

令和元年5月31日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09489

研究課題名(和文)カルシウム感受性制御を介した冠攣縮性狭心症の新たな機序解明と治療戦略

研究課題名(英文)Elucidation of novel mechanism and development of treatment strategy for coronary spastic angina through regulation of calcium sensitization

研究代表者

富田 泰史(Tomita, Hirofumi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：00431437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Aキナーゼアンカータンパク(A-kinase anchoring proteins, AKAP)ノックアウトマウスにおいて、カルシウム感受性に関与しているカルモジュリンキナーゼII(CaMKII)の発現亢進によって冠攣縮が引き起こされることを初めて明らかにした。さらに、遮断薬であるカルベジロールの冠攣縮抑制効果を明らかにした。本研究は冠攣縮性狭心症の新たな機序解明のみならず、新規治療法の開発にも寄与する可能性があり十分に意義深い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでカルベジロールの冠攣縮に対する効果は全く検討されておらず、本研究の成果は新しい作用機序に基づく新たな冠攣縮性狭心症治療の開発に寄与する可能性がある。臨床的にもカルシウム拮抗薬抵抗性の難治性冠攣縮性狭心症患者は少なくなく、その機序解明ならびに治療法の開発への応用が期待される。さらに冠攣縮は異型狭心症のみでなく、一部の労作狭心症や急性心筋梗塞症、突然死の病態にも関与する。本研究はこれらの疾患に対する新しい治療法の開発という点においても十分に意義深い。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we first showed that coronary spasm was induced in A-kinase anchoring protein knockout mice with enhanced calcium sensitization, which was supported by increased expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Furthermore, we clarified inhibitory effects of carvedilol on coronary spasm in this mouse model. The present study may help better understand mechanism of the coronary spasm and contribute to the development of novel treatment strategy for coronary spastic angina.

研究分野：循環器内科学

キーワード：冠攣縮 カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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収縮刺激に対する過剰反応を特徴とする。平滑筋の収縮に重要な 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は、膜分画 PLC 活性が亢進しており、その主体は PLC-delta 1 であることを報告した (JACC 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 活性が亢進し、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 マウス) を作製した。このマウスにアゴニスト (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、またアゴニスト刺激による冠動脈攣縮が観察された。これらのこと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を報告した (Circulation 2012)。

A キナーゼアンカータンパク (A-kinase anchoring proteins, AKAP)、特に AKAP79/150 は、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。我々は AKAP79/150 の冠攣縮における役割を検討するため、PLC-TG マウスと AKAP-KO マウスを交配し、PLC 過剰発現かつ AKAP79/150 蛋白が発現していないマウス (PLC-AKAP-KO) を作成した。予想に反し、PLC-AKAP-KO マウスではエルゴノピン投与による ST 上昇が全く抑制されなかった。それどころか、AKAP-KO マウスにエルゴノピンを投与すると、PLC-TG マウスと同様の ST 上昇が観察された。さらに重要な知見として、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平滑筋細胞と同等であり、全く亢進していなかった。

これらの知見から考えられる機序として、PLC-TG マウスでは L 型カルシウムチャンネル-AKAP/PKA/PKC を介して細胞内カルシウム濃度上昇が亢進し、結果的にカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の亢進を介して冠攣縮が引き起こされる。一方、AKAP-KO マウスでは細胞内カルシウム濃度上昇の亢進を伴わずに CaMKII が亢進するのではないかと、すなわち、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るのではないかと、という新しい機序に基づく冠攣縮誘発の可能性が示唆された。さらに遮断薬であるカルベジロールは CaMKII を抑制すると報告されている。臨床現場では冠攣縮性狭心症患者に遮断薬の単独投与は禁忌であるが、その点に関してはプロプラノロール投与により狭心症発作が増悪したという報告があるのみであり、カルベジロールの冠攣縮に対する効果は全く検討されていない。

2. 研究の目的

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。その機序は細胞内カルシウムイオン濃度上昇の亢進であり、その視点からこれまで多くの研究が行われてきた。一方、最近我々は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を伴わない冠攣縮の動物モデルを見出した。本研究の目的は、冠攣縮の新しい機序としてのカルシウム感受性亢進の関与を、その中心となる CaMKII との関連において明らかにすることである。さらにカルシウム感受性亢進を抑制するとされるカルベジロールの冠攣縮抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) AKAP-KO マウスにおける冠攣縮の誘発

AKAP-KO マウスに経静脈的にエルゴノピン (30 mg/kg) を投与し、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) により冠攣縮誘発の有無を検討した。

