

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07132

研究課題名（和文）病的・治療的血管再構築におけるCa<sup>2+</sup>輸送制御機構の解明とその創薬応用研究課題名（英文）Pathophysiological mechanism for Ca<sup>2+</sup> transport regulation in vascular remodeling and its therapeutic application

研究代表者

喜多 紗斗美（Kita, Satomi）

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：10461500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺動脈性肺高血圧症（PAH）、末梢循環障害などの血管病の発症には、血管内皮細胞障害および血管平滑筋細胞増殖・収縮に基づく血管機能異常（血管過収縮）や血管リモデリング（血管再構築）が深く関与している。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の機能異常には、Ca<sup>2+</sup>ハンドリング異常が関わりと考えられているが、その詳細な分子機序は未だ不明である。本研究では、Na/Ca交換輸送体が血管内皮細胞・血管平滑筋細胞の機能異常に関与する可能性を検討した。NCLX阻害薬により血管平滑筋細胞の増殖・遊走が抑制されたことから、NCLXが血管リモデリングに関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアはATPを産生する重要なオルガネラであるとともに、アポトーシスの誘導、活性酸素種（ROS）の生成など、細胞の生死に関わる多彩な機能を担っている。本研究により、ミトコンドリアから細胞質へのCa<sup>2+</sup>放出が血管新生、血管リモデリングおよび平滑筋収縮に機能的に働くことが示された。本研究により、NCLXの機能異常が血管病の発症に関与する可能性が示されたことから、NCLXが血管病の新たな治療標的として期待される。

研究成果の概要（英文）：Vascular dysfunction and remodeling based on endothelial cell injury and vascular smooth muscle cell proliferation/hypercontraction are deeply involved in the onset of vascular diseases such as pulmonary arterial hypertension (PAH) and peripheral arterial disease. Such vascular diseases may be associated with endothelial and arterial Ca<sup>2+</sup> handling abnormality, but the detailed molecular mechanisms are still unknown. In this study, we examined the possibility that Na/Ca exchangers participate in endothelial and arterial Ca<sup>2+</sup> handling abnormality. Our results suggest that Ca<sup>2+</sup> efflux via NCLX contributes to vascular dysfunction and remodeling.

研究分野：薬理学

キーワード：Ca輸送制御 血管再構築

## 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) 末梢循環障害などの血管病の発症には、血管内皮細胞の障害・増殖および血管平滑筋細胞の増殖・収縮に基づく血管機能異常 (血管過収縮) や血管リモデリング (血管再構築) が深く関与している。血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の機能異常には、 $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリング異常が関わると考えられているが、その詳細な分子機序は未だ不明である。PAH は、肺小動脈が狭窄し肺動脈圧が上昇する疾患群であり、終末期に右心不全が引き起こされる難治性疾患である。ヒト PAH の終末期に特徴的な血管病変として、新生内膜や叢状病変 (plexiform lesion) が認められるが、血管病変の形成機序は不明である。現在、PAH 治療薬として、 $\text{PGI}_2$  製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、5 型 PDE 阻害薬などが使用されているが、未だに PAH の予後は不良であり、新規 PAH 治療薬の開発が急務である。

ミトコンドリアは ATP を産生する重要なオルガネラであるとともに、アポトーシスの誘導、活性酸素種 (ROS) の生成などの多彩な機能を担っている。また、ミトコンドリアは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を緩衝するために高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  を貯蔵できることが報告されている。ミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、主にミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  ユニporter (MCU) によるミトコンドリアへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入とミトコンドリア  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体 (NCLX) による細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  排出の輸送バランスによって制御されている。これら輸送体によるミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構は、血管病の新たな治療標的となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、血管内皮・血管平滑筋特異的 NCLX/NCX 遺伝子改変マウスを駆使して、病的・治療的血管再構築に関わる  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体を特定し ( $\text{Ca}^{2+}$  ハンドリング異常の分子機序の解明) それを標的とした新規血管病治療戦略を提案することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管平滑筋細胞の遊走・増殖実験

野生型マウスおよび血管平滑筋特異的 NCLX 高発現マウスより肺動脈平滑筋初代培養細胞 (mPASM) を単離した。この細胞を用いて、スクラッチアッセイによる細胞遊走・増殖能の経時解析を行った。通常酸素 (20%  $\text{O}_2$ ) あるいは低酸素 (2%  $\text{O}_2$ ) 条件下で培養し、3 時間毎にモノクロ CCD カメラで細胞の状態を撮影した。治癒面積の変化を算出することにより、細胞遊走・増殖能を評価した。

#### (2) 血管リング標本を用いた血管新生実験

C57BL/6J マウスより大動脈および肺動脈を摘出し、実体顕微鏡下で脂肪組織等を除去して 1 mm 長のリング標本を作製した。マトリゲル基底膜マトリックス内に血管リング標本を留置し、周囲に MCDB131 培養液を流し込んで、通常酸素 (20%  $\text{O}_2$ ) あるいは低酸素 (2%  $\text{O}_2$ ) 条件下で培養した。培養開始 7 日目に血管リング標本の周囲の新生血管の出芽数、長さ、分岐数を定量した。NCLX 阻害薬 CGP-37157 は MCDB131 培養液中に添加した。

#### (3) 摘出血管標本を用いた血管トーン測定

C57BL/6J マウスおよび NCLX ノックアウトマウスより大動脈および腸間膜動脈を摘出し、 $\alpha_1$  アゴニスト刺激時の血管収縮反応および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を比較した。また、CGP-37157 が血管トーンに及ぼす影響について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 血管平滑筋細胞の遊走・増殖における NCLX の関与

