

201007004A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北風政史

(国立循環器病研究センター)

平成23(2011)年 3月

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北風 政史

(国立循環器病研究センター)

平成23(2011)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…………… 9
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…………… 13
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…………… 16
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…………… 19
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…………… 21
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…………… 23
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	25
古川秀比古	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Left atrial volume combined with atrial pump function identifies hypertensive patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation	43
Hypertension 2010,55, 1150-1156	
AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration via CLIP-170 phosphorylation	50
Nature Cell Biology 2010,12,583-590	
Ablation of C/EBP homologous protein attenuates ER-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload	58
Circulation 2010,122,361-369	
Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1	67
J Biol Chem 2010,285,31337-31347	
Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease	78
Circ Res 2010,107,1071-1082	
X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes	90
J. Mol. Cell. Cardiol 2010,48,1280-1289	
Spirolactone use at discharge was associated with improved survival in hospitalized patients with systolic heart failure	100
Am Heart J 2010,160(60),1156-1162	

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 国立循環器病研究センター 部長

研究要旨

本研究は、研究代表者が大規模な疾患原因遺伝子検索により同定した心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ (cardiac myosin light chain kinase=cardiacMLCK) の心疾患における役割を明らかにし、cardiacMLCK 自体の心疾患診断ツールへの応用および cardiacMLCK 活性制御薬剤の心不全治療創薬への展開を目的とする。最終年度は cardiacMLCK を心不全治療薬として応用することの妥当性を示す重要なデータが得られた。まず cardiacMLCK の遺伝子欠損マウスの解析により cardiacMLCK の発現量とその器質である MLC のリン酸化量が心収縮性と密接に相関することが示された。さらにヒト家族性心筋症の複数の家系において cardiacMLCK の突然変異が見つかり、しかも突然変異した cardiacMLCK の活性が野生型の cardiacMLCK に比し顕著に低下していることが示された。これらの事実はヒトを含めた哺乳類において cardiacMLCK の活性がミオシン軽鎖 (myosin light chain=MLC) のリン酸化を介して心筋の収縮性を生体内で調整していることを明確に示した。このことより cardiacMLCK の活性制御スクリーニング系の重要性も上がり、最終年度に生体外、生体内でのアッセイ系を確立し薬剤の評価実験を行った。さらに cardiacMLCK の高感度血中濃度測定法も確立し、心不全患者血清において上昇がみられ、心疾患診断マーカーとしての可能性も示された。より基礎的な研究では、cardiacMLCK が MLC のリン酸化を介して収縮性を上げる分子メカニズムの解析がすすみ、この中で MLC のリン酸化を制御する新たな創薬標的も発見された。

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
講師

朝倉正紀

国立循環器病研究センター
医長

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

京都府立医科大学
准教授

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

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ (cardiac Myosin Light Chain Kinase = cardiacMLCK) の心臓疾患における役割を検討し診断ツールとしての応用・心不全治療創薬への展開を目的とする。

B. 研究方法

1、cardiacMLCK の心筋収縮制御機構の解析

cardiacMLCK を介するミオシン軽鎖 (Myosin Light Chain=MLC) のリン酸化が細胞内 Ca 濃度の変化を伴わずに心筋収縮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。これまでの研究で、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、本年度もリン酸化 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目的で、MLC のリン酸化調節因子の同定を進めた。21 年度に 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、TNF により誘導を受けることにより活性調節を受けることまでを明らかにした。22 年度は、NUAK2 の器質の新規スクリーニングを行い器質の同定および NUAK2 を介する MLC のリン酸化調節機構を検討した。

器質の同定は NUAK2 で免疫沈降したうえで in vitro でキナーゼ反応を行って器質を放射線ラベルし、HPLC 展開して同定するという新しい手法を用いて行った。またこれと同時に NUAK2 と同じ LKB1 下流のリン酸化酵素 AMPK の心筋細胞における役割も解析した。さらにマウスの大動脈の狭窄モデル、新たに作成した心不全を呈する遺伝子改変マウスモデルおよびイヌペース心不全モデル、虚血心不全モデルなどを作成し、cardiacMLCK, NUAK2, AMPK のそれぞれの病態に応じた発現様式の検討、MLC のリン酸化レベルと収縮性との相関解析を詳細に行った。また AMPK に関してはその活性抑制剤による心疾患に与える影響をさらに検討するとともに同定した器質との間のシグナルが心臓に与える影響を詳細に検討した。

2、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの解析

cardiacMLCK の欠損マウスの作成においては、キナーゼドメインをコードする領域の上流の exon を lox 配列にはさみ Cre recombinase で処理することにより酵素活性のない個体ができるように遺伝子構造改変を行った。Cre recombinase を発現するマウスと掛け合わせて遺伝子領域を lox out した遺伝子改変マウスを作製した。ほぼ12週まで正常発生が見られ

たため、8週において心機能、組織所見の評価、および MLC のリン酸化レベルの評価を行った。

3、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 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。

①cardiacMLCK 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。昨年度までにスクリーニング系としてリン酸化によって電気泳動度が変化する蛍光基質を利用する Microfluidic Mobility Shift Assay 法を確立した。本年度はすでにキナーゼ活性に影響を与えることが既知である化合物からスクリーニングを行った。さらに心臓には cardiacMLCK と相同性が高く全臓器の細胞にも普遍的に発現する MLCK1 が存在するため、これらの薬剤がそれぞれに特異的な活性制御を行えるかを in vitro のキナーゼアッセイ系を利用しておこなった。

