

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：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461619

研究課題名(和文) 肺動脈性高血圧症の進展を抑制する細胞内カルシウムシグナルの解明

研究課題名(英文) Intracellular Calcium Signals Inhibiting the Progression of Pulmonary Arterial Hypertension

研究代表者

内田 敬子 (UCHIDA, Keiko)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・講師

研究者番号：50286522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：長期低酸素暴露による肺高血圧症の程度を野生型と2型イノシトール三リン酸受容体(IP3R2)ノックアウト(KO)マウスで比較したところ、心エコーによる右心機能、右心室の相対的重量による右室肥大、肺組織切片における肺動脈中膜肥厚の全てにおいて、KOマウスでは肺高血圧症が増悪していた。IP3R2は肺内では肺動脈平滑筋に特異的に発現しており、肺動脈平滑筋のアポトーシス抵抗性が亢進し、カルシウム流入分子の一つであるTRPC4の発現が上昇していた。さらに、単離肺動脈平滑筋細胞初代培養において、ストア感受性Ca²⁺流入活性が亢進しており、肺動脈性肺高血圧を増悪させている主な原因経路の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inositol trisphosphate receptor (IP3R) is an intracellular Ca²⁺ release channel. As we found the strong expression of the type 2 IP3R (IP3R2) in the pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs), we investigated the contribution of IP3R2 to pathophysiology of PAH. IP3R2 knockout (KO) mice treated with chronic hypoxia showed higher PA pressure and RV pressure than WT mice in echocardiography. RV hypertrophy and medial wall thickness of PASMCs were more severe in KO. There was significant decrease of TUNEL positive cells in KO, suggesting that apoptosis was reduced in KO PASMCs. Ca²⁺ imaging revealed that SOCE was enhanced in KO compared with WT. Taken together, chronic hypoxia-induced PAH was deteriorated in IP3R2 KO. The deletion of IP3R2 gene led to inhibition of apoptosis and enhanced SOCE in PASMCs, probably resulting in acceleration of the progression of PAH induced by chronic hypoxia.

研究分野：pediatric cardiology

キーワード：Calcium Signal Pulmonary Hypertension

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)とは進行性で予後不良の疾患である。組織学的には、直径 0.5 mm 以下の細動脈に、中膜肥厚、内膜増殖、外膜肥厚、炎症性細胞浸潤、血栓形成、叢状病変を認める。近年、PAH に対して様々な標的治療薬が開発されているが、これらの治療にもかかわらず治癒には至らず、肺移植が必要となる場合も少なくない。PAH の主要な病態は、「血管収縮」と「細胞増殖」の亢進である。PAH 治療戦略の多くは、血管収縮と細胞増殖を抑えることを目的とする。肺動脈平滑筋の収縮と細胞増殖に重要なシグナル経路の一つに、細胞内 Ca^{2+} シグナルがある。細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる経路には細胞外からの Ca^{2+} 流入と、細胞内 Ca^{2+} ストアである筋小胞体 (SR) /小胞体 (ER) からの Ca^{2+} 放出の 2 経路があり、前者に電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC)、受容体作動性 Ca^{2+} チャネル(ROC)、ストア感受性 Ca^{2+} チャネル (SOC)、 Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送体などが含まれ、後者にリアノジン受容体やイノシトール三リン酸受容体(IP_3R)などが含まれる。いずれの経路でも、細胞内 Ca^{2+} 上昇によって「血管収縮」と「細胞増殖」が亢進すると考えられているが、PAH の病態形成における細胞内 Ca^{2+} シグナルの詳細は不明で、VDCC 阻害薬以外は治療薬として使用されていない。私たちはこの中で、 IP_3R を中心に研究を進めてきた。 IP_3R には、1 型、2 型、3 型の 3 種 (IP_3R1 , IP_3R2 , IP_3R3)のサブタイプが存在し、多くの生体機能に重要な役割を担っている。最近、 $IP_3R1 \cdot IP_3R2$ および $IP_3R1 \cdot IP_3R3$ ダブルノックアウト(DKO)マウスでは胎盤血管の障害を発見し、 IP_3R が胎生期から血管新生に機能していることを明らかにした。これまでの解析で、私たちは IP_3R2 の LacZ ノックインマウスを用いて、1) IP_3R2 が体血管平滑筋よりも肺動脈平滑筋に優位に発現し、2)肺組織の中では気管支平滑筋には発現がなく、肺動脈平滑筋に特異的に発現するという独自の結果を得た(図1)。ノックダウン法を用いた解析により、大動脈平滑筋で IP_3R1 が血管ト

