

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号： 15501

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2010～2012

課題番号： 22390050

研究課題名（和文） 心筋弛緩促進型の新たな心不全治療薬の研究開発

研究課題名（英文） Development of a novel inotropic and lucitropic agent for treatment of heart failure

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送調節蛋白質であるホスホランパンに結合するアプタマーを利用した新たな心不全治療薬の開発を試みた。その結果、ナノモル・レベルで心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送を促進する RNA アプタマーを得た。これに細胞膜透過性ペプチドを結合したアプタマーは、単離心筋細胞で収縮力増強及び弛緩促進作用を示し、*in vivo* でも心機能の改善効果を示した。以上の結果から、このアプタマーが、心筋弛緩を促進することにより強心効果を発揮する新たな心不全治療薬となり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：We developed a phospholamban specific RNA aptamer as a novel inotropic and lucitropic agent to treat heart failure. The obtained aptamer increased  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in the nanomolar range. To introduce it into cardiomyocytes, we conjugated a membrane penetrating peptide to the aptamer. This aptamer facilitated contraction as well as relaxation of isolated cardiomyocytes. Furthermore, the aptamer improved cardiac functions *in vivo*. A membrane penetrating peptide-conjugated phospholamban aptamer is thus a potent inotropic and lucitropic agent and could be a novel drug for heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野： 薬理学

科研費の分科・細目： 基礎医学、薬理学一般

キーワード： ホスホランパン、アプタマー、心筋小胞体、心不全治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の分子メカニズム: 心臓の収縮・弛緩制御は、心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵部位である心筋小胞体による  $\text{Ca}^{2+}$  輸送が主要な役割を果している。この心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送は、 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ ATPase (SERCA) による能動輸送で、心筋小胞体膜蛋白質ホスホランバンによる調節系が存在する。本研究代表者らは、長年にわたり心筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送機構の解析を進め、ホスホランバンの単離・精製 (Inui, M. et al., *J. Biol. Chem.* 260:3708-15, 1985) を端緒に、ホスホランバンが SERCA に直接結合することにより抑制系として働き、ホスホランバンがリン酸化されると抑制が解除されて SERCA が活性化されるとの作用機序及び両者の機能部位を明らかにしてきた (James, P., Inui, M. et al. *Nature* 342:90-92, 1989; Sasaki, T., Inui, M. et al., *J. Biol. Chem.* 267:1674-79, 1992)。これらの働きは、カテコラミンの強心作用、弛緩促進作用の分子メカニズムとして広く知られるようになってきている。

(2) 心不全における心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送: 心不全などの病的状態では、心筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送能が著しく低下し、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇し、細胞機能不全を起こしている。この際、ホスホランバンのノックアウト・マウスでホスホランバンの抑制が解除されて心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  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 (Minamisawa S. et al., *Cell*, 99:313-322, 1999)。以降、ホスホランバンを標的とする心不全の治療が注目を集めている。

(3) ホスホランバンを標的とする心不全治療: ホスホランバンを標的とした心不全治療法は、実験的にウイルス・ベクターを用いた shRNA によるホスホランバンの発現抑制、変異ホスホランバ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、実際の臨床応用には多くの課題が残る。本研究代表者らは、ホスホランバンに結合し、SERCA との相互作用を阻害する薬物を見出すためのスクリーニング方法を開発した (Kimura, Y. & Inui, M. *Mol. Pharmacol.* 61:667-673, 2002)。しかし、企業と共同で膨大な数のライブラリーをスクリーニングしたが、現在までのところこの様な薬物は見つかっていない。海外でも同様の試みがなされたが見つかっていない。

(4) 本研究代表者らの試み: 本研究代表者らは、ホスホランバンに直接結合する一本鎖オリゴヌクレオチド (アプタマー) を 40 塩

基のランダム・ライブラリーからスクリーニングし、ホスホランバンに結合するホスホランバン・アプタマーを得た。アプタマーは特異な高次構造をとり、標的蛋白質に非常に高い親和性で結合する。非常に興味深いことに、このアプタマーはホスホランバンの SERCA への抑制作用を解除し、心筋小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  輸送を著明に促進した (Tanaka, Y., et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329:57-63, 2009)。即ち、ホスホランバン・アプタマーが SERCA-ホスホランバン系に作用する心不全治療薬となり得ることを示している。本研究では、ホスホランバンに特異的に結合するホスホランバン・アプタマーを利用した新たな心不全治療薬を開発することを目指した。

