

血中 TNNI3K レベルの変化に基づく急性虚血性心疾患の新しい診断法

頼仲 方一^{*1}, 頼仲 玉珍^{*2}

熊本大学生命科学研究部・医・^{*1}生体機能薬理学分野, ^{*2}免疫識別分野

Hoichi Yorinaka, M.D., Ph.D., Gyokuchin Yorinaka, M.D., Ph.D.

^{*1}Department of Pharmacology and Molecular Therapeutics, ^{*2}Department of Immunogenetics,
Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 860-8556, Japan.

Phone & Fax: 81-96-373-5082, E-mail: laizf@gpo.kumamoto-u.ac.jp

概要

本研究は新規 MAP キナーゼ TNNI3K の全長アミノ酸をコードする cDNA より作製したリコンビナント蛋白を用いて抗 TNNI3K ポリクローナル抗体を作製し、急性心筋梗塞患者の血中 TNNI3K 濃度を検定した。結果より、急性心筋梗塞患者の血中 TNNI3K 濃度は正常健康者より十倍以上高いことが明らかになり、血中 TNNI3K の測定は急性心筋梗塞の新しい診断マーカーであると考えられた。

略語

TNNI3K:	cardiac troponin I-interacting kinase
ILK:	intergrin-linked kinase
TAL:	tyrosine kinase like kinase family
MLKs:	mixed lineage kinases
TAK1:	TGF- β activated kinase 1
cTnI:	cardiac troponin I
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ROC:	receiver operating characteristic curve
AMI:	acute myocardial infarction

背景

TNNI3K は心筋トロポニン I と相互作用するキナーゼ(cardiac troponin I-interacting kinase)と言うものであるが胎児から成人まで心筋に特異的かつ持続的に発現する細胞質および細胞核内に局在する新規MAPキナーゼである。2002年、Manning博士は構造域のアミノ酸配列で518個の蛋白キナーゼ遺伝子を分類した(Manning G. *Science*, 2002)。その時の名前がHH498であるTNNI3KはTAK1, ILK, MLKs (mixed lineage kinase)などを一緒にTKL (Tyrosine kinase like kinases)ファミリーのメンバーになった。さらに、このキナーゼは835個のアミノ酸よりなり(分子量93kD)、MAPKKKであるintegrin-linked kinaseのアミノ酸配列と50%の相同性を持ち、心筋cTnIと特異的に相互作用するという特徴がある(Zhao Y, et al. *J Mol Med*, 2003)。

TNNI3Kの分子構造の特徴 TNNI3Kの分子構造は図1Aで示すように、N末端のアンキリンドメインや中央に位置するキナーゼドメインおよびC末端のセリン-リッチドメインからなる。図1BはTNNI3Kのいろいろな活性化部位をしめしているが、図のように、プロテインスレオニンキナーゼの活性化部位やATP結合部位と基質の結合部位の存在を示している。TNNI3Kの立体構造は図1Cの左で示す。TNNI3Kの490番のK(lysine)がR(arginine)に変更すると、TNNI3Kの活性がなくなる。図1Cの右図はTNNI3Kと相互作用し、心筋細胞の収縮力を調節しているcTnIの立体構造である(Lai ZF, *Recent Patents on Cardio. Drug Disc.* 2009)。

TNNI3K の生理学的機能 TNNI3K の生理的機能について、Ding 博士らは免疫沈降法を利用して、TNNI3K は特異的に心筋トロポニン I と結合し、心筋収縮や、心機能を調節することを示唆した (Zhao Y, et al. J Mol. Med, 2003)。さらに、最近我々は心筋細胞の発生分化に対する、TNNI3K 遺伝子の役割を検討した。多能性幹細胞である P19CL6 細胞に TNNI3K 遺伝子を導入して、TNNI3K を高発現させた細胞から心筋細胞を誘導する実験結果から、TNNI3K 高発現は心筋細胞の発生初期に拍動細胞群の形成とその拍動頻度の増加を促進し、細胞のアドレナリン反応性とカルシウム感受性を高めることが認められた。TNNI3K 高発現は心筋細胞の自発拍動頻度や収縮力を増強させるが、この心筋収縮機能の促進機序は cTnI のリン酸化抑制による、自発活動電位第4相の自動脱分極速度の促進であることを明らかにした (Lai ZF, et al. Am J Physiol, 2008)。さらに、TNNI3K は心筋細胞への分化初期に見られるアポトーシスを抑制して心筋細胞の発生分化を促進することが認められ、TNNI3K の心筋発生促進作用は分化初期におけるアポトーシスの抑制と関連することが示唆された。