②MLC リン酸化促進剤のスクリーニング

上記の in vitro のアッセイ系に加えて 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、細胞を使用した蛍光アッセイ系を構築してきた。前述したように MLC のリン酸化は細胞内 Ca 濃度の変化を伴わず筋肉の収縮性を上げることが知られている。これは MLC のリン酸化により MyosinATPase が直接アロステリックにあるいは我々が同定した NUAK2 のような結合蛋白を介して間接的に調整されていることを意味する。cardiacMLCK の活性を調整するあるいは MLC のリン酸化を調整する薬剤は細胞内の Ca 濃度を変化させずに myosinATPase の活性のみを変化させようと考えられ、これを新規心不全治療薬剤のスクリーニング系とすることを考案した。

心筋においては大量の ATP が産生消費されるが、大部分の ATP は myosin ATPase で消費される。そこで心筋細胞に ATP 濃度を検出できる蛍光プローブを導入し、ATP 濃度を直接測定し心筋での ATPase 活性をアッセイする系の確立を試みた。これと、細胞内 Ca 測定プローブを合わせてアッセイ

することにより細胞内 Ca 濃度を変化させず Myosin ATPase の活性を変化させる薬剤のスクリーニング系を確立する。

4、分子診断マーカーとしての cardiacMLCK の血中測定システムの開発及び cardiacMLCK の遺伝子変異解析

cardiacMLCK はヒト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。加えてこれまでの我々の研究により心機能における重要性がしめされているため、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

21 年度まで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 の検出感度の血中 cardiacMLCK 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。22 年度は新たに倫理委員会の承認を得て採集した重症心不全および心筋梗塞の患者からの血清内の cardiacMLCK の濃度測定を行った。

②心疾患患者での cardiacMLCK 及びその関連蛋白の全エクソン配列解析

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、倫理委員会の承認が得られている場合のみ、随時 cardiacMLCK とその関連分子の変異もしくは SNP 検索を行った。21 年度には一家系において cardiacMLCK の突然変異が観察され、ヒトにおいても cardiacMLCK の変異が収縮不全をきたす遺伝性心筋症の原因となっていることが示された。本年度はさらに解析症例を広げ、特に家族歴を有する心筋症例を中心に cardiacMLCK の変異解析を行った。次に、家族性心筋症症例で同定された変異を有する cardiacMLCK を in vitro で合成しその活性を検討し野生型の cardiacMLCK に比し変化がみられるかを検討した。

(倫理面への配慮)

動物を使用した実験は、動物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動物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、動物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飼育法の改善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や大動物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や大動物を用いてその機能解析を行う以外に有用で詳細な実験手法は存在しない。これらの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。

またヒト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 の心筋収縮制御の解析

MLC のリン酸化が myosinATPase の活性を制御する機構を解明するため、その中間シグナルに位置すると思われる NUAK2 の生化学的・生理学的解析を詳細に行った。その結果 NUAK2 は MLC の脱リン酸化酵素である MYPT と強く結合し、しかも MYPT

をリン酸化することがしめされた。NUAK2 による MYPT の2か所のリン酸化部位も同定し、その部位の変異解析等を組み合わせるにより NUAK2 が MYPT をリン酸化することにより活性を抑制していることが示された。すなわち MLC のリン酸化から myosinATPase の活性化を制御する機構の一環として MLC 上に存在する NUAK2-MYPT complex がその作用の増強機構としてはたらいっていることが示唆された。さらに NUAK2 の発現制御により心筋の収縮性が変化すること、NUAK2 と同じ LKB1 標的分子となるリン酸化酵素 AMPK の器質も新たに同定され AMPK の活性調整による微小管という構造を介した新たな心臓のストレス応答機構が明らかとなった。これらの分子機構を生体内でもアッセイするためにマウス大動脈狭窄モデルやイヌペーシングモデルにおいてこれらの酵素の発現および活性変化を検討した。不全心ではまず NUAK2、AMPK の活性増強が観察され慢性期にはいと cardiacMLCK の発現上昇が顕著にみられることが明らかになった。この発現制御機構は虚血心においても同様であり急性期には特に NUAK2 や AMPK の発現上昇がみられ、心不全に進行して cardiacMLCK の発現上昇が観察された。cardiacMLCK の活性増強に伴い MLC のリン酸化の上昇がみられ、心臓における MLC リン酸化レベルの生体内での調節は主に cardiacMLCK に依存することが明確になった。また AMPK の活性化剤は虚血心に対して保護的効果を発揮した。

これらのリン酸化酵素がそれぞれの病態に応じた心臓でのストレス機構に関与することが示され、NUAK2 や AMPK も独立した創薬候補となると期待された。

2、cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの解析

cardiacMLCK の欠損マウスはヘテロで約半分、ホモにおいてほぼすべての cardiacMLCK の発現抑制がみられた。またこの cardiacMLCK の発現量と強い相関をもって MLC のリン酸化レベルの低下が観察された。このことは MLC の心筋細胞内でのリン酸化レベルは cardiacMLCK の発現量に強く依存することを示唆する。さらに cardiacMLCK を欠損したマウスは心重量の増大、心筋収縮性の低下などヒト心筋症と類似した表現型を示した。この結果は cardiacMLCK の活性と心不全の病態との相関を示唆し、cardiacMLCK の活性調整による心不全治療の可能性を示す新たな証拠となった。

