されている。ところが、ミオシン分子の構造解析の結果からはミオシン-アクチン連関に関わるミオシン頭部のアクチン結合部位とミオシン軽鎖の結合部位であるミオシン頸部の間には物理的距離が存在し、ミオシン軽鎖のリン酸化が直接ミオシン頭部のアクチン結合部位に作用してミオシン-アクチン連関における機能を調節するとは考えにくい。このような背景のもと、我々はリン酸化ミオシン軽鎖とミオシン頭部のアクチン結合部の間に介在し、心筋収縮機能を調節するタンパク分子が存在するとの仮定をたて、その介在タンパクを同定するために以下のスクリーニングを行うこととした。これらの分子の同定は新たな創薬標的となると期待される。

①ミオシン軽鎖のリン酸化を受けるアミノ酸残基である 15 番目のセリンをアラニンに置換した非リン酸化ミオシン軽鎖もしくはアスパラギン酸に置換したリン酸化模倣ミオシン軽鎖の GST 融合タンパクを作製し、放射性同位元素 ^{35}S にて標識した培養心筋細胞のタンパク抽出液の中からそれら GST 融合タンパクと共沈する新規タンパクの同定を行った。

②放射性同位元素 ^{35}S にて標識した培養心筋細胞をミオシン軽鎖リン酸化を引き起こすカテコラミンにて刺激し、そのタンパク抽出液よりミオシン軽

鎖抗体とともに共沈するタンパク質の同定を行った抽出液の中からそれらGST融合タンパクと共沈する新規タンパクの同定を行った。

2、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

我々は個体における cardiacMLCK の機能を明らかにするためにゼブラフィッシュをモデル動物として使用していたが、ゼブラフィッシュの実験系では観血的血行動態測定を含めた詳細な心機能の評価や心不全病態類似モデルの作成が困難である。そのため哺乳動物における cardiacMLCK の機能を解析するモデルとして cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスを作製することとした。cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製に関しては以前より行っていたが、cardiacMLCK 遺伝子にはいくつかのスプライシングバリエーションが存在すること、遺伝子のゲノム領域の一部に相同組み換えを阻害すると考えられる繰り返し配列が存在することなどの理由からES細胞における相同組み換え体を得ることに難渋していた。そのため今回我々は新たな計画のもとで cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製を行うこととした。研究分担者はおもにベクターデザイン作成、ES細胞のスクリーニングを担当した。

3、cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

心筋症事例において様々なサルコメア関連タンパクの変異が報告されている。cardiacMLCK の特異的なリン酸化基質であるミオシン軽鎖もサルコメアの構成タンパクの一つであり、これまで家族性心筋症事例における変異が報告されている。そのため、心筋症を初めとした心疾患事例において cardiacMLCK の変異もしくは SNP の存在する可能性が考えられている。我々は各研究分担者の施設を含め、これまで原因が明らかにされていない心筋症事例を中心に、倫理委員会の承認および患者の承諾を得た上で、その cardiacMLCK および関連分子の変異もしくは SNP の検索を行うこととした。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤や外科的処置によっては、その投与や処置によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与や外科的処置そのものにより、マウスに身体的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合は、たとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減を図る。もし復元不可能な重大な障害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮する。新たな分子の

機能解析には様々な手法が考えられるが、cardiacMLCK に関しては、生化学的実験手法、培養細胞を用いた実験手法、小型魚類等の下等生物を用いた実験手法と全ての段階を経てきており、今後の更なる研究の発展には遺伝子改変マウスを用いた実験が必須であると考えられる。遺伝子改変マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスを用いて新たな分子の機能を詳細に解析することは心不全病態の更なる理解やそこから生まれる新たな診断・治療ツールの開発など大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこない今後樹立されるであろう遺伝子改変マウスの詳細な表現型解析を進める予定である。また前述したように本研究課題は所定の段階を経ており、今後は遺伝子改変マウスを用いてその機能解析を行う以外に有用な実験手法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

疫学研究における倫理面への配慮においては、以下の点に留意して十分な注意を払う。

- 1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者を介して情報を管理する。
- 2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

C. 研究結果

1、cardiacMLCK およびそのリン酸化基質であるミオシン軽鎖の心筋収縮における役割の生化学的解析

- ① ミオシン軽鎖のGST融合タンパクを用い、35Sにて放射性標識した培養心筋細胞タンパク抽出液からのスクリーニングではミオシン軽鎖リン酸化模倣変異体に特異的に共沈するタンパクをいくつか得ることができた。ただし、非特異的なタンパクバンドも数多く認められるため、現在は細胞の培養条件やタンパクの可溶化条件などの検討を行っている。

②放射性標識したラット培養心筋細胞からミオシン軽鎖抗体と共沈するタンパクのスクリーニングの結果、現時点ではカテコラミン刺激によるミオシン軽鎖リン酸化の誘導とともに特異的に認められるタンパクは同定されていない。現在は細胞の培養条件、細胞の刺激薬剤および刺激条件等を検討している。今回①の結果よりリン酸化ミオシン軽鎖とミオシン頭部のアクチン結合部位間に介在する分子の存在が示唆された。今後本タンパクを同定し、ミオシン-アクチン連関における機能の解析に結びつけ新たな創薬標的の検索を行う予定である。cardiacMLCK そのものに対する阻害剤、促進剤のスクリーニング系の確立も研究代表者と共同で行った。

2. cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作製

これまでの経験から cardiacMLCK 遺伝子周囲のゲノム領域が相同組み換えの起こりにくい部位であると考え、まずターゲティングベクター作製において LoxP システムを導入したコンディショナルノックダウンベクターを元に、選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子を挟んだ長腕、短腕を一般的なターゲティングベクターのそれよりも約 2 倍程度長くとした構造のベクターを作製した。また遺伝子の相同組み換えを阻害する可能性のある周囲のゲノムイントロン部位のくり返し配列に着目し、それら繰り返し配列を出来る限り含まない部分に対してベクターの設計を行った。それにより ES 細胞の相同組み替え体の選択効率を上げることができ、結果としてこれまで 1000 クローン以上の ES 細胞のスクリーニングにても得られなかった相同組み換え体を高率に得ることに成功した(約 200 クローンスクリーニング中、6 陽性クローンを同定した)。その後のキメラマウス作製にても良好なキメラ率の個体を得ることができ、現時点では F1 マウス作製の段階に到達しており、本研究は予定どおりに進行している。研究分担者は主に ES のスクリーニングに関与した。

3. cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

研究分担者の施設においては数例の重症心不全患者における cardiacMLCK の変異検索を行ったが commonSNP 以外の変異は同定できなかった。

D. 考察

2007 年になり、我々により始めて同定された cardiacMLCK は特許関係も早期から押さえているうえ、心臓における特異性、病態におけるかかわりなどから考慮してもわが国独自の創薬標的として先駆性のある分子である。本年度の研究により、cardiacMLCK の

心機能に及ぼす影響および心不全病態時の cardiacMLCK の役割などの研究に対する下地を組み立てることができた。上記研究以外にも特許に抵触するため公表できない研究成果が得られており研究代表者と共にこれらの研究も同時に進める予定である。

E. 結論

リン酸化ミオシン軽鎖とミオシン-アクチン連関の作用点であるミオシン頭部の間に介在する分子の同定により、cardiacMLCK によるミオシン軽鎖リン酸化の心機能に対する役割の解析がさらに進むものと考えられる。また cardiacMLCK そのものあるいはその作用に関係する分子をあらたな創薬対象として薬物スクリーニング系の確立を行った。また cardiacMLCK 遺伝子改変マウスの樹立にほぼ成功し、今後 in vivo における cardiacMLCK の心機能における役割を検討して心不全のモデル動物として使用する。さらにはこれらを利用して心不全病態における機能解析が進むものと期待される。ヒト心疾患症例における cardiacMLCK および関連分子の変異・SNP 検索については今後も検討を進めていく。研究分担者は主に生化学的解析を中心に研究代表者と共同で本研究を遂行していく予定である。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Ohara T, Kim J, Asakura M, Asanuma H, (5 人略) Kitakaze M. Plasma adiponectin is associated with plasma brain natriuretic peptide and cardiac function in healthy subjects. *Hypertens Res*. 2008;31:825-831
- 2.Fujita, M., Asakura, M., (4 人略) Asanuma, H., (3 人略) Kitakaze, M. (2008). Activation of ecto-5'-nucleotidase in the blood and hearts of patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 14, 426-430.
- 3.Liao, Y., Zhao, H., (2 人略) Asakura, M., Kim, J., Asanuma, H., Minamino, T., Takashima, S., Kitakaze, M. (2008). Atorvastatin slows the progression of cardiac remodeling in mice with pressure overload and inhibits epidermal growth factor receptor activation. *Hypertens Res* 31, 335-344.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

- 1、特許取得
特許出願中 1 件
特許出願準備中 1 件
- 2、実用新案登録
現在のところなし
- 3、その他
特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

分担研究報告書

大規模発現解析より得られた新規酵素心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ

(cardiacMLCK)を利用した心不全治療薬・診断マーカーの開発

研究分担者 金 智隆 国立循環器病センター 客員研究員

研究要旨

研究分担者は心疾患を中心とする大規模な疫学研究、コフォート研究をすすめてきた。本研究は、主任研究者らが同定した心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)の心筋における生化学的役割及び生理的機能を解析することを目的とする。またヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異や SNP の検索を行い心不全の病態との関連を検索・診断の明確化を計ることを目的としている。研究分担者は豊富な臨床症例から倫理委員会の承諾、患者への承諾を得た上で心不全患者・健診受診者らにおける cardiacMLCK の SNP 及び変異の有無の検索を行った。

A. 研究目的

初年度は研究代表者と協力してヒト心疾患症例における cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索についてもこれを行った。これらの解析を通じて、日本人独自の cardiacMLCK およびその関連蛋白の SNP、変異検索を行った。これらの解析によって心不全の病態における cardiacMLCK の遺伝素因における役割が明らかになると期待される。

B. 研究方法

1、cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

心筋症症例において様々なサルコメア関連タンパクの変異が報告されている。cardiacMLCK の特異的なリン酸化基質であるミオシン軽鎖もサルコメアの構成タンパクの一つであり、これまで家族性心筋症症例における変異が報告されている。そのため、心筋症を初めとした心疾患症例において cardiacMLCK の変異もしくは SNP の存在する可能性が考えられている。研究分担者は有田町研究とよばれるコフォート研究において住民の心機能の解析データを詳細に記録しているまた、遺伝子解析の承認も得ているためこれらの cardiacMLCK の遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

疫学研究における倫理面への配慮においては、

以下の点に留意して十分な注意を払う。

- 1)試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者を置いて情報を管理する。
- 2)試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 試料採取時に注射針を刺す痛みはあるが、一般の血液検査の痛みと同じく、危険や不利益はないと考える。遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられる。これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

C. 研究結果

1、cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

今回の遺伝子検索によって cardiacMLCK の数個の変異が同定された。これらは common SNP と考えられた。しかしこれらのなかには日本人独自の SNP も含まれ、今後の cardiacMLCK の遺伝子解析に重要であったと考える。