TNNI3K 高発現による虚血心筋への保護作用 TNNI3K 高発現心筋前駆細胞を心筋虚血部へ移植すると、心筋細胞再生の促進、梗塞面積の減少および左心室リモデリングの改善がみられ、心筋虚血、心筋梗塞、心不全の治療として期待できる。我々は、TNNI3K 高発現心筋前駆細胞をラットやマウスの梗塞心筋局所へ移植して、TNNI3K 高発現群の心筋梗塞による心筋障害への効果を検討した。結果をみると、TNNI3K 高発現は Flag-only 群と比べると、梗塞周辺部の心筋細胞再生の促進、梗塞面積の減少、左心室リモデリングの改善など効果があることが示唆された (Lai ZF, et al. Am J Physiol, 2008)。

研究目的

本研究では、これらの成果に基づいて、MAP キナーゼ TNNI3K の全長アミノ酸をコードする cDNA より得られたリコンビナント蛋白を利用して抗 TNNI3K ポリクローナル抗体を作製し、TNNI3K の測定系を開発し、TNNI3K が心筋虚血、心筋梗塞など心疾患におけるユニークな病態マーカーとして利用できないかを探る。さらに、これを用いた ELISA 測定系を確立し、心筋梗塞を中心とした心疾患で TNNI3K 血中レベルを測定し既存のマーカー、cTnI との比較解析を行う。

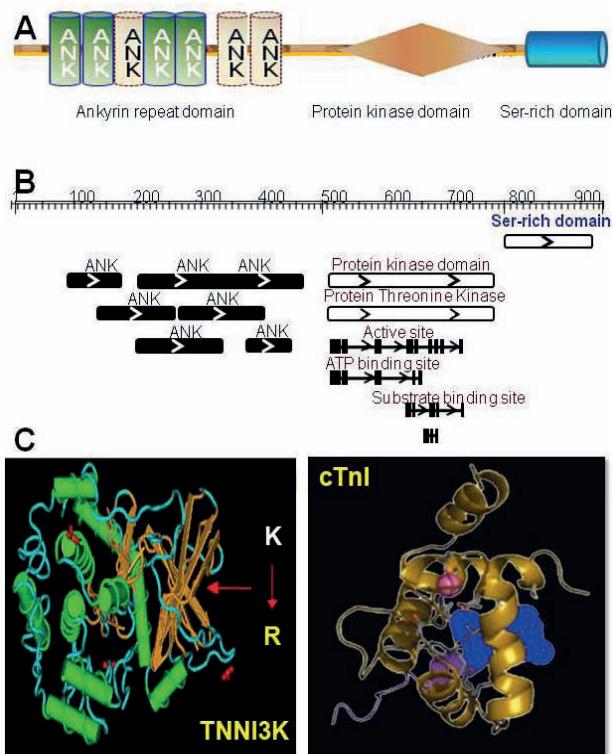


Figure 1 . Schematic illustration of TNNI3K domains

A. Human TNNI3K contains 3 kinds of domains: seven NH₂-terminal ankyrin repeats followed by a protein kinase domain and a COOH-terminal serine-rich domain. B. It contains some activity sites including active site of protein threonine kinase, ATP binding site and substrate binding site. C. Structures of TNNI3K and cTnI. *left*: Schematic illustration of stereo structure of TNNI3K. Mutation of the TNNI3K by change of the lysine (K) at site of 490 to arginine (R) was known to lose the TNNI3K activity including its auto-phosphorylation (Zhao Y, J Mol Med 2003). *right*: Stereo structure of cTnI which is known to interact with TNNI3K to modulate the cardiac contraction and beating frequency. (Modulated from Lai ZF, *Recent Patents on Cardiovasc Drug Discovery*. 2009).

結 果

1. Determination of expression of TNNI3K protein by the polyclonal antibody

まずは、我々の抗体を利用して、*in vitro* で P19CL6 細胞の分化由来の心筋に TNNI3K の発現を確認した。(1)、P19CL6 由来の心筋細胞を培養して 16 日目の培養液中の TNNI3K 濃度は、UV 照射 10 秒間後、TNNI3K 高発現グループのほうが flag-only グループより有意に高かった。(2)、抗 α -actinin および抗 TNNI3K 抗体を利用して flag-only と TNNI3K 高発現細胞の免疫染色結果をみると、TNNI3K 高発現グループのほうが flag-only グループより強かった。(3)、PCR アンプリファイヤーで確認した TNNI3K の mRNA、および Western blotting で確認した TNNI3K 蛋白の発現では、TNNI3K 高発現の場合には flag-only のほうより有意に増加したことが認められた。

2. Standard curve of the TNNI3K antibody

我々は酵素免疫測定法(ELISA 法)を用いたサンドイッチ手法により、TNNI3K 抗体を用いて測定した TNNI3K の標準曲線を作製した。TNNI3K 抗原の濃度が 0.01 から 11.1ng/ml の範囲内では直線増加であり、この範囲内に生体内の TNNI3K 濃度が測定できることが明らかになった。

3. Circulating TNNI3K concentration in acute myocardial infarction patients

我々は ELISA プレートを利用して、健常者血清と急性心筋梗塞患者血清および急性腎不全や慢性心不全歴のある人の血液標本を検体として TNNI3K の血中レベルを測定した。結果より、急性心筋梗塞患者の血中 TNNI3K 濃度は正常健康者より十倍以上高いという結果が得られた。

