

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790748

研究課題名(和文) 心筋ミオシン軽鎖キナーゼ変異による新しい心筋症発症機序の解明

研究課題名(英文) Cardiac Myosin Light Chain Kinase Mutation as a Cause of Cardiomyopathies

研究代表者

今野 哲雄 (Konno, Tetsuo)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50377389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ(cMLCK)変異が心筋症の原因か否かは不明であった。我々は、肥大型心筋症1例においてミスセンス変異を、拡張型心筋症1例において欠失変異を同定した。キナーゼアッセイにおいて、ミスセンス変異型cMLCKは野生型と比較して活性亢進を、欠失変異型は著しい活性低下を呈した。変異の同定された家系においてエクソームシーケンスを行ったが、既知の心筋症遺伝子変異は検出されなかった。キナーゼ活性亢進型cMLCK変異は肥大型心筋症を、一方失活型変異は拡張型心筋症の原因となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, cardiac myosin light chain kinase (cMLCK) was cloned from the myocardia of patients with heart failure, although it is unknown whether mutations in cMLCK gene (MYLK3) causes cardiomyopathies. We identified a missense and deletion variant in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and in dilated cardiomyopathy (DCM), respectively. In vitro kinase assay demonstrated enhanced kinase activity in the missense mutant protein, while diminished activity in deletion mutant protein. Whole exome sequencing showed absence of known DCM causing mutations in pedigrees harboring the mutation. These findings suggest that enhanced cMLCK activity may cause HCM, while declined cMLCK activity may cause DCM. Our data will provide the new insights into mechanisms responsible for cardiomyopathies.

研究分野：循環器内科学、心不全

キーワード：genetics cardiomyopathy heart failure

1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全患者は先進国で著しい増加傾向がみられ、本邦においても 120-130 万人の罹患者がいると推定されている。心筋症は心不全の主要な原因疾患であり、小児から老年まであらゆる世代で心不全死を来すため、その原因解明と治療法の開発が急務である。近年その病因が心筋の収縮蛋白・骨格蛋白の遺伝子異常であることが明らかにされたが、依然として大半の心筋症患者における原因遺伝子は不明である。申請者らは肥大型心筋症患者 400 例および拡張型心筋症患者 100 例を対象に原因遺伝子検索を精力的に行ってきたが (Konno T et al., J Am Coll Cardiol 2003, Eur Heart J 2004, Clin Sci 2007)、申請者らのこれまでの解析の結果、原因遺伝子変異が同定される割合は拡張型心筋症では約 10%、肥大型心筋症では約 50%である (図 1)。このため、未知の原因遺伝子を同定し、新しい心筋症発症機序の解明を目指す研究は極めて重要な位置づけにある。

(2) 心筋ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白 (MLCK) は 2007 年に、移植後摘出心における発現量が心不全の重症度と相関する分子として、本研究協力者である瀬口らにより初めて同定された。また瀬口らは、MLCK は心筋サルコメア蛋白であるミオシン軽鎖を基質とするリン酸化機能を有し、ゼブラフィッシュにおいて MLCK 蛋白をコードする MYLK3 遺伝子をノックダウンすると拡張型心筋症に類似した心臓表現型が認められること、を明らかにした (図 2: Seguchi et al. J Clin Invest 2007)。そこで申請者は、ミオシン軽鎖と同じくミオシン・ファミリーに属するミオシン重鎖に着目し、ミオシン重鎖変異マウスでは転写因子 MEF2 を介した胎児遺伝子の発現が、心

筋症発症に関わる重要な機序であることを明らかにした (Konno T et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。

2. 研究の目的

(1) 申請者はこれらの研究成果に基づき、MLCK をコードする MYLK3 遺伝子が、ヒト心筋症の病因遺伝子ではないかとの仮説を持つに至った。しかしながら、これまで心筋症患者において MYLK3 遺伝子変異を検索した報告はない。そこで本研究の第一の目的は、心筋症患者における MYLK3 遺伝子変異の有無を検索し、遺伝子異常と心筋症の臨床病型との関係を明らかにすることである。

申請者らは、これらの MYLK3 遺伝子解析結果に機能発現実験を追加することにより、心筋症・心不全の発症進展機序を全く新規の分子レベルで明らかにし得ると考えるに至った。すなわち、MYLK 変異による心筋症の発症過程が明らかとなれば、心筋症により引き起こされる心不全の新しい進展機序を世界に先駆けて報告出来るものと考えられる。そこで本研究の第二の目的は、変異型 MLCK 活性を *in vitro* で測定し、野生型と比較してキナーゼ活性異常の有無を確認すること、更に MYLK3 遺伝子変異または野生型 MYLK3 遺伝子をゼブラフィッシュ受精卵に導入することにより *in vivo* での心筋症発症過程を観察し、MYLK3 遺伝子変異による心筋症発症機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) MYLK3 遺伝子変異の検索:

