

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18881

研究課題名(和文)肺高血圧症で機能亢進するカルシウム感受性受容体の発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying upregulation of calcium-sensing receptor in pulmonary hypertension

研究代表者

山村 彩 (YAMAMURA, Aya)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40633219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症は、肺血管障害により持続的に肺動脈圧が上昇する難病である。我々は、肺動脈平滑筋に発現するカルシウム感受性受容体の発現機能増加が、肺動脈性肺高血圧症の病態形成に関与していることを明らかにした。本研究では、カルシウム感受性受容体と機能連関する分子として、TRPC6チャンネルを同定した。また、カルシウム感受性受容体拮抗薬の肺動脈性肺高血圧症に対する有用性を確立した。以上は、肺動脈性肺高血圧症の新規治療戦略に有益な知見である。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension is an intractable disease that pulmonary arterial pressure chronically increases due to vascular impairment. We found that upregulation of calcium-sensing receptor in pulmonary arterial smooth muscle cells is involved in pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. In this study, we showed that functional coupling of calcium-sensing receptor with TRPC6 channel and usefulness of calcium-sensing receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. Our findings provide novel therapeutic strategies for pulmonary arterial hypertension.

研究分野：薬理学

キーワード：肺高血圧症 カルシウム感受性受容体 イオンチャンネル 肺動脈 平滑筋 カルシウムシグナル

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は、肺血管の攣縮や肺血管壁の肥厚による血管内腔の狭小化、血栓形成による肺血管抵抗の上昇によって、持続的に肺動脈圧が上昇する進行性かつ難治性の血管疾患である。病態が進行すると血管壁の肥厚に伴って動脈壁全体が硬化し、肺血流量が低下して、右心室に負荷がかかるため右心不全に陥る。これまでに複数の肺高血圧の発症因子が見つかっているが、それらが複雑に関連しているため、未だに正確な発症機構は解明されていない。肺高血圧症分類の第1群であり、最も典型的な臨床像を示す肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の主な原因は、肺動脈平滑筋の攣縮と肺血管リモデリングの亢進である (McLaughlin et al., J Am Coll Cardiol, 2015)。これらの病態は、細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) の過度の上昇によって形成される。 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 過負荷の要因となる Ca^{2+} 流入経路として、様々な Ca^{2+} 透過性イオンチャネルが報告されている (Morrell et al., J Am Coll Cardiol, 2009)。しかし依然として、PAH の病態変化には、その他の経路不明な Ca^{2+} シグナルが関わっていることが推測されている。

最近、我々は、PAH の病態形成を担う新規 Ca^{2+} シグナル分子として Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) (図1) を同定した。すなわち、特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) の患者から抽出した肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) において、CaSR の発現増加および機能増強が認められた。CaSR の発現亢進による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 過負荷は、PASMCs の異常増殖を促進し、肺血管リモデリングを形成するため、PAH につながることを明らかにした (Yamamura et al., Circ Res, 2012; Yamamura et al., Circ Res, 2013)。

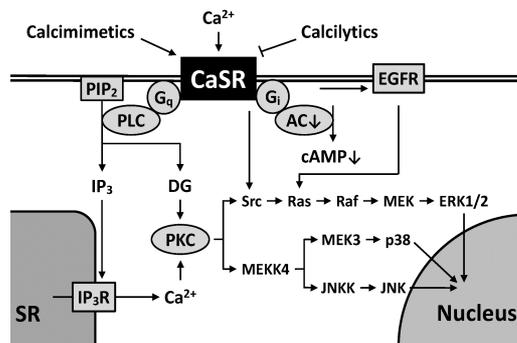


図1 Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) のシグナル機構

Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) は、細胞外 Ca^{2+} によって活性化される。CaSR は G_q タンパク質と共役し、ホスホリパーゼ C (PLC) を活性化して、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP₂) からイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP₃) を産生し、筋小胞体 (SR) 上の IP₃ 受容体 (IP₃R) からの Ca^{2+} 遊離を惹起する。PLC の活性化で産生したジアシルグリセロール (DG) は、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化した後、分裂促進因子活性化タンパク質 (MAP) キナーゼカスケードにシグナル伝達される。また、CaSR の活性は、CaSR 作動薬 (calcimimetics) や CaSR 拮抗薬 (calcilytics) によっても制御される。[山村, 血管, 2014]