(2) 細胞内カルシウム濃度ならびに CaMKII 発現の検討

野生型マウスと AKAP-KO マウスの大動脈を速やかに摘出し、Explant 法により血管平滑筋細胞を培養した。アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇を Fura-2 により測定した。さらにカルシウム感受性関連物質である CaMKII の遺伝子発現ならびに蛋白発現を Real-time RT-PCR 法ならびに Western blot 法にて検討した。

(3) AKAP-KO マウスにおける冠攣縮に及ぼすカルベジロールの影響

AKAP-KO マウスを用いて、経静脈的エルゴノピン (30 mg/kg) 投与により誘発された冠攣縮が、カルベジロール (19 mg/kg/日、ミニポンプ Alzet model 2002、DURECT により 14 日間投与) により抑制されるかどうかを、三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン + ミダゾラム + 酒石酸ブトルファノール) による麻酔下で、体表面心電図による心電図変化により検討した。さらに CaMKII 抑制作用を有さない他の遮断薬 (プロプラノロール 10 mg/kg/日、Alzet model 2002 により 14 日間投与) を用いて同様の実験を行い、遮断薬による冠攣縮抑制がカルベジロール特有の効果である可能性を検討した。

(4) AKAP5 遺伝子変異の検討

冠攣縮性狭心症患者より得られたゲノム DNA を使用し、AKAP5 (マウスの AKAP79/150 に相当) の遺伝子変異を検討した。AKAP5 遺伝子は 1282 塩基のエクソン 1 個からなり、3 個の primer

setにてAKAP遺伝子エクソンの全領域を検討可能である。直接DNAシーケンス法にて、冠攣縮性狭心症患者群ならびにコントロール群で遺伝子変異の有無を比較検討した。変異が存在した場合には、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異(non-synonymous substitution)かどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) AKAP-KO マウスにおける冠攣縮の誘発

AKAP-KO マウスにエルゴノピンを投与したところ、体表面心電図にてST上昇が観察された(5匹中4匹でST上昇あり)。一方、野生型マウス(n=5)では全てのマウスにおいてST上昇は観察されなかった(p<0.05)。

(2) 細胞内カルシウム濃度ならびにCaMKII発現の検討

AKAP-KO マウス由来の血管平滑筋細胞では、アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇は、野生型マウス由来の血管平滑筋細胞と同等であった(AKAP-KO 110 ± 14 nM vs 野生型 111 ± 19 nM, n=5, p=ns)。AKAP-KO マウスの血管平滑筋細胞における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有意に増加していた。

(3) AKAP-KO マウスにおける冠攣縮に及ぼすカルベジロールの影響

カルベジロールをAKAP-KO マウスに投与し冠攣縮を誘発したところ、6匹中3匹でST上昇が抑制された。一方、遮断薬であるプロプラノロールをAKAP-KO マウス(n=5)に投与しても、全てのマウスにおいてST上昇が抑制されなかった(p<0.05)。

(4) AKAP5 遺伝子変異の検討

冠攣縮性狭心症患者62名ならびにコントロール群64名より得られたゲノムDNAを使用し、AKAP5の遺伝子変異を検討した。冠攣縮性狭心症患者7名ならびにコントロール群5名に203番目のアミノ酸置換を伴うヘテロ遺伝子変異(イソロイシン スレオニン)を認めた。さらにコントロール群1名では、同部位のホモ遺伝子変異を認めた(2群間にはカイニ乗検定による有意差なし)。さらに、遺伝子変異を伴う冠攣縮性狭心症患者では71%(7名中5名)に多枝冠攣縮を認めたが、遺伝子変異を伴わない冠攣縮性狭心症患者では51%(55名中28名)に認めるのみであった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Ichikawa H, Shimada M, Narita M, Narita I, Kimura Y, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Rivaroxaban, a direct factor Xa inhibitor, ameliorates hypertensive renal damage through inhibition of the inflammatory response mediated by protease-activated receptor pathway, J Am Heart Assoc, 査読有、8巻、2019、e012195
DOI: 10.1161/JAHA.119.012195.

Tomita H, Sasaki S, Hagii J, Metoki N, Covert atrial fibrillation and atrial high-rate episodes as a potential cause of embolic strokes of undetermined source: their detection and possible management strategy, J Cardiol, 査読有、72巻、2018、1-9
DOI: 10.1016/j.jjcc.2018.03.002.

Kimura Y, Yamada M, Hanada K, Endo T, Narita N, Narita M, Senoo M, Yonekura M, Ichikawa H, Kurauchi S, Nakaji S, Okumura K, Tomita H, The relationship of serum eicosapentaenoic acid levels with J-waves in a general population: Analysis of the Iwaki Health Promotion Project, Int Heart J, 査読有、59巻、2018、736-740
DOI: 10.1536/ihj.17-434.

