

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460350

研究課題名(和文)筋原性血管応答におけるイオン輸送分子の局在・活性制御とその異常が導く病態機序

研究課題名(英文)Role of ion transporter localization and activity in myogenic responses

研究代表者

喜多 紗斗美(KITA, SATOMI)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10461500

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)：心臓、腎臓、脳など主要細動脈の筋原性収縮は、末梢血管抵抗の調節や血流の自動調節などに重要な役割を果たしているが、その分子機構は未だ不明な点が多い。本研究では、血管のイオン輸送分子可視化マウスの開発により、筋原性収縮の分子機構についてイオン輸送分子の局在・機能制御の面からの解明を試みた。血管平滑筋アクチンプロモーターを用い、血管NCX1可視化マウスおよび細胞内Ca²⁺シグナル可視化マウスを得た。また、PIP5Kノックアウトマウスでは筋原性収縮が抑制されており、NCX1の遺伝子発現も低下していたことから、PIP2のNCX1発現調節が筋原性収縮に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Myogenic tone have been known to plays important role for regulation of the peripheral artery resistance and blood stream in heart, kidney and brain, but the molecular mechanism still unclear. To clarify the role of NCX1 expression and localization in myogenic tone, we generated smooth muscle specific NCX1-EGFP transgenic mice. We found that myogenic responses were attenuated in PIP5K-beta knockout mice. Furthermore, gene expression level of NCX1 was decreased in PIP5K-beta knockout mice, compared with wild-type mice, suggesting that regulation of NCX1 activity by PIP2 is involved in myogenic tone.

研究分野：薬理学

キーワード：筋原性収縮 イオン輸送 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

筋原性収縮 (myogenic tone) は、血管内圧の上昇によって生じる自発的な収縮として 1902 年に Bayliss によって報告された。この機構には、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルの関与が示唆されているが、このチャンネル活性化の脱分極が惹起される機序など不明な点も多い。

これまでに申請者は、マウス腸間膜細動脈において 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX1) の特異的阻害薬 SEA0400 が筋原性収縮を抑制することを報告した (Iwamoto T, Kita S et al. *Nat Med.* 10:1193-1199, 2004)。また最近、NCX1 ヘテロ欠損マウスや TRPC3 ドミナントネガティブ変異体マウスの腸間膜細胞脈では筋原性収縮が抑制されることを見いだしており、NCX1 による Ca^{2+} 輸送が筋原性収縮の分子機序の 1 つである可能性が高い。NCX1 は細胞膜に発現して、 Na^+ と Ca^{2+} を両方向性に交換輸送するイオン輸送体であり、通常は心筋細胞や血管平滑筋細胞において細胞内から Ca^{2+} を汲み出す役割をしている。しかし、細胞内の Na^+ が増加するような特殊な状況下では、細胞内に Ca^{2+} を取り込む方向に働くと考えられており、申請者は、食塩感受性高血圧モデルの血管で NCX1 が Na^+/K^+ -ATPase と機能共役することにより NCX1 を介した細胞内への Ca^{2+} 流入が増加し、高血圧の発症に関与することを報告している。このように、NCX1 は単体での輸送あるいは他の輸送体分子との機能連関により、細胞内の Ca^{2+} 濃度を巧みに調節していると考えられる。したがって、イオン輸送体分子間の機能連関やその制御 (リン酸化やイノシトールリン脂質制御) による NCX1 の発現量・局在の変化は、筋原性収縮の分子機構を理解するために重要であると考えられるが、その詳細については明らかになっていない。

2. 研究の目的

心臓、腎臓、脳、腸などの重要な臓器では血流を一定に保つための自己調節能が発達しており、この調節には各細動脈の筋原性収縮が大きく寄与している。例えば、全身血圧の上昇により血管内圧が増加した場合、収縮することで臓器血流量の過剰な増加を防ぎ、臓器の保護や機能維持に働く。また、筋原性収縮は抵抗血管での基礎トーンスの形成に寄与し、血圧の維持に重要な役割を果たしている。一方、高血圧症、動脈硬化症、糖尿病などの血管障害では細動脈の器質的変化 (肥厚・炎症) とともに、筋原性収縮の制御異常が深く関与することが示唆されている (*Cardiovasc Res.* 95:223-232, 403-408, 2012) が、その分子機構は未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、NCX1 をはじめとするイオン輸送分子間の機能連関ならびにその制御機構を解析するため、血管平滑筋細胞

