

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16509

研究課題名(和文) MCU/NCLX輸送バランス異常に基づく肺高血圧発症機序の解明

研究課題名(英文) The study of the mechanisms of pulmonary hypertension based on abnormal MCU/NCLX transport

研究代表者

田頭 秀章 (Tagashira, Hideaki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：90735028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺血管過収縮や肺血管リモデリングにより肺小動脈が狭窄し、慢性的に肺動脈圧上昇が続くことで右室不全をきたす難治性の疾患である。その病態分子機序の詳細は不明であり、PAHの発症機序の全容解明と有効な新規治療薬の開発が望まれている。近年、ミトコンドリア内膜に存在するCa²⁺輸送体として、MCUとNCLXが同定された。しかしながら、ミトコンドリアCa²⁺輸送体の生理学的役割および病態学的意義については未だ不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアCa²⁺輸送体遺伝子改変マウスを作製し、ミトコンドリアCa²⁺輸送体と低酸素誘発性肺高血圧発症機序の関連について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、PAHの原因としてKCNK3(TASK1)やKv1.5の機能低下および非選択的陽イオンチャネルTRPC6の発現増加等が報告されており、PAHの発症・増悪には細胞膜K⁺チャネルやCa²⁺チャネルが関与することが示唆されている。本研究は、これまでに報告されている細胞膜チャネルではなく、細胞内オルガネラに発現しているミトコンドリアCa²⁺輸送体の各種遺伝子改変マウスならびに薬理的ツールを用いて、肺血管平滑筋細胞のミトコンドリアCa²⁺輸送バランス異常による肺高血圧発症への関与を明らかとしたものである。肺血管過収縮や肺血管リモデリングの新しい病態機序として極めて興味深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe and progressive disease that causes right heart failure. The pathogenesis of PAH is generally characterized by vasoconstriction, upregulated proliferation, migration, and pulmonary vascular remodeling in lung tissue. Recent studies using genetic analyses and experimental models have suggested that the hypercontraction of pulmonary arteries induced by Ca²⁺ signaling abnormality may be involved in the pathogenesis of PAH. However, the pathophysiological mechanisms of PAH via Ca²⁺ transporters are not clearly understood. Recently, MCU and NCLX have been identified as mitochondrial Ca²⁺ transporters. However, the physiological and pathophysiological role of these mitochondrial Ca²⁺ transporters are still unclear. In this study, we generated mitochondrial Ca²⁺ transporter gene altered mice and investigated the relationship between mitochondrial Ca²⁺ transporters and the pathogenesis of hypoxia-induced pulmonary hypertension.

研究分野：薬理学一般

キーワード：イオン輸送体 肺高血圧症

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺血管過収縮や肺血管リモデリングにより肺小動脈が狭窄し、平均肺動脈圧が 25 mmHg 以上となる難治性の疾患であり、肺動脈圧の高い状態が続くことにより右心不全に至る。肺血管過収縮や肺血管リモデリングの原因として、肺動脈平滑筋細胞の Ca^{2+} 制御異常が推察されているが、その分子機序の詳細は不明である。これまでに、ヒト PAH の原因遺伝子として、KCNK3 (TASK1) の変異が発見されており (NEJM, 369:351-361, 2013)、また肺高血圧疾患モデルの肺動脈では Kv1.5 の機能低下が観察されること (JCI, 100:2347-2353, 1997)、さらに、PAH 患者の肺動脈では非選択的陽イオンチャネル TRPC6 が発現増加していること (Circulation, 133:1371-1385, 2009) が報告されており、PAH の発症・増悪には K^+ チャネルや Ca^{2+} チャネルが関与することが示唆されているが、その分子機序の詳細は不明である。現在、PAH 治療薬として、プロスタサイクリン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、PDE5 阻害薬などの血管拡張薬が臨床応用されているが、重症例では肺移植が必要となることも多く、予後の十分な改善には至っていない。喫緊の課題として、PAH の発症機序の全容解明と有効な新規治療薬の開発が望まれている。

ミトコンドリアは ATP 産生のみならず、細胞の生と死に關与する重要な小器官であることが明らかになっている。近年、ミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} 輸送体として、 Ca^{2+} 流入系である Ca^{2+} 単輸送体 (MCU) (Nature, 476:336-340, 2011) と Ca^{2+} 流出系である Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体 (NCLX) (PNAS, 107:436-441, 2010) が同定されたが、これらミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体の生理学的役割および病態学的意義については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、PAH の発症機序の解明と有効な新規治療薬の開発を目指し、「正常な肺血管機能維持には、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送バランス制御が重要であり、肺高血圧症病態時にはミトコンドリア Ca^{2+} 輸送バランス異常に陥っている」という作業仮説を立て、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体遺伝子改変マウスおよび薬理的ツールを駆使した *in vivo/in vitro* 実験を実施した。

3. 研究の方法

申請者等はまず、血管平滑筋特異的ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体高発現マウスおよびミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体欠損マウスを作製した。これらミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体遺伝子改変マウスおよび野生型マウスを用いて、低酸素誘発性肺高血圧モデル実験を実施した。低酸素誘発性高血圧モデルは、低酸素チャンバー (10% 低酸素) にて、マウスを 4 週間飼育することにより作製した。低酸素処置後、Millar Mikro-Tip® カテーテル血圧システムを用いた右室収縮期圧および心拍数を測定し、その後右室重量を測定し、肺高血圧症の重症度を比較検討した。また、各肺高血圧モデルマウスから肺病変組織を採取し、免疫組織学的検討により、肺血管病変 (血管筋性化、肺小動脈密度) を検討した。

