

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590856

研究課題名（和文）冠攣縮性狭心症の成因に関する臨床分子生物学的研究：P122 蛋白の役割  
 研究課題名（英文） Clinical and molecular biological approach to the genesis of coronary artery spasm: A study on the role of p122 protein

研究代表者

奥村 謙 (OKUMURA KEN)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20185549

研究成果の概要（和文）：

PLC- $\delta 1$  活性を制御（亢進）する p122（1083 個のアミノ酸で構成される蛋白）に着目し、冠攣縮性狭心症患者とコントロール例で p122 の遺伝子および蛋白発現を比較検討した。その結果、冠攣縮性狭心症患者から採取された培養皮膚線維芽細胞において p122 遺伝子発現と蛋白発現がコントロール例に比して有意に亢進していた。一方、大動脈平滑筋細胞に p122 蛋白を過剰発現させると PLC 活性が亢進し、さらにアセチルコリン刺激に対する細胞内カルシウムイオン濃度が上昇していた。p122 遺伝子発現亢進の機序としては、p122 遺伝子の 5' 側 promoter 解析により、-228G/A ならびに -228A/A 変異が冠攣縮性狭心症男性患者の約 10% で認められ、それらの変異による promoter 活性が亢進していた。以上より、冠攣縮性狭心症患者における PLC- $\delta 1$  活性亢進の機序の一つとして p122 蛋白の発現亢進が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A p122 protein was recently cloned to potentiate phospholipase C (PLC)- $\delta 1$  activity. To investigate the role of p122 in the enhanced vasomotility, we examined p122 expression in the cultured skin fibroblasts obtained from patients with and without coronary spasm, intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) at baseline and after stimulation with acetylcholine in the cells transfected with p122, and promoter in genomic DNA. p122 protein and gene expression levels in patients with coronary spasm (n=11) were enhanced compared with that in control subjects (n=9) (both  $p < 0.01$ ).  $[Ca^{2+}]_i$  at baseline and the peak increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in response to acetylcholine were both two times higher in cells transfected with p122 than in those without p122. In the p122 promoter analysis, the -228G/A and -1466C/T variants revealed the increase in luciferase activity. The -228G/A variant was more frequent in male patients than in male controls ( $p < 0.05$ ). In conclusions, p122 is upregulated in patients with coronary spasm, which causes increased  $[Ca^{2+}]_i$  to acetylcholine and thereby seems to be related to enhanced coronary vasomotility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・分子心臓病態学

キーワード：循環器・高血圧、冠攣縮、P122 蛋白、Phospholipase C

## 1. 研究開始当初の背景

冠攣縮性狭心症は冠動脈平滑筋が収縮刺激に対して過収縮性を示す疾患である。その成因として、他施設における検討では、冠攣縮性狭心症や心筋梗塞例において、血管内皮細胞の一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) の promoter 領域に遺伝子異常を認めることが報告されている。NOS 活性の低下とこれによる NO 産生低下は血管トーンの亢進や血小板凝集、血管内膜の肥厚、そして動脈硬化性変化の促進にはつながる可能性があるものの、NO 産生低下のみで心筋虚血をきたす冠動脈の過剰収縮反応 (冠攣縮) を直接的に説明することは困難である。一方、血管平滑筋細胞膜に存在する Phospholipase C (PLC) が刺激されると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し収縮シグナリングが起動する。我々はこれまでに冠攣縮性狭心症患者から得られた培養皮膚線維芽細胞において、膜分画 PLC 活性が亢進していること、PLC 活性と冠動脈の basal tone および収縮刺激に対する反応性が正相関を示すこと、膜分画 PLC の主体が PLC- $\delta$ 1 であることを既に報告した (J Am Coll Cardiol 2000)。さらに PLC- $\delta$ 1 活性亢進の機序として 864G-A 遺伝子変異を見出したが (Circulation 2002)、この遺伝子変異は冠攣縮性狭心症患者の 10% に認められるに過ぎず、他の機序について検討を進めてきた。

## 2. 研究の目的

冠攣縮性狭心症は冠動脈平滑筋の basal tone の亢進と収縮刺激に対する過剰反応 (攣縮) を特徴とする。本研究の目的は、冠攣縮の成因を分子レベルで解明することであり、このために臨床例より得られた試料を対象とし、収縮に関わる細胞内情報伝達系について分子生物学的に検討することである。これまでに我々は、冠攣縮性狭心症患者から得られた培養皮膚線維芽細胞の膜分画 PLC 活性が亢進しており、PLC 活性と冠動脈の basal tone および収縮刺激に対する反応性が正の相関を示すこと、PLC 活性亢進の主体は PLC- $\delta$ 1 であることを明らかにした。さらに PLC- $\delta$ 1 活性に抑制的に作用する small G 蛋白の Rho A と、促進的に作用する P122 蛋白について検討し、Rho A の蛋白発現には異常を認めなかったものの、P122 の蛋白発現は冠攣縮性狭心症患者で著明に亢進していた。本研究では PLC- $\delta$ 1 活性亢進の機序に関する検討をさらに進め、P122 蛋白発現の亢進が実際に PLC- $\delta$ 1 活性を亢進させるのか明らかにす

