

200907011A

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21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22(2010)年3月

平成22(2010)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…………… 7  
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…………… 11  
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…………… 13  
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  
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…………… 18  
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…………… 20  
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.....	22
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.....	24
古川秀比古	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....</b>	<b>27</b>
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>	
Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium.....	43
Biochemical and Biophysical Research Communications 2010,393,55-60	
Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure.....	49
Journal of the American College of Cardiology 2009,53,2070-2077	
Metformin prevents progression of heart failure in dogs : Role of AMP-activated protein kinase.....	57
Circulation 2009,119,2568-2577	
Prolonged targeting of ischemic/ reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats .....	67
Journal of the American College of Cardiology 2009,53,709-717	
PDK1 coordinates survival pathways and $\beta$ -adrenergic response in the heart.....	76
Proc.Natl.Acad.Sci.USA2009,106,8689-8694	
Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling.....	82
Cardiovascular Research2009,81,449-456	

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

本研究は、心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)の心臓疾患における役割を検討しその診断・治療への応用を図ることを目的とする。本年度は昨年を引き続き、生化学的解析においては cardiacMLCK そのものあるいはその関連蛋白の同定をすすめ新たな心不全治療の創薬標的の同定に成功し発展させた。さらに cardiacMLCK の活性制御剤のスクリーニングのためのアッセイ系の確立に成功し阻害剤及び活性増強剤のスクリーニング系への基盤が完成した。また診断法としては心疾患のマーカーとしての応用を図るため、その血中測定系の確立を試み完成させた。倫理委員会の承認の後、患者サンプルの採取・血中濃度測定を行った。さらに実験系として、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完了した。ヒト心疾患症例においては、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・診断への応用を目指した研究をすすめた。その中で、共同研究者が重症心不全患者家系において cardiacMLCK の変異を発見した。2007年に我々により全く新規に同定されたリン酸化酵素 cardiacMLCK の基礎面・臨床応用面において成果が得られ、特許関係も抑えており最終年度にさらに発展させる予定である。

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

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  
第一三共株式会社抗体医薬研究所  
所長

## A. 研究目的

cardiacMLCK 活性化によるミオシン軽鎖のリン酸化は心筋収縮時の細胞内カルシウムに対する感受性を増加させる。そのため従来の強心剤と比較し作用部位が異なることによる併用効果も期待できる。また心臓に極めて特異的に存在し、心不全で発現量が増加するため心不全あるいは心筋梗塞の診断マーカーとしての応用も可能である。具体的目標は以下の3点である。

- ① cardiacMLCK の機能解析。20-21 年度に作成を進めた cardiacMLCK ノックアウトマウスの解析とリン酸化 MLC 相関分子の同定をおこなう。
- ② cardiacMLCK の活性化剤を中心としたミオシン軽鎖のリン酸化促進作用を持つ薬剤の蛍光基質アッセイ法の確立。さらに細胞を使ったスクリーニング系の構築を完成させスクリーニングを開始する。
- ③ 特異的 ELISA の確立をおこない患者血液中の cardiacMLCK を測定し心不全、心筋梗塞の診断マーカーとして応用を図る。さらに心疾患ヒト症例での MLCK および関連蛋白の変異、SNP 検索も引き続き行う。

## B. 研究方法

### 1、cardiacMLCK の心筋収縮制御機構の解析

cardiacMLCK を介する MLC のリン酸化が心筋収縮の感受性を上げることは証明されているが、その分子機構は不明な点が多い。申請者らの研究で、MLC のリン酸化部位が同定されそれに伴う構造変化も確認されている。cardiacMLCK の創薬標的としての分子機構をさらに明確にするためリン酸化 MLC の生理機能および、リン酸化以降のシグナル解析を行う。このためにリン酸化された MLC と相互作用する分子の同定を行う。これらの分子は新たな心筋収縮メカニズムの解明と新たな創薬分子標的になると期待される。さらに cardiacMLCK 欠損マウスを新たに作成し MLC のリン酸化の生理機能解析を行い cardiacMLCK の生体心での役割を検討する。

