

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591077

研究課題名(和文)冠攣縮性狭心症の成因に関する分子生物学的研究：P122蛋白の役割の確立

研究課題名(英文)Molecular biological approach to the pathogenesis of coronary spastic angina: A study on the role of p122 protein

研究代表者

奥村 謙 (Okumura, Ken)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20185549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：CSA患者において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。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。一方、PLC-TGマウスの冠動脈、大動脈ならびに腸間膜動脈のPLC活性が野生型と比べて有意に亢進しており、エルゴメトリン投与により心電図ST上昇ならびに高度房室ブロックが観察された。P122-TGにエルゴノピンを投与すると著明なST上昇と房室ブロックが観察された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Phospholipase C(PLC)-d1 activity in cultured skin fibroblasts from patients with coronary spastic angina(CSA) was enhanced, and found PLC-d1 864 G to A mutation in 10% of the male CSA patients. We also found p122 protein, cloned to potentiate PLC-d1 activity, and its gene expression level were enhanced in CSA. $[Ca^{2+}]_i$ at baseline and the peak increase to acetylcholine were both higher in cells transfected with p122 than in those without p122. Further, we generated transgenic(TG) mice with the increased PLC-d1 activity specific to the VSMCs by inducing human R257H variant PLC-d1. Intravenous ergometrine induced ST segment elevation in homozygous TG. In isolated Langendorff-perfused hearts, coronary perfusion pressure was significantly increased in homozygous TG after ergometrine. Thus, the increased PLC-d1 activity causes the enhanced coronary vasomotility in TG. Both variant PLC-d1 and enhanced p122 protein were indicated to be involved in the pathogenesis of CSA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 冠攣縮 P122蛋白 phospholipase C R257H型PLC- 1

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が、臨床例において収縮に関わる細胞内情報伝達系の検討は我々により始められた。他施設での検討では、冠攣縮性狭心症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 NO 産生低下は血管トーンスの亢進や血小板凝集、血管内膜の肥厚、動脈硬化性変化の促進に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。実際に NOS ノックアウトマウスが冠攣縮を惹起することも報告されていない。一方、KATP チャンネル (Kir6.1 または SUR2) のノックアウトマウスが冠攣縮を惹起し突然死することが報告されているが、我々の冠攣縮性狭心症患者を対象とした臨床研究では、KATP チャンネルの異常は見出せなかった (Tomita H, Okumura K, et al. *Int J Mol Med* 2006)。臨床的観点からも KATP チャンネルのノックアウトマウスは冠攣縮性狭心症の動物疾患モデルとは言い難い。

血管平滑筋収縮機構の最初に位置する Phospholipase C (PLC) が活性化されると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。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において膜分画 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相関を示すこと、PLC 活性亢進の主体は PLC-1 であることを報告した (Okumura, Osanai, et al. *J Am Coll Cardiol* 2000)。さらに冠攣縮性狭心症患者より得られた PLC-1 遺伝子のアミノ酸構造配列解析により、257 番目のアミノ酸がアルギニンからヒスチジンへ置換する R257H 亜型を発見し、機能解析では R257H 亜型の PLC-1 活性は亢進しており、アゴニスト刺激に対する細胞内カルシウムイオンの上昇が亢進することを報告した (Nakano, Osanai, Okumura, et al. *Circulation* 2002)。一方、R257H 亜型 PLC-1 は男性患者の約 10% で認められたのみで、他の機序による PLC-1 活性亢進について検討を進めてきた。

p122 は 1083 個のアミノ酸から構成される蛋白で、PLC-1 の活性を制御 (亢進) することが報告されている。最近我々は、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亢進していること、さらに大動脈平滑筋細胞において、p122 蛋白過剰発現により PLC 活性が亢進し、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が上昇することを報告した。さらに 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 活性が亢進することを報告した (Murakami, Osanai, Okumura et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010)。以上より、冠攣縮性狭心症患者における PLC-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。

