

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461127

研究課題名(和文) Rho関連キナーゼが心不全病態を修飾する新規分子機構の解明と治療薬開発

研究課題名(英文) Novel molecular mechanism of Rho related kinase modifying heart failure condition and development of therapeutic drug

研究代表者

竹藤 幹人 (TAKEFUJI, MIKITO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20709117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTP結合タンパク質RhoA(以下、RhoA)は細胞骨格形成、細胞遊走など様々な細胞内機能を制御している。RhoAが制御する細胞内シグナルが疾患については長年、研究されてきたが、RhoAおよびその下流で機能する分子の心臓での働きは不明な点が多い。本研究ではRhoAの標的分子であるRho関連キナーゼに注目し、Rho関連キナーゼの心臓内での新規標的分子を明らかにした。マウス心不全モデルでは、Rho関連キナーゼの活性化されることを確認した。Rho関連キナーゼ欠損マウスでは心不全が改善したことから、心不全発症にRho関連キナーゼが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：RhoA regulates various intracellular functions such as cytoskeleton formation and cell migration. Intracellular signals regulated by RhoA have been studied for many years for diseases, but the functions of RhoA and molecules functioning downstream therefrom in the heart are unclear.

In this study, we focused on Rho related kinase which is a target molecule of RhoA, and revealed novel target molecule in the heart of Rho related kinase. In the mouse heart failure model, it was confirmed that activation of Rho related kinase was activated. Since heart failure was improved in Rho related kinase deficient mice, it was suggested that Rho related kinase is involved in heart failure development.

研究分野：循環器内科

キーワード：キナーゼ 心不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全は全身臓器に十分な血液量を供給できない病態であり、その患者数は増加傾向にある。患者調査(厚生労働省、2011年度)によると、心不全の主要疾患別入院患者数は第2位、外来患者数は第3位であり、心不全に罹患されている方は非常に多い。人口動態統計(厚生労働省、2011年度)の疾患別死因では、心疾患による死亡は悪性新生物に次いで第2位であり、予後不良の疾患として知られている。

心不全の原因疾患として、心筋症や弁膜症などの心臓疾患が知られているが、近年、糖尿病・腎不全のような慢性疾患が心不全の原因になることが注目されている。また、心不全の息苦しさは、日常生活を大きく制限し、末期心不全は非常に苦痛を伴うものであり、治療の重要性が指摘されている。慢性心不全治療薬として、主に利尿剤や交感神経β受容体遮断薬が使用されているが、心筋での薬効は不明な点が多く、心筋保護作用をもつ新規治療薬の開発が望まれている。

(2) 低分子量 GTP 結合タンパク質 RhoA (以下、RhoA) は細胞骨格形成、細胞遊走など様々な細胞内機能を制御しており、その機能は高血圧、癌などの疾患発症に関与していることが知られている。RhoA が制御する細胞内シグナルが疾患については長年、研究されてきたが、RhoA およびその下流で機能する分子の心臓での働きは不明な点が多い。

2. 研究の目的

心臓は主要臓器を含めた体全体が必要とする血液量を送り、生体の恒常性を維持している。心不全は心臓のポンプ機能が著しく低下し、様々な臓器が機能不全に至る疾患である。キナーゼは平滑筋、神経、がん細胞では多様な生理機能を制御していることが明らかにされているが、心臓におけるキナーゼの機能は未だ不明な点が多い。申請者は、心不全時に G タンパク質及び低分子量 RhoA が働き、複数の Rho 関連キナーゼが活性化することを見出している。本研究の目的は、Rho 関連キナーゼの新規標的分子を探索し、キナーゼによる標的分子リン酸化の生理機能を解析し、心不全における Rho 関連キナーゼの役割を明らかにすることである。キナーゼを中心とした心不全研究は独創性が高く、本研究の結果は新たな心不全治療法に繋がること期待できる。

3. 研究の方法

(1) アフィニティーを用いた標的分子の網羅的探索

Rho 関連キナーゼを GST 結合タンパク質として精製し、ビーズに結合させて固相化する。ビーズと心臓の溶解質を混合し、キナーゼに結合した分子を集める。従来の方法と異なり、溶質液に脱リン酸化酵素阻害薬とγATP を加

えることにより、結合分子がキナーゼによってリン酸化された状態で解析する。Rho 関連キナーゼと結合し、かつリン酸化された分子を質量分析法により同定し、リン酸化部位も同時に決定する。

