

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08610

研究課題名(和文)新規Ca²⁺輸送体候補分子の心肥大・心不全発症機序の解明と創薬への応用研究研究課題名(英文)Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy/heart failure by Ca²⁺ transporter candidates and its application to drug discovery

研究代表者

岩本 隆宏 (Iwamoto, Takahiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20300973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：SLCトランスポーターは、生体膜の基質輸送を司る膜タンパク質群である。我々は、標的SLC輸送体分子が新規なCa²⁺輸送体であることを実験的に検証した。標的SLC輸送体分子の心筋特異的高発現マウスを作製したところ、心肥大形成、心機能低下および早期の突然死が認められた。また、これらマウスの培養心筋細胞では、野生型マウスと比較して、異常なCa²⁺トランジェントが観察された。これらの結果は、標的SLC輸送体分子の発現増加が心肥大・心不全を誘導する可能性を示唆している。今後、標的SLC輸送体分子を標的とした創薬応用を追求して行きたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SLCトランスポーター群の中から新規なCa²⁺輸送体(標的SLC輸送体分子)を見出した。この遺伝子改変マウスを用いた病態生理学的解析から、標的SLC輸送体分子は、心肥大・心不全の誘発因子である可能性が示唆された。本研究成果は、心肥大・心不全の病態解明に貢献するのみならず、新たな心不全治療薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Solute carrier (SLC) transporters are membrane proteins that facilitate the transport of substrates across biological membranes. We confirmed that the targeted SLC transporter can transport Ca²⁺, using mammalian cell expression system. Interestingly, cardiac-specific transgenic mice of the target SLC transporter exhibited cardiac hypertrophy, reduced cardiac function, and early sudden death. Furthermore, we observed abnormal Ca²⁺ transients in cultured cardiac myocytes from the cardiac-specific transgenic mice. These results suggest that upregulation of the targeted SLC transporter may induce cardiac hypertrophy/heart failure. We established the screening system for the specific inhibitors, which might be useful therapeutically.

研究分野：分子薬理学

キーワード：イオン輸送体 心不全 心肥大 病態モデル動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX)の各種遺伝子改変マウスや特異的阻害薬を開発・応用することにより、NCXの生理学的・病態学的役割の解析を一貫して行ってきた(臨床薬理 46:30-32, 2015)。これまでに、NCXは、食塩感受性高血圧症(Nat. Med. 10:1193-1199, 2004)、脳虚血再灌流障害(BBRC. 429:186-190, 2012)、臍島移植時の早期臍島障害(Am. J. Transplant. 13:2154-2160, 2013)、遠位尿細管 Ca^{2+} 再吸収(BBRC. 456:670-675, 2015)に関与していることを報告した。研究代表者は、これらの研究プロジェクトを推進する中で、SLC トランスポーター群の中からNCXと同等の Na^+ 依存性 Ca^{2+} 輸送活性を有する新規な Ca^{2+} 輸送体(標的SLC輸送体分子)を見出した。標的SLC輸送体分子は心臓に発現が認められるため、心機能(興奮-収縮連関)における生理学的役割を検討する目的で、心筋特異的高発現マウスを作製したところ、そのマウスでは顕著な心肥大・心不全(拡張型心筋症様の病像)が誘導されることを見出した。この拡張型心筋症様の表現型は、研究代表者が以前に作製した心筋特異的NCX1(活性型)高発現マウスでも観察されており、この表現型類似性からも標的SLC輸送体分子はNCX様の Na^+ 依存性 Ca^{2+} 輸送体である可能性が推察された。本研究では、標的SLC輸送体分子が新規な Na^+ 依存性 Ca^{2+} 輸送体であることを実証し、その機能的・病態生理学的役割の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、標的SLC輸送体分子が新規な Ca^{2+} 輸送体であることを実験的に証明するとともに、標的SLC輸送体分子の各種遺伝子改変マウス(心筋特異的高発現マウス、遺伝子欠損マウス)を作製して、その生理学的役割および心不全発症における病態学的意義を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) Ca^{2+} 輸送特性の *in vitro* 解析