### 2、心筋 MLC リン酸化促進剤の開発

心筋特異的な MLC のリン酸化を増加させることによる強心効果は、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度を増加させずに発揮される。そのため MLC のリン酸化を促進させる薬剤は、従来の強心剤とは異なる機序をもつ新規の強心剤となる可能性が高い。下記の方法で MLC リン酸化を促進する薬剤のスクリーニングを行う。マウス、イヌ等の大動物での作用を確認し、最終的にはヒトへの応用を目指す。

- ① cardiacMLCK 活性化剤のスクリーニング  
申請者らが同定した cardiacMLCK は特異的に

心筋に発現する MLC のリン酸化酵素であるためこの活性を上昇させる薬剤は心筋の MLC のリン酸化を特異的に上昇させると予想される。cardiacMLCK はカルモジュリンによる活性化をうけるために、同様の構造変化を cardiacMLCK にきたす薬剤はその作用を特異的に増強する可能性がある。スクリーニング系としてはリン酸化によって電気泳動度が増加する蛍光基質を作成し確立する。

- ② MLC リン酸化促進剤のスクリーニング  
MLC のリン酸化を生体内で増加させる薬剤のスクリーニングを目的として、上記の MLC リン酸化の程度を蛍光定量可能なペプチドを心筋細胞に導入する。これを蛍光顕微鏡下に観察するアッセイ系を確立し、MLC のリン酸化度を特異的に上昇させる薬剤をスクリーニングする。より生理的な状態での MLC のリン酸化を促進させる薬剤が同定できる可能性が高い。

### 3、分子診断マーカーとしての MLCK の血中測定システムの開発・MLCK の遺伝子変異解析

cardiacMLCK は心不全の病態により、その発現量が劇的に変化するため、その測定は心不全の重症度や予後を予測できる可能性がある。また心臓特異性や細胞質に比較的大量に含まれるため、従来よりも感度のよい有効なマーカーとなることが期待される。加えて心機能に重要であるため、その遺伝子上での変異や SNP が心疾患の原因遺伝子となることが予想される。

- ① 血中 cardiacMLCK 濃度の測定。平成 21 年度 cardiacMLCK の高感度 ELISA 作成をすすめ、さらに高感度化を目指す。
- ② ヒト心不全、心筋梗塞患者での cardiacMLCK 濃度の測定  
上記の ELISA を使用しヒト心不全、心筋梗塞患者の血中濃度を測定し、重症度との相関、従来の診断マーカーとの比較等を行い診断マーカーとしての可能性を評価する。
- ③ 心疾患患者での cardiacMLCK 及びその関連蛋白の全エクソンを配列解析。
- ④ これらの遺伝子の SNP や変異を検索し、病態との関連を引き続き検討する。

### (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 の心筋収縮制御の解析

今年度は初年度からスクリーニングを行っていた新たな myosin light chain(MLC)の燐酸化調節因子の同定を進めた。MLC のリン酸化を制御する新たな因子として NUAK2 というリン酸化酵素を同定し、その機能解析をおこなった。NUAK2 はサイトカ

インの一種である TNF $\alpha$  で強く誘導され、MLC の燐酸化を誘導する。心不全においては TNF $\alpha$  の血中及び組織での上昇が知られており、cardiacMLCK と相互作用して心筋の収縮性を規定することが示唆された。さらに初年度から作製を続けていた MLCK のノックアウトマウスが完成し、来年度はその解析をおこなうことによりさらに MLCK の機能解析が進行すると期待される。

### 2、分子診断マーカーとしての MLCK の血中測定システムの開発

初年度に作製されたモノクローナル抗体を利用して、最小検出感度 200pg/ml の血中 cMLCK の測定系の確立に成功した。最初に倫理委員会の承認が得られていた保存血清にて測定を行ったところ、うち一例で 1.37ng/ml という異常高値をみとめた(正常値は 0.2ng/ml 以下)。このことは、特定の病態において MLCK が異常高値を示すことを示唆し疾患マーカーとしての可能性が強く示唆された。そこで施設の倫理委員会の承認を得て、患者情報の取得と平行して、心不全患者、心筋梗塞患者の血清を採取中である。

### 3、心筋 MLC 燐酸化促進剤の開発

本年度は昨年度から調整を続けていた蛍光ラベル基質を利用した Microfluidic Mobility Shift Assay 法による MLCK の活性アッセイ系が完成した。細胞内への導入系も含めてさらに高感度のアッセイ系を確立し阻害剤、促進剤のスクリーニングを目指す。