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を特徴とする。我々は冠攣縮の成因を分子レベルで検討し、収縮に関わる細胞内情報伝達系の最初に位置する Phospholipase C (PLC) 活性が亢進し (JACC 2000)、その原因の一つとして PLC の isozyme である PLC- δ 1 の遺伝子変異の関与を明らかにした (*Circulation* 2002)。さらに最近、PLC- δ 1 活性を制御する P122 蛋白が PLC- δ 1 活性亢進を介してアセチルコリンによる細胞内 Ca イオン濃度の増加を亢進させ、過剰収縮反応に関与しうることを示した (*ATVB* 2010)。本研究の目的は、冠動脈平滑筋過剰収縮反応における P122 蛋白の役割を確立し、冠攣縮の成因を明らかにすることである。

3. 研究の方法

平成 23 年度は、冠攣縮性狭心症患者から採取したゲノムを用いて p122 の promoter 解析を行い、p122 遺伝子発現亢進の機序を検討した。このために mRNA の分解速度を規定することが知られている遺伝子の 3' 非翻訳領域 (UTR) に注目し、変異の有無を検討した。冠攣縮における p122 の役割を明確にする目的で、冠動脈平滑筋に特異的に p122 を過剰発現するマウスモデルを作成し、具体的には p122 遺伝子の cDNA を α -smooth muscle actin の promoter に接続し、トランスジェニックマウスを作製した。平成 24 年度以降は、作成した p122 過剰発現トランスジェニックマウスの表現型について組織学的に、さらに生理学的に解析するとともに、冠攣縮の病態解析、治療薬の効果の検討などを行った。

4. 研究成果

CSA 患者において 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。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。一方、PLC-TG マウスの冠動脈、大動脈ならびに腸間膜動脈の PLC 活性が野生型と比べて有意に亢進しており、エルゴメトリン投与により心電図 ST 上昇ならびに高度房室ブロックが観察された。P122-TG にエルゴノピンを投与すると著明な ST 上昇と房室ブロックが観察された。

【結論】 PLC-1 活性の機序の一つとして

p122 蛋白の発現亢進が示唆された。 PLC-TG マウスは臨床例に近似した CSA 動物モデルであると考えられた (Circulation2012)。 ジルチアゼムは本 PLC-TG マウスにおける冠攣縮誘発阻止に有効であり、臨床例と同じフェのタイプモデルであった。 P122-TG マウスも CSA 動物モデルとなることが示唆された。 いずれも PLC- 1 の冠攣縮への因子を支持する所見であり冠攣縮の病態解明に大きく寄与すると考えられる。

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 31 件)