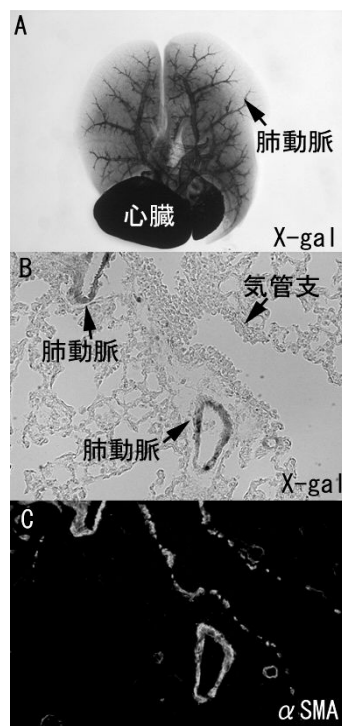


図1 $IP_3R2^{lacZ/+}$ マウス肺の Xgal 染色 (A,B) と抗 smooth muscle actin 抗体染色 (C)

ーヌスに参与すると報告されており (Zhou, BBRC, 2008)、私たちの結果から肺動脈平滑筋では IP_3R2 が血管トーススに主要な役割を担う可能性が示唆される。そこで PAH モデルマウスを作製し、 IP_3R2 ノックアウト (KO)マウス と野生型で比較することにより、PAH の病態に IP_3R2 がどのような役割を果たすかを解析することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、長期低酸素暴露で観察された IP_3R2KO マウスにおける PAH の増悪の機序を分子レベルで解明することである。個体で観察された PAH の増悪所見である肺動脈中膜肥厚の原因として肺動脈平滑筋細胞の増殖亢進や細胞内 Ca^{2+} シグナルの異常が認められるかを、単離肺動脈平滑筋細胞の初代培養を用いて細胞レベルで確認する。さらに、 Ca^{2+} 依存性のシグナルカスケードの異常の本質を明らかにし、PAH を増悪させている主な原因経路は何かを分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

長期低酸素暴露による PAH モデルマウスを作製し、 IP_3R2KO マウスで観察された肺動脈中膜肥厚の増悪の機序を解明する。 IP_3R2KO マウスと野生型マウスを低酸素下で飼育し、個体レベルでは心エコーによる右心機能評価、左右の心室の重量測定による右室肥大の評価、心臓カテーテル検査による右室圧測定を行う。細胞レベルでは、単離肺動脈平滑筋細胞を用いて、細胞増殖の亢進の有無、アポトーシスの低下の有無、細胞遊走の亢進の有無、細胞内 Ca^{2+} 動態、特に Ca^{2+} 流入の上昇の有無を観察する。

4. 研究成果

(1) IP_3R2 の肺動脈における発現様式の解析：肺の発生段階にそって、胎生期から成獣までの IP_3R2 の発現を観察した。 IP_3R2 の LacZ 遺伝子ノックインマウスを用いて、X-gal 染色を全胎仔および組織切片で実施することで、発現様式を詳細に観察しえた。また、中膜及び内膜マーカーである α -smooth muscle actin、および CD31 に対する抗体を用いた免疫組織化学法を同時に行った。その結果、肺動脈の発生の初期から成熟期のすべてにおいて、気道に併走した肺動脈第 1 分岐から末梢肺動脈まで、 α -smooth muscle actin 陽性である中膜に発現していることがわかった。一方、やはり α -smooth muscle actin 陽性である気道平滑筋には IP_3R2 の発現は見られなかった。以上より IP_3R2 は平滑筋の中でも肺動脈平滑筋に特異的なマーカー分子になり得る可能性が示唆された。

