

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591180

研究課題名（和文） 肺高血圧症におけるカリウムチャンネル制御の解明と治療応用

研究課題名（英文） Pathophysiology and pharmacotherapy in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

早瀬 康信（HAYABUCHI YASUNOBU）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20403686

研究成果の概要（和文）：

我々は、Intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel (IKca channel)が正常肺血管に存在する収縮型フェノタイプの平滑筋細胞には発現が少なく、増殖型フェノタイプへと形質転換が認められた後に多く発現すること、細胞内カルシウム濃度の制御を通じて平滑筋細胞の脱分化、形質転換、遊走・増殖に深く関わっていることを明らかにした。IKca channelの活性は臨床的、組織病理学的に肺高血圧、肺血管のリモデリングの増悪に強く関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Proliferative smooth muscle cells predominantly express intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (IKca) channels. This phenotypic shift in the Kca channel expression pattern gives rise to dramatic alterations in the electrical properties of the cell, which have functional consequences, in part because of the effect on  $Ca^{2+}$  influx. IKca channel activation contributes to  $Ca^{2+}$  entry in smooth muscle cells and therefore affect migration and proliferation in some pathophysiologic conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧、血管平滑筋細胞、イオンチャンネル、カリウムチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 血管平滑筋細胞の形質転換や遊走および増殖を制御する因子のひとつとして、さまざまなイオンチャンネルの働きの重要性が明らかになってきた。血管平滑筋細胞に存在する多種類のカリウムチャンネルは血管の収縮・弛緩や分化、増殖および形質転換に深く関わっている。

(2) カルシウム活性化カリウムチャンネルの1種である intermediate-conductance

$Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel (IKca channel)は、正常血管に存在する収縮型フェノタイプの血管平滑筋細胞では発現が少なく、増殖型フェノタイプへと形質転換が認められた後、多く発現するようになる。そして、IKca channelは、細胞内カルシウム濃度を制御するなどの作用を有し、平滑筋細胞の脱分化、形質転換、遊走・増殖に深く関わっていると報告されている。そして、IKca channelは、細胞内カルシウム濃度を制

御するなどの作用を有し、平滑筋細胞の脱分化、形質転換、遊走・増殖に深く関わっていると報告されている (Schwab A. Am J Physiol, 2001)。一方では、伸展刺激などの機械刺激を様々なイオンチャンネルが感知し、多様な細胞機構に影響を与えていることも報告されている。多種類の細胞に存在する IKCa channel も伸展刺激によって、活性化されることが報告されている (Haga JH et al, Journal of Biomechanics, 2007)。また、乳癌細胞や膵臓癌細胞に発現している IKCa channel を抑制することによって、癌細胞の増殖が抑制されることなどが報告され、悪性腫瘍細胞の増殖に大きく関与していることが証明されている。

(3) 我々は、Patch-Clamp 法を用いて、培養血管平滑筋細胞の IKCa channel が、Angiotensin II によって活性化されることを報告した (Hayabuchi et al. J Mol Cell Cardiol, 2006)。細胞増殖因子のひとつである Angiotensin II と IKCa channel の増殖作用が相互に関連しあっていることを初めて証明した報告である。

## 2. 研究の目的

(1) 以上のような報告やこれまでの我々の研究から、肺血管病変においても、IKCa channelの活性は、血管平滑筋細胞の遊走・増殖を通じて、臨床的、組織病理学的に、肺高血圧、肺血管のリモデリングの増悪に強く関与していることが推測される。このような経緯から、伸展刺激に対する肺血管平滑筋細胞のIKCa channelの発現、活性化の制御を明らかにすることが、肺高血圧症の病変の進行の機序の解明と発症・増悪の回避に有用ではないかと考えた。

(2) これまでに、IKCa channel阻害剤を使用した血管リモデリングの抑制を臨床応用した報告は無く、新たな治療法としての可能性も目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 正常および肺高血圧ラットにおけるIKCa channelの発現量を、免疫染色法、Western blot法、patch-clamp法を用いて観察する。

(2) IKCa channelの制御による肺高血圧、肺血管病変への影響をラットの肺血管組織病変および肺動脈圧、右室心筋重量を測定することによって検討する。

(3) そして、培養肺動脈平滑筋細胞に機械的刺激を与えることによる遊走および増殖を、細胞伸展システム下での培養細胞増殖の観察とBoyden chamberを用いた実験システムで観察し、IKCa channelの影響を定量的に測定する。