4. Compared with circulating cTnI level measured by ELISA method

臨床応用としてよく使われている心筋梗塞のバイオマーカーは cTnI であるが、我々は、急性心筋虚血患者の血中 TNNI3K 濃度と cTnI 濃度の変化を比較した。結果より、急性心筋梗塞患者の血中 TNNI3K の上昇程度は cTnI のより高かった。さらに、血中 cTnI 濃度の上昇は、AMI 患者のみならず、他の 6 例の急性腎不全患者の血液サンプルにも有意に増加することが見られたが、同じ患者のサンプルを使って TNNI3K 濃度では増加していなかった。この差の原因については、他の論文を検索した結果によると、急性腎不全で cTnI のレベルを増加することは骨格筋への影響からトロポニンの骨格筋タイプの放出が増加することが原因であると考えられた。

5. Specificity and sensitivity of TNNI3K ELISA sandwich kits

次に、TNNI3K の ELISA キットの感受性と特異性を検討するために、ROC 曲線(Receiver Operating Characteristic Curve, 受診者動作特性曲線)分析方法を利用して、正常健康者、急性心筋梗塞患者、慢性心不全歴のある人、および急性腎不全患者で胸痛など症状のある人、トータル 100 名の血液サンプルの血中 TNNI3K 濃度の結果を分析した。カットオフ値を 366ng/ml と設定した条件下で急性心筋梗塞患者の血中 TNNI3K 濃度に対して、その特異性が 82.4% 感受性が 86.7% という結果が得られた。

考 察

今回の注目する結果 我々は酵素免疫測定法(ELISA 法)を利用し、TNNI3K サンドイッチキットを開発した。この TNNI3K キットの特徴は、TNNI3K 抗原の濃度が 0.01 から 11.1ng/ml の範囲内では直線であり、その範囲内に生体内の TNNI3K 濃度が測定できるであった。さらに、我々はこの ELISA キットを用いて、健常者と急性心筋梗塞患者の血中 TNNI3K レベルを測定した。結果より、正常健康者、慢性心不全歴のある人の場合におけるその血中 TNNI3K レベルは相対的に低いが、急性心筋梗塞患者の場合では正常健康者より十倍以上高かった。

血中 TNNI3K 測定法を開発する意義 1) **新規性**: TNNI3K は心筋に特異的に発現し、cTnI と相互作用する新規 MAP キナーゼであり、逸脱酵素として現在用いられている各種の心筋細胞傷害マーカー分子では捉えられないか心筋の再生および収縮力についての情報を与える新規病態マーカーとなることが期待される。今回の結果と関連する特許の申請は完了である[Yorinaka H, et al. (*Patent*): Japan: 2004338918; USA: WO/2006057278, Europe: EP1832299]。

2) **優位性**: 臨床応用としてよく使われている心筋梗塞のバイオマーカー cTnI は、急性心筋梗塞患者の以外に、急性腎

不全患者の血液にも増加する。すなわち、cTnI は心筋以外に骨格筋にも存在しているので、その特異性は相対的に低い。しかし、TNNI3K は心筋細胞のみ発現しているため、TNNI3K を用いた新しい心疾患診断薬については特異性及び感受性が高いと考えられる。

3). **市場性と実現性**：本邦の心筋梗塞を含む心疾患で死亡した患者は死亡率の第二位を占める。TNNI3K を標的とした新規病態マーカーを用いた診断薬の開発は十分な市場性を有する。今後大規模応用する必要なことはリコンビナント蛋白を用いたポリクローナル抗体の作製とこれを用いた ELISA 測定系の確立および患者血中 TNNI3K レベルの測定だけであった。

結論 血中 TNNI3K レベルは急性心筋虚血や心筋梗塞の発生を予測できる。血中 TNNI3K の測定は急性心筋梗塞の診断のために新しい診断マーカーであると考えられた。

参考文献

- ① Manning G: *Science*. 298(5600):1912-1934; 2002.
- ② Zhao Y, et al. *J Mol Med*. 81(5):297-304, 2003.
- ③ Luft FC. *J. Mol. Med*. 81(5):279-280, 2003.
- ④ Yorinaka H, et al. (*Patent*): Japan: 2004338918; USA: WO/2006057278, Europe: EP1832299.
- ⑤ Feng, Y, et al. *Biochemistry (Mosc)*. 72(11):1199-204, 2007.
- ⑥ Feng Y, et al. *Gen Physiol Biophys*. 26(2):104-109, 2007.
- ⑦ Wang H, et al. *J Cell Mol Med*. 11:1582-4934, 2008.
- ⑧ Lai ZF, et al. *Am. J. Physiol. (Heart and Circ Physiol)*. 295(2):H708-716, 2008.
- ⑨ Lai ZF. *Recent Patents on Cardio. Drug Disc*. 4(3):203-210, 2009.