

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461120

研究課題名(和文)冠攣縮性狭心症動物モデルを用いた冠攣縮の成因と治療に対する分子生物学的アプローチ

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・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20185549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、冠攣縮性狭心症動物モデルであるヒトR257H亜型PLC-delta 1血管平滑筋特異的過剰発現マウス(PLC-TGマウス)を用いて、カルシウム拮抗薬による冠攣縮抑制効果の機序を明らかにした。さらにAキナーゼアンカータンパク(A-kinase anchoring proteins, AKAP)の冠攣縮における役割を初めて明らかにした。本研究は冠攣縮性狭心症の新しい機序解明のみならず、難治性冠攣縮性狭心症の治療法の開発という点においても十分に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We recently generated transgenic mice with enhanced phospholipase C-delta 1 activity (PLC-TG) and reported enhanced coronary vasomotility such as that seen in patients with coronary spastic angina. In the present study, we showed the efficacy of calcium antagonist for coronary spasm and its mechanism using the PLC-TG mice. Alterations in activity of calcium channels were suggested to be implicated in the therapeutic effect of calcium antagonist. Furthermore, we first clarified roles of A-kinase anchoring proteins in the coronary spasm. The present study may help better understand mechanism of the coronary spasm and contribute to the development of novel treatment strategy for drug-resistant coronary spasm.

研究分野：循環器内科学、不整脈学

キーワード：循環器・高血圧 冠攣縮 phospholipase C

1. 研究開始当初の背景

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。平滑筋の収縮機構に重要な役割を果たしている 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。我々はこれまでに、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-delta 1 であることを報告した (Okumura 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-delta 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 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, Okumura et al. Circulation 2002)。これら臨床例の解析データから、PLC-delta 1 の活性亢進が冠攣縮性狭心症の成因に中心的な役割を果たしていることが示された。

さらに最近我々は、変異型 PLC-delta 1(R257H) 血管平滑筋過剰発現マウス (PLC-TG) を作成した。この PLC-TG マウスの冠動脈、大動脈ならびに腸間膜動脈では、PLC 活性が野生型マウスと比べて有意に亢進していた。種々の実験より、我々が作製した PLC-TG マウスは、臨床例に即した冠攣縮性狭心症動物モデルであることが証明された (Shibutani, Okumura et al, Circulation 2012)。

冠攣縮性狭心症の治療薬として、カルシウム拮抗薬の投与が確立している。カルシウム拮抗薬は、電位依存性 L 型カルシウムイオンチャネルに特異的に結合し、細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの流入を遮断する。冠攣縮性狭心症患者におけるアゴニスト刺激に対する細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が、細胞内筋小胞体に起因するのか、それとも細胞外からのカルシウムイオン流入亢進に起因するのか、その詳細なメカニズムは解明されていない。従って、冠攣縮性狭心症治療薬としてのカルシウム拮抗薬の作用機序も十分に解明されたとはいえない。

A キナーゼアンカータンパク (A-kinase anchoring proteins, AKAP) は、プロテインキナーゼ A (PKA) に結合するタンパク質の一群である。特に AKAP79/150 は、PKA のみならず、シグナル伝達経路において PLC の下流に位置するプロテインキナーゼ C (PKC) にも結合し、細胞外からのカルシウムイオン流入調節に重要な役割を担っている。さらに AKAP79/150 は血管トーンにも関与し、アンジオテンシン II による血管トーンの亢進ならびに血圧上昇が、

AKAP150 ノックアウト (AKAP-KO) マウスでは抑制されることが報告されている (Navedo et al, Circ Res 2008)。以上のように AKAP79/150 は、カルシウムイオンを介しての血管トーンの調節に極めて重要な役割を担っているが、冠攣縮との関係は全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、冠攣縮性狭心症動物モデルである PLC-TG マウスを用いて、カルシウム拮抗薬投与による冠攣縮抑制効果を体表面心電図により検討し、カルシウムに関する細胞内シグナル伝達機構の解明ならびにカルシウム拮抗薬の作用機序を明らかにする。さらに AKAP79/150 の冠攣縮における役割を AKAP-KO マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) PLC-TG マウスにおける冠攣縮に及ぼすカルシウム拮抗薬の影響

PLC-TG マウスを用いて、経静脈的エルゴノピン (50mg/kg) 投与により誘発された冠攣縮が、カルシウム拮抗薬 (ジルチアゼム 60mg/kg/日、経口投与 14 日間) により抑制されるかどうかを、体表面心電図による心電図変化 (心拍数や ST-T 変化、房室ブロック) により検討する。さらにカルシウム拮抗薬による降圧の影響を除外するため、他の降圧薬 (利尿薬トリクロルメチアジド 1 mg/kg/日、経口投与 14 日間) を用いて同様の実験を行う。

