

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293062

研究課題名(和文) ホスホランパンを標的とした低分子化合物による新たな心不全治療薬の研究開発

研究課題名(英文) Development of a new drug for heart failure targeting phospholamban

研究代表者

乾 誠 (INUI, Makoto)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70223237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：心不全などの心臓の病的状態では、心筋細胞内のカルシウム貯蔵部位である心筋小胞体へのカルシウム輸送能が著しく低下し、細胞質カルシウム濃度が上昇して細胞機能不全を起こしている。この心筋小胞体へのカルシウム輸送の調節蛋白質であるホスホランパンは、心不全の治療の有力な標的である。本研究では、ホスホランパンに特異的に結合する短い核酸であるアプタマーを含めてホスホランパンに作用する薬物の検討を行った。その成果は、ホスホランパン・アプタマーの最適化など新たな心不全治療薬の開発に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：In the failing heart, the Ca²⁺ pumping activity of the intracellular Ca²⁺ storage site, the sarcoplasmic reticulum (SR), is significantly reduced, resulting in dysfunction of cardiomyocytes due to intracellular Ca²⁺ overload. The Ca²⁺ pumping activity of SR is regulated by phospholamban, which is a potential target to the treatment of heart failure. Here we studied a phospholamban inhibitor which augments the Ca²⁺ pumping activity of SR, including a phospholamban aptamer. Our results including optimization of a phospholamban aptamer provide a basis for the development of new therapeutic agents for heart failure.

研究分野：薬理学

キーワード：心不全治療薬 ホスホランパン アプタマー 創薬

1. 研究開始当初の背景

心臓の収縮・弛緩の制御は、心筋細胞内 Ca^{2+} の貯蔵部位である心筋小胞体による Ca^{2+} 輸送が主要な役割を果たしている。この心筋小胞体 Ca^{2+} 輸送は、 Ca^{2+} ポンプ ATPase (SERCA) による能動輸送であり、心筋小胞体膜蛋白質ホスホランパンによる調節系を有する。本研究者は、長年にわたり心筋小胞体の Ca^{2+} 輸送機構の解析を進めてきた。その結果、ホスホランパンが SERCA に直接結合すると抑制系として働き、ホスホランパンが燐酸化されると抑制が解除されて SERCA が活性化されることを明らかにし、その作用機序及び両者の機能部位を明らかにしてきた。

心不全などの病的状態では、心筋小胞体の Ca^{2+} 輸送能が著しく低下し、細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇し、細胞機能不全を起こす。この際、ホスホランパンのノックアウト・マウスでホスホランパンの抑制が解除され心筋小胞体 Ca^{2+} 輸送能が亢進すると、心肥大や不全心が改善されることが報告された。以降、ホスホランパンを標的とする心不全の治療が注目を集めている。

ホスホランパンを標的とする心不全治療では、ウイルス・ベクターを用いた shRNA によるホスホランパンの発現抑制、変異ホスホランパン発現などが試みられ、その効果が報告されている。しかし、これらの遺伝子発現を変化させる治療法は、実際の臨床応用で多くの問題点を抱える。

本研究者は、ホスホランパンに特異的に結合するアプタマーを開発し、その効果を確認した。遺伝子発現を変化させる治療法でしか出来なかったことが、薬物としてのホスホランパン・アプタマーで可能であることが明らかとなった意義は極めて大きく、低分子化合物としての治療薬開発に道を拓くものである。

2. 研究の目的

本研究は、ホスホランパンに結合して SERCA への抑制作用を解除し強心作用を発揮する低分子の薬物を見出し、その作用を確認することを目的とした。具体的には、以下の検討を行った。

- (1) ホスホランパン・アプタマーの機能と安定性を温存する最小機能単位を明らかにして、最適化を図る。
- (2) ホスホランパンと SERCA の相互作用の超微細構造を基にした薬物の可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 心筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ ATPase 活性測定
ヒト SERCA とホスホランパンを発現するバキュロウイルスを作成し、High Five 細胞に感染させた。感染した High Five 細胞からミクロゾーム画分を調製し、このミクロゾーム画分を用いて Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性を測定し、種々の薬物の効果を検討した。 Ca^{2+} 依