3、心筋 MLC リン酸化促進剤の開発

①cardiacMLCK 活性化剤のスクリーニング

Microfluidic Mobility Shift Assay 法を使用した薬剤の prescreening で得られた数種の cardiacMLCK 活性制御薬剤について in vitro において cardiacMLCK および MLCK1 に対する特異性を検討したが双方の活性制御に同程度働くことが確かめられ、器質を工夫してより特異的なアッセイ系を確立する必要が示された。

②MLC リン酸化促進剤のスクリーニング

大腸菌の F0F1-ATPsynthase の ϵ サブユニットは ATP と特異的に結合し構造変化をきたすため ATP の濃度と構造変化が相関する。このサブユニットの両端に蛍光色素を付加した FRET プローブをアデノベクターに挿入し心筋細胞に導入した。これにより心筋細胞においてリアルタイムに ATP 濃度を測定する系が確立された。

本細胞を使用してミトコンドリアの脱共役剤や虚血などの負荷をかけることにより生理的な ATP 濃度の変化を正確に測定できた。このアッセイ系を利用して、カテコラミンの作用を調べたところ ATP 濃度の低下が観察された。しかしカテコラミンは同時に細胞内 Ca 濃度も増加させるため今回の目的である Ca 濃度の増加を伴わずに収縮性を増加させる薬剤には当たらない。そこで細胞内 Ca 濃度を同時に測定し ATP 濃度を低下させるが Ca 濃度を変化させない MLC リン酸化促進剤のスクリーニング系の確立が必要と考えられた。そこでさらに上記 ATP 感受性色素の蛍光色素の組み合わせを変化させ Fura-2 と呼ばれる Ca 濃度の測定試薬と同時導入することにより細胞内 ATP と Ca 濃度を同時測定できる系を確立した。

この細胞を利用することにより生理活性物質も含めた Ca 濃度上昇を伴わず myosinATPase を活性化させる薬剤の簡便なスクリーニングをおこなうことが可能となった。今後スクリーニングをすすめていく。

4、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

①血中 cardiacMLCK 濃度の測定

初年度に作製されたモノクローナル抗体を利用して検出感度 200pg/ml の血中 cMLCK の測定系の確立に成功した。本年度も新たな抗血清を作成するなど感度の上昇を図ったが検出限界はわずかに改善するにとどまった。この測定系を利用して心筋梗塞および重症心不全患者において血中濃度を測定し特異的に上昇する個体がみられた。さらに従来的心筋梗塞および心筋症の病態マーカーであるトロポニンや BNP の値との有意な相関は見られなかった。このことは心不全の病態における発現誘導のされ方

がこれらの蛋白とは異なることから予想され、現在各患者の病態と合わせた血中 cardiacMLCK の血中濃度上昇の意義を検討している。独自の病態を反映した新たな診断マーカーとなることが期待される。より詳細な検討には現在の検出感度以下のレベルでの測定系の確立が必要であり、今後の課題であると思われる。

②cardiacMLCK およびその関連分子の変異もしくは SNP の検索

家族発症症例を中心に 21 年度につづいて 22 年度にも心筋症の家系において cardiacMLCK の突然変異が同定された。家族発症例に発見された SNP でない突然変異は本研究にて 2 例となった。本突然変異は 2 例とも cardiacMLCK のアミノ酸変異をきたしていたため双方の変異 cardiacMLCK のリコンビナント蛋白を合成し活性測定を行った。結果、2 家系のうち 1 家系にみられた変異をもつ cardiacMLCK が変異を持たない酵素に比し約 70% の活性しか持たないことが示された。このことは cardiacMLCK の欠損マウスの解析結果と合わせて cardiacMLCK の活性低下がヒト心筋症の原因となりうることを明確に示した。SNP も同時に解析を行ったが心不全の病態と関連する SNP およびハプロタイプは今回同定不可能であった。ヒト心筋症の原因としての cardiacMLCK の重要性が明らかとなったことで今後も心筋症症例において cardiacMLCK の遺伝子解読を行うことは臨床的に意義深いと考えられる。またこれらの変異がみられた症例に関しては独自の有効な治療法が確立できると考えられる。

D. 考察

cardiacMLCK の発見は、過去の厚生労働科学研究費補助金による基盤研究から得られたものであり、創薬化に成功すれば、権利関係も先行していることから、わが国独自の創薬となる。これらの基盤研究の成果を具体化することは厚生行政上も極めて意義深い。また、心不全治療への応用がすすめば国民の保健医療の向上にも大きく貢献可能である。

1、新規心疾患診断マーカーとしての応用

心不全の重症度マーカーである BNP、心筋梗塞の診断マーカーである CPK、及びトロポニンなどは臨床診断や治療に必須の診断手段である。cardiacMLCK は心不全の重症度により発現変化し、しかも心臓に極めて特異的であるため、その測定により従来のマーカーとは異なる病態把握が可能となり心不全の的確な治療法に役立つと期待される。本年度は昨年度までに確立された cardiacMLCK の高

感度 ELISA 系の確立に成功し倫理委員会の承認が得られたものから測定を行い特定の病態との関連が示唆されたことおよびこれまでの診断マーカーの値と必ずしも相関しないことが示された。今後より感度の上昇を図れば積極的に心疾患の新しいマーカーへの応用が期待される。

2、新規強心剤・心不全治療剤

cardiacMLCK の活性化剤は従来と異なる作用機序をもち、副作用の少ない新たな心不全治療薬となる可能性が高い。心不全治療の効率化、医療費の削減につながると期待される。昨年度までに確立した cardiacMLCK のアッセイ系による prescreening により cardiacMLCK の活性調整作用をもつ薬剤は同定された。特異性に課題は残るが今後あらたな創薬スクリーニング系として利用可能と思われる。

