

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460327

研究課題名(和文)血管不全における内皮イオンチャネルリモデリングの解明と治療への応用

研究課題名(英文)A molecular link between vascular failure and endothelial ion channel remodeling

研究代表者

渡邊 博之(Watanabe, Hiroyuki)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80323145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血管不全における内皮Caハンドリング異常の分子機序を解明し、血管不全治療への応用を目指した。まず臨床的側面から、血管不全と関連のある動脈硬化、睡眠時無呼吸症、腎系球体障害などの病態では、過剰な酸化ストレスと血管炎症が障害のトリガーとなっていることを明らかにした。基礎研究では、アラキドン酸などの炎症性物質を感知するOrai1/3チャネルがヒト冠動脈内皮細胞に発現して炎症誘発性Ca流入を司ること。Orai1/3の発現量が炎症関連性内皮細胞増殖の重要な要因となること、さらに、内皮Orai1/3チャネルを介したCa流入はCREBリン酸化のシグナルを介して内皮細胞増殖に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to explore the link between vascular failure and endothelial ion channel remodeling. In clinical study, we show a critical role of oxidative stress and inflammation in the development of vascular failure. In basic study, we demonstrated the constitutive expression of Orai1 and Orai3, and those co-localization in plasma membrane of cultured human coronary artery endothelial cells (hCAECs). Arachidonic acid (AA) elicited a store-independent Ca entry in hCAECs. The knockdown of either Orai-1 or Orai-3 expression drastically decreased the AA-induced Ca entry, leading to the inhibition of hCAECs proliferation. Transfection with siRNA against Orai-1 suppressed phosphorylation of cAMP-responsive element binding protein and subsequent hCAECs proliferation. These results suggest that Orai1/Orai3 is an essential component of AA-induced Ca entry pathway and is involved in hCAECs proliferation. Orai1/Orai3 might serve as a molecular link between inflammation and vascular failure.

研究分野：医歯薬学

キーワード：受容体 チャンネル 輸送系 シグナル情報伝達系

1. 研究開始当初の背景

血管内皮機能不全は動脈硬化の発症・進展のみならず、心不全の予後にも影響を及ぼす。そのため、「内皮機能をいかに健常に保つか」が心血管イベント抑制の重要な予防戦略になる。内皮細胞に作動性物質の刺激が加わると、細胞外からの Ca 流入が引き金となり NO 産生、細胞増殖反応などが惹起される。一方過剰な Ca 流入は細胞死を引き起こす。このように内皮細胞膜上の Ca 流入チャネルは、種々の刺激を感知するセンサーとして、また Ca を介した情報の transducer として重要な役割を果たしている。内皮 Ca 流入チャネルは生理学的に、受容体作動性チャネル、伸展刺激活性化チャネル、さらに、IP3-induced Ca release 後の小胞体内 Ca 枯渇がトリガーとなって活性化するストア作動性チャネル(SOC)に分類されるが、近年それら分子実体の候補として、TRP superfamily や STIM, Orai family が発見され、血管不全病態解明のための分子生物学的アプローチが可能となった。これまで血管不全や内皮機能障害を対象とした基礎研究では、eNOS 発現低下に関わる転写因子、内因性阻害物質、NO uncoupling に主眼がおかれ、Ca 流入機構については、ほとんど注目されていなかった。Ca 流入チャネルの分子構造が不明だったことがその主因であったが、Orai1/3 チャネルがアラキドン酸感受性 Ca 流入チャネルであることが発見されるなど、Ca 流入チャネルの分子構造が明らかになりつつある現在、慢性病態下でのそれら genomic な分子挙動を知ることが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では内皮機能障害の原因となる内皮イオンチャネルリモデリングのメカニズムを解明し、治療への応用に展開するための基盤となる研究を行う。具体的研究項目は、(1) 臨床的アプローチとして、血管不全をきたす病態と炎症の関連性を探る。基礎的アプローチとして(2) STIM1 ノックアウトマウスでの血管機能を調べ、STIM1 と血管不全の関連性を調べる。(3) ヒト血管内皮細胞を用いて炎症性物質と Orai チャネルの発現・機能異常の関連性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 臨床的研究

血管不全と関連のある病態として、動脈硬化関連性 ear lobe crease (ELC) 心不全患者の睡眠時無呼吸症 (SAS) を、内皮機能障害の病態としてアルブミン尿症をとりあげた。ELC の評価は、診察時の視診にて定義に従って行った。SAS の診断・重症度評価のために、polysomnography を用いAHI, AI, 4%ODI 等のパラメーターを測定した。アルブミン尿の評価はスポット尿での Urine Albumin-to-Creatinine Ratio (UACR)にて行った。

