

第 5 回万有医学奨励賞—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	名古屋大学医学部 循環器内科
氏 名	竹藤 幹人
研究テーマ	心疾患発症に関わるキナーゼの網羅的解析

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

細胞内では遺伝子発現、分子間結合、糖・脂質代謝などによりシグナルが伝達され、生体の恒常性を維持している。分子間結合は主要な細胞内シグナル伝達であり、共有結合による分子間結合に加え、非共有結合による分子間相互作用は様々な生理機能を調節している。プロテインキナーゼによるタンパク質のリン酸化は非共有結合性のシグナル伝達の代表例であり、*in vitro* および *in vivo* 手法を用いて多様な生理現象との関連が報告されてきた。何らかの原因によりプロテインキナーゼの酵素活性が低下し、タンパク質リン酸化のバランスが崩れると、正常な生理機能が抑制され、生体の恒常性維持が困難となる。反対に、過剰なリン酸化は、細胞内に病的なシグナルを生じさせ、過剰な細胞増殖や細胞収縮を引き起こし、悪性腫瘍や高血圧などの疾患を発症することが知られている。過剰なリン酸化は疾患発症に大きく関与していることから、プロテインキナーゼは治療のターゲットとしても注目されている。悪性腫瘍が生じる消化管、肺、神経などの臓器ではプロテインキナーゼとリン酸化について数多くの研究がされてきたが、心臓におけるプロテインキナーゼの役割は不明な点が多い。

プロテインキナーゼの網羅的機能解析：心臓特異的プロテインキナーゼを同定するため、脳(大脳皮質・小脳などの各部位)、肺、気管支、大動脈、心臓(右心房、左心房、右心室、左心室の各部位)、骨格筋、大静脈、腎臓、肝臓、骨髄の 17 組織のヒト RNA を用意し、全 518 種類のプロテインキナーゼの発現量を nCounter 法により測定した。心臓に強発現するプロテインキナーゼには「全ての臓器にユビキタスに発現するプロテインキナーゼ」、もしくは「心臓および骨格筋の筋組織に発現するプロテインキナーゼ」が多くを占めた。心臓特異的かつ強発現するプロテインキナーゼとして論文報告のない機能未知な Cardiac Kinase X を本研究のテーマとし、Cardiac Kinase X の臓器・組織分布：Cardiac Kinase X の臓器・組織分布を確認するため、マウス胎児(胎生 18.5 日)、マウス成体(週齢 8 週)の Cardiac Kinase X の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより評価した。臓器分布については、Cardiac Kinase X は心臓特異的に発現し、心筋細胞のみに発現していた。胎生 18.5 日では、心房中隔全体に Cardiac Kinase X が発現していたが、週齢 8 週では、房室結節にその発現が限局していることを見出していた。心筋特異的 Cardiac Kinase X 欠損マウスを作製し、心電図、心エコーなどを用いて、Cardiac Kinase X の生理的な機能について検討した。

第 5 回万有医学奨励賞—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	名古屋大学医学部 循環器内科
氏 名	竹藤 幹人
研究テーマ	心疾患発症に関わるキナーゼの網羅的解析

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

研究背景

リン酸化がシグナル伝達の重要な機構であることが明らかにされて以降、リン酸化を制御するプロテインキナーゼは多くの研究者によって研究されてきた。ヒトゲノムには 518 種類のプロテインキナーゼがコードされ、CaMK ファミリー、チロシンキナーゼなど、7 つのクラスに分類されている。いずれのグループに属するプロテインキナーゼも数多くの興味深い生理機能を制御していることが報告されてきた。ユビキタスに発現するプロテインキナーゼは悪性腫瘍・神経・免疫など幅広い分野の研究者によって研究されてきたが、心疾患におけるプロテインキナーゼの役割は不明な点が多い。

研究目的

細胞内では遺伝子発現、分子間結合、糖・脂質代謝などによりシグナルが伝達され、生体の恒常性を維持している。分子間結合は主要な細胞内シグナル伝達であり、共有結合による分子間結合に加え、非共有結合による分子間相互作用は様々な生理機能を調節している。プロテインキナーゼによるタンパク質のリン酸化は非共有結合性のシグナル伝達の代表例であり、in vitro および in vivo 手法を用いて多様な生理現象との関連が報告されてきた。518 種あるプロテインキナーゼはタンパク質をリン酸化し、タンパク質の構造・性質を大きく変化させ、タンパク質もしくはシグナル伝達経路全体を活性化もしくは不活性化させている。このプロテインキナーゼが制御する活性化・不活性化は、細胞内シグナルのスイッチの役割を果たしている。例えば、肝臓では、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) がホスホリラーゼをリン酸化・活性化し、このホスホリラーゼ活性化は莫大な量のグルコースを血中に放出し、全身へのエネルギー供給を制御している。また、骨格筋では、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) がミオシン軽鎖をリン酸化し、リン酸化によりミオシン軽鎖構造が変化し、ミオシン軽鎖上をアクチンが滑り、骨格筋が収縮する。このように、プロテインキナーゼはタンパク質をリン酸化することにより、生体機能のスイッチとして働いている。

