

## 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 4 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22590244

研究課題名（和文）

MAPキナーゼTNNI3K高発現によるTNNI3機能の修飾とその意義

研究課題名（英文）

Significances of modifying TNNI3 function by overexpression of MAP kinase TNNI3K

研究代表者：頼仲 方一 (YORINAKA, Hoichi, 別名: LAI, Zhong-Fang)

熊本大学・生命科学部・助教

研究者番号：90244110

## 研究成果の概要（和文）：

TNNI3K は心筋に特異的に発現し、心筋トロポニン I（学名 TNNI3、略称：cTnI）と相互作用する新規 MAP キナーゼである。本研究は cTnI の生理機能に対する TNNI3K の修飾機序および病理学的意義を検討すると共に虚血性心疾患の新しい分子機序の解明と、それを用いた新たな治療戦略の開発を目的とする。In vitro 実験では PKC、PKA などのリン酸化酵素の阻害薬の投与で、培養心筋細胞の拍動リズムおよび拍動頻度変化に対して TNNI3K 高発現の効果を検討したが、TNNI3K 高発現は cTnI のリン酸化を抑制すると共に PKA パスウェイの活性化を介して心筋細胞の収縮力を促進し、その拍動率も上昇させることが示唆された。In vivo 実験では本研究室で開発した in vivo エレクトロポレーション遺伝子導入法を用いてマウス心臓局所での発現を持続的に亢進させる TNNI3K と心筋収縮力調節蛋白 cTnI との生理学的相互作用及びマウス心筋梗塞などに及ぼす TNNI3K 遺伝子変異した後マウス心臓の不整脈発生率が増加されることの病理学的意義とそれに関する機序を明らかに解明した。我々の結果より、TNNI3K 高発現が心筋虚血や心筋梗塞による心機能傷害に及ぼす保護作用の機序を解明すること、および、TNNI3K を用いた心疾患の早期診断薬の開発や不整脈の新たな治療戦略を提案するが可能になるものと期待できる。

## 研究成果の概要（英文）：

TNNI3K is a MAP kinase specifically and continuously expressed in cardiac muscle and interacted with cardiac troponin I (TNNI3, or: cTnI). The aim of this study is to investigate role of TNNI3K interacting with cTnI on modification the physiological function of cardiomyocytes, suppressing some pathological injuries and to explain the new molecular mechanism for TNNI3K-mutant in the ischemic coronary heart diseases, and hope to develop some new therapeutic strategies.

**In the in vitro experiments,** 1) Effects of PKC inhibitor (GF109203X) or PKA activator (Br-8-cAMP) on the beating frequency were investigated in P19CL6-derived culture beating cardiomyocytes. Results showed that TNNI3K-overexpression increased the contractility and beating frequency together with restrained phosphorylation of cTnI through activation of the PKA pathway but not by blocking of the PKC pathway. 2) Availability of plasma TNNI3K level was investigated using with anti-TNNI3K poly-antibodies in patients diagnosed as AMI (n=40), chronic heart failure (CHF, n=18) and acute renal failure (ARF, n=6); and in healthy volunteers (n=12). Data shown that circulating TNNI3K levels were significantly higher in AMI ( $p<0.001$ ) when compared with other two groups, indicating that measurement of circulating TNNI3K level may be a novel and useful tool to diagnose AMI.

**In the in vivo experiments,** a mutated TNNI3K gene obtained from substitution of serine at 835-836 sites with alanine and was directly transfected into beating hearts using an *in vivo* gene electroporation method. Then, incidence of arrhythmic outbreak was examined in 1) control; 2) wild TNNI3K gene, and 3) TNNI3K-mutant gene introduction groups. The incidences of arrhythmias including bigeminy, tachycardia and bradycardia in the TNNI3K-mutant group were significantly higher than that in other two groups. It is expected that the elucidation of the molecular mechanisms would be connected for creation of some new anti-arrhythmic drugs.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：基礎医学：薬理学一般：創薬・ゲノム薬理学

キーワード：TNNI3K, 心筋トロポニン I, 遺伝子機能, ELISA, 心筋細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