性 ATPase 活性測定では、20 mM imidazole-HCl (pH 6.9), 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM NaN_3 , 0.1 mM ATP, 5 μ M ionomycin, ATP 再生系 (2.5 mM phosphoenolpyruvate and 30 IU/ml pyruvate kinase) 存在下で、 Ca^{2+} -EGTA バッファーを用いて遊離 Ca^{2+} 濃度を 0 から 16.3 μ M までに調製した。反応は、ATP を添加することによって開始し、37 °C で 5 分間行い、0.3 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine と 0.35 M HCl を加えることにより停止した。発色により ATPase 活性を定量化し、 Ca^{2+} 存在下から EGTA 存在下での ATPase 活性を差し引くことにより Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性とした。

(2) 成獣ラット単離心筋細胞のサルコメア長変化と細胞内 Ca^{2+} 動態の測定

単離心筋細胞は、6-8 週齢のラットの左心室から酵素処理に単離した。実験は、山口大学動物使用委員会の承認を受けて行われた。単離した心筋細胞は、0.8 μ M Fura-2 acetoxymethyl ester で室温、20 分間処理し、24 mM HEPES (pH 7.4), 126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM NaH_2PO_4 , 11 mM glucose, 0.5 mM probenecid を含む液で洗浄した。サルコメア長と細胞内 Ca^{2+} 濃度は、上記液中で 0.5 Hz で電気刺激し、IonOptix 社の筋細胞 Ca^{2+} -収縮性測定装置を用いて同時に測定した。

4. 研究成果

(1) ホスホランパン・アプタマーの最適化

アプタマーを心不全治療薬として利用するためには、血中で安定かつ高力価なアプタマーを得ることが重要である。これまでの研究で得られているホスホランパン・アプタマーのうち、Apt-19 をもとに最適化を行った。Apt-19 は、アデニンをホスホロチオエート修飾した 40 mer の RNA アプタマーである。Apt-19 と同様にホスホランパンによる SERCA への抑制を解除し Ca^{2+} 依存性 ATPase の活性化作用を有する配列に絞り込むため、表 1 に示すようなアプタマーを合成した。

表 1 ホスホランパン・アプタマー 19 の全長 (1-40) と種々の長さのアプタマーの配列。a は、ホスホチオエート化アデニンを示す。

1-40	aaaGGGaUGGGaGGGaGGGaaGGGGUGGCaaCaUGGGCUGG
11-31	GaGGGaGGaaGGGGUGGCaaC
11-25	GaGGGaGGaaGGGGU
17-31	GGaaGGGGUGGCaaC
17-25	GGaaGGGGU
11-18	GaGGGaGG

これらのアプタマー存在下での Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性を測定し、アプタマーによる活性化率を全長アプタマー (1-40) と比較した。アプタマーの濃度 500 nM で検討した結果、表 2 に示すように 11-31, 11-25, 17-31 と絞り込んで全長アプタマーと同等の活性化を示した。これに対し、17-25 と 11-18 では活性化は消失した。低いアプタマー濃度 100

nM で検討すると、11-31 と 11-25 は全長アプタマーと同等の活性化を示したが、それ以外のアプタマーは活性化が減弱或いは消失していた。実際、11-31 と 11-25 の濃度依存性を調べると、全長アプタマーと同様の濃度依存性を示し、Apt-19 は 11-25 にまで絞り込めることが示された。

表 2 種々の長さのホスホランバン・アプタマー 19 の Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性への効果

	Activation of Ca^{2+} -dependent ATPase activity at 500 nM aptamer	at 100 nM aptamer
1-40	+++	+++
11-31	+++	+++
11-25	+++	+++
17-31	+++	+
17-25	-	-
11-18	-	-

次に、100 nM の低濃度のアプタマーでホスホランバンによる SERCA への抑制を解除する全長、11-31、11-25 のアプタマーについて、血中での安定性を調べた。ヒト血漿へアプタマーを加え、37 °C で時間経過を追って血漿中から抽出し、アクリルアミド電気泳動でアプタマーの分解を調べた。その結果、全長のアプタマーや 11-31 が血漿への添加後 5 分間以内にほぼ完全に分解してしまうのに対し、11-25 は興味深いことに 24 時間後でもほとんど分解されずに残っていた。これは、11-25 が強固な構造を維持しているために RNase 等に対し抵抗性を示すものと考えられる。以上の結果は、SERCA-ホスホランバン系への作用並びに血中での安定性の観点からも優れたアプタマーの機能単位であることを示している。