2. 研究の目的

IPAH 患者の PASMCs で発現増加する CaSR の機能を修飾する分子を同定し、その発現解析および機能解析を行い、CaSR を介した Ca^{2+} シグナル経路の解明を目指した。さらに、IPAH 患者の PASMCs で認められる異常な細胞増殖に対する CaSR 拮抗薬の有効性を証明することも目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

PAH モデル動物として、低酸素誘発性肺高血圧症マウス (10% O₂ で 4 週間曝露) を作製した。Millar システムを用いて、肺高血圧症の指標である右室圧 (RVP) と右室収縮期圧 (RVSP) を測定した。また、フルトンインデックス (RV/(LV+S) ratio) も算出した。

(2) 細胞培養

ヒト対象群 (肺高血圧症以外の肺疾患患者、Normal)、IPAH 患者、慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) 患者由来の PASMCs を 10% ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、50 μg/ml D-バリン、20 μg/ml 内皮細胞増殖因子を添加した Medium 199 培地中で培養した。

(3) MTT 試験

96 穴プレートに播種した PASMCs ($\sim 1 \times 10^4$ 個/ウェル) に薬物を 72 時間曝露させた。細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて測定した。

(4) BrdU 増殖試験

MTT 試験と同様に検体を準備した。細胞増殖試験は、Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric) キット (ロシュ) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) IPAH 患者の PASMCs で発現亢進する CaSR と機能関連する分子の同定

これまでの研究で、CaSR の下流で二次的に $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を増加させる経路として、transient receptor potential canonical subfamily 6 (TRPC6) チャネルが示唆されていた。本研究では、PAH モデル動物である低酸素誘発性肺高血圧症マウスを用いて、PAH の病態形成における CaSR と TRPC6 チャネルの関与について、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて解析した。野生型マウスでは、低酸素曝露による RVSP の上昇が認められるが、CaSR ノックアウトマウスでは、その上昇が抑制されていた (図 2A, B)。また、フルトンインデックスの増加も CaSR ノックアウトマウスでは抑制されていた (図 2C)。低酸素曝露による RVSP やフルトンインデックスの上昇は、TRPC6 ノックアウトマウスでも抑制されていた (図 2D-F)。