以下は全て査読あり

1. Okumura K, Inoue H, Atarashi H, Yamashita T, Tomita H, Origasa H, for the J-RHYTHM Registry Investigators. Validation of CHA2DS2-VASc and HAS-BLED scores in Japanese patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circ J* 2014 in press. doi:http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0144
2. Kimura M, Sasaki S, Owada S, Horiuchi D, Sasaki K, Itoh T, Ishida Y, Kinjo T, Tomita H, Okumura K. Comparison of lesion formation between contact force-guided and non-guided circumferential pulmonary vein isolation: A prospective, randomized study. *Heart Rhythm*. 2014;11:984-991. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.03.019.
3. Itoh T, Kimura M, Sasaki S, Owada S, Horiuchi D, Sasaki K, Ishida Y, Takahiko K, Okumura K. High correlation of estimated local conduction velocity with natural logarithm of bipolar electrogram amplitude in the reentry circuit of atrial flutter. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014;25:387-394. doi: 10.1111/jce.12329.
4. Ruwald MH, Okumura K, Kimura T, Aonuma K, Shoda M, Kutiyifa V, Ruwald AC, McNitt S, Zareba W, Moss AJ. Syncope in high-risk cardiomyopathy patients with implantable defibrillators: frequency, risk factors, mechanisms, and association with mortality: results from the multicenter automatic defibrillator implantation trial-reduce inappropriate therapy (MADIT-RIT) study. *Circulation*. 2014;129:545-552. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004196.
5. Inoue H, Atarashi H, Okumura K, Yamashita T, Origasa H, Kumagai N, Sakurai M, Kawamura Y, Kubota I, Matsumoto K, Kaneko Y, Ogawa S, Aizawa Y, Chinushi M, Kodama I, Watanabe E, Koretsune Y, Okuyama Y, Shimizu A, Igawa O, Bando S, Fukatani M, Saikawa T, Chishaki A; J-RHYTHM Registry Investigators. Impact of gender on the prognosis of patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2014;113:957-962. doi: 10.1016/j.amjcard.2013.11.057.
6. Shimada M, Fujita T, Nakamura N, Narita I, Shimaya Y, Murakami R, Yamabe H, Osawa H, Okumura K. A case of myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated glomerulonephritis and concurrent membranous nephropathy. *BMC Nephrol*. 2013;14:73. doi: 10.1186/1471-2369-14-73.
7. Sasaki K, Sasaki S, Kimura M, Owada S, Horiuchi D, Itoh T, Ishida Y, Okumura K. Revisit of typical counterclockwise atrial flutter wave in the ECG: electroanatomic studies on the determinants of the morphology. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2013;36:978-987. doi: 10.1111/pace.12129.
8. Nishizaki F, Tomita H, Abe N, Kimura M, Higuma T, Osanaï T, Yamauchi S, Daitoku K, Fukuda I, Kamata Y, Okumura K. Acute myocardial infarction cases by a floating thrombus in the ascending aorta: A role of CD34-positive endothelial cells. *Journal of Cardiology cases*. 2013;8:e88-e90. doi:10.1016/j.jccase.2013.04.003
9. Kimura M, Sasaki S, Owada S, Horiuchi D, Sasaki K, Itoh T, Ishida Y, Kinjo T, Okumura K. Validation of accuracy of three-dimensional left atrial CartoSound™ and CT image integration: influence of respiratory phase and cardiac cycle. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2013;24:10002-10007. doi: 10.1111/jce.12170.
10. Tanaka H, Tone K, Hayashi A, Morimoto

- T, Taima K, Tanaka Y, Nakagawa H, Takanashi S, Okumura K, Kurose A. Clinical application of immunocytochemical detection of ALK rearrangement on cytology slides for detection or screening of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2013;80:289-292. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.006.
11. Tanaka H, Morimoto T, Taima K, Tanaka Y, Nakamura K, Hayashi A, Kurose A, Okumura K, Takanashi S. The long-term survival of a thymic carcinoma patient treated with S-1: a case report and literature review. *Onco Targets Ther*. 2013;7:87-90. doi: 10.2147/OTT.S54843.
 12. Nishizaki F, Tomita H, Yokoyama H, Higuma T, Abe N, Suzuki A, Endo T, Tateyama S, Ishida Y, Osanai T, Okumura K. Re-elevation of T-wave from day 2 to day 4 after successful percutaneous coronary intervention predicts chronic cardiac systolic dysfunction in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2013;28:704-713. doi: 10.1007/s00380-012-0313-y.
 13. Seya K, Ono K, Fujisawa S, Okumura K, Motomura S, Furukawa K. Cytosolic Ca²⁺-induced apoptosis in rat cardiomyocytes via mitochondrial NO-cGMP-protein kinase G pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;344:77-84. doi: 10.1124/jpet.112.198176.
 14. Yamamoto Y, Osanai T, Nishizaki F, Sukekawa T, Izumiyama K, Sagara S, Okumura K. Matrix metalloprotein-9 activation under cell-to-cell interaction between endothelial cells and monocytes: possible role of hypoxia and tumor necrosis factor- α . *Heart Vessels*. 2012;27:624-633. doi: 10.1007/s00380-011-0214-5.
 15. Seya K, Kanemaru K, Matsuki M, Hongo K, Kitahara H, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y, Okumura K, Motomura S, Furukawa KI. Br-DIF-1 accelerates dimethyl sulphoxide-induced differentiation of P19CL6 embryonic carcinoma cells into cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*. 2012;165:870-879. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01541.x.
 16. Izumiyama K, Osanai T, Sagara S, Yamamoto Y, Itoh T, Sukekawa T, Nishizaki F, Magota K, Okumura K. Estrogen attenuates coupling factor 6-induced salt-sensitive hypertension and cardiac systolic dysfunction in mice. *Hypertens Res*. 2012;35:539-546. doi: 10.1038/hr.2011.232.
 17. Shimaya Y, Shimada M, Shutto Y, Fujita T, Murakami R, Nakamura N, Yamabe H, Okumura K. Thrombin stimulates synthesis of macrophage colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor by human proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephron Extra*. 2012;2:1-8. doi: 10.1159/000335751.
 18. Dempoya J, Matsumiya T, Imaizumi T, Hayakari R, Xing F, Yoshida H, Okumura K, Satoh K. Double-stranded RNA induces biphasic STAT1 phosphorylation by both type I interferon (IFN)-dependent and type I IFN-independent pathways. *J Virol*. 2012;86:12760-12769. doi: 10.1128/JVI.01881-12.
 19. Osanai T, Tanaka M, Magota K, Tomita H, Okumura K. Coupling factor 6-induced activation of ecto-F(1)F(o) complex induces insulin resistance, mild glucose intolerance and elevated blood pressure in mice. *Diabetologia*. 2012;55:520-529. doi: 10.1007/s00125-011-2341-z.
 20. Shibutani S, Osanai T, Ashitate T, Sagara S, Izumiyama K, Yamamoto Y, Hanada K, Echizen T, Tomita H, Fujita T, Miwa T, Matsubara H, Homma Y, Okumura K. Coronary Vasospasm Induced in Transgenic Mouse With Increased Phospholipase C-1 Activity. *Circulation*. 2012;125:1027-1036. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.064303.
 21. Sagara S, Osanai T, Itoh T, Izumiyama K, Shibutani S, Hanada K, Yokoyama H, Yamamoto Y, Yokota T, Tomita H, Magota K, Okumura K. Overexpression of coupling factor 6 attenuates exercise-induced physiological cardiac hypertrophy by inhibiting