### 4、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。本年度は共同研究を行っている施設において家族発症心不全患者で cardiacMLCK の特定変異が発見され心不全の原因遺伝子となることが示唆された。

## 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。今後確立された血中測定法を利用した臨床例での診断マーカーとしての応用と、創薬標的のスクリーニングに向けての研究基盤が完成したと考える。

#### 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。また診断マーカーとしての応用のために測定系の確立に成功した。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. Utsunomiya H., Nakatani S. (5 人略) Kitakaze M. A simple method to predict impaired right ventricular performance and disease severity in chronic pulmonary hypertension using strain rate imaging. International journal of cardiology (in press).2009
2. Tsukamoto O., Fujita M. (9 人略) Minamino T., Asakura M. (3 人略) Kitakaze M. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology 53(22): 2070-2077.2009
3. Takahama H., Minamino T., Asanuma H. (7 人略) Asakura M., Kim J., Takashima S.(3 人略) Kitakaze M. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. Journal of the American College of

Cardiology. 53(8):709-717.2009

4. Sasaki H., Asanuma H. (5 人略) Asakura M., Kim J., Minamino T., Takashima S. (4 人略) Kitakaze M. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. Circulation.119(19):2568-2577.2009
5. Minamino T., Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. Journal of molecular and cellular cardiology.2009

##### 2. 学会発表

1. The 15th International Symposium on Atherosclerosis: The Biology of Atherosclerosis (June 12-18,2009,Boston, USA)
  - 1) Kitakaze M. Roles of Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in the Progression and Rapture of Atherosclerotic Plaques.
  - 2) Kitakaze M. A role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathophysiology of Atherosclerotic Plaques.
2. American Heart Association, Scientific Session 2009.(Nov.14-18,2009,Orlando,USA)
  - 1) Maeda M., Hasegawa T., Kanzaki H., Kim J., Ohara T., Asakura M., Takahama H., Amaki M., Hashimura K., Kitakaze M. Increased Aortic Stiffness is a Risk of Left Ventricular Diastolic Dysfunction Even in Normotensive Subjects.
  - 2) Takahama H., Kitakaze M., Asai T., Minamino T..Targeting of Ischemic/reperfused Myocardium by Liposomal Amiodarone Reduced Ventricular Fibillation in Rats
- 3.第 36 回国際生理学会大会 (平成21年7月27日)  
一般演題
  - 1) Takashima S., Seguchi O., Yamazaki S., Asakura M., Kitakaze M. The role of cardiacMLCK in sarcomer development in cardiomyocytes”
  - 2) Sasaki H., Asanuma H. (3人略) Asakura M., Kim J, Minamino T., Takashima S. (5 人略) Kitakaze M. Metformin therapy is associated with improved cardiac function and improved

insulin resistance in dogs”

#### 4 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会

(平成22年3月5～7日)

- 1) Tomoike H., Kim J., Asakura M., Yoshida A., Mori M., Maeda M., Kitakaze M.. Current Status of Pathophysiology of Dilated Cardiomyopathy in Japan—Reports from the Research Committee of the Investigation of Idiopathic—Cardiomyopathy.
- 2) Takashima S., Asano Y., Fujita M., Minamino T., Komuro I., Kitakaze M.. Familial Bradycardia Caused by the Mutation of Inward Rectifier Potassium Channel.
- 3) Sanada S., Kitakaze M.. A Novel Therapeutic Strategy against Cardiac Failure Based on Cardioprotective Mechanisms of Preconditioning: Brief Phosphodiesterase-3 Inhibition and Transient PKA Activation.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

##### 1、特許取得

心臓特異的キナーゼの心不全診断および治療への  
応用

公開番号： 特開2009-242388

公開日： 2009年10月22日

出願番号： 特願2009-056423

出願人： 国立循環器病センター総長 第一三共株  
式会社

出願日： 2009年03月10日

発明人： 北風政史、高島成二、瀬口理、朝倉正紀、  
大塚敏明、中丸健治、合田明日香

##### 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 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さらに検討することを目的とした。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完了する。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

本年度は昨年に引き続き、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おこなった。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相互作用する分子の同定をすすめた

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プライミ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すすめた。