る。

## 3. 研究の方法

### 1) PLC- $\delta$ 1 活性化因子 P122 蛋白・mRNA 発現の検討

本研究は当学部倫理委員会で承認されている。患者からの検体の採取は文書による同意を得た後に実施する。

対象は臨床所見 (病歴および発作時の心電図) より冠攣縮性狭心症と診断され、冠動脈造影検査時に実施したアセチルコリン (ACh) 負荷試験により自覚症状、虚血性心電図変化を伴う冠攣縮が誘発された症例および冠攣縮を示唆する病歴を有しない不整脈症例 (コントロール群)。心臓カテーテル検査時にカテーテル挿入部より皮膚小片を採取し、線維芽細胞を培養した。この培養皮膚線維芽細胞を scrape し、蛋白画分を遠心分離後、Western blot 法により P122 の細胞内発現量を NIH image で定量化した。冠攣縮性狭心症群で mRNA の発現が亢進しているかを検討するために培養皮膚線維芽細胞からキットにて mRNA を抽出し、NCBI データベースの mRNA ID: AF 026219 を参考にし、primer 並びに Taqman probe を作製した。これらを用いて real-time RT-PCR 法により定量的に冠攣縮性狭心症群ならびにコントロール群における P122 の mRNA の発現量を比較検討した。

### 2) P122 蛋白・mRNA 発現亢進機序の検討

冠攣縮性狭心症患者における P122 の蛋白発現亢進の機序を解明するために、患者から採取したゲノムを用いて P122 の promoter 解析を行った。NCBI データベースの genome ID: AH 011020 を参考にし、promoter 領域に対する種々の primer を作製した。PCR 法により P122 の promoter 領域を増幅後、各 PCR 産物を Dye Terminator 法にて蛍光標識した。ABI PRISM310 Genetic Analyzer にて直接 DNA シーケンスを行い、塩基配列を決定し、変異の有無を検討した。

冠攣縮性狭心症患者ならびにコントロール群の P122 の promoter 領域につき、ルシフェラーゼアッセイを行った。具体的には、P122 の promoter 領域を PCR 法にて増幅後 PCR 産物をルシフェラーゼレポーターベクター (Picagene basic vector) に挿入した。pcDNA1/Neo- $\beta$ -galactosidase plasmid と p122 の promoter 領域が挿入されたルシフェラーゼレポーターベクターをヒト冠動脈平滑筋細胞に cotransfection 後、ルミノメー

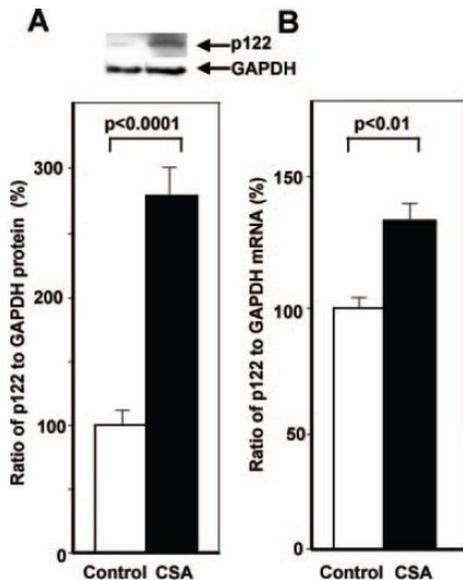
ターを用いてルシフェラーゼ並びに  $\beta$ -galactosidase活性を測定した。また、冠攣縮性狭心症患者でP122のpromoter領域に変異が見つかった場合は、そのPCR産物を用いて、同様にルシフェラーゼ活性と  $\beta$ -galactosidase活性を測定し、変異がない場合と比較検討した。

### 3) p122 過剰発現による PLC- $\delta$ 1 活性の変化の検討

Human embryonic kidney (HEK) 293 細胞およびヒト冠動脈平滑筋細胞・ラット大動脈平滑筋細胞 (A7r5) を用い検討した。PLC- $\delta$  1 とムスカリン M1 受容体遺伝子を transfection 後、正常またはアミノ酸置換を伴う変異 P122 遺伝子 (siRNA) を cotransfection させ、アセチルコリン刺激に対する細胞内遊離カルシウムイオンの反応性について、fura-2 を使用し分光蛍光光度計にて測定した。

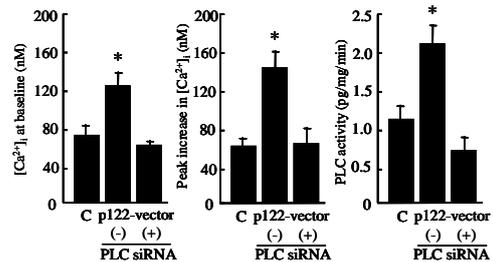
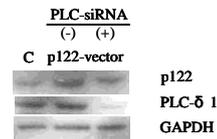
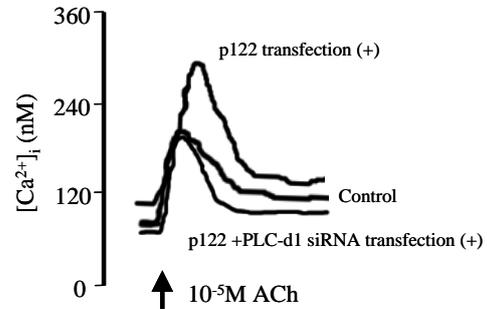
### 4. 研究の成果