野生型マウスおよび血管平滑筋特異的 NCLX 高発現マウスより肺動脈平滑筋初代培養細胞 (mPASM) を単離し、スクラッチアッセイを行った。野生型マウスより単離した mPASM は、通常酸素下に比較して低酸素下において細胞遊走・増殖が促進され、この促進作用は CGP-37157 によって抑制された。血管平滑筋特異的 NCLX 高発現マウスより単離した mPASM では、通常酸素下における細胞遊走・増殖が野生型と比較して亢進していた。低酸素下では血管平滑筋特異的 NCLX 高発現マウス mPASM の細胞遊走・増殖はさらに促進され、この促進作用は CGP-37157 によって抑制されたことから、低酸素環境下における肺動脈平滑筋細胞の遊走・増殖に NCLX が促進的に関与することが示された。

#### (2) 血管新生における NCLX の関与

C57BL/6J マウスより大動脈および肺動脈を摘出し、通常酸素 (20%  $\text{O}_2$ ) および低酸素 (2%  $\text{O}_2$ ) 条件下での血管新生に対する NCLX 阻害薬の影響について検討した。大動脈リング標本を用いた検討では、通常酸素下および低酸素下の両方の条件において血管新生が認められた。また、こ

の作用は、CGP-37157 を添加することによって抑制されたことから、大動脈における血管新生に NCLX が関与することが示唆された。一方、肺動脈リング標本の場合には、通常酸素下においてわずかに血管新生がみとめられたが、低酸素下で培養することにより、新生血管の出芽数、長さ、分岐数の全てが増加した。また、低酸素環境下でみられた血管新生は、CGP-37157 は MCDB131 によって抑制されたことから、NCLX が肺動脈において酸素濃度に依存した血管新生に関与することが示された。

### (3) 血管トーン調節におけるミトコンドリア $\text{Ca}^{2+}$ 制御機構の関与

NCLX ノックアウトマウスの体重、無麻酔下での収縮期血圧および心拍数は野生型マウスと比較してほとんど差がなかった。NCLX ノックアウトマウスに麻酔下で  $\alpha_1$  受容体アゴニストを静脈内投与したときの血圧の上昇は、野生型マウスに比べて有意に低下した。NCLX ノックアウトマウスの大動脈リング標本を用いて  $\alpha_1$  受容体アゴニストによる血管収縮反応を比較したところ、その用量反応曲線は野生型マウスに比べて右側にシフトしており、NCLX ノックアウトマウスでは  $\alpha_1$  受容体アゴニストに対する血管収縮反応が低下することが分かった。さらに、野生型マウスの腸間膜動脈を用いて  $\alpha_1$  受容体アゴニストによる血管収縮に対する CGP-37157 の影響について検討したところ、 $\alpha_1$  受容体アゴニストによる血管収縮は CGP-37157 によって抑制された。一方、MCU ノックアウトマウスを用いた同様の検討により、MCU ノックアウトマウスでは  $\alpha_1$  受容体アゴニストによる血管収縮が野生型マウスと同程度であったことから、細胞質に  $\text{Ca}^{2+}$  を排出する NCLX はアゴニストによる血管収縮に関与しているが、ミトコンドリアに  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込む MCU は直接的に関与しないことが示された。また、 $\alpha_1$  受容体アゴニスト刺激時の血管平滑筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定したところ、 $\text{Ca}^{2+}$ -free 条件下での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が NCLX ノックアウトマウスの大動脈で抑制された。さらに、カフェイン添加時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇も NCLX ノックアウトマウスで低下したことから、ミトコンドリアから汲み出された  $\text{Ca}^{2+}$  が直接的あるいは筋小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  充填を介して間接的に血管収縮に関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Nagata A, Tagashira H, Kita S, Kita T, Nakajima N, Abe K, Iwasaki A, Iwamoto T.	4. 巻 529(3)
2. 論文標題 Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX1 attenuate hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 793-798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Moriguchi, S. Kita, M. Fukaya, M. Osanai, R. Inagaki, Y. Sasaki, H. Izumi, K. Horie, J. Takeda, T. Saito, H. Sakagami, T.C. Saido, T. Iwamoto, K. Fukunaga.	4. 巻 56(6)
2. 論文標題 Aberrant amygdala-dependent cued fear memory in Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger 1 heterozygous mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 4381-4394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-018-1384-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satomi Kita, Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Tomo Kita, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 The contribution of Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger 1 in pulmonary arterial hypertension in mice.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satomi Kita, Hideaki Tagashira, Tomo Kita, Ai Shinayama, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Involvement of mitochondrial Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension.
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 喜多紗斗美, 田頭秀章, 喜多知, 品山愛, 岩本隆宏
2. 発表標題 ミトコンドリアNa+/Ca2+交換輸送体は低酸素誘発性肺高血圧の発症に関与する.
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喜多紗斗美, 田頭秀章, 喜多知, 品山愛, 岩本隆宏
2. 発表標題 低酸素誘発肺高血圧症におけるミトコンドリアNa+/Ca2+交換輸送体の関与.
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田頭秀章, 永田旭, 喜多紗斗美, 喜多知, 阿部弘太郎, 岩崎昭憲, 岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋NCX1機能異常による低酸素誘発肺高血圧発症機序
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
研究分担者	太田 紘也 (Ohta Hiroya)  (40638988)	徳島文理大学・薬学部・助教   (36102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	喜多 知  (Ki ta Tomo)  (50797107)	福岡大学・医学部・講師     (37111)	

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