

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461138

研究課題名(和文) 心筋型ミオシン軽鎖キナーゼを創薬標的とした新たな心血管作動薬の開発

研究課題名(英文) Novel cardiovascular drug discovery based on the cardiac-MLCK signalings

研究代表者

瀬口 理 (Osamu, Seguchi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医師

研究者番号：60570869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：cardiac-MLCKはヒト不全心筋検体の網羅的遺伝子発現解析により申請者らが世界に先駆けて同定した心筋特異的分子である。本分子はリン酸化酵素であり、ミオシン軽鎖をリン酸化することにより、心筋細胞のサルコメア構築や心筋収縮力に変化を与えると報告されている。本研究はcardiac-MLCKに特異的に結合する特殊ペプチドを創薬シーズとして新たな心血管作動薬を開発することを目的としており、現在それらペプチドのcardiac-MLCKリン酸化シグナルに与える効果を評価している。

研究成果の概要(英文)：A cardiac-MLCK is the cardiac specific molecules that has been discovered by the author of this research. A cardiac-MLCK is the kinase that has been reported to play a key role in reconstitution of sarcomere structures and myocardial contraction. The purpose of this research is to discover the novel drugs for cardiovascular systems based on the peptides that has specifically bound to cardiac-MLCK. Now we are evaluating the biological effect of these peptides on cardiac-MLCK signaling in both in vivo and in vitro settings.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 創薬

1. 研究開始当初の背景

本研究課題は 2007 年に申請者らが同定し、発表した心筋特異的リン酸化酵素である cardiac-MLCK に端を発する (Seguchi O, Takashima M, Kitakaze M, et al. J Clin Invest. 2007;117:2812-24)。

本リン酸化酵素はヒト不全心筋検体を用いた網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ解析) において心不全重症度に比例してその遺伝子発現が上昇する遺伝子として同定された。本報告では cardiac-MLCK 遺伝子は心筋特異的に発現し、心不全重症度として特に肺動脈圧に比例してその遺伝子発現が上昇することから不全心筋において重要な役割を持つことが示唆された。

cardiac-MLCK はリン酸化酵素であり、基質としてミオシン軽鎖をリン酸化することが知られている。これまでは心筋においては骨格筋型の MLCK が発現していると考えられてきたが、心筋にも特異的な MLCK が存在することが明らかとなった。ラット心筋細胞において本遺伝子を過剰発現させたところ、心筋細胞のサルコメア構造構築が促進され、本遺伝子を siRNA を用いてノックダウンしたところ、サルコメア構造の乱れが認められた。

さらには in vivo における本遺伝子の機能解析目的にゼブラフィッシュにおいて本遺伝子をノックダウンしたところ、心臓発生に異常を来したため、cardiac-MLCK はミオシン軽鎖のリン酸化を介して心筋サルコメア構造構築を促進することが明らかとなった。

その後、家族性心筋症の遺伝子解析により cardiac-MLCK の遺伝子変異が同定され、心不全のみならず、心筋症との関わりも示唆されている (本研究は現在他施設の研究社らにより論文作成中)。そのような中でリン酸化酵素である cardiac-MLCK の酵素活性の修飾が新たな心血管作動薬の開発につながる可能性があると考え、本研究を着想した。

cardiac-MLCK を創薬標的とした研究は以前から着手しており、他施設研究者との共同研究によりすでに cardiac-MLCK と特異的に結合する特殊ペプチドの合成に成功している。これら特殊ペプチドは「RAPID system」と呼ばれるペプチドの合成と標的タンパクとの結合性の評価を効率的に行うスクリーニングシステムであり、本システムの応用により 8 種類の特殊ペプチドを合成した。現在 In vitro の実験系においてそれら特殊ペプチドが cardiac-MLCK のリン酸化活性を抑制することを見いだしており、本研究課題の中で cardiac-MLCK のリン酸化活性修飾が心筋細胞に与える効果などの解析をすすめる、創薬標的としての可能性を探索する。

2. 研究の目的

本研究課題は現在、以下の二つの研究目的

に沿って進めている。

cardiac-MLCK の不全心筋における機能解析

cardiac-MLCK の不全心筋における遺伝子ならびにタンパク、さらには基質のリン酸化についてはいまだ十分に解明されていない。そのためヒト不全心検体もしくは小動物の心不全モデルから得られた検体を用いた様々な遺伝子・タンパク発現解析により不全心筋における cardiac-MLCK-ミオシン軽鎖リン酸化シグナルの役割を解明する。

cardiac-MLCK のリン酸化活性を収縮する新たな心血管作動薬の開発

主にはすでに合成した特殊ペプチドの cardiac-MLCK に対する効果を in vitro で確認するとともに、細胞内、in vivo でもその効果を確認し、創薬標的としての有用性を確認する。創薬標的としての有用性が確認できれば小動物から大動物、ヒトへの応用を目指して研究を進める。

