

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：84404  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18H04050  
研究課題名(和文)心不全治療を目的としたミオシン軽鎖リン酸化を調節する低分子化合物の開発と臨床応用

研究課題名(英文)Development and clinical application of low molecular chemicals that modulate myosin light chain kinase for the treatment of heart failure with preserved ejection fraction

研究代表者  
北風 政史 (Kitakaze, Masafumi)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員

研究者番号：20294069  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：サルコメア収縮性を直接的に抑制することで、肥大型心筋症(HCM)の発症と進展の抑制が期待できる。そこで本研究は、心筋収縮性の生理的増強機構であるミオシン調節軽鎖のリン酸化を抑制するため、心筋特異的ミオシン調節軽鎖キナーゼ(cMLCK)の特異的阻害剤による新しい治療薬の開発を目指した。cMLCK活性阻害によって、心筋収縮性を抑制できることを培養心筋細胞と小動物モデルで証明できた。また、cMLCK阻害剤に関しては、独自のアッセイシステムの構築とcMLCKのX線結晶構造解析まで成功し、結晶構造を参考にしながら構造展開を継続している。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

HFpEFをきたす代表的疾患である肥大型心筋症(HCM)は、その有病率が約500人に1名と頻度が高く、若年者の突然死や青壮年の重症心不全の原因となる難治性疾患である。これまでHCMに対する治療法はなかったが、サルコメアの収縮性抑制(cMLCK)という新しい視点からHCMの治療薬の開発を目指す本研究は、有効なHCM薬物療法の開発に繋がる可能性を秘めており、医学的、社会学的意義は大きい。さらに、cMLCK阻害剤開発の過程で実施したcMLCKのX線結晶構造解析では、cMLCKとcalmodulinの共結晶構造解析に世界で初めて成功しており、学術的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Direct inhibitors of sarcomere contraction are expected to be a valuable therapeutic approach for hypertrophic cardiomyopathy (HCM). The phosphorylation of myosin regulatory light chain by cardiac-specific myosin light chain kinase (cMLCK) is well-known as one of the most important physiological modulators for cardiac sarcomere contraction. Therefore, the current study is aimed to develop the cMLCK-specific allosteric inhibitor as a potential drug for the treatment of HCM. We have finished the high-throughput screening using small-molecule chemical compound libraries and our original cMLCK assay system. Also, we successfully obtained the X-ray crystal structure of the cMLCK and calmodulin complex, which can be used for the lead exploration. Furthermore, we have demonstrated that the cMLCK inhibition can effectively suppress the contractility of cardiac sarcomere in cultured cardiomyocytes and mice model of the hereditary cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科

キーワード：HFpEF 肥大型心筋症 cMLCK

## 1. 研究開始当初の背景

近年、心収縮機能の指標である左室駆出率 (EF) が保持されているにもかかわらず心不全症状を呈する症例 (heart failure with preserved ejection fraction: HFpEF) が、心不全全体の約 50% を占めることが明らかとなってきた。HFpEF の病態の本質は左室弛緩・拡張機能障害と考えられるが、HFpEF の死亡率および心不全増悪による再入院はともに心収縮機能の低下した心不全 (HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction) と同等であることから、予後不良であることも明らかにされてきた。一方、HFrEF に対しては生存率を改善する有効な薬物療法が確立しつつあるが、HFpEF の予後を改善する治療は未だに存在しないのが現状であり、その治療法の確立は循環器領域における重要な課題の 1 つである。