TNNI3K は胎児から成人まで心筋に特異的かつ持続的に発現する新規 MAP キナーゼである。共同研究者らは最近このキナーゼの遺伝子を同定し、MAPKKK の一種である integrin-linked kinase のサブファミリーの一つであると報告した (Zhao Y, et al. J. Mol. Med. 2003)。我々も心筋に特異的に発現し cTnI と特異的に相互作用する TNNI3K による cTnI 活性調節に着目し、多能性幹細胞である P19CL6 細胞に TNNI3K 遺伝子を導入し、高発現させた細胞から心筋細胞を誘導する実験結果から、TNNI3K は心筋細胞への分化初期に見られるアポトーシスを抑制して心筋細胞の発分化を促進することを明らかにしたが、TNNI3K は特異的にトロポニン I と結合し、心筋収縮力や心機能を調節することが推測された。TNNI3K 高発現は心筋細胞の自発拍動頻度や収縮力を増強させ、この心筋収縮機能の促進機序は cTnI のリン酸化抑制による、自発活動電位第 4 相の自動脱分極速度の促進であることを明らかにした (Lai ZF. et al Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008)。本研究では応募者のこれまでの研究成果を踏まえて、TNNI3K 高発現が心筋トロポニン I の機能および心機能傷害に及ぼす作用を解明したい。

### 2. 研究の目的

TNNI3K は心筋に特異的に発現し、心筋トロポニン I と相互作用する新規 MAP キナーゼである。本研究は心筋トロポニン I (学名 TNNI3, 略称: cTnI) の生理機能に対する TNNI3K の修飾機序および病理学的意義を検討すると共に虚血性心疾患の新しい分子機序の解明と、それを用いた新たな治療戦略の開発を目的とする。In vitro 実験では PKC, PKA, PKG などのリン酸化酵素の阻害薬やリン酸化サイトを変異させた cTnI を用いて TNNI3K の効果を検討するが、In vivo 実験では本研究室

で開発した in vivo エレクトロポレーション遺伝子導入法を用いてマウス心臓での発現を持続的に亢進させ TNNI3K と心筋収縮力調節蛋白 cTnI との生理学的相互作用及びマウス心筋梗塞などに及ぼす TNNI3K の病理学的意義を明らかにする。TNNI3K を用いた心疾患の新たな治療戦略を提案する。

### 3. 研究の方法

まず P19CL6 ES 細胞由来の心筋細胞分化モデルを用いて、心筋細胞の細胞電気生理学特徴及び収縮力の変化に対する TNNI3K 高発現の効果とその機序を検討する。特に、心筋トロポニン I のリン酸化に関する PKA, PKC 及び PKG 三つ経路の遮断薬を投与した条件下に TNNI3K 高発現の心筋活動電位や心筋収縮力への効果を観察する。次に P19CL6 細胞に、cTnI の変異遺伝子や非活性型 TNNI3K 変異遺伝子を発現させてトロポニン I のリン酸化が電気活動及び心筋収縮に及ぼす効果を調べる。その一環として P19CL6 細胞由来の心筋細胞における TNNI3K 高発現と cTnI 機能の相互作用の機序を検討する。一方、in vivo エレクトロポレーション遺伝子導入法を用いてマウス心臓での発現を持続的に亢進させ、このモデルで心機能や形態変化を追跡することにより TNNI3K 高発現が心筋傷害後の心臓のリモデリングや心機能低下に対してどのような作用を有するかを解析し、抗 TNNI3K-ポリクローナル抗体を用いた血中 TNNI3K 濃度の変化を測定する。

### 4. 研究成果

1) in vivo エレクトロポレーション遺伝子導入法を用いてマウス心臓で TNNI3K 遺伝子高発現や TNNI3K 変異遺伝子高発現モデルの作成。

TNNI3K 変異遺伝子(S835-836A)を導入した後モデルはマウスの二段脈、三連発、心室性頻脈などを含む不整脈モデルが再現できるので、有効な不整脈の発生機序や治療効果の評判について、よいモデルであると示唆される[Lai ZF, Chen YZ, *ら*: **Resuscitation Science Symposium (ReSS) AHA 2012** (Los Angeles, CA, USA). Nov.3-6, 2012].