(2) Rho 関連キナーゼの遺伝子欠損マウス作製

Rho 関連キナーゼには複数のアイソフォームが報告されており、定量性 PCR 法を用いて、心筋細胞に高発現する Rho 関連キナーゼのアイソフォームを 2 種、明らかにした。2 種類のアイソフォームについて、それぞれ、遺伝子欠損マウスを作製している。遺伝子欠損マウスは tamoxifen を投与することにより Rho 関連キナーゼが心筋特異的に欠損されるシステムになっている。

(3) アンギオテンシン II 負荷心不全モデル

浸透圧ポンプを用いて、アンギオテンシン II を 4 週間投与し、心臓超音波検査による心機能評価、左室重量の測定などにより心不全の発症について評価した。

(4) 圧負荷心不全モデル

マウス心不全モデルのスタンダードモデルである TAC 術 (transverse aortic constriction) を行い、圧負荷心不全における Rho 関連キナーゼの働きについても検討を行う。アンギオテンシン II 負荷モデルでは比較的短期間 (4 週間前後) の評価が主であるが、TAC 術モデルではより長期に評価することにより慢性心不全に認められる心拡大と Rho 関連キナーゼの評価を行う。

(5) リン酸化の細胞生物学的意義の解明

Rho 関連キナーゼの新規標的分子のリン酸化の働きについて、細胞生物学的手法を用いて評価を行う。標的分子をクローニングし、リン酸化部位をアミノ酸置換し、その影響について評価を行う。標的分子が転写因子の制御に関わっている報告もあり、リン酸化により心不全関連遺伝子の発現が促進もしくは抑制されるかを検討し、また、その制御メカニズムについても検討する。

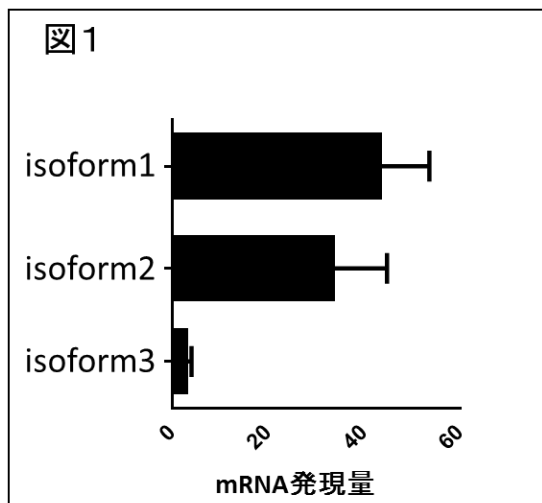
4. 研究成果

(1) Rho 関連キナーゼの新規標的分子

Rho 関連キナーゼの心筋での発現を確認した。心筋細胞には、Rho 関連キナーゼの isoform1 と isoform2 が発現していたが、isoform3 は発現していないことを確認した (図 1)。

次に、Rho 関連キナーゼの新規標的分子として、心不全発症に関わる遺伝子発現を促進する転写因子調節タンパク質を同定した。リン酸化部位は 2 箇所あり、各リン酸化部位に対して特異的なリン酸化抗体を作成した。Rho 関連キナーゼを過剰発現させた培養心筋

細胞では、2箇所ともリン酸化修飾を受けることをウエスタンブロット法により確認した。

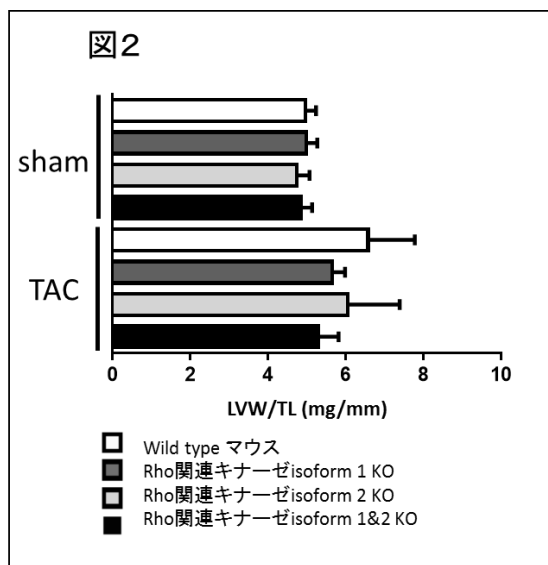


(2) 心筋特異的 Rho 関連キナーゼ欠損マウス
心筋特異的 Rho 関連キナーゼ欠損マウスを作製した。PCR 法およびウエスタンブロット法により、心筋特異的に Rho 関連キナーゼが欠損していることを確認した。

