

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790792

研究課題名(和文)新規心臓特異的リン酸化酵素の活性調節に基づく心不全・心筋症治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel drugs for heart failure treatment based on modulating kinase activity of cardiac-MLCK

研究代表者

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・医師

研究者番号：60570869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高齢化社会が進む日本において年々増加している心不全に対する新たな治療薬を開発することである。申請者らは心不全に関連する新たな生体内タンパクとして心臓型ミオシン軽鎖リン酸化酵素を同定し、現在そのタンパクのリン酸化酵素活性を調節する特殊ペプチドを合成し、創薬候補ペプチドとして解析を続けている。現在8種の創薬候補ペプチドを同定しており、それぞれのペプチドが心臓型ミオシン軽鎖リン酸化酵素の活性を抑制することを明らかにしており、将来的には心不全発症の基礎となる病的心肥大抑制薬などの心不全薬剤としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop novel drugs for heart failure which is increasing yearly in aging society of Japan.

We have previously identified novel cardiac-specific myosin light chain kinase (cardiac-MLCK) which is closely associated with the pathophysiology of heart failure. Recently, we also identified 8 unique peptide drugs suppressing kinase activity of cardiac-MLCK and we are investigating the pharmacologic effects of the peptide drugs for heart. These peptide drugs are expecting to become preventing drugs for heart failure through treating pathologic cardiac hypertrophy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・7203循環器内科学

キーワード：心不全 心筋症 遺伝子 リン酸化酵素 ペプチド創薬

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞に代表される動脈硬化性疾患や弁膜症、種々の心筋疾患など様々な心血管疾患はすべて心不全という一つの病態に帰着する。高齢化社会の進行や生活習慣病の進行に伴い心不全患者数は増加の一途をたどっており、遮断薬やACE阻害剤などの心不全治療薬によりその予後は改善したものの未だ十分とはいえない。

また本邦ではこれら内科的薬物治療に抵抗性の重症心不全の中で65歳未満の症例の一部は心臓移植治療に希望を見出すことができる。しかしながら心臓移植治療においては依然としてレシピエントの数に比して十分なドナーからの臓器提供が得られているとは言えない状況であり、幸運にもドナーからの臓器提供を受けることができた症例であっても補助人工心臓といった機械的循環補助装置装着や強心剤持続点滴下に2~3年以上もの長期の待機期間を乗り越えることが必要となり、その待機中に亡くなることも少なくない。

このような中でさらなる予後改善を目指した心不全に対する新たな治療法を開発することは循環器医療における最重要課題である。

2. 研究の目的

申請者は上記を背景とした新たな心不全治療法開発プロジェクトとして、以前より心臓型ミオシン軽鎖リン酸化酵素(cardiac-MLCK)を創薬標的とした心不全創薬に取り組んでおり、2007年に新たな心臓特異的リン酸化酵素としてcardiac-MLCKを同定し、その機能解析を含めた報告を行っている(Seguchi O, et al. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin Invest* 2007;117:2812-24)

ミオシン軽鎖リン酸化酵素(MLCK)とはミオシン重鎖の頸部に位置する一対のミオシン調節性軽鎖(Myosin regulatory light chain: MLC)をリン酸化する酵素であり、これまで平滑筋や骨格筋ではそれぞれの筋肉に特異的なMLCKが存在し、機能していることが知られていた。平滑筋ではMLCKによるMLCリン酸化は筋収縮を引き起こすといわれており、平滑筋収縮の中心に位置するシグナルであると理解されている。骨格筋においてもMLCKは骨格筋収縮のCa感受性を調節するなどの機能を有しており、骨格筋収縮の修飾に働くとされている。

Cardiac-MLCKとはヒト不全心筋においてその遺伝子発現が上昇する新規遺伝子として申請者が新規に同定した心筋特異的リン酸化酵素であり、その遺伝子発現量は心不

全重症度の指標である肺高血圧の程度と相関して上昇していた(gene symbol: MYLK3)。

また申請者らはcardiac-MLCKが基質として心室型ミオシン軽鎖(MLC2v)を特異的にリン酸化することを見出し、ラット培養心筋細胞を用いたin vitroの解析、およびゼブラフィッシュを用いたin vivoの解析において心筋細胞のサルコメア構造形成に関わることを明らかにした。特にゼブラフィッシュにおけるモルフォリノアンチセンスオリゴを用いたcardiac-MLCK遺伝子抑制実験ではゼブラフィッシュの心臓が拡張型心筋症様の拡大を呈し、cardiac-MLCKが家族性心筋症の原因遺伝子となる可能性があることが示唆された。事実、情報交換をしている他研究施設における検討では、現在ヒト家族性心筋症家系においてcardiac-MLCKの変異を同定、解析している。当該施設の検討では3つの新規遺伝子変異を同定しており、これら遺伝子変異中のcardiac-MLCKリン酸化活性増強型の変異では肥大型心筋症を、cardiac-MLCKリン酸化活性減弱型の変異では拡張型心筋症様表現型を示すことが明らかになっており、ヒト心筋症病態においてもcardiac-MLCKが重要な役割を果たす分子であることを明らかにした。