冠攣縮性狭心症患者から採取された培養皮膚線維芽細胞において、p122遺伝子発現と蛋白発現はコントロール例に比して有意に亢進していた。下図Aはp122蛋白量 (GAPDHとの比較) で、冠攣縮性狭心症群 (CSA) ではコントロール群に比して約1.8倍亢進していた。Bはp122 mRNA発現で (GAPDHとの比較)、CSA群ではコントロール群に比して約1.4倍亢進していた。



P122発現とPLC活性との関連を見ると、大動脈平滑筋細胞にp122蛋白を過剰発現させるとPLC活性が亢進し、さらにアゴニスト (アセチルコリン) 刺激に対する細胞内カルシウムイ

オン濃度上昇も亢進していた。下図はp122蛋白を過剰発現させた大動脈平滑筋細胞の細胞内Caイオン濃度 [baseline (A), アセチルコリン刺激後 (B)] とPLC活性 (C) を示すが、PLC- $\delta$  1 存在下ではPLC活性の亢進とCaイオン濃度の増加が認められた (\* $p < 0.05$ )。一方、siRNAによるPLCノックダウン下では認められなかった。



p122遺伝子発現亢進の機序としては、p122遺伝子の5'側promoter解析により、-228G/Aならびに-228A/A変異が冠攣縮性狭心症男性患者の約10%で認められ、それらの変異によるpromoter活性が亢進していた。

以上より、冠攣縮性狭心症患者におけるPLC- $\delta$  1活性亢進の機序の一つとしてp122蛋白の発現亢進が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

① Osanai T, Okumura K, et al. Novel pro-atherogenic molecule coupling factor 6 is elevated in patients with stroke: a possible linkage to homocysteine. *Ann Med.* 2010;42:79-86.

② Murakami R, Osanai T, Okumura K, et al. p122 Protein Enhances Intracellular

Calcium Increase to Acetylcholine. Its Possible Role in the Pathogenesis of Coronary Spastic Angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1968-1975.

③ Yokota T, Osanai T, Okumura K, et al. Effects of telmisartan on markers of ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction: comparison with enalapril. *Heart Vessels.* 2010;25:460-8.

④ Yokoyama H, Osanai T, Okumura K, et al. Effects of pravastatin and rosuvastatin on the generation of adiponectin in the visceral adipose tissue in patients with coronary artery disease. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011;25:378-387.

⑤ Osanai T, Okumura K, et al. Coupling factor 6 enhances Src-mediated responsiveness to angiotensin II in resistance arterioles and cells. *Cardiovasc Res* 2009;81:780-787.

⑥ Echizen T, Osanai T, Okumura K, et al. Upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor type 1 by endogenous prostacyclin inhibitor coupling factor 6 in vascular endothelial cells: a role of acidosis-induced c-Src activation. *Hypertens Res.* 2009;32:182-187

⑦ Horiuchi D, Okumura K, et al. Effect of pilsicainide on dominant frequency in the right and left atria and pulmonary veins during atrial fibrillation: Association with its atrial fibrillation terminating effect. *Eur J Pharmacol* 2009; 608: 54-61

⑧ Yokoyama J, Osanai T, Okumura K, et al. Impact of telmisartan on coronary stenting in patients with acute myocardial infarction compared with enalapril. *Int J Cardiol* 2009;132:114-120.

⑨ Osanai T, Okumura K, et al. Coupling factor 6 enhances Src-mediated responsiveness to angiotensin II in resistance arterioles and cells. *Cardiovasc Res* 2009;81:780-787.

⑩ Osanai T, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 as a novel vasoactive and proatherogenic peptide in vascular endothelial cells. *Naunyn-Schmied Arch*

*Pharmacol* 2009;380:205-214.

[学会発表] (計5件)

①Okumura K, et al. P122 Protein a positive regulator for phospholipase C- $\delta$ 1, is upregulated and involved in enhanced calcium signaling in human coronary spasm. *アメリカ心臓病学会 (AHA)* 2008, 11, 10 (ニューオリンズ)

②Shibutani S, Okumura K, et al. Coronary Vasospasm Induced In Transgenic Mice With Variant Phospholipase C- $\delta$ 1(R257H). *アメリカ心臓病学会 (AHA)* 2010. 11. 15 (フロリダ)

[図書] (計3件)

①奥村謙 心房細動の治療と管理 Q&A 第2版 2009. 3

②奥村謙 頻拍発症機序の解析法 新・心臓病プラクティス 13 2009:22-34

③奥村謙 心臓リズムマネジメントを究める メジカルビュー社 2009. 7. 10

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥村 謙 (OKUMURA KEN)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20185549

### (2) 研究分担者

長内 智宏 (OSANAI TOMOHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00169278