(2) 基礎的研究

対象; in vivo 実験では、STIM-1 ヘテロノックアウトマウスを用いた。in vitro 実験ではヒト冠動脈内皮細胞 (hCAECs) の継代培養第 4 - 5 世代を用いた。

分子生物学的実験; RT-PCR 解析、western blotting 解析でチャネル発現や CREB リン酸化を評価した。gene-silencing は Orai1 と Orai3 にたいする siRNA を作製、hCAECs に transfection した。

生理実験; マウスの心血管機能を心エコー、心電図、血圧測定し評価。細胞内 Ca 濃度測定は Fura-2 AM を hCAECs に負荷し蛍光強度の比を用いて測定した。

免疫蛍光染色

細胞増殖反応は Cell Proliferation Kit 1 (Roche, Basel, Switzerland)を用いた MTT 法で測定した

4. 研究成果

(1) SAS 症例では、図 1 に示すようにその重症度に応じて血管炎症マーカーの PTX3 が上昇していた。その炎症反応は ASV 療法によって改善することから、低酸素イベントにより引き起こされたものであった(図 2)。

図1 SAS重症度と血管炎症マーカー

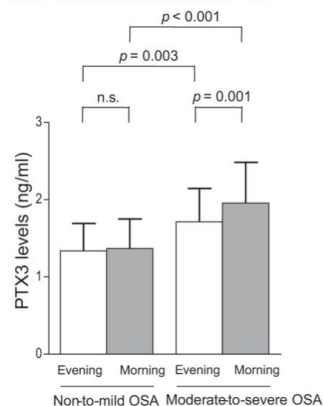
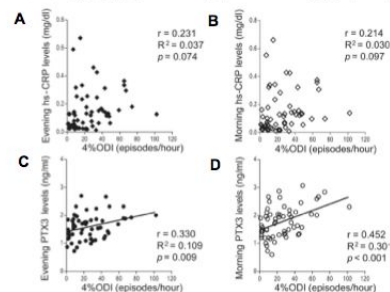
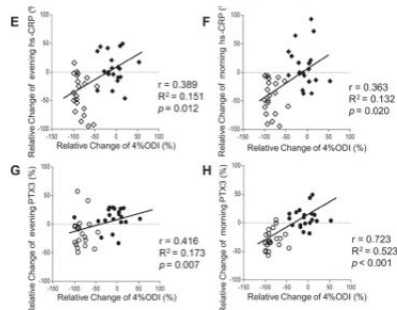


図 2

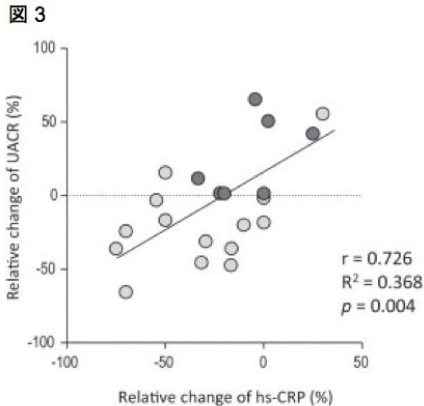
SASに伴う低酸素イベントと炎症マーカーの相関 (A-D)



ASV療法による低酸素イベントの回避と炎症マーカー改善度の相関 (E-H)



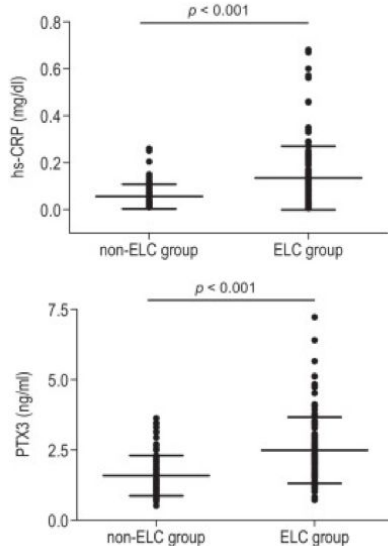
さらに SAS による血管炎症の程度と内皮障害の指標である尿中アルブミン (UACR) 量の重症度に強い相関があることを明かにした (図 3)



ASV療法によるSAS関連性炎症の改善度(X軸)と尿中微量Albの軽減度(Y軸)の相関
Black circle = non-ASV group; gray circle = ASV group. ASV, adaptive servo-ventilation

(2) 動脈硬化病変を示唆する身体所見である ELC と血管炎症にも強い関連性があることを示した (図 4)

図4 diagonal earlobe crease 所見を有する症例の血管炎症マーカー



さらに、冠攣縮性狭心症患者では、有意にアラキドン酸 (AA) 血中濃度が上昇していることを示し、学会にて発表した。上記(1)、(2)で示した臨床研究から、血管不全の病態基盤に炎症が大きく寄与していることが示唆された。血管炎症の分子メカニズムを探るため、炎症を仲介する分子として小胞体 Ca センサー分子である STIM-1 に注目、そのヘテロノックアウトマウスを用いて、その血管機能を調べた。しかし、表 1 に示すように、予想に反して明らかな異常を示さなかった。

