

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390225  
 研究課題名（和文）心筋細胞の非分裂性を規定する因子の同定・機能解析  
 と治療への応用に向けた基盤研究  
 研究課題名（英文） Identification and Functional Analysis of Cardiac Specific Singling  
 Molecules and Therapeutic Applications for Cardiovascular Disease

研究代表者 高島 成二 (Takashima Seiji)  
 大阪大学・医学系研究科・独立准教授

研究者番号：90379272

研究成果の概要（和文）：心臓の特異性を決定するシグナル因子の同定を行い、それらの機能解析を行うことにより、心血管疾患の病態解析から新しい治療法の開発につながることを目的とする。心臓で特異的に発現誘導される因子としてGSという蛋白質を同定し、低酸素ストレス時にエネルギー代謝酵素を活発に調節する因子であることを明らかにした。またストレス応答酵素の新規器質 CLI-170 を心臓から同定し、その機能を明らかにした。2つのストレス応答機構の発見が、今後心不全の病態解明と新規の治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, I newly discovered GS protein whose expression is regulated specifically different way in the cardiomyocyte. GS regulates the function of ATP synthesis. We also purified and identified a new AMPK substrate; CLIP-170 and clarified the regulatory role of AMPK in microtubule polymerization. Both discoveries lead to the understanding of novel cellular stress response in cardiomyocyte and the therapeutic approach of the cardiovascular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：組織・細胞、生体分子、循環器・高血圧

#### 1. 研究開始当初の背景

分裂して同化反応を積極的に進行する癌細胞などの細胞とは異なり、生後間もなく分裂を中止し収縮のためのエネルギー産生と異化反

応を積極的に進行する心筋細胞は、エネルギー代謝につながるシグナル、増殖シグナルに大きな差があることが予想される。こういった心臓としての臓器特異性に注目し、独自のシグ

ナル経路を同定する。そしてこれらにかかわる因子の機能を明らかにすることにより新しい心疾患の診断・治療法の開発につながると考え本研究を考案・実行することとした。

## 2. 研究の目的

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要な増殖因子シグナルを中心とした機能分子を新たに同定することにより心筋特有の生存維持機構・ストレス応答機構を解明する。そのために独自のスクリーニング系を開発するとともに、敏速な生体内での分子機能評価系を確立し、重要な因子の同定を敏速化させる。それらの相互作用から心臓の生存の分子機構を解明し、心不全の病態解明、さらには新たな治療法への展開を図る。

## 3. 研究の方法

(1)心臓の特異的機能維持にかかわる分子の同定

### ①心筋の非分裂性を規定する分子の同定

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要なシグナルの解析を通して、心臓特異的な生存維持機構の解明を行った。心臓は生後まもなく細胞分裂を中止し、さらに決して癌化をおこさない唯一の器官である。そこで、この細胞分裂抑制機構の解明を主な目的として、細胞分裂に必要な転写因子に対する心臓の反応性を比較した。心臓特異的な転写誘導をきたす分子を同定、機能解析を行った。

### ②心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

リン酸化酵素は特定の器質のリン酸化により多彩な生理作用を有することが知られているが、細胞内局所、あるいは各臓器で独自の作用を有している。リン酸化酵素はその標的器質によって機能を空間的・時間的に多様化させていることが近年明らかになりつつある。ストレス応答に関与すると考えられている AMPK ファミリー分子も心臓での強発現が確認されている。そこで心臓特異的な AMPK の器質を新たに検索同定しその生理的役割の解明を行った。

(2)独自の技術による新規リン酸化酵素器質の同定法の確立

上記の計画を実行するために、蛋白精製手法と *in vitro* リン酸化反応を組み合わせた新たな器質同定法を確立した。この手法は心臓組織を最初に高分離能のカラムで精製することにより脱リン酸化酵素を効率よく除くことが可能である。また分離されたたんぱくを器質として *in vitro* でリン酸化反応を行うため  $K_m$  の低い (アフィニティの高い) 器質を同定することが可能である。そのため臓器において特異的に重要なシグナルの同

定につながった。

(3)同定された分子機能のゼブラフィッシュ等を利用した生体内解析

上記で新たに同定されたシグナルをゼブラフィッシュを使ったアッセイ系を利用して機能解析を行った。解析には心臓特異的 GFP 発光個体、GAL4-UAS システムを利用した心臓特異的遺伝子高発現系などを利用した。