拡張型心筋症 130 例・肥大型心筋症患者発端者 400 例において、informed consent を得たのち、12 誘導心電図、心臓超音波検査、遺伝子診断用採血 (EDTA 血 10ml) を実施した。具体的には遺伝子診断用に採取

した血液検体の末梢血白血球から genomic DNA を抽出し、PCR 法に引き続き高分解融解曲線分析法を用いた高効率遺伝子変異スクリーニングを行った。異常パターンを認めたものに対して、DNA を精製した後、オートシーケンサーを用いて DNA 配列を調査した。遺伝子変異が見い出された場合には、その家族に同意を得た後に、12 誘導心電図、心臓超音波検査、遺伝子診断用採血を行って家系調査を実施した。

(2) in vitro キナーゼアッセイ

キナーゼである MLCK のリコンビナントタンパク質の発現と精製を行うために、HEK293T 細胞に、野生型または変異型 MYLK3 Flag コンストラクトをトランスフェクトし、MLCK 蛋白質を発現させた後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行うことにより MLCK 蛋白質を精製する。精製した MLCK 蛋白質とともに、基質としてマウス心から精製したミオシン軽鎖を、カルシウム依存性モジュレーターであるカルモジュリンとともにチューブ内に加え、in vitro で $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{ATP}$ と反応させるキナーゼアッセイを行う。反応後、基質であるミオシン軽鎖を SDS-PAGE にて分離し、乾燥を行った。その後、オートラジオグラフィーによりリン酸化されたミオシン軽鎖 (20kDa) の検出を行うことにより、野生型と変異型 MLCK 活性の比較検討を行った。

(3) ゼブラフィッシュを用いた in vivo 機能発現実験

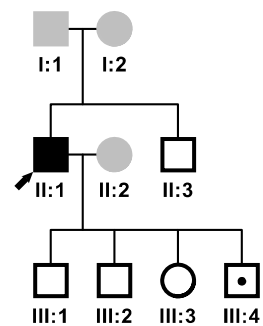
MLCK に対するモルフォリーノオリゴを用いて、変異型 MLCK ゼブラフィッシュを作成した。ゼブラフィッシュ受精卵へのモルフォリーノオリゴの注入はマイクロインジェクション法により行った。in vivo での心機能解析を効率よく行うために、心筋特異的に蛍光蛋白質(GFP)を発現するゼブラ

フィッシュ(hspGFF3A)を用いた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子解析結果

530 例の心筋症発端者 (肥大型心筋症 400 例・拡張型心筋症 130 例) を対象に MYLK3 遺伝子変異を検索し、肥大型心筋症 1 家系において、MYLK3 遺伝子 missense 変異を同定した。また、拡張型心筋症 1 家系において MYLK3 遺伝子 truncation 変異を同定した。家系調査を行った結果、truncation 変異の若年保因者 1 例を同定し、左室拡大傾向および心電図異常を呈することを明らかにした (右図)。変異の同定された家系においてエクソームシーケンスを行ったが、既知の心筋症遺伝子変異は検出されなかった。



(2) in vitro キナーゼアッセイ

肥大型心筋症で同定した missense 変異型 MLCK は、野生型 MLCK と比較して有意なキナーゼ活性の上昇を呈した (右図)。一方、拡張型心筋症患者で同定した truncation 変異型 MLCK は、野生型 MLCK と比較して著しいキナーゼ活性の低下を呈した。

(3) ゼブラフィッシュにおける in vivo 心形態・機能解析

MYLK3 遺伝子をターゲットとしたモルフォリーノオリゴ(MO)を用いて、truncation 変異に類似した変異型 MLCK ゼブラフィッシュを作成した。高速動画記録装置にてゼブラフィッシュの心拍を記録後、心機能解析ソフトウェアを用いて心室壁厚・心室径・心室短縮率を算出した。野生型

ゼブラフィッシュと比較して変異型 MLCK
ゼブラフィッシュは心室が軽度拡大傾向を
示したが有意な左室拡大は認められず、ま
た心室収縮能の低下も認められなかった。

以上、遺伝子解析およびキナーゼアッセ
イの結果より、キナーゼ活性亢進型 cMLCK
変異は肥大型心筋症を、一方失活型変異は
拡張型心筋症の原因となり得ることが示唆
された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者
には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Nagata Y, Konno T*, Fujino N, Hodatsu
A, Nomura A, Hayashi K, Nakamura H,
Kawashiri MA, Yamagishi M.