3、心不全原因遺伝子としての cardiacMLCK

21 年度に引き続き 22 年度にも心筋症の家系で cardiacMLCK の変異が発見され、さらにその活性が病態と関連することが最終年度に明確に示されたことは大変意義深い。これに加え、本年度は cardiacMLCK の遺伝子欠損マウスにおいて cardiacMLCK の発現量、MLC のリン酸化の程度と心筋収縮性の明確な相関が示された。これら本研究で明らかになった事実から、ヒトにおいても家族性心筋症のみならず孤発例の心筋症においても cardiacMLCK などの MLC のリン酸化に与える因子が心筋症の発症に関与することを意味する。以上より、本研究の成果は、原因不明の難治性心疾患である拡張型心筋症の確定診断の幅を広げるのみならず、cardiacMLCK を標的とした心筋症の新規治療法の発展に寄与すると考える。

4、あらたな創薬基盤研究の対象となる機能蛋白の同定・スクリーニング系の確立

創薬を目的として cardiacMLCK の生化学的、生理学的研究を進める中で、cardiacMLCK の活性および MLC のリン酸化レベルを調整する NUA2 など新たな創薬標的も同定された。cardiacMLCK の調整薬剤と合わせた応用も期待される。また最終年度に確立された心筋細胞内のリアルタイム ATP 濃度測定法は心筋症のみならず虚血性心疾患の病態解明および治療薬剤のアッセイ系としても使える汎用性の高い簡便なモデルであり、今後あらたな創薬事業につながると期待される。

E. 結論

①cardiacMLCK の生化学的・生理学的解析を行い、

心筋収縮における cardiacMLCK およびそれと直接
相関する MLC のリン酸化レベルの重要性が明らか
になった。また、これらの解析の過程で新たな心不
全治療標的蛋白の同定にも成功した。

- ② cardiacMLCK の欠損マウスの解析により生体内で
の cardiacMLCK の活性、MLC のリン酸化レベルと
心筋収縮性の密接な相関が明らかになった。
- ③ ヒト心筋症の原因遺伝子として cardiacMLCK の突
然変異が発見され、さらにその突然変異体の活性
が低下していたことが確かめられたことにより、ヒト
心筋症の原因としての cardiacMLCK の重要性が明
らかとなった。
- ④ ヒト血中における cardiacMLCK の高感度 ELISA 系
を確立し、特定の心不全患者での上昇を確認し新
たな心不全マーカーとしての可能性を示した。
- ⑤ これらの成果により cardiacMLCK の活性および発
現を上昇させる薬剤が心不全治療に使用できる可
能性が示され、そのスクリーニングのためのアッセ
イ系の確立に成功した。

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, 147,83-94,2011
2. Mori M, Kanzaki H(8 人略) Kitakaze M: Impact of
reduced left atrial functions on diagnosis of
paroxysmal atrial volume curve determined by
two-dimensional speckle tracking, J Cardiol, 57, 89
-94,2011
3. Motoki H, Nakatani S(2 人略) Kitakaze M :
Heterogeneous contraction of the left ventricle
demonstrated by 2-dimensional strain imaging
J.Echocardiography,8,33-39,2010
4. Min K, Asakura M(7 人略), Asanuma H(1 人略)
Minamino T(5 人略) Furukawa H(1 人
略) Takashima S(1 人略) 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
5. Toh N, Kanzaki H(7 人略) Kitakaze M: Left atrial
volume combined with atrial pump function

identifies hypertensive patients with a history of
paroxysmal atrial fibrillation, Hypertension, 55,
1150-1156, 2010

6. Kato S T, Komamura K(9 人略) Asakura M(1 人略)
Kitakaze M: Cumulative Episodes of Rejection
Altered Myocardial Sarcoplasmic Reticulum
Ca²⁺-ATPase and Ryanodine Receptor-2 mRNA
Expression in Heart Transplant Recipients
International Heart Journal, 51, 259-263, 2010
7. Liao Y, Xuan W(3 人略) Asakura M(1 人略) Takashima
S, Kitakaze M: Antihypertrophic effects of
adiponectin on cardiomyocytes are associated with
the inhibition of heparin-binding epidermal growth
factor signaling, Biochem. Biophys. Res. Commun.,
393,519-525, 2010
8. Nakano A(8 人略) Asanuma H, Asakura M, Minamino T
(2 人略) Kitakaze M, Takashima S: AMPK controls
the speed of microtubule polymerization and
directional cell migration via CLIP-170
phosphorylation, Nature Cell Biology, 12, 583-590,
2010
9. Fu HY(9 人略) Asanuma H, Asakura M, Takashima S
(1 人略) Kitakaze M, Minamino T: Ablation of C/EBP
homologous protein attenuates ER-mediated
apoptosis and cardiac dysfunction induced by
pressure overload, Circulation, 122, 361-369, 2010
10. Sasaoka T(8 人略) Asakura M(10 人略) Kitakaze M:
Improved long-term performance of pulsatile
extracorporeal left ventricular assist device, J
Cardiol, 56, 220-228, 2010
11. Higo S(7 人略) Asakura M, Asanuma H(1 人略)
Minamino T, Kitakaze M, Takashima S: Isoform
-specific intermolecular disulfide bond formation of
heterochromatin protein 1 (HP1), J Biol Chem,
285, 31337-31347, 2010
12. Takahama H, Asanuma H, (5 人略) Asakura
M, Takashima S, Minamino T (2 人略) Kitakaze
M: Histamine H2 receptor blocker ameliorates
development of heart failure in dogs independently
of α -adrenergic receptor blockade, Basic Res
Cardiol, 105, 787-794, 2010

2. 学会発表

1. World Congress of the International Society for Heart
Research 2010 (2010 年 5 月・京都)
Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S,
Yamazaki S, Asakura M, Kitakaze M.
Inhalation of Hydrogen Gas Reduced Infarct Size

following Ischemia and Reperfusion in Dogs.

2. European Society of Cardiology Congress 2010

(2010年8月・スウェーデンストックホルム)

Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S,
Yamazaki S, Takashima S, Minamino T, Asakura M,
Kitakaze M. Inhalation of Hydrogen Gas Reduced
Infarct Size Following Ischemia and Reperfusion via
Mitochondrial KATP Channels in Canine Hearts.

3. 第18回日本血管生物医学会学術集会

(平成22年12月1日～3日)

高島成二、中野 敦、望月直樹、北風政史

Phosphorylation of CLIP-170 by AMPK regulates
microtubule polymerization and cell polarity.

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

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

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)は心筋細胞特異的に発現し、ミオシン軽鎖(Myosin Light Chain=MLC)をリン酸化することにより心筋の収縮性を規定している。本研究の目的は cardiacMLCK を標的とする心不全治療薬の創薬基盤を構築することである。研究分担者はいまだ不明である MLC のリン酸化から MyosinATPase の活性化にかかわる因子の同定を進めた。特に本年度は NUAK2 と呼ばれるリン酸化された MLC と相互作用するキナーゼに注目し、その MLC リン酸化における役割を詳細に検討し新たな心筋収縮制御メカニズムを明らかにした。さらに心筋細胞内において ATP 濃度をリアルタイムで測定できる細胞系を開発し、細胞内 Ca 濃度と同時測定することにより心筋収縮の細胞内 Ca 感受性を上げる薬剤のアッセイ系を確立した。このアッセイ系は心筋細胞において MLC のリン酸化レベルを上昇させる薬剤の評価に使用できると期待される。

A. 研究目的

本年度は昨年に引き続き、cardiacMLCK の心筋収縮における役割を生化学的に明らかにすると同時に cardiacMLCK を標的とする創薬開発のための新たなアッセイ系構築を目的として研究をすすめた。

B. 研究方法

1、cardiacMLCK の心筋収縮制御機構の解析

cardiacMLCK を介するミオシン軽鎖(Myosin Light Chain=MLC)のリン酸化が細胞内 Ca 濃度の変化を伴わずに心筋収縮性を上げることは証明されている。しかし、その分子機構は不明な点が多い。これまでの研究で、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。そこで 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、本年度もリン酸化 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目的で、MLC のリン酸化調節因子の同定を進めた。21 年度に 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、TNF により誘導を受けることにより活性調節を受けることまでを明らかにした。22 年度は、NUAK2 の器質の新規スクリーニングを行い NUAK2 を介する MLC のリン酸化調節機構を検討した。

器質の同定は NUAK2 で免疫沈降したうえで in vitro でキナーゼ反応を行って器質を放射線ラベルし、HPLC を使用した高分解能精製により同定するとい

う新しい手法を用いて行った。またこれと同時に NUAK2 と同じ LKB1 下流のリン酸化酵素 AMPK の心筋細胞における役割も解析した。さらにマウスの圧負荷心不全モデルである大動脈狭窄モデルあるいは心不全を呈する遺伝子改変マウスを作成し、cardiacMLCK, NUAK2, AMPK のそれぞれの病態に応じた発現様式の検討を MLC のリン酸化レベルの測定と平行しておこなった。また AMPK に関してはその活性抑制剤による心疾患に与える影響を検討するとともに精製・同定した新たな器質との間のシグナルが心臓に与える影響を詳細に検討した。

2、cardiacMLCK の活性化および MLC リン酸化を促進する薬剤のアッセイ系の確立

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、細胞を使用した蛍光アッセイ系を構築してきた。MLC のリン酸化は細胞内 Ca 濃度の変化を伴わず筋肉の収縮性を上げることが知られている。これは MLC のリン酸化により MyosinATPase が直接アロステリックにあるいは我々が同定した NUAK2 のような結合蛋白を介して間接的に調整されていることを意味する。cardiacMLCK の活性を調整するあるいは MLC のリン酸化を調整する薬剤は細胞内の Ca 濃度を変化させずに myosinATPase の活性のみを変化させ心筋収縮性を上昇させうると考えられ、Ca 濃度変化と myosinATPase の活性変化を同時検出できるアッセイ系を新規心不全治療薬剤のスクリーニング系とす

ることを考案した。

心筋においては大量の ATP が産生消費されるが、大部分の ATP は myosin ATPase で消費される。そこで心筋細胞に ATP 濃度を検出できる蛍光プローブを導入し、ATP 濃度を直接測定し心筋での Myosin ATPase 活性をアッセイする系の確立を試みた。これと、細胞内 Ca 測定プローブを合わせて導入することにより細胞内 Ca 濃度を変化させず Myosin ATPase の活性を変化させうる薬剤のスクリーニング系を確立する。

(倫理面への配慮)

動物を使用した実験は、動物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動物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、動物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飼育法の改善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や大動物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や大動物を用いてその機能解析を行う以外に有用で詳細な実験手法は存在しない。これらの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。