何らかの原因によりプロテインキナーゼの酵素活性が低下し、タンパク質リン酸化のバランスが崩れると、正常な生理機能が抑制され、生体の恒常性維持が困難となる。反対に、過剰なリン酸化は、細胞内に病的なシグナルを生じさせ、過剰な細胞増殖や細胞収縮を引き起こし、悪性腫瘍や高血圧などの疾患を発症することが知られている。過剰なリン酸化は疾患発症に大きく関与していることから、プロテインキナーゼは治療のターゲットとしても注目されている。悪性腫瘍が生じる消化管、肺、神経などの臓器ではプロテインキナーゼとリン酸化について数多くの研究がされてきたが、心臓におけるプロテインキナーゼの役割は不明な点が

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

多い。

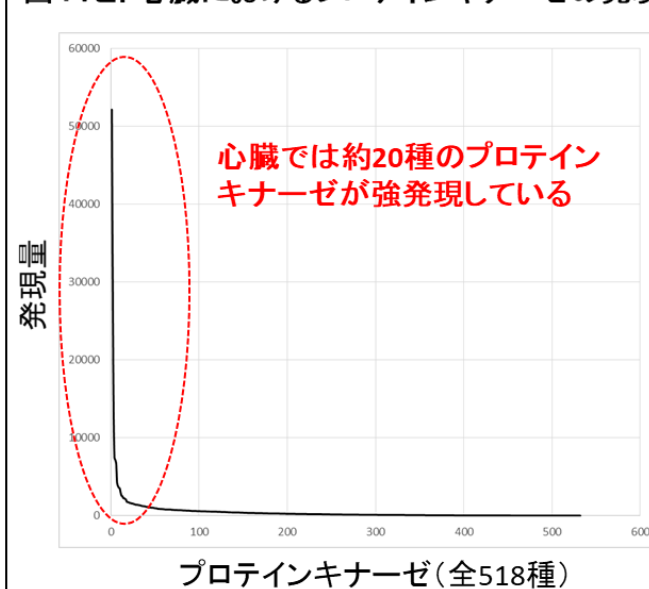
心臓は全身に血液を送るポンプ機能として絶えず収縮と弛緩を繰り返していることから、心臓ではシグナル伝達のオン・オフのスイッチ機構が絶えず働いていると推察される。心筋細胞は増殖・分裂しない終末細胞であり、出生後、生涯同じ細胞が一日に 10 万回収縮し、全身に血液を供給している。本研究の目的は、ヒトに発現する全 518 種のプロテインキナーゼを網羅的解析し、心臓特異的に発現するプロテインキナーゼを同定し、プロテインキナーゼによるスイッチ機構が心臓のどのような生理機能を制御しているかを明らかにすることである。心臓のポンプ機能を制御するシグナル解析は、ヒトの不変的な生理機能を明らかにする独創的な研究になると考えている。また、心臓特異的プロテインキナーゼは他臓器への影響が少ない心臓のみを標的臓器とする薬剤開発に繋がり、また、心筋特異的プロテインキナーゼを同定することは心毒性を来さない薬剤スクリーニングへの応用も可能となり、創薬を通じた治療への貢献も期待できる。

研究方法および結果

(実験1)プロテインキナーゼの網羅的機能解析:

心臓特異的プロテインキナーゼを同定するため、脳(大脳皮質・小脳などの各部位)、肺、気管支、大動脈、心臓(右心房、左心房、右心室、左心室の各部位)、骨格筋、大静脈、腎臓、肝臓、骨髄の17組織のヒト RNA を用意し、全 518 種類のプロテインキナーゼの発現量を nCounter 法により測定した(図1)。心臓に強発現するプロテインキナーゼには「全ての臓器にユビキタスに発現するプロテインキナーゼ」、もしくは「心臓および骨格筋の筋組織に発現するプロテインキナーゼ」が多くを占めた。心臓特異的かつ強発現するプロテインキナーゼとしてミオシン軽鎖リン酸化酵素(MYLK3)と Cardiac Kinase X を同定した。MYLK3 は大阪大学の高島博士・北風博士らにより論文報告されている(J Clin Invest 2007 年)。論文報告のない機能未知な Cardiac Kinase X を本研究のテーマ分子とした。Cardiac Kinase X の右心房、左心房、右心室、左心室の発現を比較すると右心房に最も発現していることを見出している。また、胎児、成人、老人の発現量を比較したが、年齢による発現量の変化は認められなかった。