(4) また、Patch-clamp法を用いて、伸展刺

激に対するIKCa channelの反応を観察し、その細胞内情報伝達機構を検討する。

## 4. 研究成果

(1) IKCa channel は、正常血管に存在する収縮型フェノタイプの血管平滑筋細胞では発現が少なく、増殖型フェノタイプへと形質転換が認められた後、多く発現するようになる。そして、IKCa channel は、細胞内カルシウム濃度を制御するなどの作用を有し、平滑筋細胞の脱分化、形質転換、遊走・増殖に深く関わっている。

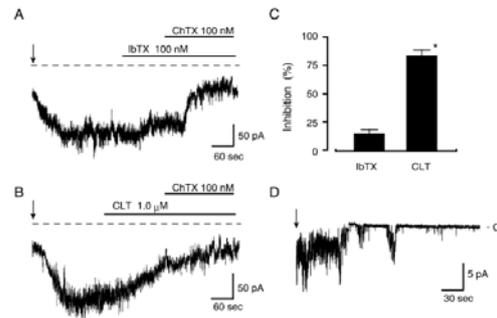


図1 IKCa channel の発現

図1Aは、収縮型平滑筋細胞のK channel電流を示している。Bは、増殖型平滑筋細胞のK channel電流を示している。Bでは、CLTでK channel電流が抑制されており、IKCa channelの発現が顕著であることを示している。

(2) IKCa channel電流をCell-attached configuration, Inside-out patch configurationなどで記録しながら、細胞膜を進展刺激した。そのときに記録したものが以下の図2である。

Patch clampのPipetteで、0, 25, 45mmHgまでの陰圧を与えた。Channelの活性は、NPo = 0.009 ± 0.003 から 0.090 ± 0.020, 0.203 ± 0.081 と有意に上昇した。

また、細胞外液の浸透圧を310 mOsm/kgH<sub>2</sub>Oから223 mOsm/kgH<sub>2</sub>Oの低浸透圧にすることによって細胞膜の進展が得られるが、この場合にも陰圧を与えたときと同様に、IKCa channelの活性化が得られた。

(3) 上記の如くの細胞膜進展刺激方法によって、IKCa channelは活性化された。このことは肺血流量増加や肺高血圧によって、肺血管平滑筋細胞の細胞膜が進展されるような刺激が持続して生じた場合に、IKCa channelが活性化していることを示している。しかし、類似の実験系において、細胞外液中のカルシウムを除いた場合や、PKC阻害剤で前処置した場合には、活性化が抑制されることが明らかになった。

(4) また、Cytochalasin Dは、IKCa channelの活性化を阻害したため、F-actinが細胞内シグナル伝達に関与している可能性が示唆され

た。我々の研究から、肺血管病変においても、IKca channelの活性は、血管平滑筋細胞の遊走・増殖を通じて、臨床的、組織病理学的に、肺高血圧、肺血管のリモデリングの増悪に強く関与していることが推測されると考えられた。

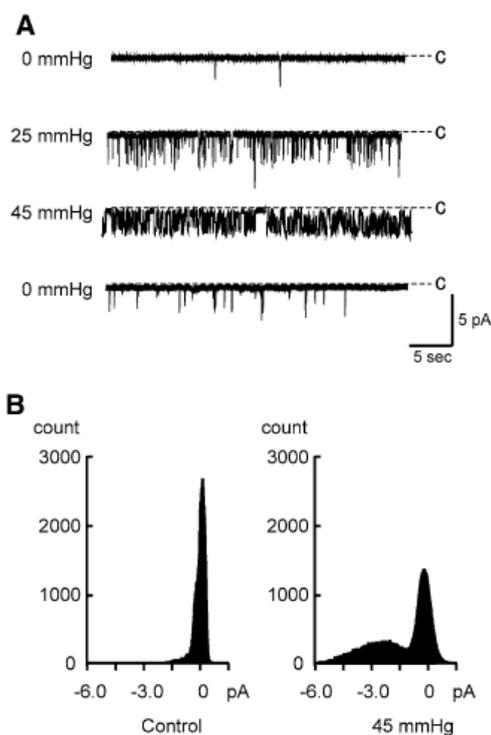


図 2

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

① Kurobe H, Tominaga T, Sugano M, Hayabuchi Y, Egawa Y, Takahama Y, Kitagawa T. Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response: three-year tracing study after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 査読有 143:2013, 656-662. e1-2. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.12.015.