表1 STIM1 K.O. マウスの心血管機能

	HR (bpm)	PQ (ms)	QRS (ms)	Systolic BP (mmHg)	Diastolic BP (mmHg)	EF (%)
WT	445.5	17.40	8.59	115.3 ± 4.0	76.5 ± 1.7	64.1
STIM1 ^{-/-}	454.7	17.84	8.55	113.2 ± 8.4	68.4 ± 8.5	63.6
P	0.88	0.91	0.54	0.99	0.62	0.88

そのため、当初の予定を変更して、不全血管で起こるプラーク内血管新生と炎症をつなぐ分子機序について研究を進めた。その際、炎症性物質の細胞センサーとなりうる Orai1/3 チャンネルに注目した。

(3) in-vitro 実験、hCAECs における Orai1 と Orai3 チャンネルの発現を RT-PCR 解析、western blotting、免疫蛍光染色で証明した (図 5)

図5 ヒト冠動脈内皮細胞における Orai1/3 チャンネルの発現

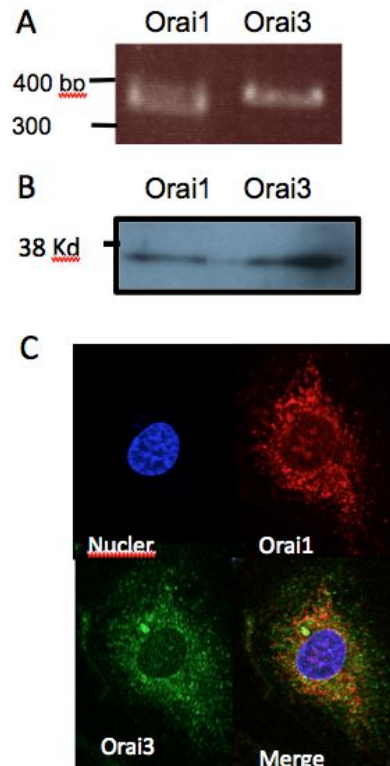
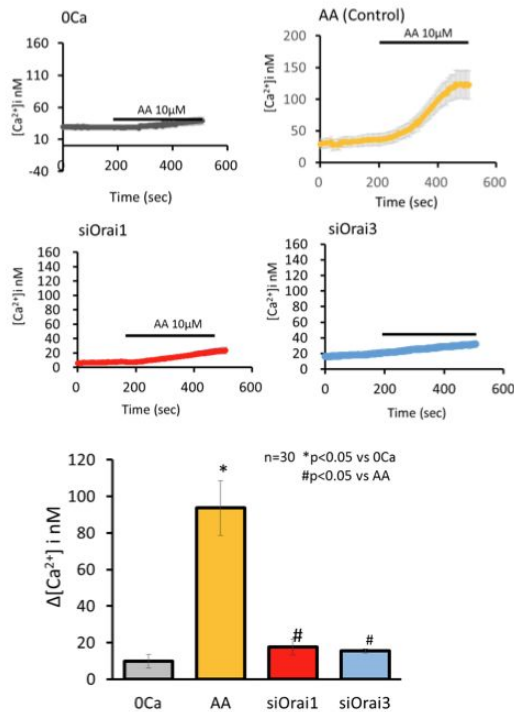


図 5C に示すように Orai1 と Orai3 は hCAECs 細胞表面に colocalize していることが示された。

(4) 炎症性物質である AA は hCAECs に細胞外からの Ca 流入を引き起こし、それは Orai1 または Orai3 の gene silencing によって顕著に抑制された (図 6)

