

システインレドックススイッチによる PKG 制御機構の応用研究

中村太志

熊本大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

従来の標準的な心不全治療と比べ、左室収縮能低下症例の予後を有意に改善した PARADIGM-HF 試験¹⁾の結果を受け、細胞内サイクリック GMP (cGMP) の増加を介した新クラス薬の薬理作用に期待が高まっている。cGMP による血管平滑筋の弛緩作用や心リモデリング抑制といった心血管保護効果は、エフェクター分子である cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG) の活性化を介しているとされるが、PKG 分子を標的とした治療応用には至っていない。

心血管に発現する PKG1 α は、cGMP の結合によって惹起される構造変化で活性調節を受けるアロステリックなリン酸化酵素として知られる。しかし、最近になってチオール基の酸化を介した cGMP 非依存性の調節機構が明らかになり、心血管における意義が注目されている^{2, 3)}。筆者は、PKG の中で 1 α アイソフォームに特異的なアミノ酸である 42 番目のシステイン (C42) が酸化されると、酵素活性のレベルに関係なく、ジスルフィド架橋結合を介して cGMP/PKG シグナル本来の抗肥大作用が減弱することを報告した⁴⁾。また同誌で、この C42 レドックススイッチが基質との相互作用や細胞内局在化を巧妙に調節している新たな制御機構を見出し、その応用研究を進めている。本研究は、既報で提唱した新規レドックス制御機構に基づき、既存薬を含めた薬理的応答への影響について検討した初めての研究である。

【目 的】

システイン酸化修飾を介した PKG レドックス制御機構が、細胞内 cGMP 増加薬による抗肥大作用に及ぼす影響について比較検討し、心不全治療における cGMP/PKG シグナルの有用性と薬理応答を明らかにする。

【方 法】

C42 をセリンに置換したレドックス非感受性 PKG1 α ^{C42S} のノックインマウスを用いて、横行胸部大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷誘導性の心肥大モデルを作製し、また PKG1 α ^{C42S} を導入発現させた胎仔ラット心筋細胞にエンドセリン 1 やフェニレフリンで肥大誘導刺激を行ったのち、cGMP 増加薬による抗肥大作用をそれぞれ比較検討した。細胞内 cGMP 濃度を増加する薬剤として、ホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) 阻害薬のシルデナフィルおよび可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化薬 (BAY602770) を用い、薬剤反応性における PKG1 α レドックス制御機構の意義を検討した。

【結 果】

野生型 PKG1 α ^{WT} マウスの心重量は TAC 刺激により約 2 倍に増加し、心筋細胞肥大や間質繊維化の増強とともに経時的に左室収縮率も低下した。野生型マウスで誘導された心肥大や繊維化は、PDE5A 阻害薬 (シルデナフィル) の投与、あるいは NO やヘムに依存せず可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を介し cGMP を生成する BAY602770 の投与により有意に抑制された。一方、レドックス非感受性 PKG1 α ^{C42S} マウスでは、野生型と比べ、圧負荷誘導性の心肥大や繊維化が有意に抑えられた。この結果は既報⁴⁾と同様で、PKG 酸化予防による効果と考えられた。しかし、SHAM 群に比し、圧負荷で誘導された PKG1 α ^{C42S} での肥大応答は、BAY602770 でさらに有意に抑制されたのに対し、PDE5A 阻害薬では抑制できなかった。PKG1 α ^{C42S} を導入発現させた胎仔ラット心筋細胞を用い、エンドセリン 1 やフェニレフリンによる肥大遺伝子の発現を評価したところ、*in vivo* での実験結果は心筋培養細胞でも再現された。すなわち、PDE5A 阻害薬による抗肥大効果が野生型の心

筋細胞でのみ発揮したのに対し、BAY602770 では PKG ジェノタイピングに関係なく示され、PKG システインレドックススイッチによる薬剤間の応答格差は、PDE5 阻害薬に特異的な現象であることが示唆された。