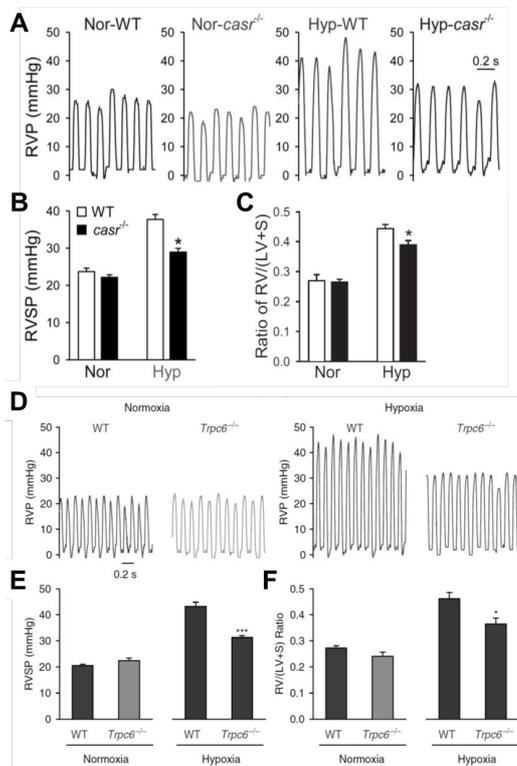


図 2 低酸素誘発性肺高血圧症の病態形成における CaSR および TRPC6 チャンネルの関与

野生型 (WT) および Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) 遺伝子欠損マウス ($casr^{-/-}$; A-C)、transient receptor potential canonical subfamily 6 (TRPC6) 遺伝子欠損マウス ($Trpc6^{-/-}$; D-F) を正常環境 (Normoxia) または低酸素曝露 (Hypoxia) 下で 4 週間飼育した。その後、肺高血圧症のパラメーターである右室圧 (RVP; A, D)、右室収縮期圧 (RVSP; B, D)、フルトンインデックス (RV/(LV+S) ratio; C, F) を測定した。CaSR および TRPC6 チャンネル遺伝子欠損マウスでは、低酸素誘発性肺高血圧症の病態が軽減していた。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. WT。[Smith et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2015; Tang et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016; 山村, 日薬理誌, 2016]

(2) PAH に対する CaSR 拮抗薬の有効性

次に、PAH に対する CaSR 拮抗薬の有効性を証明するために、効率的な細胞アッセイ系の構築を目指した。IPAH-PASMCs の細胞増殖速度は、Normal-PASMCs や CTEPH-PASMCs のものよりも 1.5 倍ほど早かった。IPAH-PASMCs に CaSR 拮抗薬である NPS2143 を投与すると、その細胞増殖は濃度依存的に抑制された ($IC_{50} = 2.64 \mu M$; 図 3)。一方、NPS2143 は Normal-PASMCs や CTEPH-PASMCs の細胞増殖には影響を与えなかった。NPS2143 とは構造的に異なる種類の CaSR 拮抗薬である Calhex 231 も、IPAH-PASMCs の過剰な細胞増殖を濃度依存的に抑制した ($IC_{50} = 1.89 \mu M$)。また、CaSR の活性化薬である R568 は、IPAH-PASMCs の細胞増殖を促進した ($EC_{50} = 0.33 \mu M$)。

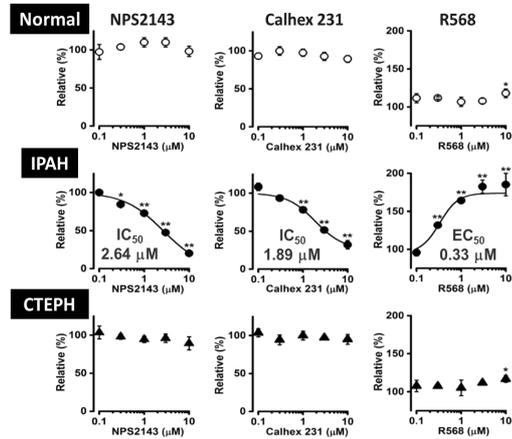


図 3 CaSR を標的としたスクリーニング系

正常ヒト (Normal)、特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 患者、慢性血栓性肺高血圧症 (CTEPH) 患者由来の肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) において、 Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) 制御薬の細胞生存率に対する作用を MTT 法で測定した。CaSR 拮抗薬である NPS2143 および Calhex 231 は、IPAH 細胞でのみ細胞増殖を抑制した。一方、CaSR 作動薬である R568 は、IPAH 細胞でのみ細胞増殖を促進した。[Yamamura et al., PLoS One, 2015]

(3) PAH に対する CaSR 拮抗薬とホスホジエステラーゼ 5 型 (PDE5) 阻害薬の併用効果

現在、PAH に対する治療薬としてホスホジエステラーゼ 5 型 (PDE5) 阻害薬が使用されている。本研究では、PAH に対する CaSR 拮抗薬と PDE5 阻害薬の併用効果を解析した。PDE5 阻害薬であるシルデナフィルは、IPAH-PASMCs の過剰な細胞増殖を濃度依存的に抑制した ($IC_{50} = 16.9 \mu M$)。一方、シルデナフィルは、Normal-PASMCs や CTEPH-PASMCs の細胞増殖には影響を与えなかった。IPAH-PASMCs に CaSR 拮抗薬である NPS2143 または Calhex 231 をシルデナフィルとともに投与すると、その過剰な細胞増殖は相加・相乗的に抑制された (図 4)。

