

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06697

研究課題名(和文) エンドセリン受容体関連分子のカルボニル化修飾に着目した肺高血圧症の病態基盤の解明

研究課題名(英文) Possible involvement of carbonylation of endothelin receptor-related molecules in the onset and development of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

堀之内 孝広 (Horinouchi, Takahiro)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：20307771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)の病態形成におけるポリアミン系の役割を明らかにするため、ポリアミンの代謝産物であるアクロレイン(ACR)が、血管内皮機能に及ぼす影響を解析した。ACRは、(1)カルシウム感受性受容体(CaSR)を介した一酸化窒素の産生促進の抑制、(2)血管内皮機能を調節するエンドセリンB型受容体(ETBR)の分解の抑制、(3)CaSRとETBRのカルボニル化、を惹起した。そして、これらの作用は、抗酸化性物質によって抑制された。

以上の結果から、ACRは、血管内皮細胞の酸化ストレスの増大を介して、PAHの病態形成に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺血管の拡張能低下や肺血管床の器質的変化を病態基盤とする難治性呼吸器疾患であり、肺動脈の炎症が関与していると考えられている。また、最近では、PAHの病態形成におけるポリアミン系の関与が示唆されている。本研究では、ポリアミン系の代謝産物であるアクロレインが、血管内皮細胞の酸化ストレスを増大させることを明らかにした。酸化ストレスは、組織の炎症応答に関与していることから、アクロレインは肺動脈の炎症を介して、PAHの発症・進展をもたらすと考えられた。これらの結果は、抗酸化性物質が、酸化ストレス(炎症応答)の低減を介して、PAHに奏功する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of the polyamine system in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH), this study examined the effect of the polyamine metabolite acrolein (ACR) on vascular endothelial function. ACR caused (1) suppression of facilitation of nitric oxide production via calcium-sensing receptor (CaSR), (2) suppression of degradation of endothelin type B receptor (ETBR) that regulates vascular endothelial function, and (3) carbonylation of CaSR and ETBR. These effects were suppressed by antioxidants.

These results suggest that ACR contributes to the pathogenesis of PAH through an increase in oxidative stress in vascular endothelial cells.

研究分野：薬理学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 エンドセリン受容体 カルシウム感受性受容体 アクロレイン 酸化ストレス
カルボニル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の発症に伴って、ポリアミンの肺組織濃度やポリアミン代謝物の血中濃度が上昇することが報告されている。アクロレイン (ACR) は、内因性ポリアミンの代謝産物であり、強力な細胞傷害活性を有する。我々は、これまでに、不飽和カルボニル化合物である ACR が、PAH の発症・進展に関与するエンドセリン受容体 (ETR) や TRPC6 チャネルといったタンパク質と直接反応 (カルボニル化修飾) し、ACR 付加体を形成することを見出している。これらの知見から、我々は、肺においてポリアミンから産生された過剰な ACR が、肺動脈平滑筋細胞や肺血管内皮細胞の傷害、ならびに、ETR やその下流に位置する分子のカルボニル化修飾を介して、PAH の病態形成に寄与すると推測し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ACR による ETR 関連分子のカルボニル化修飾の分子基盤、及び、PAH における ETR 関連分子のカルボニル化修飾の病態生理的意義を解明することである。

3. 研究の方法

ヒト血管内皮細胞 (EA.hy926 細胞)、ラット血管平滑筋細胞 (A7r5 細胞)、血管組織 (摘出ラット胸部大動脈リング標本) に対する ACR の作用を明らかにするため、下記の解析を行った。

(1) ACR が、血管内皮機能障害を惹起する明らかにするため、Western blot 法を用いて、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性 (1177 番目のセリン残基 (Ser¹¹⁷⁷) のリン酸化) 及び eNOS 発現量の変化を解析した。また、一酸化窒素 (NO) の蛍光プローブである Diaminofluorescein-2 (DAF-2) を用いて、NO 産生量を測定した。