HFpEF をきたす代表的疾患である肥大型心筋症 (HCM) は、その有病率が約 500 人に 1 名と頻度の高い難治性疾患であり、心室筋の著明な肥大による左室弛緩・拡張機能障害 (拡張不全) を呈し、若年者の突然死や青壮年の重症心不全の原因となる疾患である。HCM はサルコメア蛋白質の変異が原因遺伝子である割合が高く、変異に伴うサルコメアの収縮性増強が HCM 発症の根本的なメカニズムであることが明らかになりつつある。実際、特異的心筋ミオシン ATPase 活性の阻害 (MYK-461) によってサルコメア収縮性を直接的に抑制することにより、HCM の発症および進展の抑制や左室内圧較差の軽減が得られることが報告されている。心筋の収縮性を増強する生理的調節機構の 1 つに、ミオシン調節軽鎖のリン酸化が知られており、そのリン酸化はミオシン調節軽鎖キナーゼにより制御されている。これまで我々は、心室型ミオシン調節軽鎖 (MLC2v) のリン酸化レベルを調節する心筋特異的ミオシン調節軽鎖キナーゼ (cMLCK) を標的とした新しいタイプの DSM の開発に数年前から着手してきた。本研究は、このような背景から、HCM およびその臨床的表現型である HFpEF の病態解明と新しい治療法の開発を研究のターゲットとすることとした。

## 2. 研究の目的

HFpEF がその病態の本質をなす HCM は、予後不良疾患であり難病指定されているにもかかわらず、未だに有効な薬物療法が存在しない。そこで本研究では、①心筋特異的ミオシン軽鎖キナーゼの特異的阻害剤を独自に開発し、②その阻害剤を用い、心室型ミオシン軽鎖リン酸化抑制によるサルコメア収縮性の直接抑制が HCM の発症・進展を予防し、弛緩・拡張機能障害を改善できることを示し、③cMLCK の結晶化および cMLCK と阻害剤との共結晶作製および X 線構造解析を行うことにより阻害剤の阻害様式を検討し、④最終的に HCM の新しい最適な治療薬を開発することを目的とする。さらに、HCM およびその臨床的表現型である HFpEF 全般の治療薬として、臨床開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) cMLCK 特異的阻害剤の開発

#### ①ハイスループットスクリーニング (HTS) システムの構築

cMLCK 活性を指標とする HTS システムは存在しないため、384-well および 1536-well plate を用いた独自のシステムを構築する。

#### ②HTS の実施

国内の複数の低分子化合物ライブラリー (合計約 30 万化合物) を用いて、ヒト cMLCK に対する特異的阻害剤の HTS を実施し、より阻害活性および特異性の高い低分子化合物を探索する。平滑筋型 MLCK (smMLCK) をカウンターアッセイに用いることで、cMLCK 特異的阻害剤を選択する。同定した阻害剤の MLC2v リン酸化の低下作用を phos-tag PAGE で確認する。

#### ③primary hit 化合物の構造活性相関 (SAR) とリードの選抜

上記の検討により、MLC2v リン酸化の低下および心筋細胞収縮性低下作用を有した primary hit 化合物を qualified hit とし、qualified hit 化合物周辺 50~100 化合物 (類縁構造化合物) を集めて、構造活性相関解析を行う。それらの化合物の活性、選択性、物性を検討して、リード化合物を選択する。

### (2) cMLCK 特異的阻害剤と cMLCK の共結晶構造解析

#### ①cMLCK の大量精製および単分散条件の検討

大腸菌を用いた cMLCK の結晶化は難しく、これまで cMLCK の結晶構造は解明されていない。Sf21 昆虫細胞にバキュロウイルスを用いて cMLCK を大量精製させるシステムを構築し、cMLCK を大量に安定して発現させ、その結晶化を試みる。

#### ②共結晶化と X 線構造解析

単分散したサンプルの濃縮条件を検討し、sitting drop 法にて結晶化条件のスクリーニングを行う。さらに結晶化を得られた条件で pH、塩濃度、凝集剤の濃度を結晶化の最適化を行う。

最後に得られた結晶で X 線結晶構造解析を行う。

(3) cMLCK 活性阻害剤の効果 (MLC2v リン酸化レベル、収縮性) を培養心筋細胞で検討

① 新生仔ラット培養心筋細胞

ラット neonatal 培養心筋細胞を cMLCK 阻害剤で処理した後、MLC2v リン酸化の程度を Phos-tag SDS PAGE 法、収縮性をセルモーションイメージングシステム SI8000 cardio モデル (sony 社製) を用いて解析する。