(2) PLC-TG マウスにおけるカルシウムシグナル関連物質発現の検討

PLC-TG マウスと野生型マウスの大動脈、心臓、腸間膜動脈などの各臓器を速やかに摘出し、それらの臓器におけるカルシウムシグナル関連物質、すなわち電位依存性 L 型カルシウムチャネル (Cav1.2) ならびに AKAP79/150 の蛋白発現を Western blotting 法にて比較検討する。さらに活性化型 L 型カルシウムチャネルであるリン酸化 Cav1.2 の発現を、特異的抗体 (Serine-1928) を用いて検討する。これらカルシウムシグナル関連物質発現に及ぼすジルチアゼム投与の影響について、ジルチアゼム投与後のマウス検体を用いて同様の手法で検討する。

(3) AKAP79/150 蛋白の冠攣縮への関与

AKAP-KO マウスにおいて、経静脈的エルゴノピン (50mg/kg) 投与による冠攣縮誘発の有無を体表面心電図 (心拍数や ST-T 変化、房室ブロック) により検討する。

(4) AKAP79/150 蛋白の細胞内カルシウム濃度ならびにカルシウムシグナル関連物質発現への関与

AKAP-KO マウスの大動脈平滑筋細胞を用いて、アゴニスト刺激による細胞内カルシウム濃度ならびにその反応性を検討する。さらに、カルシウム感受性関連物質であるカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の遺伝

子ならびに蛋白発現を検討する。

4. 研究成果

(1) PLC-TG マウスにおいて、エルゴノピン投与により誘発された冠攣縮は、カルシウム拮抗薬(ジルチアゼム)投与により抑制されたが、利尿薬(トリクロルメチアジト)投与では抑制されなかった。

(2) PLC-TG マウス大動脈における Cav1.2 の蛋白発現は、野生型マウスと比較して有意に低下していた。一方、リン酸化 Cav1.2 (Serine-1928) の発現は、PLC-TG マウスにおいて亢進していた。ジルチアゼムはリン酸化 Cav1.2 の発現を抑制し、リン酸化蛋白の割合を有意に減少させた。さらに Cav1.2 のリン酸化に重要な役割を担っている PKC 活性は、PLC-TG マウスにおいて有意に亢進し、ジルチアゼム投与により抑制された。

(3) AKAP-KO マウスにエルゴノピンを投与すると、体表面心電図にて ST 上昇が観察され、冠攣縮が誘発された。

(4) AKAP-KO マウスの大動脈平滑筋細胞では、アゴニスト刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇は野生型マウスの大動脈平滑筋細胞と同等であり、全く亢進していなかった。さらに、AKAP-KO マウス大動脈平滑筋細胞におけるカルシウム感受性関連物質カルモジュリンキナーゼ II(CaMKII)の遺伝子ならびに蛋白発現は、野生型マウスと比較して、いずれも約2倍増加していた。

以上から、PLC-TG マウスにおいて誘発された冠攣縮に対し、ジルチアゼムはその抑制に有効であった。その機序として、電位依存性L型カルシウムチャネル活性の関与が示唆された。さらに、AKAP-KO マウスではカルシウム感受性の亢進によって冠攣縮が引き起こされ、冠攣縮の新たな機序となる可能性が示唆された。

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18件)

以下は全て査読あり

1. Murakami K, Osanai T, Tanaka M, Nishizaki K, Kinjo T, Tanno T, Ishida Y, Suzuki A, Endo T, Tomita H, Okumura K. Enhanced transient receptor potential channel-mediated Ca²⁺ influx in the cells with phospholipase C-1 overexpression: its possible role in coronary artery spasm. *Fundam Clin Pharmacol*. 2017 in press DOI: 10.1111/fcp.12269
2. Tanno T, Tomita H, Narita I, Kinjo T, Nishizaki K, Ichikawa H, Kimura Y, Tanaka M, Osanai T, Okumura K. Olmesartan Inhibits Cardiac

Hypertrophy in Mice Overexpressing Renin Independently of Blood Pressure: Its Beneficial Effects on ACE2/Ang(1-7)/Mas Axis and NADPH Oxidase Expression. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;67:503-509. doi: 10.1097/FJC.0000000000000374.