さらに、この 11-25 のアプタマーが心筋細胞でも実際に働くかどうかを調べた。この際、細胞内への 11-25 の導入は、本研究者が新たに開発している心筋細胞透過性アプタマーを利用した。この心筋細胞透過性アプタマーに 11-25 を繋げたアプタマーを合成して実験に供した。「研究の方法」のセクションで示したようにラットの左心室から単離した心筋細胞を用いて、サルコメア長と Fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の同時測定を行い、11-25 の効果を調べた。11-25 は、サルコメア長の短縮、短縮速度並びに伸長速度を著明に促進した (図 1)。即ち、11-25 による収縮性の増強と弛緩能の亢進が認められた。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化においても、これに対応した Ca^{2+} 濃度の増大と Ca^{2+} 濃度低下の時定数 (tau) の著明な減少が認められた (図 1)。これらの結果は、11-25 が Apt-19 の全長と同様にホスホランバンに結合し、ホスホランバンによる SERCA への抑制を解除し、 Ca^{2+} 依存性 ATPase を活性化していることを示している。その結果、心筋細胞の収縮性の増強と弛緩能の亢進がもたらされている。

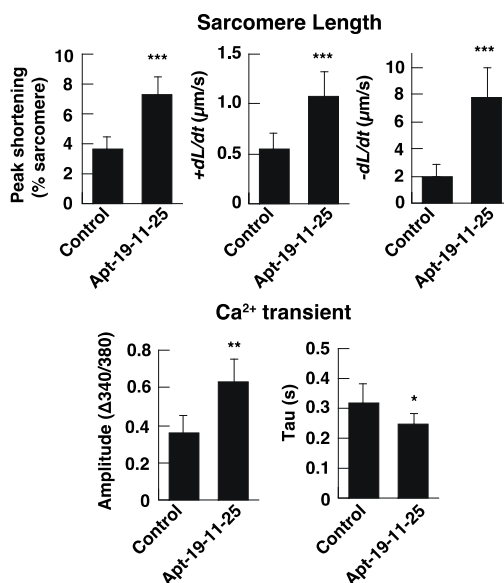


図 1 ホスホランバン・アプタマー 19 の 11-25 の単離心筋細胞のサルコメア長と細胞内 Ca^{2+} 動態への効果

(2) ホスホランバンと SERCA の相互作用の超微細構造を基にした薬物の可能性の検討

ホスホランバンと SERCA の相互作用は、細胞質ドメインと膜ドメインの両者で起こっている。ホスホランバンによる SERCA 抑制がホスホランバンの細胞質ドメインのリン酸化や抗体で解除されることから、まず、ホスホランバンの細胞質ドメインの超微細構造の解明を試みた。ホスホランバンの細胞質ドメインと GST の融合蛋白質を作成し、シッティングドロップ法にて結晶化条件のスクリーニングを行った。960 条件を検討し、さらに最適化を行った結果、0.1 M MES, pH 6.3, 29% PEG-200, 5% PEG-3000 存在下 4 °C にて蛋白質結晶を得ることが出来た。しかしながら、この結晶では十分な解像度でホスホランバン細胞質ドメインの構造を得ることが出来なかった。これは、ホスホランバン細胞質ドメインの構造が一定ではなく、幾つかの構造間の平衡状態にあるためと考えられる。実際、最近の NMR による研究もこの仮説を支持している。

次に、膜ドメインの相互作用を標的に検討を進めた。膜ドメインでのホスホランバンと SERCA の相互作用に関しては、完全ではないが結晶構造解析のデータが報告されている。このデータを基に C 末端部分の Val⁴⁹ 付近の構造から薬物デザインを行い、心筋小胞体の Ca^{2+} ポンプ ATPase 活性への効果を調べた。この薬物は、ホスホランバンの抑制を解除し、 Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性を増加させた。しかしながら、その EC_{50} は 10 μM 程度と Apt-19 等のホスホランバン・アプタマーに比べ 100~1,000 倍高く、力価が極めて低いものであった。今後、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Sakai, H., Matsuura, K., Tanaka, Y., Honda, T., Nshida, T., and Inui, M. Signaling mechanism underlying the promotion of keratinocyte migration by angiotensin II. **Mol. Pharmacol.** 査読有、Vol. 87. 2015. pp. 277-285.
DOI: 10.1124/mol.114.096461

Ishiguro, S., Yoshimura, K., Tsunedomi, R., Oka, M., Takao, S., Inui, M., Kawabata, A., Wall, T., Magafa, V., Cordopatis, P., Tzakos, A., and Tamura, T. Involvement of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) signalling in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a novel AT2R agonist effectively attenuates growth of PDAC grafts in mice. **Cancer Biol. Ther.** 査読有、Vol. 16. 2015. pp. 307-316.
DOI: 10.1080/15384047.2014.1002357

