

令和元年6月14日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04826

研究課題名(和文) 虚血性心疾患における心筋特異的ミオシン軽鎖およびリン酸化の意義とその治療への展開

研究課題名(英文) The role of myosin regulatory light chain phosphorylation in heart diseases

研究代表者

北風 政史 (KITAKAZE, Msafumi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究開発基盤センター・部長

研究者番号：20294069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素によって培養心筋細胞のミオシン調節軽鎖(MLC2v)のリン酸化が低下すること、イヌの高頻度ペースング心不全でもMLC2vのリン酸化が低下することを証明した。また、MYLK3遺伝子変異によるcMLCK蛋白質の部分欠損によりcMLCK活性が低下してヒトの心不全の原因となることを証明した。さらにcMLCKを標的とした創薬を目指してcMLCKに特異的に結合する擬天然ペプチドを8種類同定し、そのうち1つでcMLCK特異的に活性を阻害することが確認した。しかし活性を増加するペプチドは獲得できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の重要な原因である虚血および低酸素によりミオシン調節軽鎖(MLC2v)のリン酸化が低下すること、そして大動物心不全モデルでも心筋細胞のMLC2vリン酸化が低下することを証明したことは心不全の病態発症の新しい機序を解明したという点で意義が高い。さらに、cMLCK活性の低下がヒトにおいても実際に収縮性心不全の原因になることを証明できたことは、実臨床においても極めて意義深く、収縮性心不全の新しい治療標的としてcMLCKが注目される研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia significantly decreased the level of MLC2v phosphorylation in cultured neonatal cardiac myocytes. Canine failing hearts induced by high-frequency pacing also showed decreased level of MLC2v phosphorylation. Importantly, we identified the familial dilated cardiomyopathy associated with MYLK3 mutation. This truncating mutant cMLCK completely lacks the kinase activity, although it did not affect wild-type cMLCK activity. These results indicated that the depressed cMLCK kinase activity was associated with significant decrease in MLC2v phosphorylation and possibly with development of DCM in human. Finally, we tried to develop the specific modulators of cMLCK activity and identified 8 pseudo-peptides which can bind to cMLCK specifically with high affinity. We checked the effects of the 8 pseudo-peptides on the cMLCK activity and found that only one pseudo-peptide specifically inhibited cMLCK activity. However, we could not get the pseudo-peptide that can activate cMLCK.

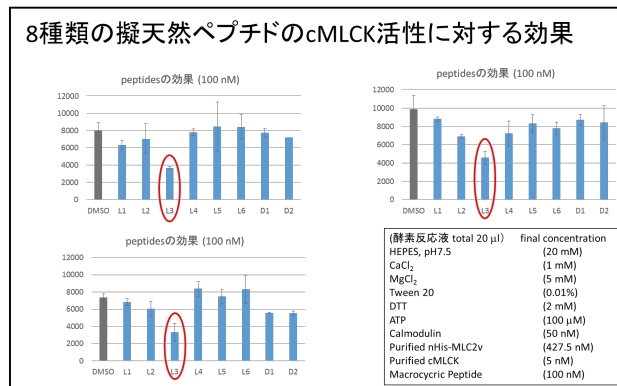
研究分野：循環器内科学・分子生物学

キーワード：循環器・高血圧 虚血性疾患 心筋梗塞 心筋保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全(CHF)を有する症例は、国民の高齢化に伴い増加しており、その重症度は年々悪化しているため、医学のみならず社会的問題と認識されつつある。その理由として、1) CHFの原因は、心筋梗塞などの虚血性心疾患と、



高血圧・弁膜症・遺伝的・免疫的負荷による非虚血性心疾患に大別されるが、虚血性心疾患に起因する心不全は、非虚血性心疾患に起因する心不全と比して予後が悪いといわれていること、2)近年、高齢化・動脈硬化に起因する虚血性心疾患症例が増加していること、3)近年、従来の受容体遮断を中心とする薬物療法に代わる新たな薬物治療の開発はなく、従来の薬物による心不全治療が限界にきていること、が挙げられる。CHFの主な原因は、心筋梗塞に代表される虚血

性心疾患であるため、CHF 抑制には、発症後の心機能低下を助長する心筋壊死・心臓リモデリング抑制が重要である。

本申請者は、2007年にヒト不全心筋の網羅的遺伝子発現解析より心筋型ミオシン軽鎖リン酸化酵素(cMLCK)を発見した(J Clin Invest 2007; 117: 2812-2824)。cardiac-MLCKによるミオシン軽鎖(MLC2v)リン酸化はサルコメア構造構築に関与することから、cardiac-MLCK活性化が心筋代謝・サルコメア構造構築を介して、心筋梗塞サイズ縮小・リモデリング抑制・心不全抑制に関与すると考え、本研究を着想した。さらに近年、ミオシンATPaseの活性化剤omecantivmecarbilが開発され、収縮性心不全の臨床試験が実施されている。このことは、心筋収縮の基本単位であるサルコメア構造に働きかける薬剤の重要性が認識されてきたと考えられる。