## 2. 研究の目的

心筋細胞内の筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送のみを促進するような薬物は、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入増加を伴わず、弛緩が十分に達成されることから収縮力を増強する理想的な強心薬となり得る。本研究は、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の調節蛋白質であるホスホランバンに特異的に結合するアプタマーを利用して、この様な作用機序を持つ臨床応用可能な新たな心不全治療薬を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 修飾ホスホランバン・アプタマーの取得: 修飾ホスホランバン・アプタマーの取得には、SELEX 法を用いた。この際、40 mer のランダム・ライブラリーからホスホランバンの細胞質ドメインに結合する RNA を 13 サイクルの繰り返しで得た。また、RNA の合成に際しては、APT の代わりに ATP- $\alpha$ -S を用いて修飾アプタマーを得た。さらに、40 mer と同等の機能をもつ 30 mer のアプタマーに絞り込んだ。また、細胞内への導入のために 5' 端に、11 個のアミノ酸からなる TAT ペプチドのうち 5 個の塩基性アミノ酸を Ala に変異した変異 TAT ペプチド (mTAT) つなげ、mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 を作成した。

(2) 修飾ホスホランバン・アプタマーの単離心筋小胞体での検討: 修飾ホスホランバン・アプタマーの活性を *in vitro* で評価するために、単離心筋小胞体及びホスホランバンを欠く単離骨格筋小胞体を用いてアプタマー存在下、非存在下で  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ATPase 活性を測定し、PLN-RNA-Apt(S)-30 による SERCA の促進効果を評価した。

(3) 修飾ホスホランバン・アプタマーの単離心筋細胞での検討：修飾ホスホランバン・アプタマーの心筋細胞への作用を調べるため単離心筋細胞に mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 あるいは RNA 配列を無作為に入れかえた mTAT-PLN-RNA-Scr(S)-30 を加え、電気刺激後の細胞長を測定することによる収縮・弛緩特性への効果を評価した。同時に、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を測定することにより細胞内  $Ca^{2+}$  動態への影響を調べた。

(4) 修飾ホスホランバン・アプタマーの心不全モデルマウスでの検討：修飾ホスホランバン・アプタマーの *in vivo* での効果を調べるため、心不全モデル動物である MLP ノックアウトマウスを用いて尾静脈から mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 あるいは mTAT-PLN-RNA-Scr(S)-30 を投与し、カテーテルを用いて心機能への影響を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 修飾ホスホランバン・アプタマーの開発：本研究代表者らがこれまでに得ていた DNA アプタマーを臨床応用可能なものにするには、マイクロモルからナノモル・レベルで効果を発揮する高力価にすることと血中でも安定なアプタマーにする必要がある。そのため、血中に存在する分解酵素に抵抗性のホスホチオエート修飾した RNA アプタマーを新たに SELEX 法でスクリーニングした。その結果、ホスホランバンに結合する修飾 RNA アプタマー (PLN-RNA-Apt(S)-30) を得た。この修飾アプタマーは、ホスホランバンに高親和性の結合 ( $K_d = \sim 10$  nM) を示し、心筋小胞体  $Ca^{2+}$  輸送を著明に促進した ( $EC_{50} = \sim 20$  nM)。単離骨格筋小胞体では、PLN-RNA-Apt(S)-30 による SERCA の促進効果は見られなかった。興味深いことに、この修飾アプタマーは、非リン酸化ホスホランバンのみに結合し、リン酸化ホスホランバンには結合しなかった。すなわち、SERCA を制御するホスホランバンの構造変化を認識していることを意味する。さらに、血中での安定性を調べたところ、DNA アプタマーが 6 時間で分解されてしまうのに対し、PLN-RNA-Apt(S)-30 は、24 時間後も安定であった。

(2) ホスホランバン・アプタマーの細胞内導入法の開発：一般の DNA、RNA の細胞内導入に使われる陽イオン性脂質によるリポソーム導入法、陽イオン性の水溶性ポリマーによる導入法、HVJ エンベロープを用いた導入法、ナノ粒子を利用した導入法などを検討した。しかし、いずれの方法でも心筋細胞への PLN-RNA-Apt(S)-30 導入効率が十分でな

いか、或いは細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を増加させ細胞機能を低下させたりした。次に、細胞透過性ペプチドを結合した PLN-RNA-Apt(S)-30 を検討した。細胞透過性ペプチドとして Antennapedia、TAT などを検討したが、いずれも一過性の  $Ca^{2+}$  流入が認められ、細胞毒性を示した。そこで、TAT 内の塩基性アミノ酸を非塩基性に換えた修飾 TAT ペプチド (mTAT) を結合させた mTAT-PLN-RNA-