Yonekura M, Kondoh N, Han C, Toyama Y, Ohba T, Ono K, Itagaki S, Tomita H, Murakami M, Medaka as a model for ECG analysis and the effect of verapamil, J Pharmacol Sci, 査読有、137巻、2018、55-60
DOI: 10.1016/j.jphs.2018.04.003

Ichikawa H, Narita I, Narita M, Tanno T, Yokono Y, Kimura Y, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Blood pressure-independent effect of olmesartan on albuminuria in mice overexpressing renin: Its beneficial role in the ACE2/Ang (1-7)/Mas axis and NADPH oxidase expression, Int Heart J, 査読有、59巻、2018、1445-1453
DOI: 10.1536/ihj.17-582

Shiroto H, Tomita H, Hagii J, Metoki N, Fujita A, Kamada T, Takahashi K, Saito S, Sasaki S, Hitomi H, Seino S, Baba Y, Uchizawa T, Iwata M, Matsumoto S, Yasujima M, Okumura K, Impact of atrial natriuretic peptide value for predicting paroxysmal atrial fibrillation in ischemic stroke patients, J Stroke Cerebrovasc Dis, 査読有、26巻、2017、772-778
DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.10.016.

Nishizaki K, Itoh T, Kimura M, Tsushima Y, Shoji Y, Kinjo T, Ishida Y, Sasaki K, Horiuchi D, Sasaki S, Tomita H, Okumura K, Safety and efficacy of contemporary catheter ablation for atrial fibrillation patients with a history of cardioembolic stroke in the era of direct oral anticoagulants, J Cardiol, 査読有、70巻、2017、86-91

DOI : 10.1016/j.jjcc.2016.10.001.

Sasaki S, Shoji Y, Ishida Y, Kinjo T, Tsushima Y, Seno M, Nishizaki F, Itoh T, Izumiyama K, Yokota T, Yokoyama H, Yamada M, Horiuchi D, Kimura M, Higuma T, Tomita H, Okumura K, Potential roles of the wearable cardioverter-defibrillator in acute phase care of patients at high risk of sudden cardiac death: A single-center Japanese experience, J Cardiol, 査読有、69 巻、2017、359-363

DOI : 10.1016/j.jjcc.2016.08.004.

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- δ 1 overexpression: its possible role in coronary artery spasm, Fundam Clin Pharmacol, 査読有、31 巻、2017、383-391

DOI: 10.1111/fcp.12269

Hagii J, Tomita H, Metoki N, Tamai Y, Saito S, Shiroto H, Hitomi H, Kamada T, Seino S, Takahashi K, Sasaki S, Yasujima M, Okumura K, Effect of rivaroxaban on prothrombin fragment 1+2 compared with warfarin in patients with acute cardioembolic stroke: Insight from its serial measurement, Thromb Res, 査読有、148 巻、2016、9-14

DOI: 10.1016/j.thromres.2016.10.011.

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, 査読有、20 巻、2016、679-688

DOI: 10.1007/s10157-015-1214-z

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, 査読有、67 巻、2016、503-509

DOI: 10.1097/FJC.0000000000000374.

[学会発表](計 18 件)

妹尾麻衣子, 花田賢二, 成田真人, 成田憲紀, 加藤朋, 工藤奈津美, 横野良和, 野坂匡史, 奥村謙, 長内智宏, 富田泰史, β -Arrestin 1 Negatively Regulates Intracellular Calcium Concentration in Acetylcholine M3 Receptor: Its Possible Role in Coronary Spastic Angina, 第 83 回日本循環器学会学術集会、2019

澁谷修司, 遠藤知秀, 西崎史恵, 花田賢二, 横山公章, 横田貴志, 富田泰史, Mutational Analysis of SUR2 Gene in Japanese Patients with Coronary Spastic Angina, 第 83 回日本循環器学会学術集会、2019

横野良和, 成田真人, 花田賢二, 野坂匡史, 加藤朋, 工藤奈津美, 對馬迪子, 外山佑一, 妹尾麻衣子, 成田憲紀, 米倉学, 長内智宏, 富田泰史, Blockade of Protease Activated Receptor-1 Attenuates Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Renin-overexpressing Hypertensive Mice, 第 83 回日本循環器学会学術集会、2019

横野良和, 成田真人, 妹尾麻衣子, 成田憲紀, 米倉学, 花田賢二, 島田美智子, 田中真実, 長内智宏, 富田泰史, レニン過剰発現マウスを用いたプロテアーゼ活性化受容体シグナル伝達抑制を介した心保護作用の検討, 第 41 回日本高血圧学会総会、2018