2. 研究の目的

cMLCKは心筋代謝・収縮と強く連関することから、本研究はcMLCK-ミオシン軽鎖リン酸化シグナルと、虚血性を含む心不全におけるリモデリングとのかかわりを心筋代謝・収縮の観点から検討することを目的とした。これまで、cMLCKと不全心とのかかわりについて検討した報告は世界に類がなく、本研究は、基礎医学的にも、臨床応用の観点からも極めて革新的なものと考えられる。さらに、サルコメア構造に働きかける薬剤候補として、cMLCKの活性を制御する創薬シーズペプチドの開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 培養心筋細胞での低酸素刺激に対するMLC2vリン酸化の影響の検討

培養新生仔ラット心筋細胞に対して、低酸素刺激を与えて、cMLCKの基質であるMLC2vのリン酸化の変化を調べる。低酸素刺激は、これまでの経験から1%酸素、30分とする。

2) cMLCK特異的活性制御ペプチドの開発

RaPIDシステムに使用するためのcMLCKを精製する。精製したcMLCKを用いて擬天然特殊ペプチドライブラリーからcMLCKに特異的に結合する擬天然ペプチドを同定する。同定したペプチドを用いてcMLCK活性を制御する活性がないかをcMLCK assayで検討する。cMLCKを活性化するようなペプチド・薬剤の開発を進めることにより、心疾患の心筋保護に関する基礎研究をおこなう。

3) イヌ不全心でのMLC2vリン酸化状態の検討

不全心におけるMLC2vのリン酸化状態を検討するため、イヌの高頻度ベising心不全モデルを作製する。心エコー検査にて心不全に進展したことを確認後に左心室組織を採取して、リン酸化等の検討を行う。

4) MYLK3遺伝子変異によるヒト拡張型心筋症におけるcMLCK活性の検討

cMLCKをコードするMYLK3の変異を原因とする拡張型心筋症家系をこれまでに同定している。この遺伝子変異によるcMLCK活性の変化や心不全発症の機序について検討を行う。

4. 研究成果

1) 培養心筋細胞における低酸素刺激に対するMLC2vのリン酸化

培養心筋細胞に低酸素刺激(1%酸素、30分)を与えて、MLC2vのリン酸化状態を調べたところ、リン酸化レベルが低下していた。

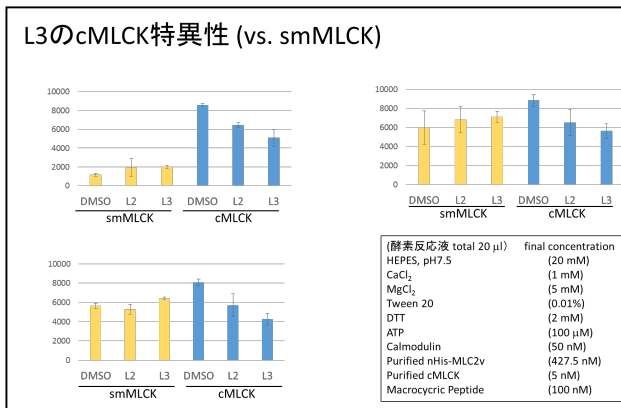
2) cMLCKの特異的活性制御ペプチドの開発

東京大学の菅教授が開発したRaPIDシステムを用いて、 10^{13} の多様性を有する擬天然特殊ペ

プチドライブラリーから cMLCK に特異的に結合する擬天然ペプチドを RaPID システムにて 8 種類同定した。この 8 種類のペプチドについて、cMLCK 活性に対する効果を測定するために in-vitro cMLCK 活性測定系を確立した。評価の方法は ADP-Glo 法で行った。

左図に示す通り、L3 ペプチドにおいて cMLCK の活性阻害作用を認めた。残念ながら、cMLCK 活性を賦活する作用を有するペプチドは同定できなかった。

次に、L3 ペプチドの cMLCK 特異性を調べるために smMLCK に対する作用を評価した。評価の方法は smMLCK と MYL9 を用いたキナーゼ反応に対する L3 ペプチドの効果を ADP-Glo 法で測定した。上図の通り、L3 ペプチドは smMLCK に対する活性阻害作用を示さなかった。以上より、RaPID システムを用いて同定された L3 ペプチドは、cMLCK 特異的に活性阻害作用を有する擬天然特殊ペプチドであることが明らかになった。近年、心筋収縮性を減弱する低分子化合物が遺伝性肥大型心筋症の治療薬と成り得る可能性を示す報告が散見される。この L3 ペプチドも cMLCK 活性阻害を介して心筋収縮性を減弱させる可能性があり、今後は L3 ペプチドも薬剤候補ペプチドと成り得る可能性が考えられる。今後は薬剤への応用を想定して L3 ペプチドの細胞膜透過性の評価を行う。細胞膜透過性が認められない場合は、細胞膜透過性ペプチドなどの付加を行っていく。さらに、cMLCK の共結晶構造解析を行う予定である。