を標的としたイオン輸送分子可視化マウスなどを開発し、筋原性収縮の分子機構とその破綻による病態機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

血管平滑筋 アクチンプロモーターを用い、GFP 誘導体標識 NCX1 あるいは Ca^{2+} センサー-GCaMP6 (埼玉大学・中井淳一教授より供与) を血管平滑筋特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。遺伝子改変マウスの腸間膜細動脈の筋原性収縮は、CCD カメラ観察下で細動脈灌流システム (0~120 mmHg 可変) を用いて計測した (Iwamoto T, Kita S et al. *Nat Med.* 2004)。

4. 研究成果

(1) 血管平滑筋 NCX1 可視化マウスの作製

血管平滑筋 アクチンプロモーターを用い、GFP 誘導体標識 NCX1 を血管平滑筋特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。また、 Ca^{2+} センサー-GCaMP6 を血管平滑筋特異的に発現するトランスジェニックマウスを同様に作製し、細胞内 Ca^{2+} シグナル可視化マウスが得られた。現在、これらマウスの腸間膜動脈に生理的灌流圧 (0-120 mmHg 可変) を負荷したときの NCX1 局在および細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定している。

(2) マウス腸間膜動脈の筋原性収縮における PIP_2 産生酵素の関与

腸間膜細動脈の筋原性収縮は NCX1 ヘテロ欠損マウスで抑制されるが、NCX1 はイノシトールリン脂質代謝回転により活性化されることが知られていることから、筋原性収縮の機序にイノシトールリン脂質代謝が関与する可能性について検討した。イノシトールリン脂質 PIP_2 の産生酵素である PIP5K および PIP5K のノックアウトマウス (筑波大学・金保安則教授より供与) の腸間膜動脈に生理的灌流圧 (0-120 mmHg 可変) を負荷したときの筋原性収縮を測定したところ、PIP5K ノックアウトマウスの筋原性収縮は野生型マウスに比較して低下していた。なお、灌流液の Ca^{2+} を除いた場合の血管径は、野生型マウスと PIP5K ノックアウトマウスとでほとんど差が見られなかった。さらに、PIP5K ノックアウトマウスの血管における NCX1 遺伝子発現をリアルタイム PCR により測定したところ、PIP5K ノックアウトマウスの血管では野生型マウスに比べて NCX1 遺伝子発現が低下しており、 PIP_2 の NCX1 発現調節が腸間膜動脈の筋原性収縮に関与する可能性が示された。

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 10 件)

Azuma YT, Hayashi S, Nishiyama K, Kita

S, Mukai K, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Na⁺/Ca²⁺ exchanger-heterozygote knockout mice display increased relaxation in gastric fundus and accelerated gastric transit in vivo. *Neurogastroenterol Motil* (in press), 2016. 査読有
DOI:10.1111/nmo.12779.

Wei J, Watanabe Y, Takeuchi K, Yamashita K, Tashiro M, Kita S, Iwamoto T, Watanabe H, Kimura J. Nicorandil stimulates a Na⁺/Ca²⁺ exchanger by acting guanylate cyclase in guinea pig cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 468(4):693-703, 2016. 査読有
DOI:10.1007/s00424-015-1763-8.

Gotoh Y[†], Kita S[†] (†co-first authors), Fujii M, Tagashira H, Horie I, Arai Y, Uchida S, Iwamoto T. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. *Biochem Biophys Res Commun* 456(2):670-675, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.12.016.

Kita S, Tagashira T, Gotoh Y, Fujii M, Iwamoto T. Phosphoinositide analysis using the HPLC system equipped with a fraction collector and the TSKgel SAX column. *Med Bull Fukuoka Univ* 42(1):175-181, 2015. 査読有

Nishiyama K, Morioka A, Kita S, Nakajima H, Iwamoto T, Azuma YT, Takeuchi T. Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 transgenic mice display increased relaxation in the distal colon. *Pharmacology* 94(5-6):230-238, 2014. 査読有
DOI:10.1159/000363246.