## 2) 心筋細胞収縮機能調節における TNNI3K と cTnI の相互作用--- P19CL6 細胞から分化した心筋細胞を用いた TNNI3K と cTnI 相互作用の解析

我々は Flag-only および TNNI3K 高発現 P19CL6 細胞群由来の心筋細胞における、その心筋細胞の拍動頻度の変化に対して PKC の阻害薬である GF109203X、プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化剤である 8-Br-cAMP および広い細胞浸透性プロテインキナーゼ阻害剤である staurosporine の効果を検討した。結果より、(1)GF109203X はその濃度が 20 から 120nM までを投与すると、Flag-only 実験群にも、TNNI3K 高発現実験群にも、その心筋細胞の拍動頻度は、約 25%を増加した。(2)8-Br-cAMP は、対照実験群より、TNNI3K 高発現実験群の場合に、その濃度依存的に心筋細胞の拍動頻度の増加の程度は高かった。(3) Staurosporine は野生型細胞群由来の心筋細胞の拍動頻度にあまり影響を与えないが、TNNI3K 高発現細胞由来の心筋細胞には濃度依存的にその拍動頻度を抑制したことが認められた。

## 3) TNNI3K 高発現が慢性の心筋および心機能傷害に及ぼす作用を調べる。--- TNNI3K 遺伝子 C 末端の調節領域の変異とマウス心臓不整脈の発生。

最近我々は、心筋に特異的に発現する TNNI3K の遺伝子を高発現させることにより心筋細胞への分化初期に見られるアポトーシスが抑制され、心筋細胞の自発拍動頻度や収縮力が増強されることを明らかにした。TNNI3K 高発現心筋前駆細胞をラットやマウスの梗塞心筋局所へ移植するとその心筋細胞再生の促進、梗塞面積の減少、左心室リモデリングの改善が見られた(特許: 頼仲、ら; 論文: Lai, et al: *Am J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 2008; Lai ZF: *Recent Patents on Cardiovasc. Drug Dis.* 2009; Lai and Chen: *World J. Hypertens.* 2012)。今回我々は、野生型 TNNI3K 遺伝子と C 末端の調節領域である 835 と 836 番目の Ser を Ala に置換する変異遺伝子(S835A, S836A)を導入した *in vitro* 心筋細胞モデルおよび *in vivo* マウスモデルの心筋細胞や心拍動状況を観察し、変異遺伝子を導入した実験群は対照実験群に比べて不整脈の発生頻度を検討した。

## 4) MAP キナーゼ TNNI3K を用いた新しい心疾患診断薬の展開研究と開発----- TNNI3K を用いた虚血性心疾患の新しい診断薬の開発

TNNI3K の全長リコンビナント蛋白を用いて、抗 TNNI3K ポリクローナル抗体を作成した。我々はこの TNNI3K キットを利用して、健康者血清と急性心筋梗塞(AMI)患者血清および急性腎不全や慢性心不全歴のある人の血液標本を検体として TNNI3K の血中レベルを測定した。その結果、AMI 患者の血中 TNNI3K 濃度は正常健康者より十倍以上高いという結果が得たが、急性腎不全患者、慢性心不全歴のある患者の血中 TNNI3K 濃度は正常健康者と比べて有意の差はなかった。さらに、我々は、AMI 患者の血中 TNNI3K 濃度と心筋トロポニン I (cTnI) 濃度の変化を比較した。AMI 患者の血中 TNNI3K の上昇程度は cTnI のより高かった。さらに、血中 cTnI 濃度の上昇は、AMI 患者のみならず、他の 6 例の急性腎不全患者の血液サンプルにも有意に増加することが見られたが、同じ患者のサンプルを使って TNNI3K 濃度では増加していなかった。

## 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 10 件)

1. Lai ZF, Chen YZ, Chen J, Kitamoto Y, Sakaguchi N, Kuwahara K, Tsuda H, Sun H, Yang ZQ, Chu JY, Li JM, Zheng JL, and Kim-Mitsuyama S. Circulating level of cardiac-specific MAP kinase, TNNI3K, as a new diagnosis biomarker for acute myocardial infarction 2013, 投稿中. 査読あり
2. Chen YZ Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A24-restricted human CTL epitope by using a new muramyl-dipeptide-derivative adjuvant. **Internal J Immuno Pharm** 2013, 投稿中 査読あり
3. Lai ZF and Chen YZ. (*Editorial*): Evidence, hypotheses and significance of MAP kinase TNNI3K interacting with its partners. **World Journal of Hypertension**. 2(2):22-28, 2012. 査読あり
4. Liu XZ, Zhu LW, Lai ZF, Guo LL, Song LL, Shi