3. 研究の方法

研究目的別に記載。

重症心不全症例に装着する機械的補助純化装置である左室補助人工心臓 (LVAD) 装着時には左室心尖部の心筋をくりぬき、同部よりポンプの脱血管を挿入する。その際に得られる LVAD 装着時左室心筋検体および移植時摘出検体における病理学的解析に平行して遺伝子発現、タンパク発現解析を行う。また補助人工心臓装着下に心臓移植に至った心不全患者の移植時摘出心臓検体についても同様の病理学的解析、遺伝子発現、タンパク発現解析を行う。心不全重症度とともに、LVAD 装着後の心機能回復との関連について解析する。

マイクロアレイ解析は SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K array, Agilent を用いて行い、得られたデータは GeneSpring version 12.5, Agilent を用いて解析する。

cardiac-MLCK のリン酸化アッセイ系の確立と、確立したアッセイ系を用いた cardiac-MLCK 活性修飾ペプチド (他施設との共同研究において合成) の効果を確認する。

cardiac-MLCK の in vitro リン酸化アッセイ系:培養細胞内にて過剰発現させた cardiac-MLCK 全長タンパクを免疫沈降にて精製し、市販の MLCK 基質ペプチドと ^{32}P -ATP を 37 度 1 分~5 分インキュベートし、 ^{32}P の取り込みの程度で評価した。

心筋細胞および in vivo リン酸化アッセイ系については現在構築中。

4. 研究成果

研究期間内に 21 例のヒト移植時摘出心臓体および 50 例のヒト LVAD 装着時心臓体を検体を収集し、マイクロアレイ解析を実施した。対照として脳出血等、心疾患以外の疾患を死因とする剖検例より健常心の検体を収集し、解析した。

移植時摘出心 21 検体においてマイクロアレイ解析を行った。そのうち 4 例は LVAD 装着中に臨床的な心機能改善（脳性ナトリウム利尿ペプチドの低下、心臓超音波検査による左室径の収縮、左室駆出率の改善、人工心臓補助下の自己心拍出の増加）を認めている。4 例の心機能回復群と 17 例の心機能非回復群、さらには正常対照群の 3 群においてクラスタリング解析を行ったところ、ある特定の 316 プロブの発現パターンに関しては心機能回復群は心機能の回復を認めない非回復群よりも正常対照群に近い遺伝子発現パターンを示していた。それにより一部の遺伝子に関しては LVAD 装着による自己心機能回復が遺伝子発現レベルにも変化を及ぼしていることが示唆された。本解析にて cardiac-MLCK の遺伝子発現についても解析したが、現時点では不全心筋における cardiac-MLCK 遺伝子発現が上昇している傾向は認めるが、LVAD 装着による心機能回復群と非回復群との比較では明確な差を認めなかった。今後は基質であるミオシン軽鎖の発現解析と、さらにはプロテオーム解析にて基質のリン酸化解析も進める。今後症例の蓄積により差が認められる可能性があり、さらに検体を収集している。

また同一症例において LVAD 装着時心臓体と移植時摘出心臓体の異なる 2 時点の検体が得られてきているため、同一症例内での異なった時点で得られた検体の解析も進めていく。

合成した cardiac-MLCK 活性修飾特殊ペプチドは in vitro のリン酸化アッセイ系において cardiac-MLCK のリン酸化活性を抑制することが再現性をもって確認できた。現在 in vivo でのリン酸化アッセイ系の確立とともに、合成ペプチドのリン酸化活性抑制効果の特異性確認のため、cardiac-MLCK リン酸化ドメインと相同性の高いドメインを持つ skeletal muscle-MLCK に対する合成ペプチドの効果をj確認している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

著者: 黒田健輔 瀬口理 南野直人 錦織充広 他

題名: 「左室補助人工心臓装着による病理学

的所見の変化」

学会名: 心筋生検研究会

開催日時: 2015 年 12 月 11 日

開催場所: 神戸国際会議場

著者: Kensuke Kuroda, Osamu Seguchi, Naoto Minamino, Mitsuhiro Nishigori, et al.

題名: Left Ventricular Assist Dive Support Provide Drastic Restoration of Gene Expression Together with Myocardial Recovery in Patients with Advanced Heart Failure.

学会名: International Society of Heart and Lung Transplantation Annual meeting 2015 (ISHLT annual meeting 2015)(国際心肺移植学会 2015)

開催日時: April 17, 2015.

開催場所: Nice, France.

〔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〕

ホームページ等
国立循環器病研究センター創薬オミックス
解析センターホームページ
<http://www.ncvc.go.jp/omics/about/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 瀬口 理

Seguchi Osamu

国立研究開発法人国立循環器病研究センター 移植医療部
医長

研究者番号: 60570869

(2) 連携研究者 黒田健輔
Kuroda Kensuke
国立研究開発法人国立循環器病研究センター 移植医療部
医師

研究者番号：

(3) 連携研究者 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 臨床研究センター
部長

研究者番号：

(4) 研究協力者 南野直人
Minamino Naoto
国立研究開発法人国立循環器病研究センター 創薬オミックス解析センター
部長

(5) 研究協力者 錦織充広
Nishigori Mitsuhiro
国立研究開発法人国立循環器病研究センター 創薬オミックス解析センター
特任研究員