### 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  
本年度は MLCK の基質である MLC の脱リン酸化の調整因子を新たに同定することに成功した。この NUAK2 と呼ばれるリン酸化酵素は特に細胞接着部位で高発現がみられ、心不全で負荷のかかるこれらの部位での特異的作用示唆される。あらたな心不全治療標的となるとも考えられ、MLCK との相互作用も含めて今後検討していく。
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、ヘテロの個体も多数得られた。その後 Mer-Cre-Mer マウスと呼ばれる心筋細胞特異的に Cre をタモキシフェンにより誘導できるマウスと掛け合わせることで、タモキシフェンをうつことによりある一定の時期から cardiacMLCK の発現抑制ができるマウスを確立した。実際にタモキシフェンの2週間連日の投与により cardiacMLCK の完全な発現抑制が確認された。今後、その表現型の解析およびこの動物を使用した薬剤のスクリーニング実験等を行う予定である。

### 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心不全患者での cardiacMLCK 変異は同定されなかった。さらに症例を増やし、解析を進める。

### 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、さらに cardiacMLCK の分子としての特徴と生体内でのアッセイ系が確立された。今後も研究をすすめるその阻害剤や促進剤の臨床応用を目指す。

### E. 結論

リン酸化ミオシン軽鎖の生化学的解析を進める中であらたなミオシン軽鎖の制御酵素の同定に成功した。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、アッセイ系の確立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

#### 英文総説

Takashima S.. Phosphorylation of Myosin Regulatory Light Chain by Myosin Light Chain Kinase, and Muscle Contraction. *Circulation Journal* 73(2) 208–213 (2009)

#### 英文原著

1. Yamauchi K, Mizushima S. (2人略) Takashima S., Murakami F.. FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F. *J Neurosci.* 29, 4044–55.(2009).
2. Yamamoto M., Standley D.M., Takashima S. (8人略) D., Takeda, K.. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med.* 206, 2747–60.(2009).
3. Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ J.* 73, 208–13.(2009).
4. Takahama H., Minamino T., Asanuma H. (7人略) Asakura M., Kim J., Takashima S. (3人略) Kitakaze M.. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol.* 53, 709–17.(2009).
5. Shintani Y., Takashima S. (2人略) Kitakaze M.. Extracellular protein kinase CK2 is a novel associating protein of neuropilin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 385, 618–23.(2009).
6. Sasaki H., Asanuma H. (5人略) Asakura M., Kim J., Minamino T., Takashima S. (4人略) Kitakaze M.. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation.* 119, 2568–77 (2009).
7. Asai M., Tsukamoto O., Minamino T., Asanuma H. (5人略) Asakura M., Takashima S., Hori M., Kitakaze M.. PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 46, 452–62.(2009).

## 邦文総説

心臓サルコメア構築に必須な新規ミオシンキナーゼ高島 成二 メディカルビューポイント  
9 30(4) 3-4 2009

## 2. 学会発表

### 1. 第36回国際生理学会大会

(平成21年7月27日～8月1日)

#### 一般演題

Takashima S., Seguchi O., Yamazaki S., Asakura M., Kitakaze M.. The role of CardiacMLCK in sarcomer development in cardiomyocytes.

### 2. 第74回日本循環器学会総会・学術集会

(平成22年3月6日)

#### シンポジウム

Takashima S., Asano Y., Fujita M., Minamino T., Komuro I., Kitakaze M..Familial Bradycardia Caused by the mutation of Inward Rectifier Potassium Channel.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

### 1. 特許取得

心臓特異的キナーゼの心不全診断および治療への応用

公開番号： 特開2009-242388

公開日： 2009年10月22日

出願番号： 特願2009-056423

出願人： 国立循環器病センター総長 第一三共株式会社

出願日： 2009年03月10日

発明人： 北風政史、高島成二、瀬口理、朝倉正紀、大塚敏明、中丸健治、合田明日香

### 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を含めた心不全関連遺伝子の発現調整機構の解明、変異解析のための検体採取をおこなった。

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発現調節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 ER ストレス反応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 ER ストレスの役割

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、ER ストレスに伴う特異的シグナルがこれらの遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。そこで今年度は ER ストレスによる cardiacMLCKを含めた各種心不全関連遺伝子の発現調整機構の解析をおこなった。

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)

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データを厳重に管理・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 及びその関連蛋白の同定とその発現にかかわる ER ストレスの役割

