

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791000

研究課題名（和文）

肺高血圧症における肺血管内皮のイノシトール 3 燐酸受容体を介するシグナル伝達機構

研究課題名（英文） molecular signaling mechanism via IP3 receptors in vascular endothelial cells in a state of pulmonary hypertension

研究代表者

古道 一樹 (KODO KAZUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10338105

研究成果の概要（和文）：細胞内のカルシウム動態を担うイノシトール三リン酸受容体の 2 型は、肺組織において肺動脈の平滑筋に特異的に発現しており、大動脈平滑筋や気管支平滑筋には発現しない。2 型イノシトール三リン酸受容体遺伝子欠損マウスでは肺高血圧症における右心室肥大が増悪する可能性がある。2 型イノシトール三リン酸受容体が肺動脈の血管トーンを調整する特異的分子であり、肺高血圧症の進展を抑制的に制御する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We have found that type 2 inositol trisphosphate receptor, one of intracellular calcium release channels, is expressed specifically in the vascular smooth muscle cells of the pulmonary arteries not of the systemic arteries nor of the bronchi in the lung tissue, and that disruption of the gene of type 2 inositol trisphosphate receptor might worsen monocrotaline pyrrole-induced pulmonary hypertension. Our results suggest that type 2 inositol trisphosphate receptor might have a role for controlling pulmonary vascular tone and negatively regulate exacerbation of pulmonary hypertension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：小児循環器学

1. 研究開始当初の背景

イノシトール三リン酸 (IP3) - IP3 受容体 (IP3R)系は、生体においてほぼすべての細胞

に存在し、細胞内カルシウム (Ca²⁺) 動態を担う。心臓発生の早期から発現が認められ、心筋の発生、成熟に機能し、また、不整脈や心不全では、IP3 - IP3R 系に異常をきたすこと

が心筋の病態と密接に関連する可能性が示唆されている。さらに、心筋肥大に関与するエンドセリン 1(ET-1)などの因子は IP3 IP3R 系を介する可能性がある。以上の結果は、心筋細胞の分化、増殖、機能維持において IP3 IP3R 系は重要であることを示唆するものである。一方、生体の循環動態の調節において心臓と肺循環系は密接な関連をもつが、肺血管における IP3 IP3R 系の役割は未だ明らかではない。

先行研究によって、3 種類存在する IP3R の isoform のうち、type 1 と type 3 をともに欠失させたマウスでは心臓および血管系の発生に重篤な障害をきたすことが判明した。一方、肺高血圧の発症や増悪に関与する因子に VEGF や ET-1 など、下流に IP3 IP3R 系が存在する因子がある。これらの因子が適正な血管新生から逸脱した作用をもつと下流の IP3 IP3R 系の調節を障害し、細胞増殖、肥大を促すことにより異常な肺血管リモデリングが誘導される可能性がある。

2 . 研究の目的

循環系において重要であり生体内に広く発現する IP3 IP3R 系の肺循環における役割を解明し、さらに、IP3 IP3R 系を介した原発性肺高血圧症の分子細胞機序を解明し、肺高血圧症の新たな治療法の開発への基礎的知見を得ることを目的とする。

3 . 研究の方法

(1) 肺循環における IP3R の各 isoform の発現様式の観察

type 2 IP3R ノックアウトマウスを用いた

galactosidase 染色

type 2 IP3R ノックアウトマウスは、翻訳開始領域に続いて LacZ 遺伝子を挿入しているため、galactosidase 染色で詳細に内在性の type 2 IP3R の発現を観察することが可能である。胎生 14 日から生後 1 か月までの type 2 IP3R ノックアウトマウスから肺組織を取り出し、パラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合溶液で固定後、X gal 溶液を用いて室温下で galactosidase 染色を 24 時間行った。染色後の肺組織をパラフィンに包埋し、作製したパラフィン切片に対し Nuclear Fast Red 染色液で対比染色を行った。また、同パラフィン切片を平滑筋マーカーである

smooth muscle actin (SMA) に対する抗体で免疫組織化学を行った。

マウス肺組織の凍結切片またはパラフィン切片を用いて type 1 または type 3 IP3R に対する抗体による免疫組織化学法
胎生 14 日、胎生 18 日および生後 2 日のマウスから取り出した心肺組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、凍結ブロックに包埋し、凍結切片を作製した。抗 IP3R type 1 抗体および抗 IP3R type 3 抗体による免疫組織化学を行った。

