

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15366

研究課題名(和文) 骨格筋型ミオシン軽鎖キナーゼをターゲットとした新規筋弛緩薬の開発

研究課題名(英文) Development of the specific inhibitor for skeletal muscle myosin light chain kinase

研究代表者

大矢 良平(Oya, Ryohei)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50728053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(skMLCK)によるミオシン制御軽鎖のリン酸化は骨格筋の収縮を修飾する重要な分子機構であり、skMLCKの作用を調整することで筋収縮力増加もしくは減少作用があると考えられる。本研究では東京大学低分子化合物フルライブラリを用い、数十の阻害薬と12の活性化剤の発見した。またSODマウス(家族性筋萎縮性側索硬化症モデルマウス)に、AAV6を用いてskMLCKの遺伝子導入を行い筋収縮力の増加を確認することに成功した。特に強縮刺激時には大きな筋収縮力増強効果を見ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋収縮力に異常をきたす疾患は多く存在する。脳梗塞後の痙縮では筋収縮の亢進が、神経筋疾患では低下がみられるが、それらには有効な治療薬が存在しない。本研究では、skMLCKの作用を活性化、もしくは阻害することでこれらの疾患の治療につながる可能性が示唆された。また治療薬を開発するうえで活性化剤、阻害剤の候補となる低分子化合物の同定に成功した。これらの化合物の解析を進めることで新規治療薬の開発へとつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The muscle disease is hard to treat and the development of a new medicine is necessary to improve muscle function. The phosphorylation of myosin regulatory light chain by skeletal muscle myosin light chain kinase (skMLCK) is important for muscle contraction. To activate or inhibit skMLCK may induce to increase or reduce the force produced by skeletal muscle, respectively.

In our present study, we performed the high throughput screening for skMLCK activator or inhibitor using Tokyo university low molecular weight compounds full library. And we finally found the 106 candidates of activator and 12 candidates of inhibitor. Furthermore, we constructed the measurement system of muscle force, and successfully showed that the skMLCK gene transfer using adeno associated vector induced the increment of muscle force in SOD mouse (which is the model mouse of amyotrophic lateral sclerosis).

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科学

キーワード：骨格筋型ミオシン軽鎖キナーゼ 化合物スクリーニング 酵素活性測定 筋萎縮性側索硬化症 神経筋疾患

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や外傷後の筋痙縮は患者の ADL と健康寿命を著しく低下させる。筋痙縮は中枢性の収縮シグナルの持続的増強が主病態と言われているが、従来の薬物治療には効果が強く副作用が強い末梢性筋弛緩薬と、効果が弱く選択性のない中枢性筋弛緩薬しかなく、患者や家族、医療従事者の負担を増やす要因となっている。末梢の筋組織の収縮亢進が筋痙縮の本態であり、その分子機構を標的とする特異的薬剤であれば末梢性筋弛緩をもって病態改善が望める。

筋収縮力の低下を起こす疾患も治療法が乏しく社会的な課題である。特に、神経筋疾患は理学療法以外に有効な治療法は存在しない。現在遺伝子治療を含め新規治療法が模索されており、筋収縮力を増強させるような新規の筋収縮薬の開発が求められている。

本研究において、我々が創薬の標的に設定した骨格筋特異的ミオシン軽鎖キナーゼ (skMLCK) はミオシン制御軽鎖 (MYLPF) をリン酸化しアクチン-ミオシンの結合力を上げ、骨格筋収縮を制御している。skMLCK を標的とする薬剤を開発できれば筋収縮力に異常をきたす疾患の治療が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

(1) skMLCK による骨格筋収縮力の変化

本研究の一つ目の目的は skMLCK の作用により実際に筋収縮力に変化が生まれるかを調べることである。この前提を解明することができれば、skMLCK の活性を修飾するような薬剤の開発が、疾患治療に結び付くと考えられる。

(2) skMLCK の阻害剤・活性化剤の同定・開発

skMLCK の阻害剤は筋収縮力を低下させる可能性があり、こういった薬剤は筋痙縮を緩和することができる、新規筋弛緩薬として臨床応用可能であると考えられる。また skMLCK の活性化剤は、神経筋疾患患者などの全身の骨格筋の収縮性を増強することができると考えられる。こういった薬剤によってリハビリ効果を促進し、患者の QOL を改善し、家族や医療従事者の介護による負担を軽減し、医療経済的問題も解決することができると考えられる。

3. 研究の方法

(1) skMLCK による筋収縮力の変化

・筋収縮力測定系の構築

小動物 (マウスまたはラットの下肢筋) による収縮性評価系を確立する。小動物の下肢筋を摘出、もしくは生体内で直接張力トランスデューサーに接続し収縮力を測定する系を確立する。

・AAV6 を用いた skMLCK の遺伝子導入システムの構築

AAV6/eGFP-T2A-skMLCK を大量精製し培養細胞およびマウス筋肉組織への skMLCK 遺伝子の導入を試みる。この際モデルマウスとして SOD マウス (筋萎縮性側索硬化症モデルマウス) を用い筋収縮力が改善するかを評価する。

(2) skMLCK の活性を修飾する低分子化合物の同定

・High Throughput Screening (HTS) システムの構築

精製した skMLCK と MYLPF を用いて 1536-well および 384-well プレートによる HTS 系の確立を行う。Z prime > 0.6、%CV < 5%、S/B ratio > 2 の系を構築する。