C. 研究結果

1、cardiacMLCK の心筋収縮制御機構の解析

心臓においては cardiacMLCK を主なシグナル経路とする MLC のリン酸化が myosinATPase の活性を制御する。この分子機構を解明するため、その中間シグナルに位置すると思われる NUAK2 の生化学的・生理学的解析を詳細に行った。まず未同定であった NUAK2 の器質の同定を生体外リン酸化酵素反応と免疫共沈降法を利用した手法で行った。その結果 NUAK2 は MLC の脱リン酸化酵素である Myosin Light Chain Phosphatase(MYPT)と強く結合し、しか

も MYPT をリン酸化することがしめされた。変異解析と質量分析を組み合わせた方法により NUAK2 による MYPT の2か所のリン酸化部位も同定し、その部位の変異解析等と組み合わせることにより NUAK2 が MYPT をリン酸化することにより活性を抑制していることが示された。すなわち MLC のリン酸化から myosinATPase の活性化を制御する機構の一環として MLC 上に存在する NUAK2-MYPT 蛋白複合体がその作用の増強機構としてはたらいっていることが示唆された。さらに NUAK2 とこれらの変異体のノックイン・ノックアウト解析により NUAK2 の活性化により心筋の収縮性が変化することを明らかにした。

さらに本年度は NUAK2 と同じ LKB1 ファミリーに属する AMPK とミオシンリン酸化シグナルの相関解析もおこなった。AMPK は myosin ATPase の活性上昇に伴う ATP 消費により上昇した AMP を感知して活性化されるリン酸化酵素である。そのため NUAK2 や MLC のリン酸化レベルとの相関が示唆される。しかし、AMPK およびその下流シグナルは不明な点が多かった。そこで心筋より AMPK の器質 CLIP-170 を新たに同定しそのシグナル解析を行った。結果、AMP により生体内で活性化された AMPK は CLIP-170 のリン酸化を通じて微小管機能の活発化を惹起し、細胞全体の代謝機能の改善に働くことが示された。これらの研究は NUAK2 や AMPK などの一種のストレス応答蛋白が、さまざまな形で細胞内のエネルギー情報に応じて活性調整され心筋細胞の代謝、収縮に寄与していることを示唆する。そこでさらにこれらの分子機構が生体内でも機能していることを示すためにマウス大動脈狭窄心不全モデルや心不全をきたす遺伝子改変マウスにおいてこれらの酵素の発現および活性変化を検討した。結果、不全心ではまず NUAK2、AMPK の活性増強が観察され慢性期にはいると cardiacMLCK の発現上昇が顕著にみられることが明らかになった。cardiacMLCK の活性増強に伴い MLC のリン酸化の上昇がみられ、心臓における MLC リン酸化レベルの生体内での調節は主に cardiacMLCK に依存することが改めて明確になった。

また研究代表者らの研究において AMPK の活性化剤が実際に心筋障害を改善することが示され AMPK シグナルの心筋保護効果も同時に明らかとなり、上記の分子メカニズムの重要性が確かめられた。

2、cardiacMLCK の活性化および MLC リン酸化を促進する薬剤のアッセイ系の確立

細胞内の ATP 濃度の測定はこれまで NMR や発光器質を用いた方法が一般的であったが、装置が煩雑であったり、細胞内 ATP 濃度に測定系そのものが影響するなど、測定系自体の問題が多くみられた。

そこで我々は、心筋細胞の ATP 濃度を簡単に、しかも細胞内 ATP 濃度に影響を与えない形で評価するため以下のような系を構築した。

大腸菌の F₀F₁-ATP synthase の ε サブユニットは ATP と特異的に結合し構造変化をきたすため ATP の濃度と構造変化が相関する。このサブユニットの両端に蛍光色素を付加した FRET プローブをアデノベクターに挿入し心筋細胞に導入した。これにより心筋細胞においてリアルタイムで ATP 濃度を測定する系が確立された。

本細胞を使用してミトコンドリアの脱共役剤や虚血などの負荷をかけることにより生理的な ATP 濃度の変化を正確に測定できた。このアッセイ系を利用して、カテコラミンの作用を調べたところ ATP 濃度の低下が観察された。しかしカテコラミンは同時に細胞内 Ca 濃度も増加させるため今回の目的である Ca 濃度の増加を伴わずに収縮性を増加させる薬剤には当たらない。そこで細胞内 Ca 濃度を同時に測定し ATP 濃度を低下させるが Ca 濃度を変化させない MLC リン酸化促進剤のスクリーニング系の確立が必要と考えられた。そこでさらに上記 ATP 感受性色素の蛍光色素の組み合わせを変化させ Fura-2 と呼ばれる Ca 濃度の測定試薬と同時導入することにより細胞内 ATP と Ca 濃度を同時測定できる系を確立した。

この細胞を利用することにより生理活性物質も含めた Ca 濃度上昇を伴わず myosin ATPase を活性化させる薬剤の簡便なスクリーニングをおこなうことが可能となった。今後スクリーニングをすすめていく。

D. 考察

細胞分裂を行わず常に大量の ATP 消費を伴う心筋細胞には特にエネルギー枯渇に対する 2 重 3 重の適応メカニズムがあることが予想される。今回明らかになったエネルギー枯渇状態および心機能の低下状態における MLC のリン酸化、cardiac MLCK の発現上昇、炎症性サイトカインによる NUAQ2 の活性化、AMP の上昇による AMPK の活性化はそれぞれが複雑に絡み合っただけでこれらの適応反応をつかさどっている。これらの生化学的基盤は心臓を対象とする創薬基盤研究に必須のものと考えられる。今後研究代表者のすすめる cardiac MLCK の活性増強を目的とする創薬研究に関する重要な成果となったと考える。

