

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860577

研究課題名(和文)冠攣縮性狭心症動物モデルにおけるカルシウムシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Experimental study on calcium signaling in coronary spastic angina animal model

研究代表者

横田 貴志 (Yokota, Takashi)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40624888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臨床例に即した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、カルシウムイオンの動態に関わる細胞内シグナル伝達機構を解析し、カルシウム拮抗薬による冠攣縮抑制効果の機序を分子レベルで初めて明らかにした。本研究は冠攣縮性狭心症の病態の解明のみならず、難治性冠攣縮性狭心症の機序解明ならびにそ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 showed that coronary spasm is induced in transgenic mice with enhanced phospholipase C-delta 1 activity (PLC-TG). Although calcium antagonist therapy is established as a treatment for coronary spastic angina, its precise mechanism remains unclear. In the present study, we investigated the efficacy of calcium antagonist and its mechanism using the PLC-TG mice. Calcium antagonist suppressed coronary spasm in the PLC-TG mice, as in the clinical cases. Alterations in protein expression levels and activity of calcium channels were suggested to be implicated in the pathogenesis of coronary spasm and in the therapeutic effect of calcium antagonist. Our study may help better understand calcium signaling in the coronary spasm and contribute to the development of novel therapy for drug-resistant coronary spasm.

研究分野：循環器病学

キーワード：冠攣縮 カルシウム

## 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有する。平滑筋の収縮機構に重要な役割を果たしている酵素である Phospholipase C (PLC) が活性化されることにより、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 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、ならびに PLC 活性亢進の主体は PLC-delta 1 であることを報告した (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- PLC-delta 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 (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、ヒト R257H 亜型 PLC-delta 1 を血管平滑筋特異的に過剰発現させたマウス (PLC-TG) を作製した。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。PLC-TG 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 上昇ならびにそれに続く高度房室ブロックが観察された。さらに Microvascular filling 法により、アゴニスト刺激による冠動脈攣縮が観察された。ランゲンドルフ灌流装置で測定された冠動脈灌流圧は、PLC-TG マウスでエルゴノピン投与により有意に上昇した。以上の実験から我々が作製した 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 (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ン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。しかし、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言い難い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床例に即した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) を用いて、カルシウムイオンの動態に関わる細胞内シグナル伝達機構を解析することにより、臨床に即した冠攣縮の機序、特にカルシウム拮抗薬の作用機序を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) PLC-TG マウスで誘発された冠攣縮に及ぼすカルシウム拮抗薬の影響

我々のこれまでの実験により、生後 24 週前後の PLC-TG マウスにおいて、経静脈的エルゴノピン (50mg/kg) 投与により冠攣縮が誘発されている (Circulation 2012)。冠攣縮に及ぼすカルシウム拮抗薬の影響を検討するため、カルシウム拮抗薬 (ジルチアゼム 60 mg/kg/日) を 14 日間連続投与する。カルシウム拮抗薬による降圧の影響を除外するため、コントロール群として他の降圧薬 (トリクロルメチアジド 1 mg/kg/日) を用いて同様の実験を行い、両薬剤投与後の血圧を tail-cuff 法にて測定する。

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により検討する。

(2) PLC-TG マウスのカルシウムイオンチャンネル発現の検討

PLC-TG マウスの大動脈を速やかに摘出後、電位依存性 L 型カルシウムチャンネル (Cav1.2) の遺伝子発現ならびに蛋白発現を Real-time PCR 法ならびに Western blotting 法にて検討する。さらに活性型の L 型カルシウムチャンネルはリン酸化されているため、リン酸化 Cav1.2 (Serine-1928) の発現を Western blotting 法にて検討する。さらにジ

ルチアゼム投与後のカルシウムイオンチャネル発現の変化についても同様の手法で検討する。

### (3)細胞内遊離カルシウムイオン調整物質の検討

イノシトール3リン酸受容体1 (IP3R-1) は、血管平滑筋の細胞内遊離カルシウムイオン濃度上昇に寄与することが知られている。Aキナーゼアンカータンパク (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が、特にAKAP79/150はPKAのみならず、L型カルシウムイオンチャネルや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 (Scott et al, Circulation 2010)。PLC-TGマウスにおけるこれらの物質の蛋白発現について検討する。さらにPKC活性についても検討する。

## 4. 研究成果

(1) PLC-TGマウスにおいて、ジルチアゼムならびにトリクロルメチアジト投与後の収縮期血圧は同等であり、2群間に有意差を認めなかった。

エルゴノピン投与により誘発された冠攣縮は、ジルチアゼム投与により抑制されたが、トリクロルメチアジト投与では抑制されなかった ( $p < 0.05$ )。

(2) マウス大動脈におけるCav1.2の蛋白発現は、PLC-TGマウスにおいて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の発現は、PLC-TGマウスにおいて亢進し、さらにリン酸化蛋白の割合 ( $p\text{-Cav1.2}/\text{Cav1.2}$ ) はPLC-TGマウスにおいて有意に亢進していた。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。