図1:ヒト心臓におけるプロテインキナーゼの発現



(実験2) Cardiac Kinase X の臓器・組織分布:

Cardiac Kinase X の臓器・組織分布を別の方法で確認するため、マウス胎児(胎生 18.5 日)、マウス成体(週齢 8 週)の Cardiac Kinase X の発現を in situ ハイブリダイゼーションにより評価した。臓器分布については

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

nCounter 法と同様、Cardiac Kinase X は心臓特異的に発現し、心筋細胞のみに発現していた。胎生 18.5 日では、心房中隔全体に Cardiac Kinase X が発現していたが、週齢 8 週では、房室結節にその発現が限局していることを見出した(図2)。

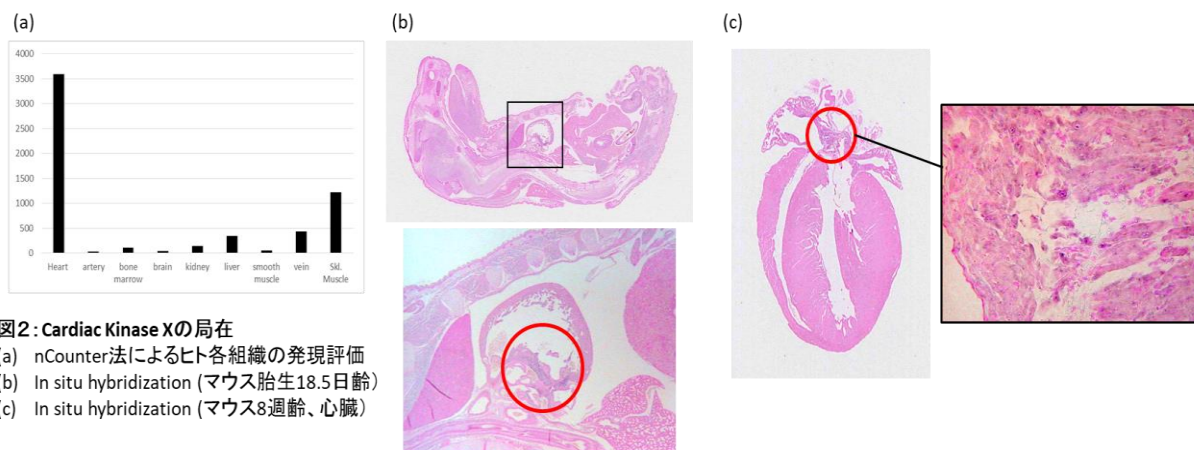


図2: Cardiac Kinase Xの局在

- (a) nCounter法によるヒト各組織の発現評価
 (b) In situ hybridization (マウス胎生18.5日齢)
 (c) In situ hybridization (マウス8週齢、心臓)

(実験3) Cardiac Kinase X 欠損マウス:

CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子欠損マウスを作製は、研究期間が大幅に短くできる方法として注目されている。本研究でも CRISPR-Cas9 システムを用いて Cardiac Kinase X のコンベンショナル遺伝子欠損マウスとコンディショナル遺伝子欠損マウスを作製した。

まず初めにコンベンショナル遺伝子欠損マウスを用いて、胎生致死の有無を評価したが、wild type マウス、ヘテロ欠損マウス、完全欠損マウスともに胎生致死の違いはなく、また、形態的な異常も認めないことから、Cardiac Kinase X が胎生期の心臓形成への関与は否定的であった。

続いて、成体マウス(週齢 8 週)では Cardiac Kinase X が房室結節に限局して発現しており、心電図(安静時、カテコラミン負荷時、心不全時)により房室結節を中心とした生理機能への影響を遺伝子欠損マウスにより解析した。遺伝子欠損マウスでは、心房心室間の伝導時間が wild マウスよりも延長している傾向を認めたが、統計学的な有意差は認めなかった。現在、週齢 52 週までのマウスを心電図にて評価を行っており、加齢により不整脈の発生に関与するか否かを評価している。

また、圧負荷心不全モデルや心筋梗塞モデルなどを用いた、心疾患における Cardiac Kinase X の機能について、現在、検討中である。

今後の課題

未知なプロテインキナーゼの機能解析は、生物学・医学的に重要な新たなシグナル伝達のスイッチ機構を明らかにすることに繋がる。Cardiac Kinase X の局在評価では、これまでにプロテインキナーゼとは異なるユニークな生理機能を制御している可能性を秘めているが、遺伝子欠損マウスを用いた実験では生理機能は見出せておらず、今後、薬剤負荷、加齢、疾患モデルなどを用いて、機能解析を進めていく。

第 5 回万有医学奨励賞－生活習慣病領域－
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所	属	
氏	名	

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	
2	
3	
4	

② <論文 PDF 添付なし>

1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究追加助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1		
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2018 年 6 月 投稿	Circulation (リバイス実験中)
2		
3		
4		