Right ventricular hypertrophy is associated
with cardiovascular events in hypertrophic
cardiomyopathy: evidence from study with
magnetic resonance.

Can J Cardiol 2015 (査読あり)
2015;31:702-8.

doi: 10.1016/j.cjca.2014.12.036.

(*Corresponding author)

(2) Nomura A, Konno T*, Fujita T, Tanaka Y,
Nagata Y, Tsuda T, Hodatsu A, Sakata K,
Nakamura H, Kawashiri MA, Fujino N,
Yamagishi M, Hayashi K.

Fragmented QRS predicts heart failure
progression in patients with hypertrophic
cardiomyopathy

Circ J. (査読あり) 2015;79:136-43. doi:
10.1253/circj.CJ-14-0822.

(*Corresponding author)

(3) Hodatsu A*, Konno T*, Hayashi K,

Funada A, Fujita T, Nagata Y, Fujino N,
Kawashiri MA, Yamagishi M.

Compound heterozygosity deteriorates
phenotypes of hypertrophic
cardiomyopathy with founder MYBPC3
mutation: evidence from patients and
zebrafish models

Am J Physiol Heart Circ Physiol. (査読有
り) 2014;307:H1594-604. doi:
10.1371/journal.pone.0101465.

(*Equal contribution)

(4) Konno T*, Hayashi K, Fujino N, Nagata
Y, Hodatsu A, Masuta E, Sakata K,
Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M.

High sensitivity of late gadolinium
enhancement for predicting microscopic
myocardial scarring in biopsied specimens
in hypertrophic cardiomyopathy.

PLoS One. (査読あり) 2014;9:e101465.
doi: 10.1371/journal.pone.0101465.

(*Corresponding author)

(5) Fujita T*, Konno T*, Yokawa J, Masuta
E, Nagata Y, Fujino N, Funada A, Hodatsu
A, Kawashiri MA, Yamagishi M, Hayashi K.
Increased extent of myocardial fibrosis in
genotyped hypertrophic cardiomyopathy
with ventricular tachyarrhythmias

J Cardiol. (査読あり) 2014 (in press) doi:
10.1016/j.jjcc.2014.10.002.

(*Equal contribution)

(6) Fujino N, Konno T, Yamagishi M,
Hayashi K.

Left ventricular apical aneurysm and
systolic dysfunction in hypertrophic
cardiomyopathy.

J Cardiol. (査読あり) 2014;64:253-5.

doi: 10.1016/j.jjcc.2014.04.009.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Hodatsu A, Konno T, Hayashi K, Nagata Y, Teramoto R, Fujino N, Kawashiri MA, Yamagishi M.

Compound heterozygosity affects phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy with MYBPC3 mutations: evidence from zebrafish models

American College of Cardiology Scientific Sessions 2015 (San Diego, U.S.A., 2015 年 3 月 16 日)

(2) Konno T, Hayashi K, Fujino N, Nagata Y, Hodatsu A, Masuta E, Sakata K, Nakamura H, Kawashiri MA, Yamagishi M.

Electrocardiographic QRS fragmentation as a marker for myocardial scarring in hypertrophic cardiomyopathy.

European Society of Cardiology, Annual congress in 2014 (Valcerona, Spain, 2014 年 9 月 2 日)

(3) 今野哲雄. 心不全の治療過程で出現する腎機能悪化：腎うっ血の関与を中心にトルバプタン使用の現状を含めて

第 116 回日本循環器学会北陸地方会（金沢，2014 年 7 月 6 日）

（招待講演）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://intmed2.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_j.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今野 哲雄 (KONNO, Tetsuo)

金沢大学医学系・助教

研究者番号：50377389

(2)連携研究者

北風 政史 (KITAKAZE, Masafumi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・

臨床研究開発部・部長

研究者番号：20294069

高島 成二 (TAKASHIMA, Seiji)

大阪大学大学院・生命機能研究科・教授

研究者番号：90379272

山崎 悟 (YAMAZAKI, Satoru)

独立行政法人国立循環器病研究センター・

細胞生物学部細胞形態研究室・室長

研究者番号：70348796

瀬口 理 (SEGUCHI, Osamu) 独立行政法

人国立循環器病研究センター・病院移植
部・研究員
研究者番号：60570869