② Hayabuchi Y, Sakata M, Ohnishi T, Inoue M, Kagami S. Ratio of Early Diastolic Tricuspid Inflow to Tricuspid Lateral Annulus Velocity Reflects Pulmonary Regurgitation Severity but Not Right Ventricular Diastolic Function in Children With Repaired Tetralogy of Fallot. *Pediatric Cardiology* 査読有 34:2013, 1112-1117. doi: 10.1007/s00246-012-0612

-1.

③ Sakata M, Hayabuchi Y, Inoue M, Ohnishi T, Kagami S. Left Atrial Volume Change Throughout the Cardiac Cycle in Children With Congenital Heart Disease Associated With Increased Pulmonary Blood Flow : Evaluation Using a Novel Left Atrium-Tracking Method. *Pediatric Cardiology* 査読有 34:2013, 105-111. doi: 10.1007/s00246-012-0395-4.

④ Hayabuchi Y, Inoue M, Sakata M, Ohnishi T, Kagami S. Subclavian and pulmonary artery steal phenomenon in a patient with isolated left subclavian artery and right aortic arch. *J Clin Ultrasound* 査読有 41:2013, 265-268. doi: 10.1002/jcu.21874.

⑤ Watanabe N, Hayabuchi Y, Nakagawa R, Saijo T, Kagami S. Multidetector-row computed tomography evaluation of bilateral bronchial narrowing associated with increased pulmonary blood flow in children with congenital heart disease. *Congenital Heart Disease* 査読有 7:2012, 410-416. doi: 10.1111/j.1747-0803.2012.00653.x.

⑥ Hayabuchi Y, Sakata M, Ohnishi T, Kagami S. A novel bilayer approach to ventricular septal deformation analysis by speckle tracking imaging in children with right ventricular overload. *J Am Soc Echocardiogr* 査読有 24:2011, 1205-1212. doi: 10.1016/j.echo.2011.06.016.

⑦ Hayabuchi Y, Inoue M, Watanabe N, Sakata M, Ohnishi T, Kagami S. Serum concentration of heart-type fatty acid-binding protein in children and adolescents with congenital heart disease. *Circ J* 査読有 75:2011, 1992-1997. doi: 10.1253/circj.CJ-10-1256.

⑧ Hayabuchi Y, Nakaya Y, Mawatari K, Inoue M, Sakata M, Kagami S. Cell membrane stretch activates intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle cells. *Heart Vessels* 査読有 26:2011, 91-100. doi: 10.1007/s00380-010-0025-0.

⑨ Hayabuchi Y, Inoue M, Watanabe N, Sakata M, Nabo MM, Kagami S. Minimum-intensity projection of multidetector-row computed tomography for assessment of pulmonary hypertension in children with congenital heart disease. *Int J Cardiol* 査読有 149, 2011, 192-198. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.01.008.

⑩ Hayabuchi Y, Inoue M, Sakata M, Kagami S. Multidetector-row computed tomography

visualized peripheral pulmonary artery patency in a patient with occluded modified Blalock-Taussig shunt. Int J Cardiol 査読有 15: 2011, e57-58. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.10.010.

⑩ Hayabuchi Y. Coronary arteriovenous fistula: direct connection of the proximal circumflex artery to the coronary sinus. Pediatric Cardiology 査読有 31:2010, 168-169. doi: 10.1007/s00246-009-9555-6.

〔学会発表〕(計 28 件)

① 早瀬康信、阪田美穂, 大西達也, 渡辺典子, 香美祥二 心室中隔は2層に区分され、それらの asynchrony は心室中隔機能低下を惹起する、第 48 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2012. 7. 5 京都国際会館(京都市)

② 早瀬康信、阪田美穂, 大西達也, 渡辺典子, 香美祥二: Fontan 術後患者の肝機能障害・肝線維症に対するウルソデオキシコール酸の効果、第 48 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2012. 7. 5 京都国際会館(京都市)

③ 阪田美穂、早瀬康信, 大西達也, 香美祥二: Dual Doppler 法を用いた拡張早期左室流入血流と僧帽弁輪運動の時相解析による左室拡張障害診断第 48 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2012. 7. 5 京都国際会館(京都市)

〔図書〕(計 1 件)

Hayabuchi Y, Sakata M, Ohnishi T, Kagami S: Springer, Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Vol.6 Mechanically gated channels and their regulation, 2012, 159-188.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早瀬 康信 (HAYABUCHI YASUNOBU)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 20403686

### (2) 研究分担者

阪田 美穂 (SAKATA MIHO)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号: 80532514

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: