

201007004B

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20～22年度 総合研究報告書

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20～22年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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
- 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 変更の可能性あり

- Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium43
Biochemical and Biophysical Research Communications 2010,393,55-60
- Left atrial volume combined with atrial pump function identifies hypertensive patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation49
Hypertension 2010,55, 1150-1156
- AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration via CLIP-170 phosphorylation56
Nature Cell Biology 2010,12,583-590
- Ablation of C/EBP homologous protein attenuates ER-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload64
Circulation 2010,122,361-369
- Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 ...73
J Biol Chem 2010,285,31337-31347
- A histamine H₂ receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of β -adrenergic receptor blockade84
Basic Res Cardiol 2010,105,787-794
- Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure92
Journal of the American College of Cardiology 2010,53,2070-2077
- Prolonged targeting of ischemic/ reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats100
Journal of the American College of Cardiology 2009,53,709-717
- Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition109
Cardiovasc Res 2008, 79, 600-610
- Activation of ecto-5'-nucleotidase in the blood and hearts of patients with chronic heart failure120
Journal of Cardiac Failure 2008, 14, 426-430
- Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease125
Circ Res 2010,107,1071-1082

X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel
AP1/CRE-like element in cardiomyocytes137
J. Mol. Cell. Cardiol 2010,48,1280-1289

Global gene expression profiling in the failing myocardium.....147
Circ J 2009, 73, 1568-1576

Spirolactone use at discharge was associated with improved survival in
hospitalized patients with systolic heart failure156
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)

総合研究報告書

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して開始された。その成果として、最終年度までに cardiacMLCK およびそれに関する蛋白を心不全治療薬の標的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を作製し、その解析により 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。さらにヒト心不全症例における cardiacMLCK およびその関連遺伝子の変異解析により、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。これらの研究結果を踏まえ生体外、生体内でのアッセイ系を新たに確立し cardiacMLCK の活性を制御する薬剤の評価系を作成し薬剤効果を検討した。さらに心不全の診断マーカーへの応用を図るために cardiacMLCK の高感度血中濃度測定法も確立し心不全患者血清での濃度測定を行った。結果、一部の心不全患者血清において上昇がみられ、特定の心疾患病態を反映する診断マーカーとしての可能性が示された。さらに cardiacMLCK の創薬基盤につながる研究成果として、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。これら多方面の研究により cardiacMLCK を中心とする創薬基盤研究は、ほぼ当初の目的を到達できたと考える。

また、本研究と時を同じくして2011年に MyosinATPase の活性を直接上げる薬剤(Osmecative mecabile)の臨床試験が phaseII に入り、心不全に対する顕著な有用性が大きな注目を集めた。細胞内 Ca を上昇させずに直接収縮性を変化させる発想は本研究と全く同一であり、cardiacMLCK の活性増強剤に対する期待は最終年度に入り一層高まった。さらに心不全によって上昇する cardiacMLCK を標的とする本研究の目指す心不全治療薬は発現変化の少ない MyosinATPase を標的とする Osmecative mecabile より優れた心不全の治療薬となる可能性を秘めており、今後もその活性増強剤を産学連携で進めていく所存である。

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
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

小室一成

千葉大学大学院医学研究院
教授
(現、大阪大学大学院医学系研究科 教授)
(平成 20,21 年度)

金 智隆

国立循環器病研究センター
医師
(現、同 客員研究員)
(平成 20 年度)

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、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ため、MLC のリン酸化調節因子の同定をおこなった。20 年度よりリン酸化 MLC の結合蛋白の同定を積極的に行い、21 年度に MLC のリン酸化を制御する新たな因子として NUA2 というリン酸化酵素を同定した。22 年度には、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 NUA2 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 NUA2 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 NUA2 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シング心不全モデル、虚血心不全モデルなどを作成し、cardiacMLCK, NUA2, 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

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。そこで、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繰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)。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週まで正常発見が見られたため、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。そこで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。全年度にわたってその感度および特異性を上げるため、器質ペプチドの改良等をおこなった。このアッセイ系を利用して、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 NUAQ2 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ると考えられ、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

cardiacMLCK の血中濃度測定のための高感度測定系を作成するために全年度にわたってヒト cardiacMLCK モノクローナル抗体の作成を行った。抗原は哺乳類細胞に強制発現させた全長 cardiacMLCK の粗精製蛋白を利用し、30種以上のモノクローナル抗体が得られた。これの抗体を用いて高感度検出系を構築し、施設の倫理委員会の承認をえて採集した患者血清において血中 cardiacMLCK の濃度を検討し、病態との相関、従来の心不全や心筋梗塞の診断マーカーとの比較解析を行った。

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 検索を行い、ヒト心不全の病態と cardiacMLCK 遺伝子変異の相関解析を行った。

(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

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因子の研究を全年度にわたって積極的にすすめた、20 年度より様々な生化学的手法を用いてリン酸化 MLC と相互作用する因子の同定をおこなった。その過程で 21 年度には MLC のリン酸化体に直接結合する蛋白として NUAK2 という新規のリン酸化酵素を同定するにいたった。NUAK2 は TNF など炎症性サイトカインにより誘導を受けることにより活性制御される特徴あるリン酸化酵素であり、心不全の初期に心筋より分泌される TNF により活性制御されていることが示唆された。このことは NUAK2 が心不全の初期応答蛋白として MLC のリン酸化に関与することを強く示唆する。そこで 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この 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こと