心筋特異的 Rho 関連キナーゼ欠損マウスを1年間飼育したが、心重量および心駆出率はコントロールマウスと有意な差は認めなかった。

(3) 圧負荷心不全モデル

Rho 関連キナーゼ欠損により非ストレス下の心機能には影響がないことから、圧負荷ストレスによる心不全モデルを用いて、評価した。Wild type マウスと Rho 関連キナーゼ欠損マウスに TAC 術を施行し、4週後の心重量、を評価した(図2)。

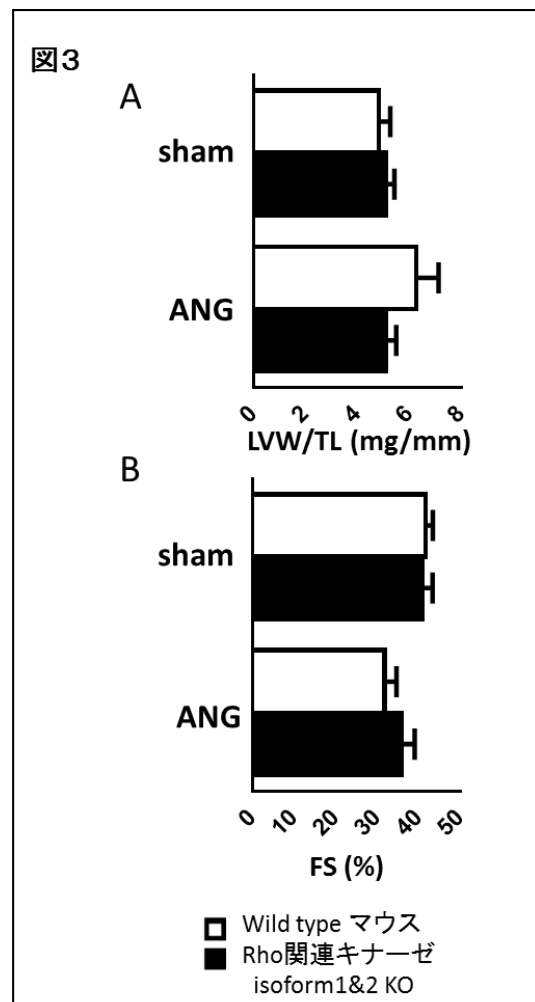


TAC 術により心肥大を認めたが、Rho 関連キナーゼ欠損により、心肥大は抑制された。

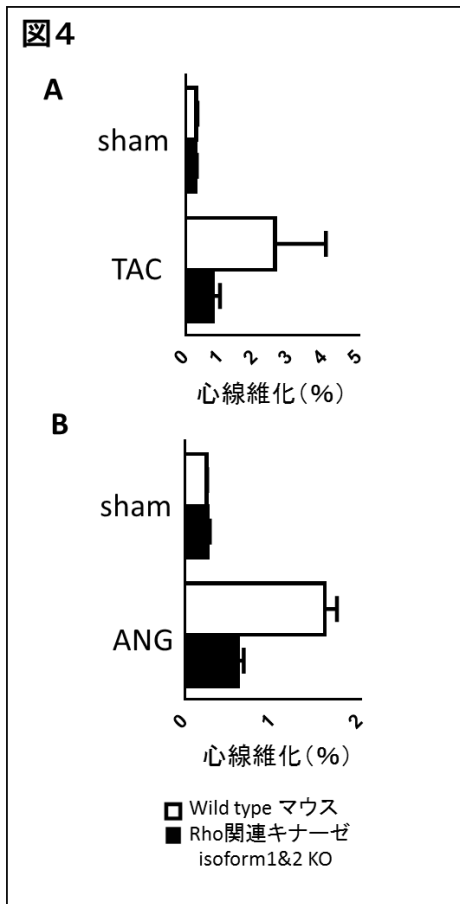
心不全のマーカーである BNP 上昇も Rho 関連キナーゼ欠損により改善を認めた。

(4) アンギオテンシン II 負荷心不全モデル :

Rho 関連キナーゼ欠損により非ストレス下の心機能には影響がないことから、アンギオテンシン II を4週間投与し、Wild Type マウス (15匹) と心筋特異的 Rho 関連キナーゼ欠損マウス (15匹) を比較検討した。アンギオテンシン II の持続投与により Wild Type マウスの心重量は1.5倍程度大きくなったが、Rho 関連キナーゼ欠損マウスでは、心肥大の傾向が抑制された(図3A)。心機能の指標となる FS も改善し(図3B)、また、血中 BNP 濃度の改善も認められ、心不全の改善傾向を認めた。