## 4. 研究成果

(1)心臓の特異的機能維持にかかわる特異的分子の同定

我々は以前、HB-EGF と呼ばれる増殖因子が心臓の機能維持に重要な役割を果たすことを報告してきた。この増殖シグナルの働きにより心臓においても分裂細胞と同様 *c-fos* や *c-myc* と呼ばれる癌遺伝子の誘導がおこる。しかしその後は特異的な遺伝子の調整機構が働き心臓の非分裂性が規定されている。特に *c-myc* は最近 iPS 細胞の誘導に使用されるなど細胞運命決定とも深い関与が示唆されている。そこで *c-myc* を心臓および分裂細胞で発現させ、それにより誘導される遺伝子の差を網羅的に解析した。

結果、GS という蛋白が心臓特異的に *c-myc* により発現誘導されることが明らかになった。GS は今日までほとんど、その機能が解析されていなかった。そこで、GS の結合蛋白の精製・同定を行い F-ATP synthase という蛋白との結合を証明した。

F-ATP synthase はミトコンドリアに存在する酸化的リン酸化に関与する重要な分子であり、特にミトコンドリアの発達した心臓においてはその細胞機能に直接かわることが考えられた。そこで、ATP 感受性 FRET を使用した実験により細胞内では GS が F-ATP synthase の活性を上昇させること、低酸素により強く発現誘導されることなどを明らかにした。つまり、GS は F-ATP synthase の働きを動的に制御し低酸素などのストレスに応答する重要な適応物質であることが明らかになった。

今後はさらに GS の分子メカニズムを解明し、ATP の産生の直接調整という新しい心不全治療への可能性を検討していく。

(2)心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

ストレス応答蛋白として知られる AMPK の新しい器質として CLIP-170 を心臓組織から同定し、その微小管動態における役割を明らかにした。まず心筋ホモジネートを高分離能のカラムにて分離し、その各フラクションにおいて *in vitro* リン酸化反応を行い、放射線標識されたたんぱくをさらに高分離能の

カラムにより精製することにより同定した。同定された CLIP-170 は微小管の先端に結合することは既知であったがその機能は不明であった。

そこでその機能を解析するために、まずリン酸化部位(S311)を同定し、S311 リン酸化 CLIP-170 抗体を作成することにより、in vivo においても AMPK が CLIP-170 の S311 をリン酸化することを証明した(図 1)

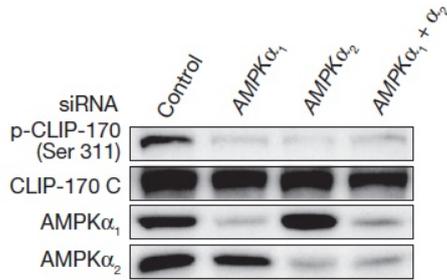


図 1、AMPK の阻害により CLIP-170 のリン酸化が抑制される。p-CLIP-170 は CLIP-170 のリン酸化特異的抗体、CLIP-170C はリン酸化非特異的抗体によるウエスタンブロッティングをそれぞれ示す。AMPK の活性を siRNA により抑制すると CLIP-170 のリン酸化レベルは著明に低下する。

さらに AMPK を抑制すると微小管スピードが減少するという興味深い現象が観察された(図 2)。

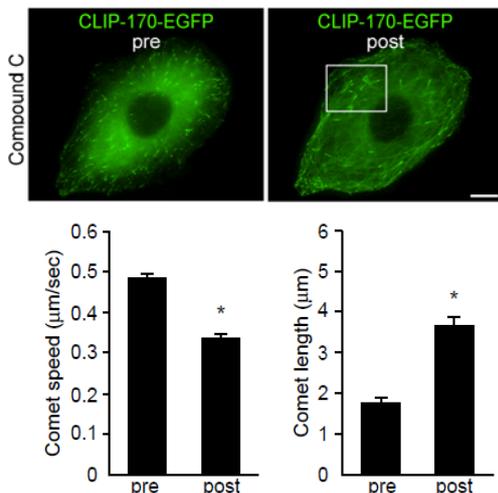


図 2、AMPK 抑制剤 Compound C による微小管伸長スピード抑制作用。CLIP-170-GFP を安定発現させた細胞に Compound C を投与した。CLIP-170 は上図のように comet 状に微小管のスピードに合わせて中心体から細胞膜側に向かって移動する。Compound C により AMPK の活性が抑制されると CLIP-170 の comet の長さが伸びるとともに微小管の伸長スピードを表す comet のスピードも顕著に減少した(下図)。

これまで微小管の伸長スピードを動的に制御する酵素は知られておらず、エネルギー代謝の異常をはじめとした様々なストレスによって活性化される AMPK が CLIP-170 のリン酸化を介して微小管制御を介して何らかのストレス応答をおこなっていると考えられた。

さらに CLIP-170 のリン酸化を抑制するあるいは CLIP-170 の非リン酸化変異体を導入すると、微小管の伸長スピードの低下のみならず退縮距離の短縮も観察された。これにより微小管の安定性が過剰に増加し、微小管を構成するチューブリンの N 末端のチロシンが脱落した微小管が増加することも観察された。安定化した微小管は通常細胞遊走の方向にのみ伸長しているが AMPK が抑制された状態では安定化した微小管が全方向性に広がり、細胞極性の消失および細胞遊走が極端に抑制された(図 3)。

