

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11058

研究課題名(和文) protein kinase Dによる血管収縮制御の解明と血管障害への応用

研究課題名(英文) Role of protein kinase D in vasoconstriction

研究代表者

水野 祐介 (MIZUNO, Yusuke)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80433192

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)：プロテインキナーゼD (PKD) は細胞運動、心筋収縮、血管新生、平滑筋収縮など、様々な細胞プロセスや生理機能に関与することが知られてるが、血管機能におけるPKDの役割は不明であった。我々は、ラットにおける全身循環と大動脈の収縮におけるPKDの役割について、また、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMCs) を用いPKDアイソフォームの正確な役割を検討した。その結果、PKD1 は大動脈および全身循環の収縮に関与している可能性があり、PKD1による血管運動活性の制御は、MYPT1のリン酸化と関連している可能性がある。PKDの血管収縮における役割の解明は、新たな循環動態の制御につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管の過剰収縮は高血圧等の様々な病態に関わっており、高血圧の罹患率は我が国では60歳以上では50%を超えている。高血圧は心筋梗塞、脳梗塞等の様々な病態を引き起こすため、その予防、治療に多大な医療費が投入されている。しかしながら、血管障害発症の機序は未だ十分には解明されていない。PKDによる血管収縮の発症機序の一端を解明することは、新たな循環動態の制御につながる可能性があり、将来的な血管障害に対する予防治療に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Protein kinase D (PKD) is known to be involved in a variety of cellular processes and physiological functions, including cell motility, myocardial contraction, angiogenesis, and smooth muscle contraction, but the role of PKD in vascular function has been unknown. We investigated the role of PKD in systemic circulation and aortic contraction in rats and the exact role of PKD isoforms in human aortic smooth muscle cells (HASMCs). We found that PKD1 may be involved in contraction of the aorta and systemic circulation, and that regulation of vasomotor activity by PKD1 may be associated with phosphorylation of MYPT1. Elucidation of PKD may lead to novel regulation of circulation dynamics.

研究分野：麻酔科

キーワード：血管収縮 Protein kinase D MYPT1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ D (PKD) は、複数の分子の制御を通じて、細胞運動、心筋収縮、血管新生、平滑筋収縮など、様々な細胞プロセスや生理機能に関与することが知られている。これらの制御は血管運動活性と密接に関連していると推定されるが、血管機能における PKD の役割は不明である

2. 研究の目的

我々は、PKD の血管収縮および血管障害の関与の可能性を検討するための、ラットにおける全身循環と大動脈の収縮における PKD の役割について検討した。また、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMCs) を用いて RNA 干渉を行い、PKD アイソフォームの正確な役割を検討した。

3. 研究の方法

Sprague-Dawley ラットを用いて、大腿動脈から体血圧 (SBP)、心拍出量 (CO) および全身血管抵抗 (SVR) を測定した。また PKD 阻害剤 CRT0066101 の静脈内注射に伴う血行動態の変化を記録した。大動脈リングサンプルの等尺性張力を測定し、ノルエピネフリン (NE) 誘発収縮に対する CRT0066101 の抑制効果を検討した。血管運動活性における PKD の関与を検討するため、NE で刺激した PKD、ミオシン標的サブユニット-1 (MYPT1)、CPI-17、ミオシン軽鎖 (RLC) および熱ショックタンパク質 27 (HSP27) のリン酸化を大動脈収縮における経路の活性化の指標として計測した。HASMCs では、細胞内カルシウム濃度と NE 刺激による細胞短縮の同時測定を行った。HASMCs では、PKD1、2、3 をそれぞれ特異的 siRNA でノックダウンし、PKD、MYPT1、CPI-17、RLC のリン酸化とアクチン重合を測定した。

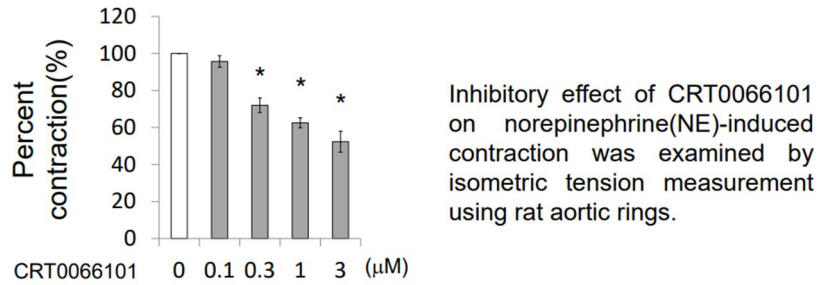
4. 研究成果

CRT0066101 は大動脈リング標本における NE 誘発収縮を用量依存的に抑制した。

(図 1)

図 1

Effect of CRT0066101, PKD inhibitor on isometric tension of rat aortic rings

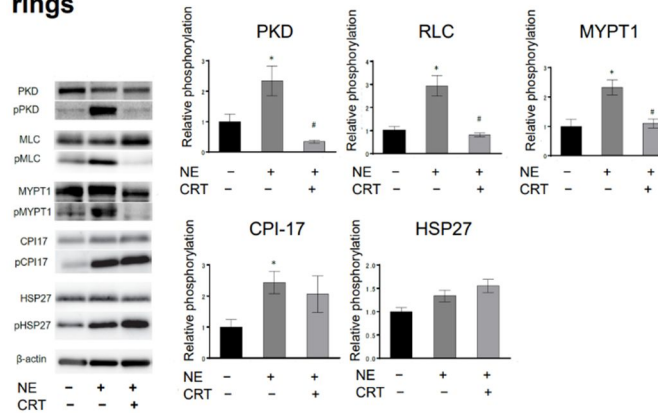


- Pretreatment of CRT0066101 decreased NE-induced contraction dose-dependently. *p < 0.05,