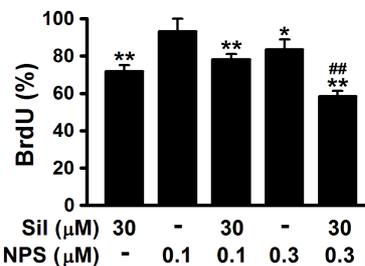


図 4 IPAH 患者由来 PASMCs の過剰な細胞増殖に対する CaSR 拮抗薬と PDE5 阻害薬の併用効果

特発性肺動脈性肺高血圧症患者 (IPAH) 由来の肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) における細胞増殖を BrdU アッセイで測定した。IPAH-PASMCs において、 Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) 拮抗薬である NPS2143 とホスホジエステラーゼ 5 型 (PDE5) 阻害薬であるシルデナフィルの併用効果による細胞増殖抑制効果は、それぞれの単独での効果よりも強力だった。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (100%); ## $p < 0.01$ vs. sildenafil or NPS2143。[Yamamura et al., Eur J Pharmacol, 2016]

(4) まとめ

CaSR および TRPC6 遺伝子欠損マウスでは、低酸素曝露による肺高血圧症の病態が軽減していた。そのため、CaSR と TRPC6 チャネルの発現亢進と機能的連関による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 過負荷が、IPAH の病態を形成することが分かった。この分子機構が、PAH における肺動脈平滑筋の過収縮と肺血管リモデリングの亢進に強く関与していることが示唆された(図5)。

また、IPAH 患者における PSMCs の過剰な細胞増殖を介した肺血管リモデリングが、CaSR の活性によって制御されていることを薬理的に証明した。さらに、IPAH-PSMCs の過剰な細胞増殖は、PDE5 活性阻害に加えて、CaSR 活性も同時に阻害することで、より効果的な細胞増殖抑制効果を期待できることが明らかになった。この結果は、CaSR 拮抗薬の単独投与や PDE5 阻害薬との併用が、PAH の新規治療法として有用であることを示唆している。

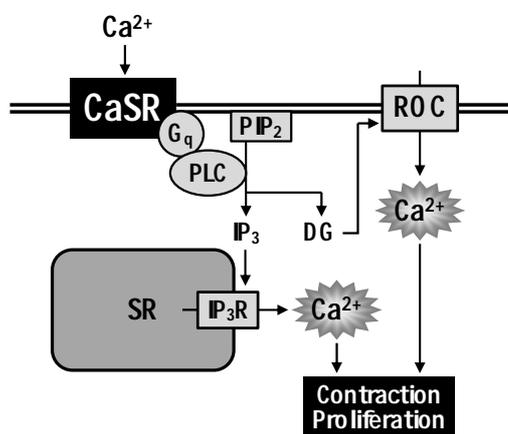


図5 CaSR と TRPC6 チャネルの機能連関

特発性肺動脈性肺高血圧症患者 (IPAH) 由来の肺動脈平滑筋細胞 (PSMCs) では、 Ca^{2+} 感受性受容体 (CaSR) と受容体作動性 Ca^{2+} (ROC) チャネルを担う transient receptor potential canonical subfamily 6 (TRPC6) の発現が亢進した結果、持続的な細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) の増加が起こる。 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 過負荷は、肺血管攣縮や細胞増殖・肺血管リモデリングを誘発し、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病態を形成すると考えられる。[山村, Bio Clinica, 2016]

(5) おわりに

肺高血圧症の中で、最も典型的な臨床像を示す PAH は、厚生労働省が定める特定疾患治療研究事業対象疾患 (難病) に指定されている。PAH の発症および病態形成機構が、完全には解明されていないため、適切な治療薬が存在せず、疾患の治療や患者の QOL (quality of life) の改善が不十分であった。近年、プロスタグランジン I_2 (PGI_2 、プロスタサイクリン) 製剤、エンドセリン受容体拮抗薬 (ERB)、ホスホジエステラーゼ 5 型阻害薬 (PDE5-I) など有効な治療薬が開発されてきているが、依然として十分な薬物治療が確立