Kudo N, Kimura Y, Hanada K, Kato T, Tsushima M, Toyama Y, Yokono Y, Senoo M, Narita N, Narita M, Yonekura M, Ichikawa H, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, p122RhoGAP/DLC-1 Overexpression Enhances Intracellular Calcium Concentration and Causes Coronary Spasm: Potential Role for Coronary Spastic Angina, American Heart Association Scientific Sessions 2018, 2018

Narita N, Hanada K, Kawamura Y, Nozaka M, Kato T, Kudo N, Yokono Y, Senoo M, Narita M, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Carvedilol Suppresses Coronary Spasm in A-Kinase Anchoring Protein 150 Knockout Mice: Its Novel Therapeutic Role in Coronary Spastic Angina, American Heart Association Scientific Sessions, 2018

Narita M, Hanada K, Yokono Y, Senoo M, Narita N, Kudo N, Kato T, Nozaka M, Kawamura Y, Tanaka M, Shimada M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Inhibitory Effects of Rivaroxaban, a Direct Factor Xa Inhibitor, on Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Renin-Overexpressing Hypertensive Mice, American Heart Association Scientific Sessions 2018, 2018

Narita M, Hanada K, Yokono Y, Narita N, Senoo M, Kimura Y, Ichikawa H, Shimada

M, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, A direct factor Xa inhibitor, rivaroxaban, attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in renin-overexpressing hypertensive mice., European Society of Cardiology Congress 2018, 2018
田中真実, 長内智宏, 奥村謙, 富田泰史, Experimental Study for Elucidating Mechanism of Coronary Spasm Using iPSC; Role of p122 RhoGAP/DLC-1 and Phospholipase C, 第 82 日本循環器学会学術集会, 2018
Senoo M, Hanada K, Ichikawa H, Kimura Y, Narita M, Narita N, Kato T, Kudo N, Yokono Y, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Involvement of Beta-arrestin-mediated Signaling in Acetylcholine M3 Receptor: Its Possible Role in Coronary Spastic Angina, 第 82 日本循環器学会学術集会, 2018
Narita M, Yamada M, Kurauchi S, Nakaji S, Tomita H, A Novel Electrocardiographic Criterion for the Diagnosis of Left Ventricular Hypertrophy in the Japanese General Population, 第 82 日本循環器学会学術集会, 2018
Kimura Y, Hanada K, Senoo M, Narita N, Narita M, Yonekura M, Ichikawa H, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, p122RhoGAP/DLC-1 Overexpression Enhances Intracellular Calcium Concentration in Response to Acetylcholine in Isolated Vascular Smooth Muscle Cells, 第 82 日本循環器学会学術集会, 2018
市川博章, 成田真人, 横野良和, 加藤朋, 木村嘉宏, 妹尾麻衣子, 成田憲紀, 工藤奈津美, 田中真実, 長内智宏, 奥村謙, 富田泰史, Rivaroxaban ameliorates hypertensive renal damage through inhibition of protease-activated receptor pathways in mice overexpressing renin, 第 82 日本循環器学会学術集会, 2018
市川博章, 島田美智子, 成田真人, 木村嘉宏, 妹尾麻衣子, 成田憲紀, 米倉学, 田中真実, 長内智宏, 奥村謙, 富田泰史, 第 Xa 因子阻害薬リバーロキサバンの高血圧性腎障害保護作用の検討, 第 40 回日本高血圧学会総会, 2017
Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Experimental Study for Elucidating Mechanism of Coronary Spasm Using ipsc-derived Smooth Muscle Cells; Role of P122 Rhogap /DLC-1 and Phospholipase C, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2017, 2017
Ichikawa H, Shimada M, Narita M, Kimura Y, Senoo M, Narita N, Yonekura M, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, Rivaroxaban, a direct factor Xa inhibitor, ameliorates angiotensin II-induced renal damage through inhibition of protease-activated receptor pathway-mediated inflammatory response, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2017, 2017
Nishizaki K, Narita N, Senoo M, Narita M, Yonekura M, Kimura Y, Ichikawa H, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, 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
Senoo M, Hanada K, Nishizaki K, Ichikawa H, Kimura Y, Narita N, Narita M, Yonekura M, Tanaka M, Osanai T, Okumura K, Tomita H, 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

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥村謙
ローマ字氏名：Ken Okumura
所属研究機関名：弘前大学
部局名：医学研究科
職名：客員研究員
研究者番号（8桁）：20185549

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。