心不全においてERストレスがXBP1という遺伝子のスプライシング産物の産生を通して各心不全関連遺伝子の発現制御をおこなうことが明らかとなった。これらの発現に必要な領域等を同定し、心不全における発現の重要性を明らかにした。

#### 2. 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。研究分担者は心不全において発生するERストレスとcardiacMLCKの発現調整があきらかになればよりその心不全での役割が解明されると期待される。

### E. 結論

心不全において引き起こされるさまざまな遺伝子発現制御はその病態機構を理解するうえでさらに重要性を増すと思われる。研究分担者は引き続きこれらの系におけるERストレス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、cardiacMLCKを発現調整を介するERストレス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., Takashima S., Hori M., Kitakaze M. PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. J Mol Cell Cardiol. 46, 452-62, 2009
2. Takahama H., Minamino T., Asanuma H. (7人略) Asakura M., Kim J., Takashima S. (3人略) Kitakaze M. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. Journal of the American College of Cardiology. 53(8):709-717.

### 2. 学会発表

1. Sawada T., Minamino T., Asano Y., Takasima S., Kitakaze M., Komuro I. X-box Binding Protein 1 Regulates Brain Natriuretic Peptide through a Novel AP1/CRE-like Element in Cardiomyocytes. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得  
細胞融合促進剤、及びその使用  
特許 4294688 号  
特許権者：南野哲男、北風政史、興和株式会社  
平成 21 年 4 月 17 日
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 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 の発現解析、また心不全患者の遺伝子プロファイリングの解析をおこなった。

A. 研究目的

本年度は研究代表者と協力して 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。さらに cardiacMLCK と平行して患者の病態パラメータと相関して発現制御される遺伝子のプロファイリング解析をおこなった。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 と平行して発現変動する遺伝子のプロファイリング

cardiacMLCK は不全心において患者の肺動脈圧に連動して遺伝子発現制御を受けることが明らかになった。同様の手法を利用して患者の病態情報と連動して発現制御を受ける遺伝子群の検索を行い、新たな心不全関連遺伝子の同定および解析をおこなった。

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。本年度はキメラマウスの作製、cre lox マウスの確立、実際の遺伝子発現抑制を行った。

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 と平行して発現変動する遺伝子のプロファイリング

12例の心不全患者と2例の正常心の遺伝子発現プロファイリングにより各種の患者病態パラメータと相関する14種の遺伝子を同定した。さらにこの中から心筋細胞における強制発現により、カテコラミンなどの薬剤に対して異なる反応を示す遺伝子や、形態変化をきたす遺伝子を抽出した。さらにこれらの遺伝子の強制発現及びノックアウトマウスを作製した。このうち2種の遺伝子改変マウスに関しては血圧の変動が見られ心血管系での重要な役割が示唆された。

##### 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替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 Mer-Cre-Mer マウスとの掛け合わせ及びタモキシフェンによる cardiacMLCK の発現抑制に成功している。

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



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。

Kitakaze M., Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation*. 119, 2568-77. (2009).

#### 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。さらに cardiacMLCKの同定と同様の解析手法を利用することによりさらに新しい心不全診断治療標的の同定法を確立できた。

#### E. 結論

心不全の病態パラメーターと相関する遺伝子を検索することにより新たな心不全の診断・治療に必要な因子の同定に成功した。また cardiacMLCK遺伝子改変マウスの樹立に成功し、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. Asakura M., Kitakaze M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J*. 73, 1568-76.(2009).
2. Min K.D., Asakura M. (6人略) Takahashi A., Asanuma H., Yamazaki S., Minamino T. (5人略) Furukawa H., Isomura T., Takashima S., Mochizuki N., Kitakaze M., Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 393, 55-60.(2010).
3. Sasaki H., Asanuma H. (5人略) Asakura M., Kim J., Minamino T., Takashima S. (4人略)

##### 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

心臓特異的キナーゼの心不全診断および治療への応用

公開番号： 特開2009-242388

公開日： 2009年10月22日

出願番号： 特願2009-056423

出願人： 国立循環器病センター総長 第一三共株式会社

出願日： 2009年03月10日

発明人： 北風政史、高島成二、瀬口理、朝倉正紀、大塚敏明、中丸健治、合田明日香

##### 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 小室一成 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究要旨