これらの研究成果をもとに申請者らはcardiac-MLCKがMLC2vリン酸化を介して心筋細胞機能の中心を担うサルコメア構造の構築やひいては心筋収縮機能においても重要な役割を果たす可能性があると考え、研究を進めている。

3. 研究の方法

本研究課題は心不全・心筋症におけるcardiac-MLCK-ミオシン軽鎖シグナル解析および、cardiac-MLCKリン酸化活性調節剤の開発の二つの研究を軸に行った。

に関しては国立循環器病研究センターにて施行した左室補助人工心臓装着症例および、心臓移植症例の手術時に採取されたヒト心筋検体を収集している。また大動脈縮窄心不全モデルマウスから得られた心筋検体からのcardiac-MLCK、ミオシン軽鎖の遺伝子、タンパク発現解析を行う。

に関しては、本研究期間の当初、cardiac-MLCKリン酸化の定量的アッセイ系を独自に構築し、そのアッセイ系に基づいて、薬剤候補化合物のスクリーニングを行う方向での研究を進めていた。しかしながら、本研究方法で必要とされるリン酸化の定量的アッセイ系の構築が困難であったため、研究期間半ばにて、新たな手法で薬剤候補をスクリーニングすることとした。

新たな薬剤候補スクリーニング法の概要はcardiac-MLCKのリン酸化酵素活性中心を標的としてアロステリックに活性を制御する薬剤を同定する方法である。具体的には東

京大学大学院理学系研究科、生物有機化学教室にて行っている「RAPID システム」による結合合成ペプチドのスクリーニングを行い、得られた創薬シーズペプチドの効果を検証する。

4. 研究成果

についてはヒトおよびマウスの心筋検体の収集、抗体作成、定量 PCR プローブ作成などを行い、順次解析を始めていくことにしている。

については平成 25 年度にピオチンタグ付きの cardiac-MLCK タンパクを大量に精製し、これを基に「RAPID システム」にて合成特殊ペプチドとの結合についてスクリーニングを行ったところ、cardiac-MLCK と直接相互作用する複数の特殊ペプチドの合成、同定に成功した。

候補ペプチドの cardiac-MLCK リン酸化活性化調節効果の確認：

我々はこれまでの cardiac-MLCK に対する研究の中で、放射性同位元素 (^{32}p -ATP) を用いた cardiac-MLCK の *in vitro* リン酸化アッセイ系を確立してきた。今回の確認実験ではこのアッセイ系を用い、*in vitro* のリン酸化反応系に得られたペプチドを添加し、其々の候補ペプチドを添加した際の cardiac-MLCK リン酸化活性を定量的に評価した。その結果、下図のように陽性コントロール (positive control: PC) に比して、全ての候補ペプチド (L-1, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, D-1, D-2) において cardiac-MLCK リン酸化活性を抑制することを明らかにした。

現在この結果を受けて、其々の創薬候補ペプチドのリン酸化活性抑制効果の IC50 を求める実験を継続している。さらにはラット培養心筋細胞系での創薬候補ペプチドの cardiac-MLCK リン酸化活性抑制効果の確認を行うことにしている。

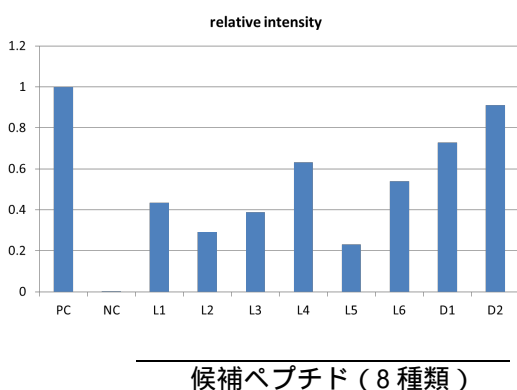


図) 創薬候補ペプチドによる cardiac-MLCK リン酸化活性抑制効果

陽性コントロール (PC) に対して L5, L2, L3, L1, L6, L4, D1, D2 の順に cardiac-MLCK のリン酸化活性を抑制している。

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0件)

[学会発表](計0件)

[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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

研究会発表
平成 25 年度 Vascular Biology Innovation Conference

題名「心臓型 MLCK と心不全、心筋症との関わり」

6. 研究組織

(1) 研究代表者
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・医師

研究者番号：60570869

(2) 研究分担者
なし

(3) 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
基盤センター・部長

研究者番号：20294069

高島成二 (TAKASHIMA, Seiji)
大阪大学大学院医学系研究科 医化学講

座・教授

研究者番号：90379272