標的SLC輸送体分子の安定発現細胞(CCL39線維芽細胞)を作製して、 Na^+ 依存性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 輸送活性(Mol Pharmacol. 70:2075-83, 2006)およびイオン輸送電流(Pflügers Arch. 468:693-703, 2016)を測定した。

(2) 心筋特異的高発現マウス及び遺伝子欠損マウスの *in vivo* 心機能解析

MHCプロモーターを用いて標的SLC輸送体分子の心筋特異的高発現マウスを作製した。マウスの心機能・形態について、心重量/体重比測定、心肥大マーカー解析、心臓病理解析、血圧・心拍数測定、心エコー解析(Mモード)を実施し、野生型マウスと比較した。さらに、標的SLC輸送体分子の遺伝子欠損マウスを作製し、同様に心機能・形態を解析した。

(3) *in vivo* 心肥大・心不全モデル実験

野生型マウス、心筋特異的高発現マウスおよび遺伝子欠損マウスを用いて、圧負荷心不全モデル実験を実施した。(2)に準じて、心臓の器質的・機能的変化を解析し、野生型マウスの同モデルと比較した。

(4) *in vitro* 心筋機能解析

遺伝子改変マウスおよび野生型マウスから培養心筋細胞を調整し、 Ca^{2+} 蛍光色素(Fura-2/AM)の導入により、細胞質 Ca^{2+} シグナルをイメージング解析した。

4. 研究成果

(1) 標的SLC輸送体分子の Ca^{2+} 輸送特性

標的SLC輸送体分子の安定発現細胞(CCL39線維芽細胞)を作製して、 Na^+ 依存性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 輸送活性を測定したところ、1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)の約70%活性に相当する Ca^{2+} 輸送活性が計測できた。また、NCX1電流の測定法(Pflügers Arch. 468:693-703, 2016)に準じて、標的SLC輸送体分子の安定発現細胞のイオン電流を測定したところ、 Ca^{2+} キャリアーの実験条件により、内向き・外向き電流が計測できた。

(2) 遺伝子改変マウスの *in vivo* & *in vitro* 心機能解析

標的SLC輸送体分子の発現分布をreal-time PCRで解析したところ、心臓に発現が認められた。そこで、心機能(興奮-収縮連関)における標的SLC輸送体分子の役割を検討する目的で、標的SLC輸送体分子の心筋特異的高発現マウスを作製したところ、そのマウスは顕著な心肥大・心拡大(拡張型心筋症様の病像)、心機能低下および早期の突然死が認められた。この拡張型心筋症様の表現型は、研究代表者が以前に作製した心筋特異的NCX1(活性型)高発現マウスでも観察されており、この表現型類似性からも標的SLC輸送体分子が Na^+ 依存性 Ca^{2+} 輸送体である可能性が推察された。さらに、心筋特異的高発現マウスから培養心筋細胞を調整し、 Ca^{2+} 蛍光色素(Fura-2/AM)の導入により、細胞質 Ca^{2+} シグナルをイメージング解析したところ、野生型マウスと比較して、異常な Ca^{2+} トランジェントが認められた。一方、標的SLC輸送体分子の遺伝子欠損マウスでは、見かけ上正常な心機能・形態が観察された。現在、遺伝子改変マウスと野生型マウスの比較において、圧負荷心不全モデル実験を実施中である。