3) イヌ心不全モデルでの MLC2v のリン酸化

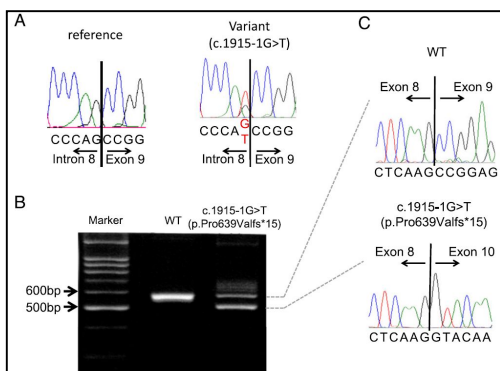
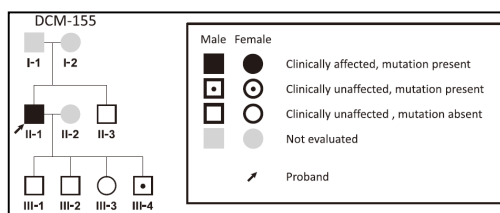
イヌの高頻度ペースング心不全モデルを作製した。右総頸静脈よりペースングリードを挿入して、240ppm で 5 週間 ~ 6 週間のペースング刺激を行った。ペースング終了後の心エコー検査にて左心室の拡大と左室駆出率 (EF30 ~ 40%) の著明な低下を確認した。左心室の心筋組織を採取して、phos-tag PAGE による MLC2v リン酸化の程度の観察を行ったところ、正常心と比較して、不全心において有意にミオシン調節軽鎖のリン酸化が低下していることが判明した。

有意にミオシン調節軽鎖のリン酸化が低下していることが判明した。

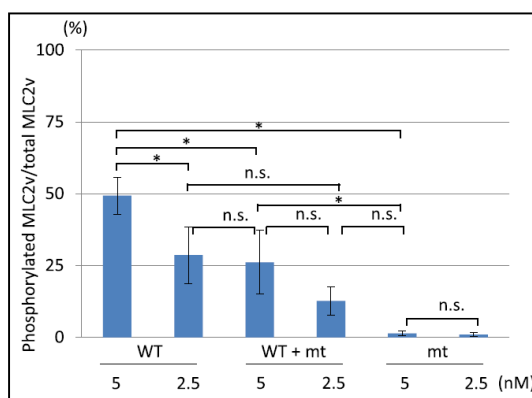
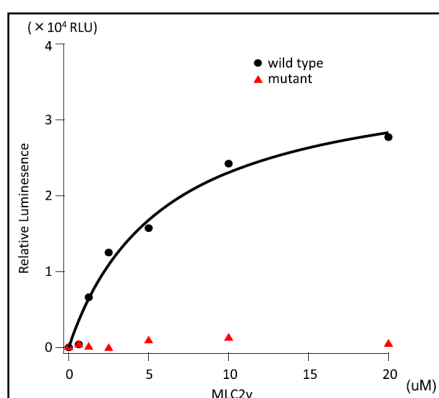
4) ヒトの遺伝性拡張型心筋症における MYLK3 変異の同定

拡張型心筋症を家族性に発症する患者および近親者のエクソーム解析を実施した結果、MYLK3 (心臓特異的 MLCK) の遺伝子変異が原因遺伝子として考えられる家系を同定した。

本遺伝子変異は MYLK3 遺伝子の exon 9 の splicing acceptor 部位の一塩基変異による exon skipping のため、MYLK3 mRNA のアミノ酸読み取り枠のずれを生じ (out of frame) mRNA 上にストップコドンが新たに出現して MYLK3 合成が翻訳途中で停止して、酵素活性部位が途中から欠損した MYLK3 が合成されていた (truncating mutation)。



この truncating mutation を有する cMLCK のキナーゼ活性を完全に喪失していたが、野生型 cMLCK のキナーゼ活性には影響しないことから、心筋症発症の機序としてはハプロ不全が考えられた。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hodatsu Akihiko, Fujino Noboru, Uyama Yuki, Tsukamoto Osamu, Imai Okazaki Atsuko, Yamazaki Satoru, Seguchi Osamu, Konno Tetsuo, Hayashi Kenshi, Kawashiri Masaaki, Asano Yoshihiro, Kitakaze Masafumi, Takashima Seiji, Yamagishi Masakazu

Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy

ESC Heart Failure、査読有、6巻、2019、406-415

DOI : 10.1002/ehf2.12410

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等、該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：瀬口 理

ローマ字氏名：SEGUCHI, Osamu

所属研究機関名：国立循環器病研究センター

部局名：病院

職名：医長

研究者番号(8桁)：60570869

研究分担者氏名：山崎 悟

ローマ字氏名：YAMAZAKI, Satoru

所属研究機関名：国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：室長

研究者番号（8桁）：670348796

(2)研究協力者

伊藤 慎（ITO, Shin）

今津 美樹（IMAZU, Miki）

福田 弘毅（FUKUDA, Hiroki）

櫃本 竜郎（HITUMOTO, Turo）

中島 友里（NAKAJIMA, Yuri）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。