② 遺伝性心筋症由来心筋細胞 (疾患 iPS 細胞)

遺伝性心筋症の原因変異を有する iPS 細胞を樹立して (患者細胞より樹立または CRISPR/Cas9 を利用して作製)、cMLCK 阻害の生理学的意義や cMLCK 阻害剤の効果などを評価する。

(4) 遺伝性心筋症の小動物モデルの作製

遺伝性心筋症の小動物 (マウス) モデルを作製する。方法としては CRISPR を利用して MLC2v 遺伝子変異や cMLCK 遺伝子変異をマウス受精卵にノックインしてヒト遺伝性心筋症モデルマウスを作製する。生後経時的観察してヒトと同じ病態を発症するか否かを心機能や cMLCK 活性および MLC2v リン酸化を評価することにより検討する。

(5) 得られた cMLCK 阻害剤の HFpEF への効果を検討

現在、ダールラットなど複数の HFpEF の動物モデルが存在する。これらの動物モデルにおいて MLC2v リン酸化の抑制により拡張機能障害が改善できるか評価する。

#### 4. 研究成果

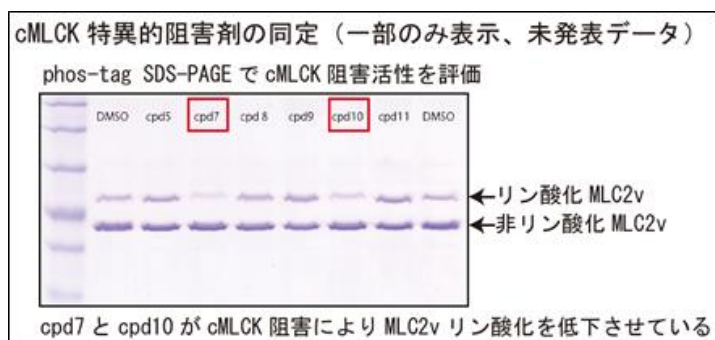
(1) cMLCK 特異的阻害剤の開発

①ハイスループットスクリーニング (HTS) システムの構築

cMLCK は昆虫細胞、calmodulin と MLC2v は大腸菌を用いて作製し、in-vitro cMLCK assay 法を構築した。さらに、スループットを上げるために、384-well および 1536-well plate を用いた cMLCK 活性を指標とする HTS システムを独自に構築した。偽陰性および疑陽性を避けるために、キナーゼ活性の測定には、発光法 (ADP-Glo) と蛍光法 (熊谷法) の 2 種類の方法を採用した。構築したシステムの一部を論文化した (K. Kamikubo et al. Non-Radioactive In Vitro Cardiac Myosin Light Chain Kinase Assays. J Vis Exp. 2020;160. doi: 10.3791/61168.)。

②HTS の実施

cMLCK 特異的阻害剤を開発するために低分子化合物ライブラリー (約 20 万化合物) を用いてハイスループットスクリーニングを実施し、cMLCK 活性を 50% 以上阻害する化合物を 112 個同定した。次に、これら 112 個の化合物に対して特異性を評価するために他のキナーゼを用いてカウンターアッセイを実施し、cMLCK 特異的に阻害作用を有する化合物は 34 個であった。更に、これらに対して濃度依存的阻害作用の確認を実施し、濃度依存的に阻害作用を発揮した 25 化合物について、phos-tag PAGE を用いて実際に基質のリン酸化が低下することを確認した。また、ラットおよびサルの cMLCK でも阻害活性を有する事を確認した。



③primary hit 化合物の構造活性相関 (SAR) とリードの選抜

上記の 25 化合物の中から 2 系統に絞って構造展開を実施したが、ATP 競合阻害である事が分かった。このため、非 ATP 競合性のアロステリック阻害剤の開発を目指して、cMLCK の結晶構造を参考にしながら構造展開を実施することとした。現在も構造展開を継続している。