(2) フローサイトメトリー (FACS) による肺血管内皮細胞の単離

胎生 14 日、胎生 18 日、生後 2 日のマウス肺組織をハサミで細かく刻み、コラゲナーゼ溶液と non-enzymatic dissociation buffer に反応させ単細胞に分散した。分散した細胞を、血管内皮細胞表面マーカーである PECAM に対する蛍光 (フィコエリスリン) 抗体で染色した。さらに死細胞である 7-アミノアクチノマイシン D 陽性細胞を除き、PECAM 陽性細胞を FACS で分離した。同じ方法で得られた肺組織分散細胞を magnetic bead でラベルした抗

PECAM 抗体で染色し、magnetic separator で分離し、FACS による方法を比較した。単離細胞から RNA を抽出し、バイオアナライザーを用いて品質を確認した。

(3) type 2 IP3R ノックアウトマウスおよび野生型マウスにおける肺高血圧症モデルの作製と比較

モノクロタリンピロール静脈注射または 10% 低酸素下 6 週間飼育により type 2 IP3R ノックアウトマウスおよび野生型マウスに肺高血圧症モデルマウスを作製した。各々のマウスにおいて、イソフルレン吸入麻酔下心臓超音波検査を行った。さらに、ペントバルビタール・キシラジン腹腔内注射による麻酔下で、体重、摘出した全心重量、切り出した右心室重量、心室中隔および左心室を合わせた重量を微量秤量計で測定した。摘出した肺組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片作製した。肺組織切片を用い、弾性繊維染色であるエラスティカ染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、抗 SMA 抗体による免疫組織化学を行い、肺動脈径に対する中膜壁厚の割合、炎症所見の有無、内膜壁厚の有無、末梢肺動脈の muscularization の割合を観察し、type 2 IP3R ノックアウトマウスと野生型マウス間で比較した。

4. 研究成果

(1) 肺組織における type 2 IP3R の発現様式
type 2 IP3R ノックアウトマウスの肺組織を用いて、galactosidase 染色と SMA との二重染色を試みた。胎生 14 日から生後 1 か月のマウス肺組織において、type 2 IP3R の発現を表す LacZ 陽性細胞は同時に SMA が陽性であった。LacZ 陽性細胞は気道と併走す

る血管、すなわち肺動脈の血管平滑筋に特異的に観察された。さらに、肺動脈主幹部や上行大動脈では内膜と中膜が、動脈管や下行大動脈では内膜のみが、そして左右の肺動脈以降の末梢肺動脈では中膜のみが LacZ 陽性であった。したがって type 2 IP3R は血管の部位によって発現領域が異なることがわかった。肺組織の凍結切片を用いた抗 type 1 IP3R 抗体による免疫組織化学では、気道上皮組織および肺血管ともに一様に染色が認められた。

(2) 肺血管内皮細胞の単離方法の確立

本分散法では、胎生 14 日マウス胚から取り出した肺組織は容易に分散したが、発生が進むにつれ凝集が認められ、分散細胞を得られる割合が低下した。また、長時間の酵素処理や、振盪などの物理的刺激を加えると死細胞が増加した。したがって、肺組織の分散は、獲得できる細胞が少なくはなるが、短時間 37 度に incubation する方法を採用した。肺血管内皮細胞を分離する方法として FACS と magnetic separator とで比較したところ、magnetic separator ではさらに死細胞の割合が高くなり、細胞へのダメージが強いことが予測された。分離された細胞から抽出した RNA はバイオアナライザーによる RNA Integrity Number 値から品質が高いことを確認した。

(3) ノックアウトマウスを用いた type 2 IP3R 遺伝子欠損による肺高血圧症への影響

野生型およびノックアウトマウスの尾静脈からモノクロタリンピロールまたは溶媒であるジメチルホルムアミドのみを静脈注射した。各マウスに対して、静脈注射 2 週間後に心臓超音波検査をおこなった。長軸像・短軸像・四腔像の観察と、肺動脈血流速度の測

定を行ったが、各マウス間で有意な差は認められなかった。モノクロタリンピロールを注射した野生型マウスに比較してモノクロタリンピロールを注射したノックアウトマウスのほうが右心室/(中隔+左心室)重量比が高い傾向にあった。一方、肺組織を用いたエラスティカ染色像やヘマトキシリン・エオジン染色像は野生型とノックアウトで差は認められなかった。さらに、有意な中膜壁の肥厚も観察されなかった。しかし、まだ実施した個体数、施行回数ともに少ないため回数を増やす必要があると考えられた。また、モノクロタリンピロールは非常に不安定な物質であるため、本ロットの至適濃度を検討する必要があると考えられた。低酸素飼育による肺高血圧症モデルは現在実施中である。

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1件)

Kodo K, Yamagishi H. A decade of advances in the molecular embryology and genetics underlying congenital heart defects. 査読有, Circ J. 2011 22;75(10):2296-304. Review.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

特記事項無

6. 研究組織

(1)研究代表者

古道 一樹 (KODO KAZUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 10338105