(2) 低酸素曝露による肺高血圧モデルの IP_3R2KO マウスと野生型マウスとの比較:10% 酸素の低酸素下で 8 週間飼育すると再現性よく肺高血圧を作製できた。低酸素曝露の IP_3R2KO マウスにおいて、野生型に比較して心エコー検査で肺高血圧所見の増悪が観察された。さらに、体重あたりの右心室重量が

増加し右室肥大が認められた。また IP_3R2KO マウスの肺組織切片では、肺動脈中膜肥厚の増悪が観察された。

(3) IP_3R2KO マウスの肺組織における TRPc チャンルの発現変化: IP_3R2KO マウスにおいて低酸素曝露で誘発された肺高血圧症が増悪していた機序に関して、肺高血圧症の増悪に関わるカルシウムシグナル分子の一つである TRPc チャンルに着目した。TRPc のサブタイプのうち、TRPc1, c4, c6 はストア感受性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) や受容体作動性 Ca^{2+} 流入 (ROCE) を介して肺高血圧症の増悪因子である肺血管収縮を引き起こす。野生型および IP_3R2KO マウスを用いて 8 週間の低酸素曝露による肺高血圧症モデルマウスを作製し、採取した肺組織の lysate を用いて抗 TRPc1, 抗 TRPc4, 抗 TRPc6 抗体によるウエスタンブロットを行った。ポジティブコントロールとして脳組織 lysate を用いた。抗 TRPc1 抗体は今回コントロールにおいてもバンドが得られなかったが、低酸素曝露の肺組織において、野生型に比べて KO マウスで TRPc4 の発現が上昇し、TRPc6 の発現は変化がなかった。

(4) マウス肺動脈平滑筋初代培養細胞を用いたカルシウムイメージング: ラットの肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) 初代培養法を参考にマウス PASMC 初代培養実施した。培養後 5 日から 6 日後に 4% 酸素下で 24 時間培養し、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo4-AM をロードし共焦点顕微鏡を用いて SOCE および ROCE を測定した。低酸素濃度下培養によって、野生型 PASMC においても正常酸素濃度下培養と比較して SOCE が増加し、さらに、低酸素濃度下培養を行った IP_3R2KO マウス PASMC ではさらに SOCE が増加していた。 IP_3R2KO マウスに認められた低酸素曝露による肺高血圧症の増悪に SOCE の増加が関与する可能性が示唆された。

(5) IP_3R2KO マウス肺におけるアポトーシス活性: IP_3R2KO マウスにおいて低酸素曝露により誘発された肺高血圧症の所見が増悪していた原因の一つとして、アポトーシス抵抗性の関与がないか検討した。野生型および IP_3R2KO マウスの肺切片を用いた TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞の割合を比較したところ、 IP_3R2KO マウスで TUNEL 陽性細胞が少なくアポトーシス抵抗性が亢進していると考えられた。その機序として、 IP_3R2 が bcl2 を介した cytochrome c の放出を促進するという報告があることから、 IP_3R2KO マウスでは bcl2-cytochrome c を介したアポトーシスの促進機構が抑制される可能性が考えられた。

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 1 件)

Uchida K, Nakazawa M, Yamagishi C, Mikoshiba M, Yamagishi H. Type 1 and 3

inositol trisphosphate receptors are required for extra-embryonic vascular development. *Developmental Biology*, 査読有り, 418 巻, 2016 年, 89-97. 10.1016/j.ydbio.2016.08.007.

