

ミオシン調節軽鎖のリン酸化を標的とした経口強心薬の開発

塚本 蔵

大阪大学大学院医学系研究科

【研究の背景】

従来の強心剤は cAMP-PKA signaling pathway を活性化し、細胞内 Ca^{2+} 動態など多岐にわたる下流因子に影響を与えるため、心筋酸素消費量の増加、神経体液性因子の活性化、不整脈や低血圧の誘発などが問題であった。ミオシン軽鎖のリン酸化は心筋の収縮性を増強するが、その際、他の signaling pathways に影響を与えない。よってミオシン調節軽鎖リン酸化増強剤は、副作用が少なく、生命予後の悪化させずに心収縮性を増強し、血行動態の改善を図ることができる理想的な強心剤と成り得る可能性がある。

【目 的】

生命予後に悪影響を及ぼさずに血行動態の改善できる新しい経口心不全治療薬を開発することで、治療抵抗性重度心不全患者の ADL および生命予後の改善をもたらすことにある。かかる目的のため、ミオシン調節軽鎖リン酸化の増強を標的とした経口強心剤の開発を目指す。

【方 法】

ミオシン調節軽鎖リン酸化を増強する化合物のハイスループットスクリーニング (HTS)

バキュロウイルスによるミオシン調節軽鎖をリン酸化するキナーゼの大量精製、基質である MLC2v を大量精製し、384-well plate を用いて HTS システムを構築し、キナーゼ活性を指標に HTS を行う。

薬剤候補化合物の培養心筋細胞での効果

培養心筋細胞に薬剤候補化合物で処理し、キナーゼ活性、心筋細胞収縮性、細胞内 Ca^{2+} 動態への影響、細胞毒性などを評価する。

X 線共結晶構造解析と薬剤候補化合物の最適化

同定した薬剤候補化合物とキナーゼを共結晶構造解析用に大量精製する。精製後は共結晶化の最適な条件の検討を行い、X 線共結晶構造解析を行う。

【結 果】

HTS に必要な酵素、基質の大量精製に成功し、384-well または 1536-well plate を用いた HTS システムの構築に成功した。このシステムで複数の低分子化合物ライブラリーを用いて HTS を実施し、キナーゼ活性を特異的に賦活化する低分子化合物を複数得ることに成功した。現在は、これらの候補化合物の培養心筋細胞における効果(収縮性、細胞内 Ca^{2+} 動態など)を観察している。

また、X 薬剤候補化合物とキナーゼの X 線共結晶構造解析の準備として、キナーゼの結晶化条件の検討に取り組み、キナーゼの単分散を得ることができている。これらを用いて現在、結晶化条件を検討している。

【考 察】

これまでキナーゼの活性化剤の開発は難しいとされていたが、現在までに複数の特異的キナーゼ活性化剤を得ることができた。しかしながら、これらが培養心筋細胞あるいは生体において Ca^{2+} 動態に影響することなく心臓の収縮性を増強できるかは今後、慎重に検討していく必要がある。また、今後は同定した候補化合物の類縁構造体を入手して構造活性相関を測定する必要がある。一方、心筋のミオシン調節軽鎖のリン酸化を脱リン酸化する特異的脱リン酸化酵素の特異的阻害剤の可能性についても検討していく必要がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

心不全患者の低下した ADL を如何にして改善させ社会へ復帰させるかは医学的および社会的な直近の課題である。従来の強心薬は血行動態の改善と引き換えに心不全患者の長期予後に悪化するため、その使用は治療抵抗性重症心不全患者に限られている。また、高度先進医療の恩恵を享受できる重症心不全患者は僅かである。誰もが等しく治療を受けることができる生命予後に悪影響を及ぼすことなく心収縮力を増強して低心拍出症候群による症状を改善することができる新しい心不全治療薬の開発は、医療現場のニーズに合った、極めて重要な医学的課題と我々は考えている。本研究は生命予後の悪化を懸念することなく積極的に血行動態の改善を図ることができる強心薬を開発することで、心不全患者の ADL の改善と社会への復帰を促進することに繋がることから、臨床への貢献度は極めて高い。

【参考・引用文献】

1. Tsukamoto O, Asanuma H, Kitakaze M. Targeting lysosomal Ca^{2+} to reduce reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2015; 108:321-3. doi: 10.1093/cvr/cvv242.
2. Tsukamoto O, Kitakaze M. Recent Progress and Next Challenges in the Treatment of Symptomatic Heart Failure in Japan. *Circ J.* 2015 Oct 23; 79(11):2322-3. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1014.
3. Tsukamoto O, Kitakaze M. Different Implications of Functional Tricuspid Regurgitation Between Heart Failure (HF) With Reduced Ejection Fraction (EF) and HF With Preserved EF. *Circ J.* 2015; 79(7):1448-9. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0560.
4. Yi Yan, Osamu Tsukamoto (共同筆頭著者および corresponding author), Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlm5. *Nature Communications.* 2015; 6:6137. doi: 10.1038/ncomms7137
5. Tsukamoto O and Kitakaze M. Biochemical and physiological regulation of cardiac myocyte contraction by cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ J.* 2013; 77:2218-25.