研究分担者は、心肥大、心不全の形成機序の解明などを中心に研究を進めてきた。本研究は、研究代表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さら生理的機能を解析することを目的としている。分担研究者は自らの研究背景をもとに、研究代表者がすすめつつある、当施設での cardiacMLCK に関する心疾患ヒト血液サンプルの解析に対する準備および研究分担者が作成したマウスの心不全発症機序における cardiacMLCK の役割を検討した。

A. 研究目的

本年度は、心不全発症マウスにおける cardiacMLCK の役割検討及び研究代表者らが計画するヒト心疾患患者の血液を利用した cardiacMLCK 関係の各項目を測定するための準備を行った。

B. 研究方法

1、PDK1-MerCre マウスにおける cardiacMLCK の役割検討

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cMLCK)と心不全の病態との関連性を意義づけるために、心筋特異的 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1)ノックアウトマウス(PDK1-MerCre マウス)の心不全発症機序について検討を昨年引き続きおこなった。

2、cardiacMLCK 関係の各項目のヒトサンプル測定

cardiacMLCK はその心臓特異的発現から多くの心疾患において発現の変化等がおこることが知られている。また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おり 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ることから、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 を焦点にあてた臨床サンプル測定を行う。

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、PDK1-MerCre マウスにおける cardiacMLCK の役割検討

PDK1-MerCre マウスは心筋細胞のアポトーシスと $\beta$ 受容体の脱感作によって心不全を発症することが明らかとなった。現在、この PDK1-MerCre マウスにおける cardiacMLCK の発現と活性についておこなっている。

2. cardiacMLCK 関係の各項目のヒトサンプル測定  
ヒト心疾患患者の血液を利用した cardiacMLCK 関係の各項目を測定するための準備を行った。

#### D. 考察

cardiacMLCKは、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。心不全の病態と関連して鋭敏に変化することから考えても今後病態との関連が強く示唆される。研究代表者らの研究とあわせてさらに心不全・虚血心の病態との関連を検討していく。

#### E. 結論

cardiacMLCKの蛋白・遺伝子レベルでの発現と病態との関連を今後明らかにしていく。

#### 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. Kayama Y., Minamino T. (12 人略) Komuro I. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. J Exp Med 206:1565-1574, 2009.
2. Ikeda H., Shiojima I. (7 人略) Komuro I. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 47:664-675, 2009.
3. Ito K., Akazawa H. (12 人略) Komuro I. PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart. Proc Natl Acad Sci USA 106:8689-8694, 2009.

##### 2. 学会発表

小室一成 「心不全の新しい発症機序と治療」日本循環器学会北海道地方会教育セッション(平成 21 年 6 月 13 日, 北海道)

・小室一成 「心不全の新しい発症機序と再生治療」

第 30 回千葉県小児循環器研究会(平成 21 年 9 月 11 日, 千葉)

・小室一成 「心不全の新しい発症機序と再生治療」第 57 回日本心臓病学会学術集会ランチョンセミナー(平成 21 年 9 月 19 日, 北海道)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む。)

1. 特許取得  
現在のところなし
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 筒井裕之 北海道大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

研究分担者は、心肥大、心不全の形成機序の解明、慢性心不全患者のデータベース構築などを中心に研究を進めてきた。本研究は、研究代表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さら生理的機能を解析することを目的としている。研究分担者は自らの研究背景をもとに、研究代表者がすすめてある、当施設での cardiacMLCK に関する心疾患ヒト血液サンプルの解析に対する準備を行った。

A. 研究目的

本年度は研究代表者らが計画するヒト心疾患患者の血液を利用した cardiacMLCK 関係の各項目を測定するための準備を行った。

B. 研究方法

cardiacMLCK はその心臓特異的発現から多くの心疾患において発現の変化等がおこることが知られている。また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おり 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ることから、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 を焦点にあてた臨床サンプル測定を行う。

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

ヒト心疾患患者の血液を利用した cardiacMLCK 関係の各項目を測定するための準備を行った。

D. 考察

cardiacMLCKは、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。心不全の病態と関連して鋭敏に変化することから考えても今後病態との関連が強く示唆される。研究代表者らの研究とあわせてさらに心不全・虚血心の病態との関連を検討していく。