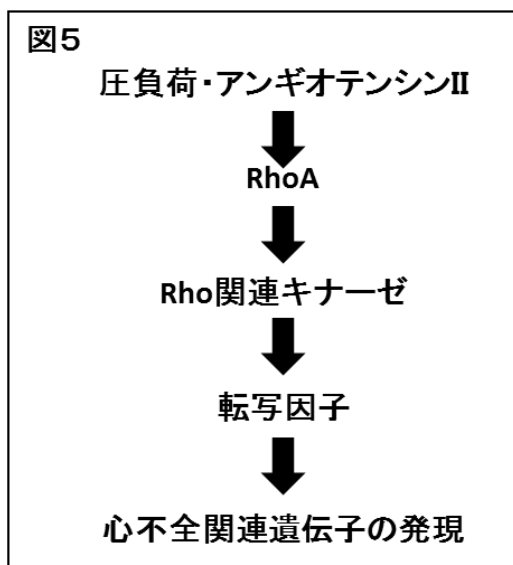


心肥大の抑制に加え、心臓の線維化を sirius red 染色により評価した。TAC 術およびアンギオテンシン II ともに心臓の線維化を促進するが、Rho 関連キナーゼの欠損により心臓の線維化も抑制された(図4A, B)。



(5) Rho 関連キナーゼと心不全発症メカニズム

標的キナーゼを GST 結合タンパク質として精製し、ビーズに結合させて固相化後、ビーズと心臓の溶解質を混合し、キナーゼに結合した分子を集めた。溶質液に脱リン酸化酵素阻害薬と γ ATP を加えることにより、結合分子がキナーゼによってリン酸化された状態で解析する方法を申請者らは開発している (PLoS One 2010 年)。



Rho 関連キナーゼと結合し、かつリン酸化

された分子を質量分析法により同定し、リン酸化部位も同時に決定する。心不全の心筋細胞では、転写因子の活性化が注目されており、同定された分子のうち、特に転写因子もしくはその関連分子のリン酸化に注目し、解析した。解析の結果、複数の転写因子調節タンパク質をリン酸化に参与している可能性がある (図5)。

今後は、細胞生物学的手法などを用いて、リン酸化と心不全発症メカニズムについて研究を進める予定である。

(6) Akt と Girdin のリン酸化について

Rho 関連キナーゼと心不全の解析に加え、Akt と心筋梗塞の関連についても解析を行っている。研究の成果については、論文報告をしている。

Girdin は心臓線維芽細胞に発現しリン酸化されることが確認し、Girdin のリン酸化は心臓線維芽細胞の増殖及び遊走能の制御を介して、心筋梗塞後の組織修復に必要なコラーゲンの産生に重要な役割を果たしていることを示した。Girdin SA マウスでは心筋梗塞後の心臓破裂が高頻度で発生し、生命予後が不良であり、Girdin のリン酸化のが阻害されることによる心筋梗塞後の不十分な組織修復が不良な生命予後につながると考えられた。近年、心臓線維芽細胞はコラーゲンなどの細胞外基質を産生し、傷害を受けた心臓の組織修復に関与重要な役割を果たしていると報告されており、Akt による Girdin のリン酸化が心筋梗塞後の組織修復に重要な役割を果たしていることが示唆された。最近、Girdin は肝線維化、血管損傷後の新生内膜形成、腎障害に関与していると報告されているが、心臓での Girdin の発現について初めての報告であり、心臓線維芽細胞に発現していることは間葉系細胞に発現している点で肝臓や腎臓と同様である。in vitro では種々の液性因子刺激による心臓線維芽細胞の増殖・遊走に Akt が関与することが知られていると報告されているが、心筋梗塞後の心臓での心臓線維芽細胞における Akt の役割は十分に解明されていない。Girdin が Akt による Girdin リン酸化されることが心臓線維芽細胞の増殖と遊走を制御していることを明らかにした。

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 1 件)

Akt-dependent Girdin phosphorylation regulates repair processes after acute myocardial infarction.

Hayano S, Takefuji M (corresponding author), Maeda K, Kobayashi K, Enomoto A, Takahashi M, Murohara T. J Mol Cell Cardiol. 2015 年; 88: 55-63, 査読有
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.09.012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹藤 幹人 (TAKEFUJI, Mikito)
名古屋大学・医学部附属病院・
助教
研究者番号: 20709117

(2) 研究分担者

天野 睦紀 (AMANO, Mutsuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
准教授
研究者番号: 90304170

(3) 連携研究者

室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
教授
研究者番号: 90299503

(4) 連携研究者

貝淵 弘三 (KAIBUCHI, Kozo)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
教授
研究者番号: 00169377