(2) ACR が、血管内皮細胞に発現するエンドセリン B 型受容体 (ET_BR) の細胞内動態に及ぼす影響を明らかにするため、Western blot 法を用いて、エンドセリン-1 (ET-1) による ET_BR のタンパク質分解を解析した。

(3) ACR が、細胞内 Ca²⁺動員機構に及ぼす影響を明らかにするため、細胞内 Ca²⁺の蛍光プローブである Fura-2/AM を用いて、細胞内 Ca²⁺濃度を測定した。

(4) ACR が、タンパク質のカルボニル化を惹起するか明らかにするため、ACR 付加体と反応する ARP (Aldehyde Reactive Probe) と Western blot 法を用いて、カルボニル化タンパク質を検出した。

(5) ACR が、細胞膜傷害を惹起するか明らかにするため、細胞膜傷害を受けた細胞の核を染色するヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide, PI) を用いて、細胞膜傷害の程度を測定した。

(6) ACR が、血管組織に及ぼす影響を明らかにするため、摘出ラット胸部大動脈標本を用いた張力測定実験を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト血管内皮細胞に、ACR を処理したところ、eNOS の活性化の指標となる Ser¹¹⁷⁷ のリン酸化量と eNOS タンパク質発現量が減少した。これらの結果から、ACR は NO 産生を抑制すると考えられた。NO 蛍光プローブである DAF-2 を用いて、血管内皮細胞から遊離される NO 量を測定したところ、静止時の細胞において NO 産生が確認され、この基礎レベルの NO 産生は ACR 処理によって、ほぼ完全に抑制された。これらの結果から、ACR は、NO 産生の抑制といった血管内皮機能障害を惹起することが明らかになった。

(2) ACR による NO 産生の抑制機序を明らかにするため、NO 産生のメカニズムを検討した。ヒト血管内皮細胞において、細胞外 Ca²⁺濃度の上昇に伴って、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇した。この細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、Ca²⁺感受性受容体 (CaSR) 遮断薬や G_{q/11} タンパク質阻害薬によって抑制された。これらの結果から、CaSR が細胞外 Ca²⁺によって刺激されると、G_{q/11} タンパク質の活性化を介して、細胞内 Ca²⁺濃度上昇が引き起こされることが明らかになった。そして、基礎レベルの NO 産生は、細胞外 Ca²⁺除去、CaSR 遮断薬処理、G_{q/11} タンパク質阻害薬処理、eNOS 阻害薬処理によって抑制された。このことから、ACR は、CaSR-G_{q/11} タンパク質-eNOS 系を阻害することによって、NO 産生を抑制すると考えられた。興味深いことに、ACR を処理した血管内皮細胞では、CaSR 遮断薬の作用消失と CaSR のカルボニル化が認められた。この知見から、ACR による CaSR のカルボニル化によって、CaSR の構造変化が生じ、CaSR 遮断薬の結合能が変化したのではないかと推測した。CaSR は、細胞外領域で二量体を形成し、その機能を発揮するが、ACR を処理した細胞では、

CaSR の二量体が減少していた。即ち、ACR によって CaSR の二量体形成が阻害された結果、CaSR 遮断薬の結合能と CaSR のシグナル伝達が変化した可能性が考えられた。

(3) ET_BR を安定発現させたヒト血管内皮細胞において、ACR は、ET_BR のカルボニル化を惹起した。次に、ET_BR のカルボニル化が、ET_BR の分解に及ぼす影響を検討した。ET-1 により ET_BR を刺激したところ、ET_BR のタンパク質発現量が経時的に減少した。一方、ACR を処理した血管内皮細胞では、ET-1 による ET_BR のタンパク質発現量の減少が抑制された。これらの結果から、ACR による ET_BR のカルボニル化は、ET_BR の分解を抑制することが明らかになった。一般に、タンパク質のリジン残基は、カルボニル化修飾を受けることが知られている。ET_BR の細胞内 C 末端領域には 5 個のリジン残基が存在し、これらがユビキチン化修飾を受けることによって、ET_BR の分解が促進される。そこで、ACR による ET_BR の分解抑制が、ユビキチン化修飾に關与するリジン残基のカルボニル化、即ち、ET_BR のユビキチン化修飾の阻害によるものか明らかにするため、リジン残基をアルギニンに置換した変異体を用いて解析を行った。しかしながら、ET_BR 変異体においても、ACR による ET_BR のカルボニル化が認められた。以上の結果から、ACR は、ET_BR のユビキチン化修飾部位とは異なるアミノ酸残基のカルボニル化修飾を介して、ET_BR のタンパク質分解を阻害することが明らかになった。