(3) マウス大動脈におけるIP3R-1ならびにAKAP蛋白の発現は、2群間に有意差を認めなかった。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。

以上のことから、Cav1.2ならびにそのリン酸化の変化が冠攣縮の病態に関与してい

ることが示唆され、カルシウム拮抗薬によるL型カルシウムチャネルの直接阻害と同時に、PKC抑制を介したL型カルシウムチャネルリン酸化の抑制が、カルシウム拮抗薬の冠攣縮の抑制機序であ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4件)

Ong DS, Lee JS, Soeda T, Higuma T, Minami Y, Wang Z, Lee H, Yokoyama H, Yokota T, Okumura K, Jang IK. Coronary Calcification and Plaque Vulnerability: An Optical Coherence Tomographic Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016 in press. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.115.003929. 査読有.

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. 査読有.

Yokota T, Tomita H, Mori Y, Kudo T, Hiraga H, Suto N, Higuma T, Abe N, Hanada H, Osanai T, Okumura K. 論文標題: Imidapril and enalapril similarly inhibit plasma matrix metalloproteinase activities and attenuate left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63:528-32. doi: 10.1097/FJC.000000000000077. 査読有.

Endo T, Tomita H, Higuma T, Abe N, Kushibiki M, Saitoh S, Yamada M, Yokota T, Echizen T, Yokoyama H, Tateyama S, Suzuki A, Ishida Y, Murakami K, Osanai T, Okumura K. Low serum eicosapentaenoic acid level is a risk for ventricular arrhythmia in patients with acute myocardial infarction: a possible link to

J-waves. Heart Vessels. 2014;29:847-54.  
doi: 10.1007/s00380-013-0435-x. 査読有.

〔学会発表〕(計 6 件)

Takashi Yokota, Takumi Higuma, Tomo Kato, Yuichi Tsushima, Fumie Nishizaki, Kei Izumiyama, Hiroaki Yokoyama, Masahiro Yamada, Hirofumi Tomita, Ken Okumura, Prasugrel Versus Clopidogrel for Residual Thrombus Burden: An Optical Coherence Tomography Study. 第 80 回日本循環器学会学術集会、平成 28 年 3 月 18 - 20 日、仙台国際センター他(宮城県仙台市)

横田貴志、加藤朋、對馬迪子、西崎史恵、泉山圭、横山公章、山田雅大、富田泰史、樋熊拓未、奥村謙、ステント留置術後の円錐枝の閉塞により Brugada 症候群様の心電図変化を示し、その後心室細動を来した 1 症例、第 38 回日本心血管インターベンション治療学会 東北地方会、平成 27 年 7 月 25 日、酒田市公益ホール、(山形県酒田市)

横田貴志、市川博章、木村嘉宏、大和田真玄、今田篤、藤野安弘、Drug Coated Balloon (DCB)で no-flow を来したステント内再狭窄の 1 例、第 37 回日本心血管インターベンション治療学会 東北地方会、平成 27 年 1 月 17 日、いわて県民情報交流センター アイーナ(岩手県盛岡市)

横田貴志、木村嘉宏、大和田真玄、今田篤、藤野安弘、阿部慎一、森康宏、血栓溶解薬の冠動脈投与が有効であった 3 症例、第 36 回日本心血管インターベンション治療学会 東北地方会、平成 26 年 7 月 19 日、弘前文化センター(青森県弘前市)

Yuji Ishida, Hirofumi Tomita, Takashi Yokota, Shuji Shibutani, Tomohide Endo, Akiko Suzuki, Kazuo Murakami, Tomohiro Tanno, Takahiko Kinjo, Makoto Tanaka, Tomohiro Osanai, and Ken Okumura. Altered expression and phosphorylation levels of L-type calcium channel play a critical role in the mouse model of coronary spastic angina. 第 78 回

日本循環器学会学術集会、平成 26 年 3 月 21 - 23 日、東京国際フォーラム他(東京)

Yuji Ishida, Hirofumi Tomita, Takashi Yokota, Shuji Shibutani, Tomohide Endo, Akiko Suzuki, Kazuo Murakami, Tomohiro Tanno, Takahiko Kinjo, Tomohiro Osanai, and Ken Okumura. Altered expression and phosphorylation levels of L-type calcium channel play a critical role in the mouse model of coronary spastic angina. The American Heart Association's Scientific Sessions 2013, 平成 25 年 11 月 16 - 20 日, Dallas 米国

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 貴志 (YOKOTA TAKASHI)

弘前大学医学部附属病院 助教

研究者番号：40624888

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：