(2) cMLCK 特異的阻害剤と cMLCK の共結晶構造解析

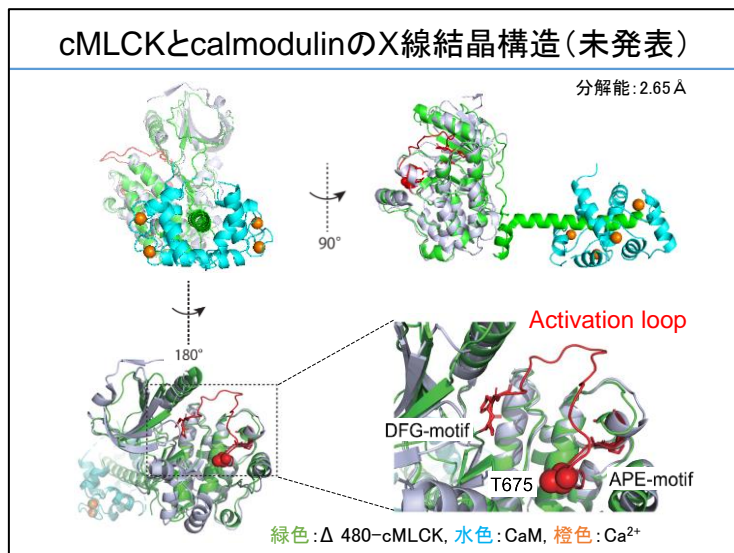
①cMLCK の大量精製および単分散条件の検討

cMLCK 特異的阻害剤と cMLCK の共結晶構造解析を行うためにまず、cMLCK の大量精製および単分散条件の検討を行った。Sf21 昆虫細胞にバキュロウイルスを用いて cMLCK を 10L の大量精製培養システムを構築し、cMLCK を大量に安定して発現させることができた。次に精製した cMLCK の単分散条件について検討した。His tag および Flag tag を用いて sequential に affinity 精

製を行った後、ゲルろ過で単分散を確認したところ、ほとんどの蛋白質は void に回収され、凝集してしまっていることが確認された。そこで活性に影響しない程度に cMLCK の N 末端を欠損させていき、それぞれについて単分散を観察した結果、最終的に単分散する N 末端欠損 cMLCK を得ることが出来た。また、cMLCK の結合蛋白質であるカルモジュリンも大腸菌のシステムを用いて構築し、大量精製に成功した。これら cMLCK とカルモジュリン蛋白質を混合し複合体を形成させた後、ゲルろ過を実施したところ、推測される分子量の高さに単分散して回収できた。

#### ② 共結晶化と X 線構造解析

単分散したサンプルを 10 mg/ml 程度まで濃縮し、sitting drop 法にて結晶化条件のスクリーニングを約 1000 条件で実施した。さらに、結晶化を得られた条件で pH、塩濃度、凝集剤の濃度を結晶化の最適化を実施し、X 線構造構造解析に使用できる結晶を得ることが出来た。X 線回析を行った結果、これまでに解像度 2.65 Å での cMLCK と calmodulin の共結晶構造を得ることに成功している。



### (3) cMLCK 活性阻害剤の効果 (MLC2v リン酸化レベル、収縮性) を培養心筋細胞で検討

#### ① MLC2v リン酸化レベル

これまでに合成された cMLCK 阻害剤が ATP 競合型であったため、阻害剤を用いた培養細胞での効果の検討は未実施である。代わりに、cMLCK をコードする *MYLK3* 遺伝子の変異 (P639Vfs15) により拡張型心筋症 (DCM) を発症する遺伝性 DCM 患者より iPS 細胞由来心筋細胞を作製した。P639Vfs15 変異では、cMLCK 活性が完全に消失することから、cMLCK 活性阻害と同等の効果を観察することが可能である。P639Vfs15 変異を有する iPSC 由来心筋細胞は、野生型的心筋細胞と比較して MLC2v のリン酸化が低下していることを確認できた。