E. 結論

cardiac MLCK による MLC のリン酸化上昇を介する細胞内シグナルの解析を行い NUAQ2 と AMPK という 2 つのリン酸化酵素のエネルギー代謝、心筋収縮性に与える役割を明らかにした。また新たな MLC リン酸化状態の細胞アッセイ系を構築した。

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

英文原著

1. Hamaoka, M., Chinen, I., Murata, T., Takashima, S., Iwamoto, R., Mekada, E., Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and Diphtheria Toxin binding. *J Biochem.* 148(1) 55-69 (2010).
2. Liao, Y., Xuan, W., Zhao, J., Bin, J., Zhao, H., Asakura, M., Funahashi, T., Takashima, S., Kitakaze, M., Antihypertrophic effects of adiponectin on cardiomyocytes are associated with the inhibition of heparin-binding epidermal growth factor signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 393, 519-25.(2010).
3. Min, K.D., Asakura, M., Liao, Y., Nakamaru, K., Okazaki, H., Takahashi, T., Fujimoto, K., Ito, S., Takahashi, A., Asanuma, H., Yamazaki, S., Minamino, T., Sanada, S., Seguchi, O., Nakano, A., Ando, Y., Otsuka, T., 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).
4. Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min K-D, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration via CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 12(6), 583-590 (2010).
5. Higo, S., Asano, Y., Kato, H., Yamazaki, S., Nakano, A., Tsukamoto, O., Seguchi, O., Asai, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Minamino, T., Komuro, I., Kitakaze, M., Takashima, S. Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1). *J Biol Chem.* 285, 31337-47 (2010).
6. Fu, H.Y., Okada, K., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., Sawada, T., Okuda, K., Asano, Y., Sanada, S., Asanuma, H., Asakura, M., Takashima, S., Komuro, I., Kitakaze, M., Minamino, T., Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation.* 122, 361-9.(2010).

邦文総説

1. 高島成二:心臓のカルシウム動態,症例に生かす心機能評価,22-25, 2010
2. 高島成二:心筋ミオシンのリン酸化・活性化と心機能制御,Annual Review 循環器 2010, 16-21, 2010

2. 学会発表

第18回日本血管生物医学会学術集会

(平成22年12月1日～3日)

高島成二、中野 敦、望月直樹、北風政史

Phosphorylation of CLIP-170 by AMPK regulates
microtubule polymerization and cell porality.

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

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 南野哲男 大阪大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨

cardiacMLCK は研究代表者により発見された心臓特異的キナーゼであり、心不全の病態と密接に相関してその発現が調整される。cardiacMLCK は MLC をリン酸化することにより何らかの分子機構により心筋収縮性を上げることから新しい強心剤としての可能性も示唆される。本研究は cardiacMLCK の創薬基盤を築くための分子の生化学的・生理学的解析を目的とする。研究分担者は実地臨床において多くの心不全患者を診療する中で心筋細胞における ER ストレスに注目し、心不全における病的役割を検討してきた。本年度も ER ストレスと cardiacMLCK の発現機構の分子相関および重症心不全および家族性心筋症の家系の集約と遺伝子解析等を行った。

A. 研究目的

cardiacMLCK の心不全における著明な発現上昇は低下した心筋収縮性に対する一種のストレス応答と考えられるが、その発現を規定するシグナルメカニズムは不明である。cardiacMLCK を創薬標的とする際には、その発現メカニズムの解析は重要である。研究分担者は主に心不全に伴って負荷される ER ストレスを中心に cardiacMLCK の発現調整機構の解析を行った。

B. 研究方法

1. 心筋細胞に対する ER ストレス負荷と cardiacMLCK の発現解析

心不全におけるストレス負荷と cardiacMLCK の発現との相関を解析するためにタプシガルギンを加えることにより ER ストレスを加え、cardiacMLCK の発現解析を行った。さらに ER ストレスに対する特異性は低い低酸素、酸素ラジカルなどの細胞負荷を加え cardiacMLCK の発現状況および MLC のリン酸化を検討した。

2. 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ミ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ミ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、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)

動物を使用した実験は、動物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動物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、動物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飼育法の改善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や大動物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や大動物を用いてその機能解析を行う以外に有用で詳細な実験手法は存在しない。これらの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。

またヒト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. 心筋細胞に対する ER ストレス負荷と cardiacMLCK の発現解析

ラット培養心筋細胞における cardiacMLCK の発現および MLC のリン酸化を通常培養で検討した。培養条件によって cardiacMLCK は鋭敏にその発現が上下し MLC のリン酸化とともに非常に不安定であることが明らかになった。これは培養心筋細胞が毎回初代培養細胞を使用すること、細胞の播種の仕方によって拍動の程度が異なることに起因すると思われる。その中でも ER ストレス負荷(タプシガルギン投与)によって、ER ストレスのマーカーである heat shock protein や CHOP の発現上昇は薬剤の容量依存性に増加し、ER ストレスが再現性よく起こっていることが示されたが cardiacMLCK の発現および MLC のリン酸化は低下した。また血清やカテコラミン、アンジオテンシン II などの刺激によっては cardiacMLCK の発現量の軽度の増加と MLC のリン酸化上昇が観察された。

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 cardiacMLCK の commonSNP 以外の変異は同定できなかった。

D. 考察

cardiacMLCK の発現は急性のストレス障害(虚血、圧負荷等)では誘導されないことが *in vivo* の実験でも示されている。我々の系でも急性の ER ストレスに応答して cardiacMLCK が誘導されることはないことが明らかとなった。cardiacMLCK が慢性の心不全においてのみ強く発現誘導がかかることは従来の心不全マーカーとは異なる発現誘導メカニズムが存在することを示唆し大変興味深い。cardiacMLCK 活性上昇は MLC のリン酸化を介して心筋収縮性を上昇させることが知られており、その独自の発現誘導メカニズムを明らかにすれば間接的に MLC のリン酸化を上昇させ心筋収縮性を上げることが可能になると思われ新たな心不全治療薬の標的となると期待される。

E. 結論

cardiacMLCK の発現様式は従来のストレス刺激とは異なる独自のシグナル経路を介することが示され、そのシグナルの解明による新しい心不全治療への手がかりとなる可能性が示唆された。

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. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T.: Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload, *Circulation*, 2010 Jul 27;122(4):361-9. Epub 2010 Jul 12.
2. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M: Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease, *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1071-82. Review.

2. 学会発表

- 第33回心筋代謝研究会 YIA
ER stress regulates BNP through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes.
澤田玉季、小室一成、北風政史、南野哲男
第14回日本心不全学会学術集会 YIA
小胞体発信アポトーシスシグナル CHOP 遺伝子欠失マウスでは圧負荷による心肥大・心不全が抑制される
富海英、小室一成、北風政史、南野哲男

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

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 朝倉正紀 国立循環器病研究センター 室長

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。本年度は cardiacMLCK の遺伝子改変マウスが完成したためその解析を行い生体内での cardiacMLCK の重要な役割を明らかにした。さらに心不全患者家系に cardiacMLCK の変異を見だし、ヒトでも cardiacMLCK の活性低下が心不全の原因となることを示した。

A. 研究目的

本年度は 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、cardiacMLCK の遺伝子改変マウスの解析を行った。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もしくは SNP の検索についてもこれを行い発見された変異についてその生化学的解析をおこなった。これらの実験を通して、cardiacMLCK を中心とした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 遺伝子欠損マウスの作製

cardiacMLCK の欠損マウスの作成においては、キナーゼドメインをコードする領域の上流の exon を lox 配列にはさみ Cre recombinase で処理することにより酵素活性のない個体ができるように遺伝子構造改変を行った。Cre recombinase を発現するマウスと掛け合わせて遺伝子領域を lox out した遺伝子改変マウスを作製した。ほぼ12週まで正常発生が見られたため、8週において心機能、組織所見の評価、およびMLCのリン酸化レベルの評価を行った。

2. 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)

動物を使用した実験は、動物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動物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、動物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飼育法の改善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や大動物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や大動物を用いてその機能解析を行う以外に有用で詳細な実験手法は存在しない。これらの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。

またヒト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 遺伝子欠損マウスの解析

cardiacMLCK の欠損マウスはヘテロで約半分、ホモにおいてほぼすべての cardiacMLCK の発現抑制がみられた。またこの cardiacMLCK の発現量と強い相関をもって MLC のリン酸化レベルの低下が観察された。このことは MLC の心筋細胞内でのリン酸化レベルは cardiacMLCK の発現量に強く依存することを示唆する。さらに cardiacMLCK を欠損したマウスは心重量の増大、心筋収縮性の低下などヒト心筋症と類似した表現型を示した。この結果は cardiacMLCK の活性と心不全の病態との相関を示唆し、cardiacMLCK の活性調整による心不全治療の可能性を示す新たな証拠となった。

2. cardiacMLCK およびその関連分子の変異もし

くは SNP の検索

家族発症症例を中心に 22 年度に心筋症の家系において cardiacMLCK の突然変異が同定された。家族発症例に発見された SNP でない突然変異は本症例にて 2 例目となった。これらの突然変異は 2 例とも cardiacMLCK のアミノ酸変異をきたしていたため双方の変異 cardiacMLCK のリコンビナント蛋

白を合成し活性測定を行った。結果、2 家系のうち 1 家系にみられた変異をもつ cardiacMLCK が変異を持たない酵素に比し約 70% の活性しか持たないことが示された。このことは cardiacMLCK の欠損マウスの解析結果と合わせて cardiacMLCK の活性低下がヒト心筋症の原因となりうることを明確に示した。SNP も同時に解析を行ったが心不全の病態と相関する SNP およびハプロタイプは今回同定不可能であった。ヒト心筋症の原因としての cardiacMLCK の重要性が明らかとなったことで今後も心筋症症例において cardiacMLCK の遺伝子解読を行うことは臨床的に意義深いと考えられる。またこれらの変異がみられた症例に関しては独自の有効な治療法が確立できると考えられる。

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、ヒトを含めた哺乳類における cardiacMLCK の心筋収縮における重要な役割が明らかになった。

E. 結論

cardiacMLCK の遺伝子欠損マウスにおいて MLC のリン酸化レベルの低下に平行して心機能の低下が観察された。またヒト家族性心筋症症例において cardiacMLCK の変異が発見され、変異による cardiacMLCK の活性低下が観察された。

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. Min K, Asakura M (7 人略) Asanuma H (1 人略) Minamino T (5 人略) Furukawa H (1 人略) Takashima S (1 人略) 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

2. 学会発表

報告事項なし

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