次に、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体遺伝子改変マウスおよび野生型マウスの肺動脈か

ら初代培養肺動脈平滑筋細胞を調製した。この培養肺血管平滑筋細胞を用いて、低酸素培養、Ca²⁺ imaging による細胞内 Ca²⁺動態の検出および酸素消費量測定の実験系確立を試みた。

4 . 研究成果

本研究に用いた、ある平滑筋特異的ミトコンドリア Ca²⁺輸送体高発現マウスでは、野生型マウスに比較して、低酸素誘発性肺高血圧モデル作製後の右室収縮期圧の増加抑制、右室重量比の増加抑制がみられた。また、筋性化により肺動脈のリモデリングを評価した結果、野生型マウスに比較して、低下低酸素誘発性肺高血圧が軽症化していることを見出した。他のミトコンドリア Ca²⁺輸送体高発現マウスでは逆に、低酸素誘発後の右室収縮期圧の増加、右室重量比の増加共に増悪がみられ、肺動脈のリモデリングの増悪も含めた、肺高血圧症状が重症化することも見出している。また、これらミトコンドリア Ca²⁺輸送体遺伝子欠損マウスを作製し、同様の検討を行った結果、高発現マウスと相関する結果を得た。

次に、低酸素誘発性肺高血圧症の抑制、増悪メカニズムを検討するため、これら遺伝子改変マウスより、肺動脈平滑筋細胞を単離・培養し、低酸素培養、Ca²⁺ imaging による細胞内 Ca²⁺動態の検出および酸素消費量測定の実験系の確立を試みた。野生型マウスより、肺動脈平滑筋細胞を単離・培養し、低酸素チャンパーにて細胞を培養後(2%低酸素) Ca²⁺ imaging を行った結果、アゴニスト刺激による細胞内 Ca²⁺濃度が通常酸素下にて培養した細胞に比較して増加する実験系の確立に成功した。今後は、これらミトコンドリア Ca²⁺輸送体遺伝子改変マウスおよび単離平滑筋細胞を用いて、低酸素誘発性肺高血圧発症機序を *in vivo*, *in vitro* 両面より検討していく予定である。

本研究は、これまでに報告されている細胞膜チャンネルではなく、細胞内オルガネラに発現しているミトコンドリア Ca²⁺輸送体の各種遺伝子改変マウスならびに薬理的ツールを用いて、肺血管平滑筋細胞のミトコンドリア Ca²⁺輸送バランス異常による肺高血圧発症への関与を明らかとしたものである。肺血管過収縮や肺血管リモデリングの新しい病態機序として極めて興味深いものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamada H, Sakata N, Tanaka T, Tagashira H, Yoshimatsu G, Kawakami R, Wada H, Iwamoto T, Kodama S.	4. 巻 146(6)
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and angiogenesis rescue murine ischemic hindlimb via transient receptor potential vanilloid 4.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 244-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.04.009.	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 Kon N, Wang HT, Kato YS, Uemoto K, Kawamoto N, Kawasaki K, Enoki R, Kurosawa G, Nakane T, Sugiyama Y, Tagashira H, Endo M, Iwasaki H, Iwamoto T, Kume K, Fukada Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger mediates cold Ca ²⁺ signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 eabe8132.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abe8132.	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 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shoda W, Nomura N, Ando F, Tagashira H, Iwamoto T, Ohta A, Isobe K, Mori T, Susa K, Sohara E, Rai T, Uchida S.	4. 巻 15(6)
2. 論文標題 Sodium-calcium exchanger 1 is the key molecule for urinary potassium excretion against acute hyperkalemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0235360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0235360.	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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田頭秀章、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 TRPM7/CNNM2遺伝子改変マウスを用いたMg代謝異常による心血管病態解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田頭秀章、喜多紗斗美、阿部弘太郎、岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋NCX1阻害処置は低酸素誘発肺高血圧を改善する
3. 学会等名 第5回臨床薬理学会 九州・沖縄地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Kohtaro Abe, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Vascular smooth muscle NCX1 as a potential drug target for pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Tomo Kita, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 The pathophysiological role of vascular smooth muscle NCX1 for pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 65th Biophysical Society Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Characteristics of sudden death in cardiac-specific conditional NCX1 knockout 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 田頭秀章、永田旭、喜多知、阿部弘太郎、岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋NCX1を介したCa ²⁺ シグナル異常は低酸素誘発性肺高血圧の発症に関与する
3. 学会等名 第49回日本心脈管作動物質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Tomo Kita, Tomohiro Numata, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto.
2. 発表標題 Development of a new model mouse for Mg metabolism disorder targeted for functional suppressing TRPM7
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 田頭秀章、喜多紗斗美、喜多知、岩本隆宏
2. 発表標題 低酸素誘発肺高血圧発症に血管平滑筋NCX1を介したCa ²⁺ シグナル異常が関与する
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Tomo Kita, Akinori Iwasaki, Kohtaro Abe, Takahiro Iwamoto.
2. 発表標題 Vascular smooth muscle NCX1 is involved in the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (国際学会)
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

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