

令和元年6月5日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09520

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法を用いたeNOS活性化によるNO合成と血管機能の調節

研究課題名(英文) Optogenetical regulation of eNOS activity and vascular function

研究代表者

井上 浩一 (Inoue, Koichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80345818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、光感受性分子を細胞に導入・刺激し、細胞や生体での生理活性を引き出す光遺伝学的手法が開発された。実際、神経細胞や実験動物の脳に導入し、光刺激によりその神経活動を修飾することにより脳機能や脳梗塞等でおこる脳障害を改善することが報告されているが、非神経系への適応はまだほとんどない。本研究課題では、光遺伝学ツールを血管系の細胞に導入し、光刺激により血管径や血管機能を調節することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、光感受性分子を細胞に導入・刺激し、細胞や生体での生理活性を引き出す光遺伝学的手法が開発された。実際、神経細胞や実験動物の脳に導入し、光刺激によりその神経活動を修飾することにより脳機能や脳梗塞等でおこる脳障害を改善することが報告されているが、非神経系への適応はまだほとんどない。本研究課題では、光遺伝学ツールを血管系の細胞に導入し、光刺激により血管径や血管機能を調節することを目指した。光刺激により血管内皮細胞でのカルシウム上昇が認められたので、今後は、生体における血管機能の修飾ができれば血流の調節などに利用できる。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in optogenetic tools using light-sensitive molecules shed light on exclusive regulation of physiological activities. Especially, the achievement on neuroscience is prominent; modulation of neuronal activity by introducing them into neuronal cells in animals, resulting in the improvement of brain function and neuronal disorder caused by stroke, etc. However, little is known how optogenetics contributes to non-neuronal system. This research employs optogenetics for vascular system and tries to regulate vascular function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：光遺伝学 血管内皮細胞 一酸化窒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞(vascular endothelial cells, EC)は血管の裏打ちをする一層の細胞層を形成し、抗凝固作用を持ち閉塞を防ぐなど、全身の血液循環に貢献している。また、血液循環のサポートをするだけにとどまらず、それ自身多くの生理活性分子を放出し、血管の収縮・拡張を調節する。そのための多くの生理活性物質を放出するが、そのうちの一つに一酸化窒素(Nitric oxide, NO)がある。NOはガス状小分子で、EC内で生産された後拡散し細胞膜を透過する。そして、周囲の細胞に影響を与える。特に、血管平滑筋におけるグアニル酸シクラーゼの活性化はcGMPの上昇をもたらす。そして、平滑筋細胞内でCa²⁺流入減少によるアクチン-ミオシン鎖の弛緩を促進し、血管機能の維持に貢献している。

ECでは通常NOはendothelial NO synthase (eNOS)により産生される。eNOSはECに構成的に発現しており、その活性は細胞内のCa²⁺-カルモデュリンにより調節されている。すなわち、ECが何らかの刺激を受け、EC内のカベオラへのCa²⁺流入が起こると、Ca²⁺-カルモデュリン複合体が結合してeNOSが活性化し、NOの産生が向上する。また、Ca²⁺-カルモデュリンとは別にリン酸化によってもeNOSは活性化する。このようにeNOSの活性化はNOの産生に重要であるが、刺激によりeNOSの蛋白レベルの発現上昇を起こし、NOの産生が増加することもある。

虚血性心疾患の発症の初期等にはECの機能不全が起こり、NOの産生が不十分となる。狭心症発作などではニトログリセリンの舌下投与によるNO産生を促し、血管拡張効果を期待している。また、心臓カテーテルにおける冠動脈の収縮誘発試験ではアセチルコリン(Ach)投与によりECによるNO産生より血管平滑筋による収縮が優位となり血管が拡張するが、機能不全のECではAchによるNO産生が十分ではなく、逆にAchによる血管平滑筋の刺激が優位となり、血管が収縮する。このように、ECの機能不全によるNO産生の減少は血管拡張能を減少させ、結果として動脈の硬化や、さらには易血栓傾向を作り出し、脳梗塞や心筋梗塞、末梢動脈閉塞等の疾患を発症する礎となりうる。

2. 研究の目的

申請者らはeNOSの発現を調節できる標的分子を探索しており、それらの活性をコントロールできればNO産生を調節でき、最終的に血管緊張の調節に至ると考えている。しかしながら、内在性の分子に依存する標的のターゲティングは、標的分子の同定・検証からスタートし、薬剤ライブラリーからのスクリーニング等からその分子に特異的に作用する分子の発見、という長い道のりを超えていかなければならない。実際、そのような過程を踏まえて実用化に至った治療薬はほとんど存在しない。そのため、同様の効果を得るために、外来性の分子をECに導入し、その機能活性を能動的に調節するという手法が考えられる。本申請課題では、血管組織レベルで外部からの光刺激により細胞内カルシウムレベルを上昇し、NO産生を促進し、血管機能をコントロールすることをめざす。