されたとは言い難く、新規の作用機序を持つ治療薬の開発が切望されている。そのため、我々が PAH の病態に関与することを見出した CaSR や TRPC6 分子が、PAH の病態機構の全容解明や治療薬の開発につながることを期待される。

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 15 件)

山村寿男, 山村彩. 肺高血圧症における平滑筋細胞のカルシウムチャネルの種類と役割. Pulmonary Hypertension Update, inpress (2017 年 4 月号予定). 【総説】【査読無】

山村彩. 肺高血圧症とカルシウム感受性受容体. Medical Science Digest, 43(2):112-113 (2017). 【総説】【査読無】
Chen J, Sysol JR, Singla S, Zhao S, Yamamura A, Valdez-Jasso D, Abbasi T, Shioura KM, Sahni S, Reddy V, Sridhar A, Gao H, Torres J, Camp SM, Tang H, Ye SQ, Comhair S, Dweik R, Hassoun P, Yuan JX, Garcia JG, Machado RF. Nicotinamide

phosphoribosyltransferase promotes pulmonary vascular remodeling and is a therapeutic target in pulmonary arterial hypertension. Circulation, 135(16):1532-1546 (2017) (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024557).

【査読有】

Song S, Ayon RJ, Yamamura A, Yamamura H, Dash S, Babicheva A, Tang H, Sun X, Cordery AG, Khalpey ZI, Black SM, Desai AA, Rischard F, McDermott KM, Garcia JG, Makino A, Yuan JX. Capsaicin-induced Ca^{2+} signaling is enhanced via upregulated TRPV1 channels in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic PAH. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 312(3):L309-L325 (2017) (doi: 10.1152/ajplung.00357.2016). 【査読有】

山村彩. 肺高血圧症におけるカルシウムシグナル. BIO Clinica, 31(6):634-641 (2016). 【総説】【査読無】

山村彩. カルシウム感受性受容体. 日薬理誌, 148(5):278-280 (2016) (doi: 10.1254/fpj.148.278). 【トピックス】【査読無】

山村彩. 肺高血圧症で発現変動するイオンチャネル. 日薬理誌, 148(5):226-230 (2016) (doi: 10.1254/fpj.148.226). 【総説】【査読無】

平野勝也, 山村彩. 肺循環薬理学研究の最前線: 序文. 日薬理誌, 148(5):225 (2016). 【トピックス】【査読無】

山村彩. 肺高血圧症を増悪させるカルシウムブロッカーの分子機構. 薬学雑誌, 136(10):1373-1377 (2016) (doi: 10.1248/yakushi.16-00086). 【総説】【査読無】

Yamamura A, Yagi S, Ohara N, Tsukamoto K. Calcilytics enhance sildenafil-induced antiproliferation in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Eur J Pharmacol, 784:15-21 (2016) (doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.059). 【査読有】

Tang H*, Yamamura A* [co-1st-author], Yamamura H, Song S, Fraidenburg DR, Chen J, Gu Y, Pohl NM, Zhou T, Jiménez-Pérez L, Ayon RJ, Desai AA, Goltzman D, Rischard F, Khalpey ZI, Black SM, Garcia JG, Makino A, Yuan JX. Pathogenic role of calcium-sensing receptors in the development and progression of pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 310(9):L846-L859 (2016) (doi: 10.1152/ajplung.00050.2016). 【査読有】

山村彩, 山村寿男. 肺動脈平滑筋における Ca²⁺シグナルの異常. 東邦医学会雑誌, 62(3):200-202 (2015). 【総説】【査読無】

Yamamura A, Ohara N, Tsukamoto K. Inhibition of excessive cell proliferation by calcilytics in idiopathic pulmonary arterial hypertension. PLoS One, 10(9):e0138384 (2015) (doi: 10.1371/journal.pone.0138384). 【査読有】

Kozaki Y, Umetsu R, Mizukami Y, Yamamura A, Kitamori K, Tsuchikura S, Ikeda K, Yamori Y. Peripheral gene expression profile of mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in SHRSP5/Dmcr rats. J Physiol Sci, 65(5):417-425 (2015) (doi: 10.1007/s12576-015-0380-9). 【査読有】