Nishiyama K, Azuma YT, Kita S, Azuma N, Hayashi S, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1/2 double-heterozygote knockout mice display increased nitric oxide component and altered colonic motility. *J Pharmacol Sci* 123(3):235-245, 2013. 査読有
DOI:10.1254/jphs.13114FP

Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension* 62(5):872-878, 2013. 査読有
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01543

Mera T[†], Itoh T[†], Kita S[†] (†co-first authors), Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M,

Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of donor islets with the Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. *Am J Transplant* 13(8):2154-2160, 2013. 査読有
DOI:10.1111/ajt.12306

Nishizawa T, Kita S, Maturana AD, Furuya N, Hirata K, Kasuya G, Ogasawara S, Dohmae N, Iwamoto T, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for the counter-transport mechanism of a H⁺/Ca²⁺ exchanger. *Science* 341(6142):168-172, 2013. 査読有
DOI:10.1126/science.1239002

Yamamura H, Cole WC, Kita S, Hotta S, Murata H, Suzuki Y, Ohya S, Iwamoto T, Imaizumi Y. Overactive bladder mediated by accelerated Ca²⁺ influx mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 305(3):C299-C308, 2013. 査読有
DOI:10.1152/ajpcell.00065.2013.

[学会発表](計13件)

喜多紗斗美, 田頭秀章, 荒井勇二, 岩本隆宏, 遺伝子改変マウスを用いた血管NCLXの機能解析, 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月11日, 横浜

喜多紗斗美, 田頭秀章, 岩本隆宏, 遺伝子改変マウスを用いたミトコンドリアNa⁺/Ca²⁺交換体の心血管機能解析, 第68回日本薬理学会西南部会, 2015年11月21日, 下関

喜多紗斗美, 田頭秀章, 岩本隆宏, 遺伝子改変マウスを用いたNCLXの心血管機能解析, 生理研研究会2015「心臓・血管系の包括的な機能統合研究」, 2015年10月29日, 岡崎

喜多紗斗美, 田頭秀章, 岩本隆宏, ミトコンドリアNa⁺/Ca²⁺交換体(NCLX)の生理機能:NCLXノックアウトマウスを用いた解析, 第8回トランスポーター研究会九州部会, 2015年7月18日, 鹿児島

喜多紗斗美, 田頭秀章, 岩本隆宏, NCLXノックアウトマウスの心機能解析, 第10回トランスポーター研究会年会, 2015年6月20日, 東京

喜多紗斗美, 岩本隆宏, NCXの構造・機能解析における最近の進歩, 日本薬学会第135年会, 2015年3月28日, 神戸

喜多紗斗美, 岩本隆宏, Na⁺/Ca²⁺交換輸送体の活性制御と血管トーン調節, 第56回日本平滑筋学会総会, 2014年8月8日, 横浜

喜多紗斗美, 米良利之, 伊東威, 小玉正太, 安波洋一, 岩本隆宏, NCX1 inhibitor improves the efficiency of islet

transplantation、第9回トランスポーター研究会年会、2014年6月15日、名古屋

Satomi Kita, Toshiyuki Mera, Takeshi Itoh, Shohta Kodama, Yohichi Yasunami, Takahiro Iwamoto. Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. 第87回日本薬理学会年会、2014年3月20日、仙台
喜多紗斗美、岩本隆宏、曄 細胞のCa²⁺調節機構におけるNa⁺/Ca²⁺交換体の役割、第91回日本生理学会大会、2014年3月16日、鹿児島

喜多紗斗美、岩本隆宏、PIP₂によるNa⁺/Ca²⁺交換輸送体機能制御の分子機構と病態生理学的意義、第55回日本平滑筋学会総会、2013年8月7日、旭川

Satomi Kita, Yuji Arai, Ichiro Horie, Takahiro Iwamoto. Involvement of TRPC3/6 channels in myogenic tone regulation and alpha1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction of murine mesenteric arteries. The 2nd HD Physiology International Symposium, 2013年6月29日、東京

喜多紗斗美、荒井勇二、堀江一郎、岩本隆宏、マウス腸間膜細動脈の筋原性収縮およびalpha1アゴニスト収縮におけるTRPC3/6の関与について、第8回トランスポーター研究会年会、2013年6月15日、熊本

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 紗斗美 (KITA, Satomi)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10461500

(2) 研究分担者

藤井 誠 (FUJII, Makoto)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：30398086

後藤 雄輔 (GOTOH, Yusuke)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90609489