により NUA2 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 NUA2-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 NUA2 の発現制御により心筋の収縮性が変化すること、NUA2 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、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やイヌペースング心不全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 NUA2、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。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 NUA2 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、NUA2 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

① cardiacMLCK 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。

② MLC リン酸化促進剤のスクリーニング

大腸菌の FOF1-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

作成した30種のモノクローナル抗体を元に高感度 ELISA の確立を行った。まず MLCK には cardiacMLCK と配列の類似した smooth muscle MLCK (MLCK2), skeletal muscle MLCK (MLCK1) が存在するため cardiacMLCK とのみ選択的に結合し、反応性の強い抗体 10 種を選択し、さらにサンドイッチ検出系において感度の良好な抗体ペアの選択を行った。検出系として当初はアクリジニウムエステルを使用していたが 21 年度途中よりアルカリフォス

ファクターゼを使用することにより高感度で測定レンジの広い系の構築が可能となった。その他ブロッキング剤の検討、固相抗体量の最適化、一次反応および二次反応の最適化、標識抗体の最適化など多くの工夫を加え全年度にわたって検出系の高感度化をおこなった。結果、報告書作成時現在での最小検出感度は 180pg/ml (2fmol/ml) である。さらに過剰量の競合抗体添加による阻害実験により心不全患者血清において 86%の阻害がかかったことにより、ある程度の cardiacMLCK が血中に流出していることが強く示唆された。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。そこで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新鮮血清内の cardiacMLCK の濃度測定を行った。結果、心筋梗塞および重症心不全患者において血中濃度が特異的に上昇する個体が見られた。これらの値は従来の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た。

② 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 検索を倫理委員会の承諾のもとに行った。100 例あまりの心不全孤発例を対象とした SNP 検索では心不全と有意な相関を示す cardiacMLCK の exon および intron の SNP およびハプロタイプは検出できなかった。しかし、心筋症の家系において cardiacMLCK の突然変異が 2 例同定された。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。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。全年度にわたる検討の末 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。本研究により確立された 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

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相関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、

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NUAK2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。
- ②cardiacMLCK 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
後頁参照
- 2、学会発表
別添報告参照

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)
総合研究報告書

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一貫してすすめてきた。特に 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、MLC のリン酸化を促進する新規強心剤のスクリーニング系の確立に貢献した。同時に cardiacMLCK 遺伝子欠損マウスの作成・解析および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 の検索を行った。

A. 研究目的

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行う。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・解析を研究代表者と共同で行った。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 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。本研究で、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

解析を行うため、MLC の燐酸化調節因子の同定をおこなった。20 年度よりリン酸化 MLC の結合蛋白の同定を積極的に行い、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た。22 年度には、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の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。また20年度より研究代表者とともに cardiacMLCK の遺伝子改変マウスの作成を行った。

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。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うると考えられ、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MyosinATPase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。

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)

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 の心筋収縮制御機構の解析

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因子の研究を全年度にわたって積極的にすすめた。20 年度より様々な生化学的手法を用いてリン酸化 MLC と相互作用する因子の同定をおこない、21 年度には MLC のリン酸化体に直接結合する蛋白として NUAK2 という新規のリン酸

化酵素を同定した。NUAK2 は TNF など炎症性サイトカインにより誘導を受けることにより活性制御される特徴あるリン酸化酵素であり、心不全の初期に心筋より分泌される TNF により活性制御されていることが示唆された。すなわち心不全の初期応答蛋白として MLC のリン酸化に関与することが強く示唆された。

さらに 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この 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。これらの結果より、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 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、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やイヌペース心不全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。

cardiacMLCK の遺伝子改変マウスにおいては cardiacMLCK の発現量低下と平行して MLC のリン酸化レベルの低下および心収縮性の低下が観察され、生体心の収縮性における cardiacMLCK の重要

性が改めて示唆された。

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 感受性プローブ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。

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

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

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、cardiacMLCKの発現上昇、炎症性サイトカインによるNUAK2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cardiacMLCK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

cardiacMLCK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NUAK2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
後頁参照

2、学会発表
別添報告参照

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)
総合研究報告書

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。研究分担者はユビキチン・プロテアソームシステム系が cardiacMLCK の発現低下に関与すること、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. 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. 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。

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、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 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、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(タプシガルゲン投与)によって、ER ストレスのマーカーである heat shock protein、CHOP の発現上昇、さらに XPB1 のスプライシング産物の増加等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き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。

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 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ตอบสนอง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。これらの分子機構のなかでユビキチンプロテアゾーム系や ER ストレスがそのシグナル機構に関係することが

明らかとなった。

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

後頁参照

2. 学会発表

別添報告参照

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

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
総合研究報告書

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

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiacMLCK)はその心臓への限局した発現と疾患の重症度に関連した発現変化より注目され発見された分子である。その特異的な発現様式とミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化をきたすという特徴から心不全の創薬標的となりうると考えられた。本研究は 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。研究分担者は cardiacMLCK の生化学的解析から遺伝子改変マウスの作製・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。これらの事実は cardiacMLCK を心不全の創薬標的として研究を進めるうえで重要な発見となった。

A. 研究目的

cardiacMLCKを活性増強させることによる心不全治療を目的として、その生化学的解析およびマウスおよびヒトにおける生体内での機能解析を行う。

B. 研究方法

1. 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。そこで、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)。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。