〔学会発表〕(計 10 件)

Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi. Role of Tbx4 for Pulmonary Vascular Development Related to Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. 日本循環器学会、2017 年 3 月 17 日 ~ 19 日、石川県立音楽堂他 (石川県金沢市)。

Akimichi Shibata, Keiko Uchida, Reina Ishizaki, Takatoshi Tsuchihashi, Jun Maeda, Katsuhiko Mikoshiba, Takao Takahashi, Hiroyuki Yamagishi. A Role of Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors to Inhibit the Progression of Pulmonary Arterial Hypertension. American Heart Association Scientific Session 2015, 2015 年 11 月 7 日 ~ 11 日, Orange County Convention Center (Orlando, FL, USA).

Keiko Uchida, Reina Ishizaki, Akimichi Shibata, Takatoshi Tsuchihashi, Hiroyuki Yamagishi. New Insights into Molecular Mechanisms Underlying Cardiovascular Development and Clinical Implications for Congenital Heart Diseases. the International Society for Heart Research 2015, 2015 年 12 月 10 日 ~ 12 日, Kobe Convention Center (兵庫県神戸市)。

内田敬子, 石崎怜奈, 柴田映道, 土橋隆俊, 山岸敬幸. 肺血管発生における Tbx4 の発現と機能. Molecular Cardiovascular Conference II 2015, 2015 年 9 月 4 日 ~ 5 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)。

Keiko Uchida, Reina Ishizaki, Akimichi Shibata, Takatoshi Tsuchihashi, Hiroyuki Yamagishi. Microarray using developing lungs suggest a putative role of TBX4 in the lung vasculature. Weinstein Cardiovascular Development Conference 2015, 2015 年 4 月 30 日 ~ 5 月 2 日, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (Boston, MA, USA).

Akimichi Shibata, Keiko Uchida, Reina Ishizaki, Takatoshi Tsuchihashi, Jun Maeda, Katsuhiko Mikoshiba, Takao Takahashi, Hiroyuki Yamagishi. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits pulmonary arterial hypertension by regulating intracellular calcium signals in vascular smooth muscle. The Congress of Asian Society for Pediatric Research 2015, 2015 年 4 月 16 日 ~ 18 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)。

柴田映道, 内田敬子, 石崎怜奈, 土橋隆俊, 前田潤, 御子柴克彦, 山岸敬幸. 細胞内カルシウム制御分子イノシトール三リン酸受容

体は肺動脈性肺高血圧症の重要化を抑制する．日本小児肺循環研究会、2015年1月31日、笹川記念会館（東京港区）．

石崎怜奈、内田敬子、柴田映道、土橋隆俊、前田潤、御子柴克彦、山岸敬幸．イノシトール三リン酸受容体（2型）の肺動脈発生マーカーとしての有用性．日本小児肺循環研究会、2015年1月31日、笹川記念会館（東京港区）．

柴田映道、内田敬子、石崎怜奈、土橋隆俊、前田潤、御子柴克彦、山岸敬幸．肺高血圧症の重症化を抑制するイノシトール三リン酸受容体の役割．日本肺高血圧学会、2014年10月3日～5日、大手町サンケイプラザ（東京都千代田区）．

柴田映道、内田敬子、石崎怜奈、土橋隆俊、前田潤、山岸敬幸．肺動脈性肺高血圧症の重症化を抑制するイノシトール三リン酸受容体の新たな役割．日本小児循環器学会、2014年7月3日～5日、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）．

〔図書〕（計1件）

Keiko Uchida, Maki Nakazawa, Chihiro Yamagishi, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Yamagishi, Springer, Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease -From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology-, 2016, 237-239

〔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 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 敬子 (UCHIDA, Keiko)
慶應義塾大学・保健管理センタ ・講師
研究者番号：50286522

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山岸 敬幸 (YAMAGISHI, Hiroyuki)
慶應義塾大学・医学部小児科・教授
研究者番号：40255500

(4) 研究協力者

御子柴 克彦 (MIKOSHIBA, Katsuhiko)
柴田 映道 (SHIBATA, Akimichi)