以上、本研究において、標的SLC輸送体分子が新規な Ca^{2+} 輸送体であることを実験的に証明し

た。標的 SLC 輸送体分子の心筋特異的高発現マウスでは、心肥大形成、心機能低下および早期の突然死が認められた。また、これらマウスの培養心筋細胞では、異常な Ca^{2+} トランジェントが観察された。これらの結果は、標的 SLC 輸送体分子の発現増加が心肥大・心不全を誘導する可能性を示唆している。現在、標的 SLC 輸送体分子に対する新規阻害薬スクリーニング系を確立しており、今後、標的 SLC 輸送体分子を標的とした創薬応用を追求して行きたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岩本隆宏、田頭秀章、喜多紗斗美	4. 巻 271
2. 論文標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体の構造・機能の解明から治療への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 42-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩本隆宏、田頭秀章、喜多紗斗美	4. 巻 271
2. 論文標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体の構造・機能の解明から治療への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 42-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriguchi S, Kita S, Fukaya M, Osanai M, Inagaki R, Sasaki Y, Izumi H, Horie K, Takeda J, Saito T, Sakagami H, Saïdo TC, Iwamoto T, Fukunaga K.	4. 巻 131
2. 論文標題 Reduced expression of Na ⁺ /Ca ²⁺ exchangers is associated with cognitive deficits seen in Alzheimer's disease model mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 291-303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2017.12.037.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bai X, Ihara E, Hirano K, Tanaka Y, Nakano K, Kita S, Iwamoto T, Ogino H, Hirano M, Oda Y, Nakamura K, Ogawa Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Endogenous Hydrogen Sulfide Contributes to Tone Generation in Porcine Lower Esophageal Sphincter Via Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 209-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2017.11.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriguchi S, Kita S, Inagaki R, Yabuki Y, Sasaki Y, Ishikawa S, Sakagami H, Iwamoto T, Fukunaga K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Aberrant Amygdala-Dependent Cued Fear Memory in Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger 1 Heterozygous Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 4381-4394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-018-1384-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriguchi S, Kita S, Yabuki Y, Inagaki R, Izumi H, Sasaki Y, Tagashira H, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Fukunaga K.	4. 巻 55(5)
2. 論文標題 Reduced CaM Kinase II and CaM Kinase IV Activities Underlie Cognitive Deficits in NCKX2 Heterozygous Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 3889-3900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-017-0596-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tagashira H, Nagata A, Kita S, Suzuki S, Iwasaki A, Iwamoto T.	4. 巻 45(1)
2. 論文標題 Calcium Signaling Abnormality in Pulmonary Arterial Hypertension.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Bull Fukuoka Univ.	6. 最初と最後の頁 45-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 岩本隆宏
2. 発表標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体の構造と機能 : NCX1変異解析とCaCa結晶構造の整合性
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田頭秀章、永田旭、喜多知、阿部弘太郎、岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋NCX1を介したCa ²⁺ シグナル異常は低酸素誘発性肺高血圧の発症に関与する
3. 学会等名 第49回日本心脈管作動物質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本隆宏
2. 発表標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体の構造と機能：NCX1変異解析とCaCA結晶構造の整合性
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Tomo Kit, Akinori Iwasaki, Kohtaro Abe, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Vascular smooth muscle NCX1 is involved in the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田頭秀章、永田旭、喜多知、阿部弘太郎、岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋NCX1を介したCa ²⁺ シグナル異常は低酸素誘発性肺高血圧の発症に関与する
3. 学会等名 第49回日本心脈管作動物質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本隆宏
2. 発表標題 教育講演: Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体のマニアックな研究法
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tagashira H, Nagata A, Kita S, Suzuki S, Abe K, Iwasaki A, Iwamoto T.
2. 発表標題 Vascular smooth muscle NCX1 is involved in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kita S, Tagashira H, Iwamoto T.
2. 発表標題 Involvement of variable interaction between Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger and sodium-transporting proteins in regulation of vascular tone.
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tagashira H, Nagata A, Kita S, Suzuki S, Abe K, Iwasaki A, Iwamoto T.
2. 発表標題 The role of vascular smooth muscle NCX1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.
3. 学会等名 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kita T, Tagashira H, Numata T, Kita S, Iwamoto T.
2. 発表標題 Characterization of transgenic mice overexpressing dominant negative TRPM7 mutant.
3. 学会等名 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本隆宏、田頭秀章、鈴木沙理、喜多紗斗美
2. 発表標題 新規Mg ²⁺ 代謝異常症モデルマウスを用いた心血管病態機序の解析
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田頭秀章、鈴木沙理、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 臓器特異的遺伝子改変マウスを用いた心血管Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体の機能解析
3. 学会等名 第70回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福岡大学医学部薬理学 http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/pharmaco/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田頭 秀章 (Tagashira Hideaki) (90735028)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	