(4) ヒト血管内皮細胞に、ACR を処理したところ、濃度依存的な細胞膜傷害が認められた。ACR による細胞膜傷害は、プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬及び細胞内 Ca²⁺キレート薬によって、有意に抑制された。これらのことから、ACR は、PKC 及び細胞内 Ca²⁺依存性に、細胞膜傷害を惹起することが明らかになった。血管平滑筋細胞においても、ACR による PKC 依存性の細胞膜傷害が認められた。また、ACR を前処理した摘出ラット胸部大動脈リング標本において、 α_1 -アドレナリン受容体や ETR を介した血管平滑筋の収縮反応が消失した。これらのことから、ACR は、血管組織を傷害し、血管収縮能を喪失させることが明らかになった。以上の結果から、ACR は、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞において、PKC の活性化を介した細胞膜傷害を惹起することによって、血管張力制御機構の破綻をもたらすと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Karki Sarita, Terada Koji, Mazaki Yuichi, Miwa Soichi	4. 巻 140
2. 論文標題 Ca ²⁺ signal is involved in endothelin-1-induced internalization of endothelin type A receptor expressed in Chinese hamster ovary cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 102-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Mazaki Yuichi, Terada Koji, Miwa Soichi	4. 巻 143
2. 論文標題 Extracellular Ca ²⁺ promotes nitric oxide production via Ca ²⁺ -sensing receptor-Gq/11 protein-endothelial nitric oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 315-319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Mazaki Yuichi, Terada Koji, Miwa Soichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Cigarette smoke extract and its cytotoxic factor acrolein inhibit nitric oxide production in human vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1804-1809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀之内孝広, 真崎雄一, 三輪聡一
2. 発表標題 カルシウム感受性受容体-Gq/11タンパク質シグナル伝達系はヒト血管内皮細胞からの一酸化窒素遊離に関与する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀之内孝広, 真崎雄一, 寺田晃士, 三輪聡一
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるカルシウム感受性受容体を介した一酸化窒素産生機序
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内孝広, 真崎雄一, 三輪聡一
2. 発表標題 Involvement of Ca ²⁺ -sensing receptor-Gq/11 protein signaling pathway in nitric oxide release from human vascular endothelial cells
3. 学会等名 Pharmacology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内孝広, 真崎雄一, 三輪聡一
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素の活性化におけるカルシウム感受性受容体の関与
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内孝広, 真崎雄一, 三輪聡一
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるカルシウム感受性受容体を介したNO産生に対するタバコ煙ガス相水抽出物及びアクロレインの抑制作用
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀之内孝広, 大平洋, 佐藤一紀, 崎山信哉, 中谷資隆, 中村順一, 鈴木奈緒子, 杉本絢子, 林下晶子, 渡部拓, 真崎雄一, 三輪聡一, 西村正治, 辻野 一三
2. 発表標題 青黛の摂取に伴う肺動脈性肺高血圧症の発症機序に関する薬理学的考察
3. 学会等名 第60回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平洋, 堀之内孝広, 佐藤一紀, 中谷資隆, 杉本絢子, 渡部拓, 西村正治, 辻野一三
2. 発表標題 青黛起因性肺動脈性肺高血圧症の発症メカニズムについて
3. 学会等名 第3回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------