・HTS の実施

東京大学フルライブラリの低分子化合物を利用して、skMLCK を活性化する低分子化合物に対する HTS を実施する。

・カウンターアッセイの実施

平滑筋型ミオシン軽鎖キナーゼ (smMLCK) および心筋型ミオシン軽鎖キナーゼ (cMLCK) に対するカウンターアッセイを ADP-Glo 法および phos-tag PAGE 法を用いて実施する。

4. 研究成果

(1) skMLCK 遺伝子導入による筋収縮力の変化 (Proof of Concept の確立)

まず骨格筋収縮力測定系を作成し、ex vivo で摘出筋の筋収縮力が測定可能であることを確認した。筋収縮測定には長趾伸筋を用い、tendon-to-tendon で摘出した筋をトランスデューサーに接続し行う。

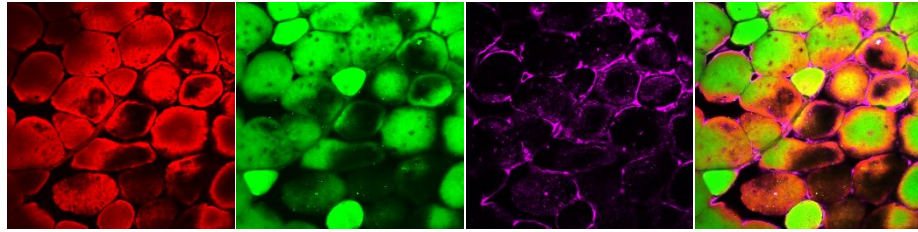
・AAV6/eGFP-T2A-skMLCK の培養細胞への感染

AAV6 を培養細胞に感染させることでタンパク発現が見られた。またコントロールベクターとして AAV6-eGFP も作成し培養細胞において eGFP が発現することが確認された。

・ AAV6 を用いたマウス下肢への遺伝子導入

8 週齢の SOD マウスの下肢へウイルスベクターを筋肉注射し、6 週後に筋収縮力を測定し、遺伝子発現 (ddPCR)、タンパク発現 (免疫染色、ウェスタンブロット) を確認した。

(図 1 : 免疫染色、左から actin, eGFP, flag, merge)



(図 2 : ウェスタンブロット、上から flag, tubulin, 左から奇数番目が skMLCK ベクターを投与した下肢、偶数番目はコントロールベクターを投与した下肢)

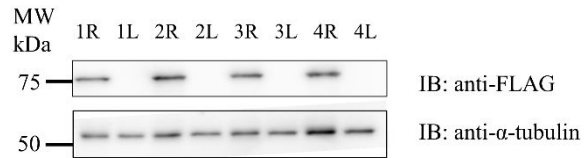
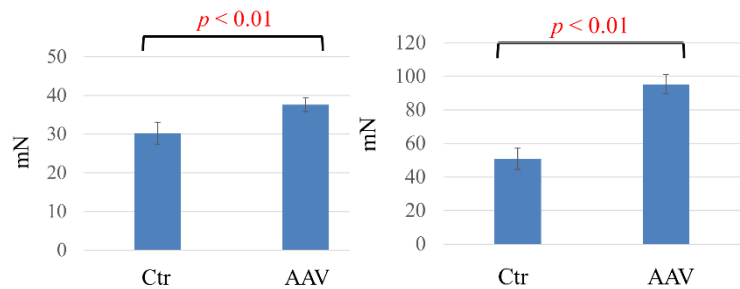


図 1, 2 に示すようにベクターを投与した群では skMLCK のタンパク発現が見られ、ddPCR でも遺伝子発現が見られた。さらに筋収縮力も図 3 に示すように、投与した下肢では単収縮でも強縮でも増強することが確認された。



以上の結果より skMLCK を遺伝子導入することで筋収縮力が増強することが確認された。

(図 3 : 左が単収縮、右が強縮刺激を与えた結果)

(2) skMLCK の活性を修飾する低分子化合物の同定

まず HTS 系を確立した。酵素活性の測定には最終的に熊谷法を用い、1536-well plate での最適化を行った。

東京大学フルライブラリを用いて低分子化合物のアッセイを行った。最初のアッセイでは阻害剤として 3617 個、活性化剤として 1471 個が Hit した。(inhibitor > -3SD, > 35.4%, activator < -30%, %inhibition) さらにコンファメーションアッセイを行って阻害剤として 1948 個、活性化剤として 404 個が Hit した。(N = 4, Kinase - KUMA > 50%, or 30% < kinase - KUMA < 50% and %Inhibition of kinase > 30%, or 30% < kinase - KUMA < 50% and %Inhibition of KUMA < 10%, activator < -30%) 再度 ADP-Glo 法でコンファメーションアッセイを行い阻害剤として 1494 個、活性化剤として 34 個まで絞り込んだ。(N = 4, inhibitor > 35%, activator < -15%) 次に smMLCK に対してカウンターアッセイを行い阻害剤として 769 個、活性化剤として 34 個まで絞り込んだ。最終的にタイトレーションアッセイを行い、阻害剤として 106 個、阻害剤として 12 個の低分子化合物を同定するに至った。

今後はそれぞれの構造分析を行いさらに絞り込んで実際に生理的、生化学的な作用を持つかを調べていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------