3. Narita I, Shimada M, Yamabe H, Kinjo T, Tanno T, Nishizaki K, Kawai M, Nakamura M, Murakami R, Nakamura N, Tomita H, Saleem MA, Mathieson PW, Okumura K. NF- κ B-dependent increase in tissue factor expression is responsible for hypoxic podocyte injury. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20:679-688. DOI: 10.1007/s10157-015-1214-z
4. Kawai M, Osanai T, Tanaka M, Magota K, Tomita H, Okumura K. Mitochondrial Inhibitory Factor Protein 1 Functions as an Endogenous Inhibitor for Coupling Factor 6. *J Cell Biochem*. 2016;117:1680-1687. DOI: 10.1002/jcb.25461
5. Itoh T, Kimura M, Tomita H, Sasaki S, Owada S, Horiuchi D, Sasaki K, Ishida Y, Kinjo T, Okumura K. Reduced residual conduction gaps and favourable outcome in contact force-guided circumferential pulmonary vein isolation. *Europace* 2016;18:531-537. doi: 10.1093/europace/euv206.
6. Han C, Tomita H, Ohba T, Nishizaki K, Ogata Y, Matsuzaki Y, Sawamura D, Yanagisawa T, Osanai T, Imaizumi T, Matsubara A, Adachi T, Ono K, Okumura K, Murakami M. Modified sympathetic sympathetic nerve regulation in AKAP5-null mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469:897-902. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.057.
7. Sasaki K, Sasaki S, Kimura M, Horiuchi D, Itoh T, Ishida Y, Kinjo T, Tomita H, Okumura K. Catheter ablation of ventricular arrhythmias arising from the basal septum of the right ventricle: characteristics and significance of junctional rhythm appearing during ablation. *J Interv Card Electrophysiol* 2016;45:159-167. doi: 10.1007/s10840-015-0095-0.
8. Tomita H, Hagii J, Metoki N, Saito S,

- Shiroto H, Hitomi H, Kamada T, Seino S, Takahashi K, Sasaki S, Yasujima M, Okumura K. Severity and Functional Outcome of Patients with Cardioembolic Stroke Occurring during Nonvitamin K Antagonist Oral Anticoagulant Treatment. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015;24:1430-1437. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.
9. Tomita H, Okumura K, Inoue H, Atarashi H, Yamashita T, Origasa H, Tsushima E, on behalf of the J-RHYTHM Registry Investigators. Validation of Risk Scoring System Excluding Female Sex From CHA2DS2-VASc in Japanese Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation - Subanalysis of the J-RHYTHM Registry. *Circ J* 2015;79:1719-1726. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0095.
 10. Higuma T, Abe N, Tateyama S, Endo T, Shibutani S, Yokoyama H, Hanada K, Yamada M, Tomita H, Hanada H, Osanai T, Kume N, Okumura K. Plasma soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 as a novel prognostic biomarker in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circ J*.2015;79:641-648. doi: 10.1253/circj.CJ-14-0904.
 11. Yokoyama H, Tomita H, Nishizaki F, Hanada K, Shibutani S, Yamada M, Abe N, Higuma T, Osanai T, Okumura K. Deeply re-inverted T-wave at 14 days after the onset of first anterior acute myocardial infarction predicts improved left ventricular function at 6 months. *Clin Cardiol*. 2015;38:157-163. doi: 10.1002/clc.22366.
 12. Kinjo T, Tanaka M, Osanai T, Shibutani S, Narita I, Tanno T, Nishizaki K, Ichikawa H, Kimura Y, Ishida Y, Yokota T, Shimada M, Homma Y, Tomita H, Okumura K. Enhanced p122RhoGAP/DLC-1 expression can be a cause of coronary spasm. *PLOS ONE* 2015;10:e0143884. doi: 10.1371/journal.pone.0143884.
 13. Owada S, Tomita H, Kinjo T, Ishida Y, Itoh T, Sasaki K, Horiuchi D, Kimura M, Sasaki S, Okumura K. CHA2DS2-VASc and HAS-BLED scores and activated partial thromboplastin time for prediction of high plasma concentration of dabigatran at trough. *Thrombosis Res*. 2015;135:62-67. doi: 10.1016/j.thromres.2014.10.025.
 14. Kimura M, Sasaki S, Owada S, Horiuchi D, Sasaki S, 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.
 15. Seya K, Yamaya A, Kamachi S, Murakami M, Kitahara H, Kawakami J, Okumura K, Murakami M, Motomura S, Furukawa K. 8-Methyltryptanthrin-Induced Differentiation of P19CL6 Embryonal Carcinoma Cells into Spontaneously Beating Cardiomyocyte-like Cells. *J Nat Prod*.2014;77:1413-1419. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.03.019.
 16. Suzuki A, Osanai T, Tanaka M, Tomita H, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 attenuates CXCR4 expression through the HIF-1 and c-Src pathways and promotes endothelial apoptosis and inflammation. *Hypertens Res*. 2014;37:708-715. doi: 10.1038/hr.2014.65.
 17. Sasaki S, Tomita H, Shibutani S, Izumiyama K, Higuma T, Itoh T, Sasaki S, Horiuchi D, Kimura M, Okumura K. Usefulness of the wearable cardioverter-defibrillator in patients at high risk for sudden cardiac death. *Circ J* 2014;78:2987-2989. doi:10.1253/circj.CJ-14-1098
 18. Tateyama S, Higuma T, Endo T, Shibutani S, Hanada K, Yokoyama H, Yamada M, Abe N, Sasaki S, Kimura M, Okumura K. Prognostic impact of atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Arrhythmia* 2014;30:460-465. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.joa.2013.12.006
- 〔学会発表〕(計 13 件)
1. Senoo M, Hanada K, Okumura K, et al. Possible Involvement of Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation in Acetylcholine Muscarinic M3 Receptor Signaling in Coronary Spasm. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年 3 月 17 日 金沢市教育プラザ (石川県・金沢市)