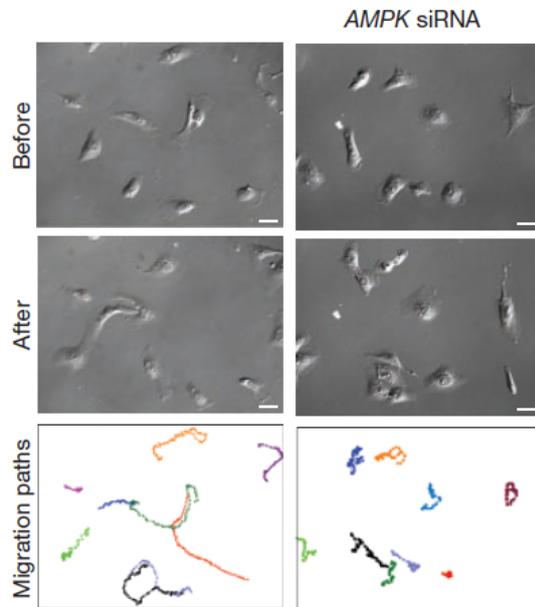


図 3、AMPK の抑制により細胞遊走が障害される。

線虫やショウジョウバエでは早期から AMPK が細胞極性を規定する因子として注目されていたが長年その器質・および分子メカニズムは不明であった。本実験から AMPK による極性形成にはこの CLIP-170 が関与することが強く示唆された。

さらに zebrafish を使った実験により in vivo でも CLIP-170 が極性形成に重要であることを証明した。

これらの発見は、ストレスに反応して活性化され解糖系などを変化させて ATP 産生に働くと考えられていた AMPK が、実は微小管の活性化による細胞機能全体の補強を行っているという全く新しい分子メカニズムを明

らかにした。これは細胞生物学的にも大変興味深い発見であり Nature Cell Biology 誌に current topics として取り上げられた。

近年、AMPK の活性促進剤が心不全を改善すること、AMPK が虚血障害に抑制的に働くことなどが報告されているが、本発見はこれらの分子メカニズムにも深く関与することが示唆される。今後さらにこの AMPK-CLIP-170 の生体内での作用が明らかとなれば、心臓特異的な保護機構の解明、治療法の開発につながると期待される。

#### 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 2 2 件)

1. Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. 査読有  
AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation.  
*Nat Cell Biol.* 12(6):583-590. 2010
2. Higo S, Asano Y, Kato H, Yamazaki S, Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S. 査読有  
Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1).  
*The Journal of biological chemistry.* 285(41):31337-31347. 2010
3. Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, Yamazaki S, Asano Y, Okada K, Tsukamoto O, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Kitakaze M, Komuro I.  
X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel API/CRE-like element in cardiomyocytes. 査読有  
*Journal of molecular and cellular cardiology.* 48(6):1280-1289. 2010
4. Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamazaki S, Minamino T, Sanada S, Seguchi O, Nakano A, Ando Y, Otsuka T, Furukawa H, Isomura T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M.  
Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 393(1):55-60. 2010
5. Liao Y, Xuan W, Zhao J, Bin J, Zhao H, Asakura M, Funahashi T, Takashima S, Kitakaze M.  
Antihypertrophic effects of adiponectin on cardiomyocytes are associated with the inhibition of heparin-binding epidermal growth factor signaling. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 393(3):519-525. 2010
6. Hamaoka M, Chinen I, Murata T, Takashima S, Iwamoto R, Mekada E.  
Anti-human HB-EGF monoclonal antibodies inhibiting ectodomain shedding of HB-EGF and diphtheria toxin binding. 査読有  
*Journal of biochemistry.* 148(1):55-69. 2010
7. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T.  
Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. 査読有  
*Circulation.* 122(4):361-369. 2010
8. Yamauchi K, Mizushima S, Tamada A, Yamamoto N, Takashima S, Murakami F.  
FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F. 査読有  
*J Neurosci.* 29(13):4044-4055. 2009
9. Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H, Kubo E, Ito H, Takaura M, Matsuda T, Soldati-Favre D, Takeda K.  
A single polymorphic amino acid