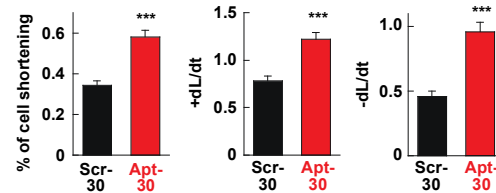
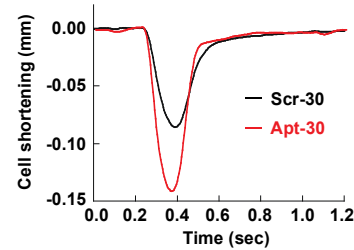


図1 mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 によるラット成獣心筋細胞の弛緩能と収縮性の亢進

Apt(S)-30 を合成し、検討した。その結果、mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 は、細胞毒性を示さず、高率に細胞内に導入された。

(3) 修飾ホスホランバン・アプタマーの単離心筋細胞での検討：ラットの心室から単離した心筋細胞を用いて、mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 の収縮・弛緩能及び細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化に対する効果を調べた。その結果、mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 は、細胞毒性を示さず、高率に細胞内に導入され、ラット成獣心筋細胞の収縮力増強と弛緩促進作用を示した (図1)。これらに対応する細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化も認められた。mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 の RNA 配列を無作為に入れかえた mTAT-PLN-RNA-Scr(S)-30 では、このような作用は見られなかった。

(4) 修飾ホスホランバン・アプタマーの心不全モデルマウスでの検討：ホスホランバン・アプタマーの不全心への効果を MLP ノックアウトマウスを用いて調べた。MLP ノックアウトマウスは、ヒトの拡張型心筋症と同様の症状を呈して心不全を発症してくる。尾静脈への mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 投与 4 時間後に心機能を調べた結果、著明な心機能の改善が認められた。

(5) 以上の結果から、mTAT-PLN-RNA-Apt(S)-30 は、血中での安定性が高く、細胞毒性を示さずに細胞内に導入でき、心筋弛緩能を促進することにより強心効果を発揮する新たな心不全治療薬となり得ることが示された。

#### 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 Honda, T., Ishii, A., and Inui, M. (2013) Regulation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by PDZRN3. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304: in press. 査読有 DOI:10.1152/ajpcell.00343.2012
- ② Shintani-Ishida, K., Inui, M., and Yoshida, K. (2012) Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload. 査読有 *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53:233-239. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.05.012
- ③ So, M., Kotake, T., Matsuura, K., Inui, M., and Kamimura, A. (2012) Concise synthesis of 2-benzazepine derivatives and their biological activity. 査読有 *J. Org. Chem.* 77:4017-4028. DOI: 10.1021/jo300380z
- ④ Miyazaki, Y., Ikeda, Y., Shiraishi, K., Fujimoto, S. N., Aoyama, H., Yoshimura, K., Inui, M., Hoshijima, M., Kasahara, H., Aoki, H., and Matsuzaki, M. (2012) Heart failure-inducible gene therapy targeting protein phosphatase 1 prevents progressive left ventricular remodeling. 査読有 *PLoS one* 7:e35875. DOI: 10.1371/journal.pone.0035875
- ⑤ Aoyama, H., Ikeda, Y., Miyazaki, Y., Yoshimura, K., Nishino, S., Yamamoto, T., Yano, Y., Inui, M., Aoki, H., and Matsuzaki, M. (2011) Isoform-specific role of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca<sup>2+</sup> cycling. 査読有 *Cardiovasc. Res.* 89:79-89. DOI:10.1093/cvr/cvq252
- ⑥ Honda, T., Yamamoto, H., Ishii, A., and Inui, M. (2010) PDZRN3 negatively regulates BMP-2-induced osteoblast differentiation through inhibition of Wnt signaling. 査読有 *Mol. Biol. Cell* 21:3269-3277. DOI: 10.1091/mbc.E10-02-0117

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ホスホランバン標的修飾 RNA アプタマー

発明者：乾 誠、田中貴絵、酒井大樹、池田安宏、松崎益徳

権利者：山口大学

種類：特許

番号：特願 2012-028555

出願年月日：平成 24 年 2 月 13 日

国内外の別：国内

#### 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

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

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