Smith KA, Voiriot G, Tang H, Fraidenburg DR, Song S, Yamamura H, Yamamura A, Guo Q, Wan J, Pohl NM, Tauseef M, Bodmer R, Ocorr K, Thistlethwaite PA, Haddad GG, Powell FL, Makino A, Mehta D, Yuan JX. Notch activation of Ca²⁺ signaling in the development of hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension. Am J Respir Cell Mol Biol, 53(3):355-367 (2015) (doi: 10.1165/rcmb.2014-02350C). 【査読有】

塚本喜久雄. 肺高血圧症由来細胞の異常増殖に対する CaSR 阻害薬と PDE5 阻害薬の相加・相乗的抑制効果. 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月 28 日, アクトシティ浜松 (浜松).

山村彩, 藤富恵史, 八木聡美, 大原直樹, 塚本喜久雄. CaSR 阻害薬と PDE5 阻害薬の併用は肺高血圧症モデル細胞の異常増殖を相加相乗的に抑制する. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 東北大学 (仙台).

山村彩, 藤富恵史, 八木聡美, 大原直樹, 塚本喜久雄. 肺高血圧症由来細胞の異常増殖に対する CaSR 阻害薬と PDE5 阻害薬の併用効果. 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 16 日, 長崎ブリックホール (長崎).

藤富恵史, 塚本喜久雄, 大原直樹, 山村彩. 細胞増殖を指標とした肺高血圧症治療薬評価系の開発. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016, 2016 年 8 月 24 日, 東北大学 (仙台).

Chen J, Sysol JR, Shioura KM, Singla S, Yamamura H, Yamamura A, Reddy V, Torres J, Sridhar A, Tang H, Yuan JX, Garcia JG, Machado RF. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) attenuated experimental pulmonary hypertension. AFMR Midwestern Regional Meeting, Apr 21, 2016, Chicago (USA).

Tang H, Gu Y, Black SM, Garcia JG, Makino A, Yuan JX, Yamamura A, Fraidenburg DR, Chen J. Pathological roles of calcium-sensing receptors and transient receptor potential canonical channels 6 in the development and progression of pulmonary hypertension. AFMR Midwestern Regional Meeting, Apr 21, 2016, Chicago (USA).

山村彩, 八木聡美, 鈴村紗世, 大原直樹, 塚本喜久雄. 肺高血圧症由来肺動脈平滑筋細胞におけるカルシウム感受性受容体拮抗薬の抗増殖作用. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (横浜).

山村彩, 八木聡美, 鈴村紗世, 大原直樹, 塚本喜久雄. Ca²⁺感受性受容体阻害薬による肺高血圧症由来肺動脈平滑筋細胞の増殖抑制. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 10 日, パシフィコ横浜 (横浜).

鈴村紗世, 堀井千裕, 平工明里, 塚本喜久雄, 大原直樹, 山村彩. 肺高血圧症モデルラットで発現増加するカルシウム感受性受容体の性差による影響. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015, 2015 年 8 月 29 日, 東京大学 (東京)

〔学会発表〕(計 11 件)

山村彩, 藤富恵史, 八木聡美, 大原直樹,

山村彩, 鈴村紗世, 大原直樹, 塚本喜久雄. 低酸素誘発性肺高血圧症モデル動物におけるカルシウム感受性受容体拮抗薬の効果. 第 57 回日本平滑筋学会総会, 2015 年 8 月 27 日, 山口大学(宇部).
山村彩. 肺高血圧症を増悪させるカルシウムブロッカーの分子機構. 第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会, 2015 年 7 月 4 日, 名古屋市立大学(名古屋). 【招待講演】

〔その他〕

ホームページ(金城学院大学・学術研究データベース)

http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/index.php/search/teacher_info?teacherid=12847

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 彩 (YAMAMURA, Aya)
金城学院大学・薬学部・助教
研究者番号: 40633219