- on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. 査読有  
*J Exp Med.* 206(12):2747-2760. 2009
10. **Takashima S.**  
Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. 査読有  
*Circ J.* 73(2):208-213. 2009
  11. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, **Takashima S**, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M.  
Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. 査読有  
*J Am Coll Cardiol.* 53(8):709-717. 2009
  12. Suna S, Sakata Y, Shimizu M, Nakatani D, Usami M, Matsumoto S, Mizuno H, Ozaki K, **Takashima S**, Takeda H, Tanaka T, Hori M, Sato H.  
Lymphotoxin-alpha3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF-kappaB signaling. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):374-378. 2009
  13. Sugimoto K, Okamura K, Tanaka H, **Takashima S**, Ochi H, Yamamoto T, Matoba R.  
Methamphetamine directly accelerates beating rate in cardiomyocytes by increasing Ca(2+) entry via L-type Ca(2+) channel. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2009
  14. Shintani Y, **Takashima S**, Kato H, Komamura K, Kitakaze M.  
Extracellular protein kinase CK2 is a novel associating protein of neuropilin-1. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 385(4):618-623. 2009
  15. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Ito S, Ogai A, Asakura M, Kim J, Minamino T, **Takashima S**, Sanada S, Sugimachi M, Komamura K, Mochizuki N, Kitakaze M.  
Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. 査読有  
*Circulation.* 119(19):2568-2577. 2009
  16. Asai M, Tsukamoto O, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asano Y, Takahama H, Sasaki H, Higo S, Asakura M, **Takashima S**, Hori M, Kitakaze M.  
PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. 査読有  
*Journal of molecular and cellular cardiology.* 46(4):452-462. 2009
  17. Zhao H, Liao Y, Minamino T, Asano Y, Asakura M, Kim J, Asanuma H, **Takashima S**, Hori M, Kitakaze M.  
Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. 査読有  
*Hypertens Res.* 31(10):1977-1987. 2008
  18. Yamamoto H, **Takashima S**, Shintani Y, Yamazaki S, Seguchi O, Nakano A, Higo S, Kato H, Liao Y, Asano Y, Minamino T, Matsumura Y, Takeda H, Kitakaze M.  
Identification of a novel substrate for TNFalpha-induced kinase NUA2. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 365(3):541-547. 2008
  19. Suna S, Sakata Y, Sato H, Mizuno H, Nakatani D, Shimizu M, Usami M, **Takashima S**, Takeda H, Hori M.  
Up-regulation of cell adhesion molecule genes in human endothelial cells stimulated by lymphotoxin alpha: DNA microarray analysis. 査読有  
*J Atheroscler Thromb.* 15(3):160-165. 2008
  20. Liao Y, Zhao H, Ogai A, Kato H, Asakura M, Kim J, Asanuma H, Minamino T, **Takashima S**, Kitakaze M.

Atorvastatin slows the progression of cardiac remodeling in mice with pressure overload and inhibits epidermal growth factor receptor activation. 査読有  
*Hypertens Res.* 31(2):335-344. 2008

21. Li F, Zhao H, Liao Y, **Takashima S**, Asano Y, Shintani Y, Hori M, Kitakaze M.

Higher mortality in heterozygous neuropilin-1 mice after cardiac pressure overload. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 370(2):317-321. 2008

22. Kato H, **Takashima S**, Asano Y, Shintani Y, Yamazaki S, Seguchi O, Yamamoto H, Nakano A, Higo S, Ogai A, Minamino T, Kitakaze M, Hori M.

Identification of p32 as a novel substrate for ATM in heart. 査読有  
*Biochem Biophys Res Commun.* 366(4):885-891. 2008

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：心臓特異的キナーゼの心不全診断および治療への応用

発明者：高島 成二、瀬口 理、朝倉 正紀、北風 政史、大塚 敏明、中丸 健治、合田 明日香

権利者：国立循環器病センター総長・第一三共株式会社

種類：特願

番号：2009-056423

出願年月日：2009年10月22日

国内外の別：国内

名称：微小管伸長抑制剤をスクリーニングする方法および微小管伸長抑制剤

発明者：北風 政史、望月 直樹、高島 成二、中野 敦

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特願

番号：2009-160508号

出願年月日：2009年7月7日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高島 成二 (Takashima Seiji)

大阪大学医学系研究科・独立准教授

研究者番号：90379272

### (2) 研究分担者

南野 哲男 (Minamino Tetsuo)

大阪大学医学系研究科・講師

研究者番号：30379234

### (3) 連携研究者

朝野 仁祐 (Asano Yoshihiro)

大阪大学医学系研究科・助教

研究者番号：60527670

塚本 蔵 (Tsukamoto Osamu)

大阪大学医学系研究科・特任研究員

研究者番号：80589151

加藤 久和 (Kato Hisakazu)

大阪大学医学系研究科・特任研究員

研究者番号：30589312

### (4) 研究協力者

中野 敦 (Nakano Atsushi)

大阪大学医学系研究科・特任研究員

研究者番号なし

山崎 悟 (Yamazaki Satoru)

国立循環器病研究センター・室長

研究者番号：70348796