この反応格差の機序を探るべく、TAC 心筋組織を用い、まずは PKG のジスルフィド二量体を非還元 SDS-PAGE で検討した。ジスルフィド架橋による PKG の二量体化は野生型の TAC 肥太心で有意に増加したものの、PDE5A 阻害薬投与後の心筋でそのレベルは増加したままであった。また、PKG1 α^{C42S} の心筋ではジスルフィド二量体の形成を全く認めなかった。この結果から、PDE5A 阻害薬による抗肥大作用の格差の理由として、単なる抗酸化(ジスルフィド二量体の低下)というよりは、他の機序が考えられた。そこで、TAC 心筋組織およびエンドセリン 1 で刺激された胎仔ラット心筋細胞を用いて、PDE5 の酵素活性を評価した。野生型 PKG1 α^{WT} における PDE5 活性レベルは、PKG1 α^{C42S} と比べ、肥大刺激により有意に高値を呈することがわかった。また、アダルトマウス心筋より単離した心筋細胞を用いて PDE5 のリン酸化を評価したところ、PDE5 の活性化には PKG の活性化に加え、ジスルフィド二量体化による S92 リン酸化(PKG リン酸化部位)が必要であることがわかった。つまり、PDE5 がより活性化する野生型の PKG1 α^{WT} 心筋において、PDE5A 阻害薬は薬理効果を発揮していることが示唆された。

次に、酸化型 PKG による格差的な PDE5 リン酸化機序を探るべく、PKG-PDE5 のタンパク質間相互作用について、FLAG 融合 PKG1 α^{C42S} を導入した胎仔ラット心筋細胞を用いてプルダウンアッセイを行った。PKG-PDE5 間の結合親和性は過酸化水素の添加により増強したが、予想に反し、PKG ジスルフィド二量化に由来した差を野生型と PKG1 α^{C42S} の間に認めなかった。そこで、細胞内の局在を免疫組織学的に評価したところ、Z 帯に局在する PDE5 は細胞質にびまん性に存在する酸化型の PKG と強く共局在化する一方で、刺激により細胞膜に移行した後しばらく膜分画に留まる還元型 PKG とは共局在化が乏しいことがわかった。以上より、細胞内シャットリング機構の存在がわかってきた PKG1 α と PDE5 の空間的な分布差が、S92 リン酸化の格差および PDE5 阻害薬の応答に寄与していることが示唆された。

【考 察】

本研究は、PKG によるリン酸化を介した PDE5 の活性化に、細胞質に留まる酸化型の PKG とその活性化が必要であることを示す初めての報告である。この結果を踏まえ、有効な PDE5 阻害薬の薬理発揮には、酸化ストレスの蓄積増加が予想される疾病の重症度ならびに酸化型 PKG の重要性が示唆される。細胞内 cGMP を増やす薬剤の中で、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(カルペリチド)や LCZ696、PDE9 阻害薬の有用性が期待されるが、これらの薬剤における PKG1 α レドックス制御機構の意義は不明であり、今後の検討が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

肺高血圧症例のみならず、様々な心不全患者において、PDE5 阻害薬の有効性に関する臨床試験が行われているが、結果は一貫していない⁵⁻⁷⁾。本研究の成果は、PDE5 阻害薬の応答性を説明する新たな機序として高い臨床的意義があり、PKG の C42 酸化を簡易に評価できるツールの開発により PDE5 阻害薬の有効性を予測するバイオマーカーとして応用発展が期待される。

【参考・引用文献】

1. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR; PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 371:993-1004, 2014
2. Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, Charles RL, Brennan JP, Schröder E, Browning DD, Eaton P. Cysteine redox sensor in PKG1 α enables oxidant-induced activation. *Science*. 317:1393-7, 2007
3. Pryszazhna O, Rudyk O, Eaton P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med*. 18:286-90, 2012

4. Nakamura T, Ranek MJ, Lee DI, Shalkey Hahn V, Kim C, Eaton P, Kass DA. Prevention of PKG1 α oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *J Clin Invest*. 125:2468–72, 2015
5. Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, LeWinter MM, Rouleau JL, Bull DA, Mann DL, Deswal A, Stevenson LW, Givertz MM, Ofili EO, O'Connor CM, Felker GM, Goldsmith SR, Bart BA, McNulty SE, Ibarra JC, Lin G, Oh JK, Patel MR, Kim RJ, Tracy RP, Velazquez EJ, Anstrom KJ, Hernandez AF, Mascette AM, Braunwald E; RELAX Trial. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA*. 309:1268–77, 2013
6. Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ Heart Fail*. 4:8–17, 2011
7. Hoendermis ES, Liu LC, Hummel YM, van der Meer P, de Boer RA, Berger RM, van Veldhuisen DJ, Voors AA. Effects of sildenafil on invasive haemodynamics and exercise capacity in heart failure patients with preserved ejection fraction and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. *Eur Heart J*. 36:2565–73, 2015