- YZ. Preparation of controlled-release tablets of sasanquasaponin using broomcorn-stalk and its performance. **Advanced Materials Research** Vol 415-417, 1713-1716, 2012. 査読あり
- Liu XZ, Yang JH, **Lai ZF**, Guo LL, Song LL, Bi YQ. Preparation of controlled-release tablets of sasanquasaponin **Advanced Materials Research** Vol.396-398, 1684-1687; 2012. 査読あり
  - Liu XZ, Yang JH, Song LL, Song YX, **Lai ZF**: Preparation of controlled-release tablets of sasanquasaponin-casein. **Spectroscopy and Spectral Analysis**. 32(6):1650-1653, 2012. DOI:10.3964/j.issn.1000-0593(2012)06-1650-04 査読あり
  - Liu D, He H, Li GL, Chen J, Yin D, Liao ZP, **Lai ZF**. Mechanisms of chloride in cardiomyocyte anoxia-reoxygenation injury: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation. **Mol Cell Biochem**. 355(1-2):201-9, 2011. DOI:10.1007/s11010-011-0855-9 査読あり
  - 頼仲方一**, 頼仲玉珍: "血中TNNI3Kレベルの変化に基づく急性虚血性心疾患の新しい診断法" 平成22年度 熊本大学総合技術研究会報告集 (CD-ROM). 07-III-2p01-04, 2011. 査読なし
  - Dong YF, Liu L, **Lai ZF**, Yamamoto E, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Nako H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Aliskiren enhances protective effects of valsartan against type 2 diabeti nephropathy in mice. **J Hypertens**. 28(7):1554-65, 2010. DOI:10.1097/HJH.0b013e328338bb11 査読あり
  - Chen YZ** Liu G, Senju S, Irie A, Hirata S, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. SARS-CoV spike protein-derived HLA-A2-restricted CTL epitope identified by using HLA-A2/D<sup>b</sup>-transgenic mice. **Internatl. J. Immunopath. Pharm**. 23(1):165-177, 2010. 査読あり
- [学会発表] (計 18 件)
- 頼仲方一**: MAPキナーゼであるTNNI3Kとそれのパートナーとの相互作用する証拠、仮説と意義. 第86回日本薬理学会年會 福岡国際会議場、平成25年3月22日。
  - 頼仲方一**, 荒木寛幸: MAPキナーゼTNNI3Kを用いた新しい心疾患診断薬の展開研究と開発. JST推薦シーズ新技術説明会資料集 p33-35, JST東京本部別館ホール、東京・市々谷. 平成25年2月25日。
  - 頼仲方一**, 頼仲玉珍, 津田弘久, 北本康則, 光山勝慶: TNNI3KのC末端調節領域の変異はCa<sup>2+</sup>-oscillationの増加と共にマウス心筋の不整脈発生率を上昇させる。第65回の日本薬理学会西南部会. 熊本、熊本大学薬学部、平成24年11月23日。
  - Kitamoto Y, Kitamura H, Sugai H, Taguma Y, Imamura T, **Yorinaka H**: Urine of AKI patients promotes metanephric cell growth and recovery of renal function after ischemia-reperfusion injury in mouse. *The 2012 ASCB Annual Meeting* (San Francisco, CA), Dec. 15-19, 2012.
  - Lai ZF**, **Chen YZ**, Chen J, Tsuda H, Kitamoto Y, Kim-Mitsuyama S. Mutation of Tnni3k gene increased incidence of arrhythmias in culture cardiomyocytes and *in vivo* mouse hearts. *Resuscitation Science Symposium (ReSS) AHA 2012* (Los Angeles, CA, USA). Nov. 3-6, 2012.
  - Lai ZF** (*Invited speaker*): TNNI3K gene mutation and cardiac arrhythmias. **China Heart Congress 2012**. China National Center. Beijing, China. Aug. 9-12, 2012.
  - Lai ZF**, **Chen YZ**, Tsuda H, Kim-Mitsuyama S. (Oral) Mutation of TNNI3K C-terminal regulatory region increased incidence of arrhythmias in cultured cardiomyocytes and *in vivo* mouse heart. The 85<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Kyoto International Conference Center, Japan, Mar 14-16, 2012.
  - 頼仲方一**, 頼仲玉珍 (シンポジウム): 心原性突然死リスクを抑圧に向けたTNNI3K遺伝子の機能解析と新薬開発。日光シンポジウム—膜輸送体研究の前衛を目指して。日光東照宮晃苑 平成23年12月17-18日。
  - Lai ZF**. Circulating TNNI3K levels as a new diagnosis biomarker for acute myocardial infarction, its background, current situation and