3. 研究の方法

まず、内在性にeNOSを発現していないHEK293細胞にhBACCS2を強制発現し、適切な光刺激によりhBACCS2を活性化し、細胞内Ca²⁺の上昇を蛍光カルシウムイメージング法を用いて検出する。続いて、内在性にeNOSを持つbEnd3細胞等の血管内皮系細胞にhBACCS2を強制発現し、細胞内Ca²⁺を上昇させる。さらに、Ca²⁺に引き続いて起こるNO産生を検出する。

4. 研究成果

細胞内のCa²⁺濃度を恣意的に上昇するために、Ca²⁺チャネルOrai1を活性化し細胞内Ca²⁺上昇を導く小蛋白分子hBACCS2を赤色蛍光蛋白mCherryと共に発現するプラスミドを導入した。このプラスミドをHEK293細胞に導入し、蛍光Ca²⁺指示薬Fluo-8を用いてCa²⁺イメージングを行った。蛍光顕微鏡においてmCherryの蛍光を確認することでhBACCS2陽性細胞を同定した。これらの細胞に青色光(波長480nm)を当てたところ、Fluo-8の子度が上昇し、細胞内Ca²⁺の上昇が検出できた。その後、マウス血管内皮細胞株であるbEnd.3細胞を使い、電気選考法を用い遺伝子導入を行い、同様のCa²⁺イメージングを行ったところ、HEK293細胞の場合と同様青色光照射による細胞内Ca²⁺の上昇が認めら連絡た。mCherryだけを導入したコントロールではHEK293細胞、bEnd.3細胞ともに光刺激によるCa²⁺の上昇が認められなかった。これらのことから、外来性の光感受性分子の導入により血管内皮細胞株での細胞内Ca²⁺の制御ができることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Huang Y, Leng TD, Inoue K, Tao Y, Liu M, Horgen FD, Fleig A, Li J, Xiong ZG. TRPM7

- channels play a role in high glucose-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2018;**293**:14393-14406. (査読有)
2. Asai H, Inoue K, Sakuma E, Shinohara Y, Ueki T. Potential implication of SGK1-dependent activity change in BV-2 microglial cells. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2018;**10**:115-123. (査読有)
 3. Liu M, Inoue K, Leng T, Guo S, Xiong Z-G. ASIC1 promotes differentiation of neuroblastoma by negatively regulating Notch signaling pathway. *Oncotarget* 2017;**8**:8283-8293. (査読有)
 4. Wu B, Leng T, Inoue K, Li J, Xiong Z-G. Effect of redox modifying agents on the activity of Channelrhodospin-2. *CNS Neurosci. Ther.* 2017;**23**:216-221. (査読有)
 5. Inoue K, Leng T, Yang T, Zeng Z, Ueki T, Xiong Z-G. Roles of serum- and glucocorticoid-inducible kinases in stroke. *J. Neurochem.* 2016; **138**:354-361. (査読有)
 6. O'bryant Z, Leng T, Liu M, Inoue K, Vann K, Xiong Z-G. Acid Sensing Ion Channels (ASICs) in NS20Y cells – potential role in neuronal differentiation. *Mol. Brain* 2016;**9**:68. (査読有)
 7. Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong Z-G, Ueki T. Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016; **478**:53-59. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 井上浩一、森本浩之、佐久間英輔、和田郁雄、植木孝俊. ミクログリアの活性に与えるフラクタルカインの影響、第 124 回日本解剖学会、2019 年 3 月、新潟.
2. 井上浩一、植木孝俊、Zhiqiang Xiong. TRPM7 を介する神経傷害、第 78 回日本解剖学会中部地方会、2018 年 10 月、富山.
3. 井上浩一. イオンチャネルを介した神経障害の亜鉛毒性. 第一回名古屋市立大学医学学会. 2018 年 9 月、名古屋.
4. Asai H, Inoue K, Sakuma E, Ueki T. CRISPR/Cas9-mediated disruption of SGK1 enhances potential inflammatory activity of microglial BV-2 cells. 47th annual meeting for Society for Neuroscience. Oct. 2017. Washington DC.
5. 井上浩一、浅井勇人、佐久間英輔、植木孝俊. ミクログリアにおけるリン酸化酵素 SGK1 の機能解析、第 77 回日本解剖学会中部地方会、2017 年 10 月、豊明.
6. Liu M, Inoue K, Xiong ZG. ASIC1 regulates neuronal differentiation of neuroblastoma through Notch signaling pathway. AACR 107th Annual Meeting. Apr. 2016 New Orleans

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 佐久間 英輔
ローマ字氏名： SAKUMA EISUKE
所属研究機関名： 名古屋市立大学
部局名： 大学院医学研究科
職名： 講師
研究者番号(8桁)： 90295585

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。