- | | |
|---|---|
| 2. 成田 憲紀、富田 泰史、奥村 謙. Trend of Anticoagulation Therapy in Patients with Non-valvular Atrial Fibrillation in a Japanese Local Region: Analysis Using the “Kokuho Database”. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年 3 月 19 日 ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県・金沢市) | 11 月 07 日 ~ 2015 年 11 月 11 日 オーランド (アメリカ合衆国) |
| 3. Kimura Y, Tomita H, Okumura K, et al. p122RhoGAP/DLC-1 Overexpression Enhances Intracellular Calcium Concentration in Response to Acetylcholine in Isolated Vascular Smooth Muscle Cells. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年 3 月 19 日 金沢フォーラス (石川県・金沢市) | 9. Murakami K, Okumura K. Enhanced Trpc Channel-Mediated Ca ²⁺ Influx in the Cells With Phospholipase C- 1 Overexpression. AHA2014 2014 年 11 月 16 日 McCormick Place, シカゴ (アメリカ合衆国) |
| 4. Nishizaki K, Tomita H, Okumura K, et al. Disruption of A-kinase Anchoring Protein 150 Induces Coronary Spasm through Enhancement of Calcium Sensitization: A Potential Role of microRNA-30b. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年 3 月 19 日 金沢フォーラス (石川県・金沢市) | 10. Kinjo T, Okumura K. Coronary Vasospasm Induced in Transgenic Mouse With Vascular Smooth Muscle- Specific Overexpression of p122RhoGAP/ DLC1. AHA2014 2014 年 11 月 16 日 シカゴ (アメリカ合衆国) |
| 5. Nishizaki K, Tomita H, Okumura K, et al. Disruption of A-kinase Anchoring Protein 150 Causes Coronary Spasm Through Enhanced Calcium Sensitization: A Potential Role of MicroRNA-30b. AHA2016 2016 年 11 月 11 日 ~ 2016 年 11 月 15 日 ニューオーリンズ (アメリカ合衆国) | 11. Higuma T, Okumura K. Incidence and Morphologic Characteristics of Plaque Erosion in Patients With Acute Myocardial Infarction: A Combined Optical Coherence Tomography and Intravascular Ultrasound Study. AHA2014 2014 年 11 月 16 日 シカゴ (アメリカ合衆国) |
| 6. 金城貴彦、田中真実、長内智宏、澁谷修司、石田祐司、丹野倫宏、西崎公貴、市川博章、木村嘉宏、富田泰史、奥村謙. Enhanced p122RhoGAP/DLC-1 Expression can be a Cause of Coronary Spasm. 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 年 3 月 20 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市) | 12. Osanai T, Okumura K. Chronic Nuclear Acidosis Defines Aging and Lifespan by Histone 4 Lysine 5 Acetylation in Mice. AHA2014 2014 年 11 月 16 日 シカゴ (アメリカ合衆国) |
| 7. 西崎公貴、富田泰史、市川博章、木村嘉宏、金城貴彦、丹野倫宏、田中真実、長内智宏、奥村謙. Disruption of A-kinase Anchoring Protein 150 Induces Coronary Spasm through Enhancement of Calcium Sensitization. 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 年 3 月 20 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市) | 13. Higuma T, Okumura K. Plaque Erosion, Compared to Plaque Rupture, is Associated With Better Outcomes After Primary Percutaneous Coronary Intervention in Patients With STsegment Elevation Myocardial Infarction. AHA2014 2014 年 11 月 16 日 シカゴ (アメリカ合衆国) |
| 8. Kinjo T, Osanai T, Okumura K, et al. Coronary Vasospasm Induced in Transgenic Mouse With Overexpression of p122RhoGAP/DLC1. AHA2015 2015 年 | 〔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

奥村 謙 (Okumura, Ken)
弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：20185549

(2) 研究分担者

長内 智宏 (Osanai, Tomohiro)
弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：00162978

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()