- perspectives. *The 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Heart Research Section*. Tokyo Japan. The National Center of Science Building. Dec. 2-3, 2011.
10. 頼仲方一、頼仲玉珍、津田弘久、光山勝慶。TNNI3KのC末端調節領域の変異は培養心筋細胞とC57BL6マウスでの不整脈の発生を誘発する。第64回の日本薬理学会西南部会福岡、KKRホテル博多、平成23年11月20日。
  11. 頼仲方一: “血中TNNI3Kレベルの変化に基づく急性虚血性心疾患の新しい診断法” Innovation Japan 2011, 東京国際フォーラム、東京有楽町。平成23年9月22日。
  12. 頼仲方一、頼仲玉珍、光山勝慶: “血中TNNI3Kに基づく急性心筋傷害の新しい診断法” 第5回トランス ポーター研究会九州部会、宮崎、ホテルJALシティ。平成23年9月17日。
  13. Lai ZF, Chen YZ, Chen J, Tsuda H, Kim-Mitsuyama: "(Poster) Measurement of circulating TNNI3K level is a novel diagnostic biomarker for acute myocardial infarction" Proceedings the 84<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Yokohama Pacifico, Japan, Mar 24, 2011.
  14. Yorinaka H (Invited speaker): "How TNNI3K interacts with TNNI3? the hypothesis, evidences and significances" 上海応用化工学院シンポジウム2011. 上海応用化工学院, 中国上海, 2011年1月3日。
  15. Lai ZF, (Free topics), Chen YZ, Chen J, Kitamoto Y, Sakaguchi N, and Kim-Mitsuyama S. Elevated plasma level of cardiac-specific MAP kinase TNNI3K in acute myocardial infarction and its significances. *The 20<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology*. (Kagoshima Prefectural Citizens Exchange Center, Japan) Nov. 25-27, 2010.
  16. Lai ZF: (*Symposium*), Chen YZ, Chen J, Kitamoto Y, Sakaguchi N, and Kim-Mitsuyama S. Elevated plasma level of cardiac-specific MAP kinase TNNI3K in acute myocardial infarction and its significance. *Session Core Seven: Stroke Council Award and Lecture: Cerebrovascular Disease/Stroke*. AHA annual meeting (Chicago, Illionis, USA), Nov. 13-17, 2010; *Abstract: Circulation* 122:A14040, 2010.
  17. Lai ZF (*Invited seminar*) TNNI3K, a new MAP kinase gene, could be a molecular target for the treatment and diagnostic agents on cardiac diseases. *Temple University School of Medicine. Philadelphia, PA, USA, 19140, Nov. 9-11, 2010.*
  18. Lai ZF, Chen YZ, Liu L, Kataoka K and Kim-Mitsuyama S. Angiotensin II-induced abnormal electrical activities during hypoxia and reoxygenation would be important arrhythmogenic factors. *World Congress of Cardiology 2010* (Beijing, China). June, 16-19, 2010. *Abstract: Circulation* 122:e115, 2010.

#### [産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

①名称: MAP キナーゼ TNNI3K を用いた心疾患治療剤

発明者: 頼仲方一、丁金鳳、孟 憲敏

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: JP5124812

EP1832299

取得年月日:

JP: 平成 24 年 11 月 9 日

EP: 2011. 7. 20

国内外の別: 国内および国外

#### [その他]

ホームページ等

[www.geocities.jp/yorinakah/laipubmed.html](http://www.geocities.jp/yorinakah/laipubmed.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

頼仲 方一 (YORINAKA, HOICHI)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号: 902441101

(2) 研究分担者

頼仲 玉珍 (YORINAKA, GYOKUCHIN)

熊本大学・生命科学研究部・産学官連携研究員

員

研究者番号: 50418828