Nishida, T., Inui, M., and Nomizu, M. Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions. **Prog. Retin. Eye Res.** 査読有、Vol. 47. 2015. pp. 38-63.
DIO: 10.1016/j.preteyeres.2015.01.004

Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y. S., Kageyama, S., Hoshino, M., Fujii, T., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., and Shirakawa, M. The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. **Nat Commun.** 査読有、Vol. 6. 2015. 6116.
DOI: 10.1038/ncomms7116

Uchimura, S., Fujii, T., Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K., and Muto, E. A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation. **J Cell Biol.** 査読有、Vol. 208. 2015. pp. 211-222.
DOI: 10.1083/jcb.201407039

Sakai, H., Ikeda, Y., Honda, T., Tanaka, Y., Shiraishi, K., and Inui, M. A cell-penetrating phospholamban-specific RNA aptamer enhances Ca²⁺ transients and contractile function in cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 査読有、Vol. 76. 2014. pp. 177-185.
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.006

Maeda, N., Yoshimura, K., Yamamoto, S., Kuramasu, A., Inoue, M., Suzuki, N., Watanabe, Y., Maeda, Y., Kamei, R.,

Tsunedomi, R., Shindo, Y., Inui, M., Tamada, K., Yoshino, S., Hazama, S., and Oka, M. Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. **Ann. Sur. Oncol.** 査読有、Vol. Suppl 4. 2014. pp. S546-S554.
DOI: 10.1245/s10434-014-3564-2

Minamino T., Morimoto Y. V., Kinoshita M., Aldridge P. D., and Namba K. The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. **Sci Rep.** 査読有、Vol. 4. 2014. 7579.
DOI: 10.1038/srep07579

Bai F., Morimoto Y. V., Yoshimura S. D., Hara N, Kami-Ike N., Namba K., and Minamino T. Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. **Sci Rep.** 査読有、Vol. 4. 2014. 6528.
DOI: 10.1038/srep06528

Honda, T., Ishii, A., and Inui, M. Regulation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by PDZRN3. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 査読有、Vol. 304. 2013. pp. C1091-C1097.
DOI:10.1152/ajpcell.00343.2012

Kawamoto A., Morimoto Y. V., Miyata T., Minamino T., Hughes K. T., Kato T., and Namba K. Common and distinct structural features of Salmonella injectisome and flagellar basal body. **Sci Rep.** 査読有、Vol. 3. 2013. 3369.
DOI: 10.1038/srep03369.

〔学会発表〕(計7件)

酒井大樹、松浦健二、本田健、西田輝夫、乾 誠、IGF-1 promotes epithelial wound healing independently of the IGF-1 receptor via angiotensin II signaling. 第89回日本薬理学会、2016年3月11日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

本田健、仲田成美、永井涼人、乾 誠、Regulation of myogenic differentiation by PDZRN3 through modification of Id2 expression. 第89回日本薬理学会、2016年3月10日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

酒井大樹、池田安宏、本田健、田中貴絵、白石宏造、乾 誠、Enhancement of Ca²⁺

transient and contractile function of cardiomyocytes by phospholamban specific RNA aptamer. 第88回日本薬理学会、2015年3月19日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

倉増敦朗、若林深恵、本田健、樋口友莉恵、乾 誠、谷内一彦、Small GTPase Rac2 mediates histamine-induced migration of mouse mast cells. 第88回日本薬理学会、2015年3月19日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

酒井大樹、池田安宏、本田健、田中貴絵、白石宏造、乾 誠、ホスホランパンアプタマーによる心筋収縮能および Ca^{2+} トランジェントの増強作用、第67回日本薬理学会西南部会 2014年11月23日、産業医科大学(福岡県・北九州市)

酒井大樹、中島京、岩田博夫、乾 誠、Promotion of vascular endothelial cell migration and tube formation by SEK-1005. 第87回日本薬理学会 2014年3月21日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

酒井大樹、中島京、岩田博夫、乾 誠、SEK-1005 による血管内皮細胞の遊走及び管腔形成促進効果、第23回日本循環薬理学会、2013年12月6日 福岡大学(福岡県・福岡市)

〔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〕

なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者

乾 誠 (INUI, Makoto)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70223237

(2) 研究分担者

上村 明男 (KAMIMURA, Akio)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30194971

倉増 敦朗 (KURAMASU, Atsuo)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90302091

本田 健 (HONDA, Takeshi)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30457311

(3) 連携研究者

難波 啓一 (NAMBA, Keiichi)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：30346142