PI3K/Akt signaling in mice. J Hypertens. 2012;30:778-786. doi: 10.1097/HJH.0b013e3283505101.

22. Yokoyama H, Saito S, Daitoku K, Fukuda I, Higuma T, Hanada H, Osanai T, Okumura K. 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. doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00847.x.
23. Hanada K, Osanai T, Sukekawa T, Ohya F, Izumiyama K, Sagara S, Ito T, Yamamoto Y, Sibutani S, Tomita H, Okumura K. Inhibition of P38 MAP Kinase Attenuates Left Ventricular Hypertrophy and Inhibits Progression of Systolic Dysfunction on Pressure-Overload Induced Pathological Cardiac Hypertrophy in Mice. Hiroasaki Med J. 2011;62:18-26.
24. Shibutani S, Osanai T, Oya H, Sagara S, Izumiyama K, Yamamoto Y, Hanada K, Tomita H, Okumura K. Mutation Analysis ABCG9 Gene in Japanese Patients with Coronary Spastic Angina. Hiroasaki Med J. 2011;62-27-33.
25. Osanai T, Yamada M, Okumura K. Nongenomic response to aldosterone. Hypertension. 2011;58:e3. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.174680.

〔学会発表〕(計4件)

1. Ishida Y, Okumura K, et al. Altered expression and phosphorylation levels of L-type calcium channel play a critical role in the mouse model of coronary spastic angina. 米国心臓病学会 (AHA2013) 2013年11月17日 アメリカ合衆国(ダラス)
2. 石田祐司、奥村謙他. Altered Expression and Phosphorylation of L-type Calcium Channel in the Coronary Spastic Angina Mouse Model and the Effects of Diltiazem. 第78回日本循環器学会学術集会 2013年3月23日、東京.
3. 村上和男、奥村謙他. Enhanced TRP C Channel Mediated Ca²⁺ Influx may be Involved in the Drug Resistant Coronary Spasm Induced by Enhanced Phospholipase C- 1. 第78回日本循

環器学会学術集会 2013年3月23日、東京.

4. 澁谷修司、奥村謙他. Variant SUR2B Protein (R1546H) Detected in a Patient with Multivessel Coronary Artery Spasm. 第78回日本循環器学会学術集会 2013年3月23日、東京.

〔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

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: 00162978