#### ② 収縮性

MLC2v リン酸化と同様に、P639Vfs15 変異を有する iPSC 由来心筋細胞の収縮性を観察することで、cMLCK 活性阻害の収縮性を評価した。P639Vfs15 変異心筋細胞は野生型と比較して収縮速度が有意に低下することを確認した。

一方、合成した化合物の効果을判定するための細胞の樹立にも取り組んだ。肥大型心筋症 (HCM) を引き起こすサルコメア蛋白質の変異を導入した iPSC 細胞の樹立に取り組み、*Myh7* 遺伝子にヒト HCM 原因遺伝子変異を導入した HCM モデル iPSC 細胞の樹立に成功し、さらに心筋細胞への分化に成功した。その他、HCM の原因遺伝子変異として最も頻度の高い *Mypbc3* 遺伝子の変異を有する HCM モデル iPSC 細胞由来心筋細胞の作製にも成功した。これらの培養心筋細胞で、HCM に特徴的とされる super-relax state/disordered relax state (SRX/DRX) 比の低下と、収縮性の増加も確認できた。今後は、これらの HCM モデル心筋細胞に対する化合物の効果을判定する予定である。

### (4) 遺伝性心筋症の小動物モデルの作製

遺伝性心筋症の小動物 (マウス) モデルを作製して、cMLCK 阻害による収縮抑制効果と治療への応用について検討することを目的とした。そこで、まずヒトの DCM で同定した *MYLK3* 遺伝子の変異 (P639Vfs15) を CRISPR/Cas9 によってノックイン (KI) したマウスを作製した。Heterozygous および homozygous KI マウスを樹立することに成功し、心臓での cMLCK の発現量が野生型と比較して、heterozygous KI マウスでは半減し、homozygous KI マウスでは完全に消失していることを確認できた。よって、このマウスは cMLCK の活性を阻害したモデルとして利用できると考えられ、今後、機能解析を行う予定である。また、今後創製される独自の cMLCK 阻害剤の HCM での収縮抑制作用を確認するための遺伝子改変マウスの作製にも取り掛かる予定である。

(5) 得られた cMLCK 阻害剤の HFpEF への効果を検討

現在、ダールラットなど複数の HFpEF の動物モデルが提唱されているが、我々はある遺伝子の欠損マウスが生後 10 週齢頃から自然に HFpEF の表現型を示す事を見出している。今後は、本マウスの表現型を精査して、HFpEF モデルとしての妥当性を検証して、cMLCK 阻害剤の効果を検討していく予定としている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukamoto O.	4. 巻 21
2. 論文標題 Direct Sarcomere Modulators Are Promising New Treatments for Cardiomyopathies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E226.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010226.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 塚本蔵	4. 巻 37
2. 論文標題 直接的サルコメア制御剤による新しい心不全治療薬の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 143-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 山田憲明, 塚本蔵	4. 巻 51
2. 論文標題 心臓病における創薬開発、新たな治療介入で疾患を克服する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 心臓	6. 最初と最後の頁 1252-1259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hodatsu Akihiko, Fujino Noboru, Uyama Yuki, Tsukamoto Osamu, Imai Okazaki Atsuko, Yamazaki Satoru, Seguchi Osamu, Konno Tetsuo, Hayashi Kenshi, Kawashiri Masa aki, Asano Yoshihiro, Kitakaze Masafumi, Takashima Seiji, Yamagishi Masakazu	4. 巻 6
2. 論文標題 Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 406 ~ 415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.12410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	塚本 蔵  (TSUKAMOTO OSAMU)  (80589151)	大阪大学・生命機能研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	高島 成二  (TAKASHIMA SEIJI)  (90379272)	大阪大学・生命機能研究科・教授   (14401)	
研究分担者	山崎 悟  (YAMAZAKI SATORU)  (70348796)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長   (84404)	

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
---------	---------