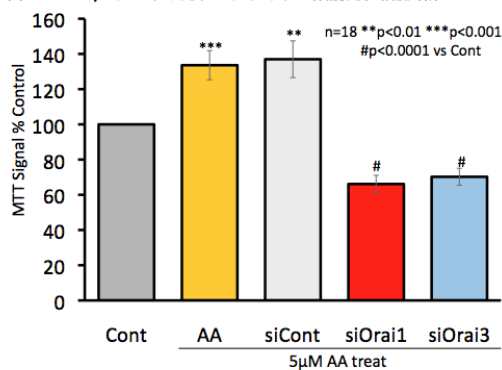
図6 Orai1/3 チャンネル発現とアラキドン酸誘発性Ca流入



このことから Orai1/3 チャンネルが、AA 誘発性 Ca 流入の流入経路となっていることが明らかとなった。

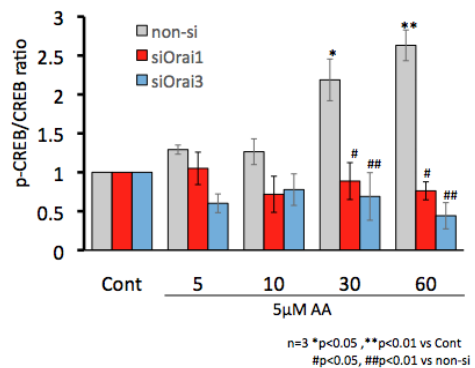
(5) 血管炎症とプラーク内血管新生の関連を調べるため、hCAECs の細胞増殖反応を MTT 方で調べたところ、図 7 に示すように炎症で惹起された細胞増殖は、Orai1 または Orai3 の gene silencing によって抑制された。

図7 Orai1/3 チャンネル発現とアラキドン酸誘発性細胞増殖



さらに、その増殖反応の細胞内シグナルを検討したところ、図 8 に示すように、CREB リン酸化の関与が示唆された。

図8 Orai1/3 チャンネル発現とアラキドン酸誘発性 CREB リン酸化



以上から、炎症性物質 AA は内皮細胞に Orai1/3 チャンネル経路とした Ca 流入を促し、CREB リン酸化のシグナルを介して細胞増殖を引き起こすことが明らかとなった。この結果は、血管炎症下でのプラーク内血管新生の分子機序の一端を解明したものである。

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5件)

Koyama T, Watanabe H, Ito H. The Association of Circulating Inflammatory and Oxidative Biomarker Levels with Digonal Earlobe Crease in Patients with Atherosclerotic Diseases. J Cardiol. 2016;67(4):347-51. 査読有

Tamura Y, Koyama T, Watanabe H, Hosoya T, Ito H. Beneficial Effects of Adaptive Servo-Ventilation Therapy on Albuminuria in Patients with Heart Failure. J Cardiol. 2015;65(5):412-7. 査読有

Kobukai Y, Koyama T, Watanabe H, Ito H. Morning Pentraxin3 Levels Reflect Obstructive Sleep Apnea-Related Acute Inflammation. J Appl Physiol. 2014;117(10):1141-8. 査読有

Kiso H, Ohba T, Iino K, Sato K, Terada Y, Murakami M, Ono K, Watanabe H, Ito H. Sildenafil prevents the up-regulation of TRPCs in the development of cardiomyocytes hypertrophy. Biochem Biophys Commun. 2013;5;436(3):514-8. 査読有

Igarashi G, Iino K, Watanabe H, Ito H. Remote Ischemic Pre-Conditioning Alleviates Contrast-Induced Acute Kidney

Injury in Patients with Moderate Chronic Kidney Disease. Circ J. 2013;77(12):3037-44. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

The 23 th Scientific Congress of HSH (KOR), 2013.5.11

Watanabe H. Transient receptor potential(TRP) Channel and Hypertensive Heart Disease.

The 30th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section (San Diego, USA), 2013.6.28-29

Iino K, Watanabe H, Ito H. Remote Ischemic Pre-Conditioning Alleviates Contrast-Induced Acute Kidney Injury in Patients with Moderate Chronic Kidney Disease.

第62回日本心臓病学会学術集会(仙台)、2014.9.26-28

田村善一、小山崇、渡邊博之、伊藤宏. 慢性心不全患者の微量アルブミン尿に対するASV療法の効果に関する検討

第62回日本心臓病学会学術集会(仙台)、2014.9.26-28

阿部起実、飯野健二、真壁伸、寺田茂則、小山崇、寺田豊、渡邊博之、伊藤宏. 冠攣縮性狭心症における血中EPA/AAの検討

第79回日本循環器学会学術集会(大阪)、2015.4.24-26

小山崇、渡邊博之、伊藤宏. Anti-inflammatory Effects of Daytime ASV Therapy on Albuminuria in Heart failure Patients-A Novel Therapeutic Approach for Cardio-renal Disease-

第19回日本心不全学会学術集会(大阪)、2015.10.22-24

小山崇、渡邊博之、伊藤宏. 短時間ASV療法は心不全患者の尿中微量アルブミンを抑制する

第80回日本循環器学会学術集会(仙台)、2016.3.18-20

高橋久美子、渡邊博之、飯野健二、伊藤宏. Orai1/Orai3: A Molecular Link between Inflammation and Endothelial Cell Proliferation.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
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

渡邊 博之 (WATANABE Hiroyuki)
秋田大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 80323145

(2) 研究分担者

伊藤 宏 (ITO Hiroshi)
秋田大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10232464

大場 貴喜 (OOBA Takayoshi)

秋田大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80431625

(3) 連携研究者

()

研究者番号: