

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09645

研究課題名(和文) EDHF産生機構が高血圧で障害される機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of impaired EDHF during hypertension.

研究代表者

後藤 健一 (Goto, Kenichi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30549887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、(1)ラットの腸間膜動脈の内皮細胞では、TRPV4チャンネルが機能的に発現していること、(2)アセチルコリンは内皮のTRPV4チャンネルを開口し、シグナル経路下流のSKCaとIKCaチャンネルを活性化させることで内皮依存性過分極(EDH)を介した反応を惹起すること、(3)遺伝性高血圧ラットでは正常血圧ラットと比し、内皮のTRPV4とSKCaチャンネルの発現が低下しており、これらのチャンネルの発現低下が遺伝性高血圧ラットの腸間膜動脈におけるEDHを介した反応の障害に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧において内皮依存性弛緩反応は障害されており、内皮機能障害は高血圧患者における心血管疾患の発症と関連している。したがって、高血圧における内皮機能障害の機序を解明すること、内皮機能障害の有効な治療法を開発することは臨床的にも重要である。本研究により、遺伝性高血圧ラットにおける内皮依存性過分極反応の障害が、血管内皮細胞におけるTRPV4とSKCaチャンネルの発現低下に起因することが明らかとなった。今後、高血圧患者において、TRPV4とSKCaチャンネルを標的とした心血管疾患の新たな予防法や治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The results of the present study demonstrated that: (1) functional TRPV4 is expressed in endothelial cells of rat mesenteric arteries; (2) the opening of endothelial TRPV4 channels and the downstream activation of SKCa and IKCa are involved in ACh-induced, EDH-mediated responses in this vascular bed; (3) endothelial TRPV4 and SKCa channels are downregulated in genetically hypertensive rats but not in normotensive rats, contributing to the impaired EDH-mediated responses in mesenteric arteries of genetically hypertensive rats.

研究分野：高血圧、血管内皮機能

キーワード：血管内皮機能 高血圧 内皮依存性過分極 TRPV4チャンネル カルシウム感受性カリウムチャンネル ラット

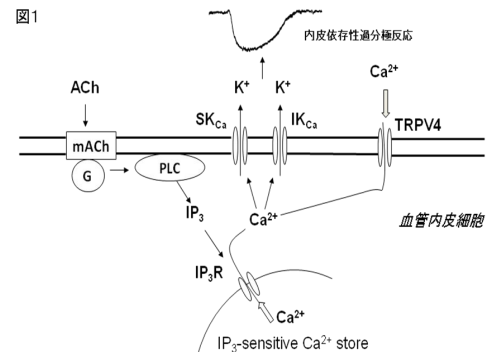
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮は、内皮由来一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリンなどの種々の内皮由来因子を産生・放出し、血管平滑筋の緊張調節に極めて重要な役割をはたしている。これら血管弛緩因子の産生放出以外にも、血管内皮細胞の膜電位過分極 (Endothelium dependent hyperpolarization: EDH) が内皮平滑筋間に存在するギャップジャンクションを介して血管平滑筋に電氣的に伝播され血管平滑筋が過分極されることも内皮依存性の血管弛緩反応に関与している。血圧調節に関する抵抗血管レベルでは、内皮依存性弛緩反応の大部分が EDH により惹起されることが知られている。EDH の標的イオンチャネルの一つである小コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル (SKCa) ノックアウトマウスでは EDHF 反応の減弱とともに血圧上昇をきたすことが報告されており (Brahler et al. Circulation 2009) EDH 産生調節機構の破綻は、細小血管レベルでの血管内皮機能障害を惹起し、高血圧の発症や進展に至ると考えられる。

申請者らのグループは、ヒト本態性高血圧のモデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR) では正常血圧ラット (WKY) と比べて、EDH を介した内皮依存性過分極・弛緩反応が減弱しており、EDH 反応の減弱が、SHR でみられる血管内皮機能障害の一因となっていることを明らかにし (Fujii et al. Circ Res 1992) 高血圧病態下で EDH 反応が障害される機序の解明を目指して一連の研究を行ってきた (Onaka et al. Circulation 1998, Goto et al. Hypertension 2000, Goto et al. J Physiol 2004, Kansui et al. Am J Physiol 2004, Goto et al. J Hypertens 2007, Goto et al. Hypertens Res 2012)。しかしながら、その機序は未だ明らかにされていない。

EDH を介した過分極反応は、IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>ストアからの Ca<sup>2+</sup>放出により、血管内皮の小コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル (SKCa) および中コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル (IKCa) が活性化されることにより惹起される。IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>ストアの Ca<sup>2+</sup>が枯渇した後は、TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) チャンネルが開口することで内皮細胞へ Ca<sup>2+</sup>が持続的に流入し、SKCa および IKCa が活性化されることで、EDH を介した過分極反応が持続する (Sonkusare et al. Science 2012) (図1)。



TRPV4 チャンネルは血管内のシェアストレスで活性化され、内皮依存性の血管弛緩を惹起することが報告されている (Mendoza SA et al. Am J Physiol 2010) したがって、TRPV4 チャンネルや、その下流にある KCa チャンネルは、生体内においても EDH 反応を惹起させ、血管緊張調節に重要な役割をはたしていると考えられ、TRPV4-KCa 経路を介した膜電位調節機構の破綻は、高血圧の発症・進展に寄与すると考えられる。しかしながら、高血圧病態下での TRPV4 チャンネルや KCa チャンネルの病態生理については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

申請者らは、これまでの一連の研究により、長期にわたる高血圧の持続により、血管内皮由来過分極 (EDH) を介した内皮依存性過分極・弛緩反応が障害され、高血圧に伴う血管内皮機能障害の一因となることを明らかにしてきた。しかし、そのメカニズムは不明である。本研究では、高血圧病態下における EDH 反応の障害に、血管内皮細胞のイオンチャネルの

障害が関与するとの仮説を立て、生理学および分子生物学的側面から検証を行う。さらに、近年、慢性炎症と血管機能障害との関連が示唆されているが、慢性炎症と EDH との関係について検討されたものはなく、慢性炎症とイオンチャネルとの関係についても検討を行う。本研究課題の遂行を通じ、高血圧に伴う血管内皮機能障害のメカニズムの一端を解明し、血管内皮機能障害の新たな治療法開発への足がかりをつかみたい。

### 3. 研究の方法

実験には、20 週齢の雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) および正常血圧コントロールとして同週齢の Wistar Kyoto ラット (WKY) の摘出腸間膜動脈を用いる。まずは、高血圧に伴う EDH 反応の障害が、EDH の標的イオンチャネル (TRPV4, SKCa, IKCa) の機能の低下に起因するかを、微小電極法、等尺性収縮法を用いた生理・薬理学的実験によって検討する。EDH の標的イオンチャネル (SKCa, IKCa, TRPV4) の生理機能を調べるために、SKCa, IKCa, TRPV4 の特異的なアゴニストとして、それぞれ CyPPA, 1-EBIO, GSK1016790A を用い、微小電極法による血管平滑筋の膜電位変化と等尺性張力法による血管弛緩反応について、CyPPA, 1-EBIO, GSK1016790A それぞれの薬剤に対する用量依存性の過分極・弛緩反応を記録する。また、SKCa, IKCa, TRPV4 の特異的なアンタゴニストとして、それぞれ apamin, TRAM-34, RN-1734 を用い、これらのアンタゴニストの EDH を介した過分極・弛緩反応への効果を調べることで、それぞれのイオンチャネルがどの程度 EDH を介した反応に寄与しているかを検討する。得られたデータについて、WKY と SHRSP で比較検討する。

次に、高血圧の病態下における EDH の標的イオンチャネル (TRPV4, SKCa, IKCa) の発現レベルについての検討を行う。20 週齢の SHRSP および同週齢の WKY の摘出腸間膜動脈を用い、EDH の標的イオンチャネル (TRPV4, SKCa, IKCa) の発現レベルについて、ウェスタンブロッティングによる蛋白発現解析を行う。さらに、チャネルの発現変化が血管内皮での変化を反映したものであるかを、免疫蛍光染色法を用いたチャネル蛋白の局在解析により確認する。さらに、EDH の標的イオンチャネルの機能や発現低下に、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 が関与している可能性について検討を行う。

### 4. 研究成果

WKY の腸間膜動脈において、EDH を介した反応は、SKCa, IKCa の阻害薬 (apamin+TRAM-34) により著明に抑制され、さらに TRPV4 の選択的阻害薬である RN-1734 および HC-067047 によって減弱した。SHRSP の腸間膜動脈において、EDH を介した過分極・弛緩反応は、WKY に比べて有意に減弱していた。TRPV4 のアゴニストである GSK1016790A は、WKY の腸間膜動脈において、用量依存性に過分極・弛緩反応を引き起こしたが、SHRSP の腸間膜動脈においては、わずかな過分極を惹起するものの、弛緩反応は消失していた。SKCa の選択的活性化薬である CyPPA による過分極・弛緩反応は、WKY の腸間膜動脈と比較して、SHRSP の腸間膜動脈において減弱していたが、減弱の程度は軽度であった。WKY の腸間膜動脈に比べ、SHRSP の腸間膜動脈では、血管内皮の TRPV4 と SKCa の蛋白発現は有意に低下していた。一方、SHRSP の腸間膜動脈において、IKCa の機能と発現は保たれていた。これらの結果から、SHRSP の上腸間膜動脈においては、血管内皮における TRPV4 と SKCa の発現低下が、EDH を介した反応の障害に関与している可能性が示唆された。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 の血中濃度は市販のキットを用いて測定をおこなったが、WKY, SHRSP いずれにおいても測定感度以下であり、慢性炎症と EDH の標的イオンチャネルの機能や発現低

下との関連については有意な所見を得ることはできなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Goto K, Ohtsubo T, Kitazono T. Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. Int J Mol Sci. 19:E315, 2018.
2. Seki T, Goto K, Kiyohara K, Kansui Y, Murakami N, Haga Y, Ohtsubo T, Matsumura K, Kitazono T. Downregulation of endothelial transient receptor potential vanilloid type 4 channel and small-conductance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underpins impaired endothelium-dependent hyperpolarization in hypertension. Hypertension 69:143-153, 2017.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Seki T, Goto K, Kiyohara K, Kansui Y, Murakami N, Haga Y, Ohtsubo T, Matsumura K, Kitazono T. Downregulation of endothelial transient receptor potential vanilloid type 4 channel and small-conductance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underpins impaired endothelium-dependent hyperpolarization in hypertension. 第41回日本高血圧学会総会 2017-10
2. Seki T, Goto K, Kiyohara K, Kansui Y, Murakami N, Haga Y, Ohtsubo T, Matsumura K, Kitazono T. Downregulation of endothelial transient receptor potential vanilloid type 4 channel and small-conductance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underpins impaired endothelium-dependent hyperpolarization in hypertension. 26<sup>th</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Korea, Seoul, Sep 24<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> 2016

〔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：  
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：  
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：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：関 拓紀

ローマ字氏名：Seki Takunori

研究協力者氏名：野口 英子

ローマ字氏名：Noguchi Hideko

研究協力者氏名：大坪 俊夫

ローマ字氏名：Ohtsubo Toshio

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。