大腿動脈リング標本において NE 刺激は PKD , MYPT1 , RLC , CPI-17 のリン酸化を増加させ、CRT0066101 の前投与により CPI-17 以外のリン酸化は減少した。しかし NE はリング標本の HSP27 リン酸化を増加させなかった (図 2)

図 2

Effect of CRT0066101 on PKD1, RLC, MYPT1, CPI-17 and HSP27 phosphorylations in contracted rat aortic rings

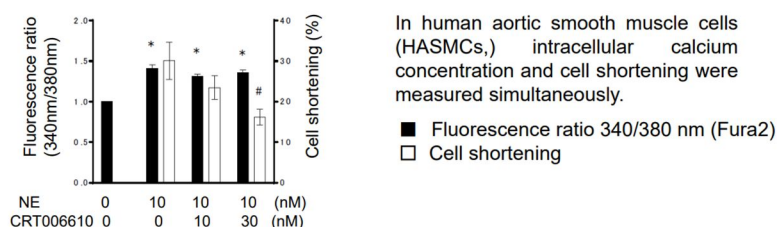


- NE increased phosphorylations of PKD, MYPT1, RLC and CPI-17 in rat aortic rings, which were attenuated by pretreatment of CRT0066101 except CPI-17. *p < 0.05,

CRT; CRT0066101, NE; norepinephrine, RLC; myosin regulatory light chain, MYPT1; myosin targeting subunit 1, HSP27; Heat shock protein 27

HASMCs において、NE は細胞収縮と細胞内カルシウム濃度の上昇を生じさせた。CRT0066101 はカルシウム濃度の上昇に影響を与えることなく、NE による細胞短縮を抑制した (図 3)。

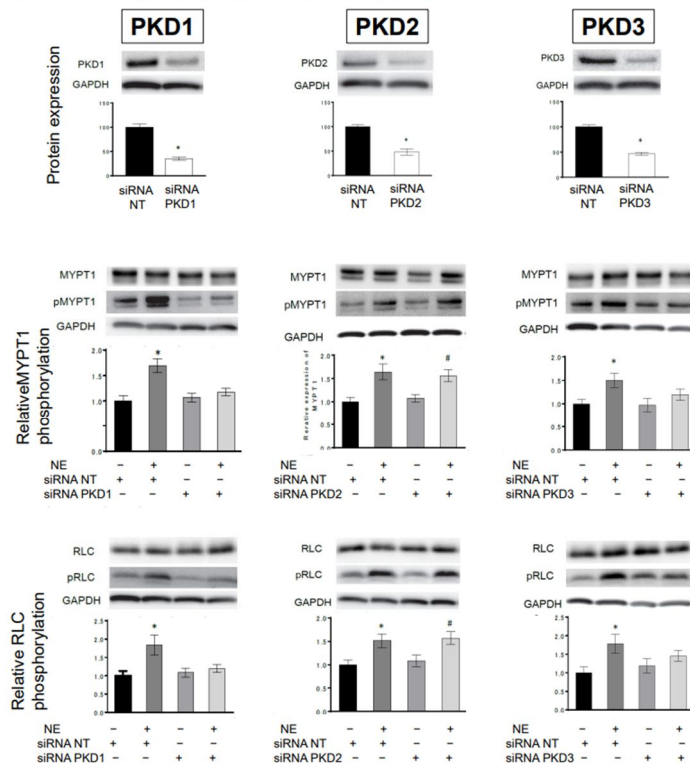
図 3 Effect of CRT0066101 on intracellular calcium concentration and cell shortening in human aortic smooth muscle cells



- CRT0066101 inhibited NE-induced cell shortening without affecting calcium concentrations
- *p < 0.05, #p < 0.05

HASMCs において、NE による MYPT1 および RLC のリン酸化の増加は、PKD1 によって有意に抑制されたが、PKD2, 3 ノックダウンでは抑制されなかった (図 4)。

図 4 Phosphorylation of MLC and MYPT1 in HASMCs silenced with PKD1, PKD2 and PKD3 siRNAs



- PKD1, PKD2, and PKD3 were knocked down by their specific siRNA respectively in HASMCs. NT; non-target.
- Knock down of PKD1, PKD3 attenuated NE-induced phosphorylation of MYPT1 and RLC.

これらの結果より、PKD 阻害剤、CRT0066101 による大動脈輪の NE 誘発収縮の減弱は、MYPT1 および RLC のリン酸化の減少に関連していたが、CPI-17 および HSP27 のリン酸化は減少していなかった。この結果を確かめるために行った HASMCs を用いた PKD1 のノックダウン実験では、NE 誘発の MYPT1 および RLC のリン酸化を減衰させた。また HASMCs において CRT0066101 は、アクチン重合および細胞内カルシウム制御に影響を与えることなく細胞収縮を減弱させた。

結論

以上より、PKD1 は NE 刺激の大動脈平滑筋収縮において、MYPT1 のリン酸化を制御することで収縮に影響を与えている可能性が示唆された。PKD1 は大動脈および全身循環の収縮に関与している可能性があり、PKD の解明は、新たな循環動態の制御につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Mizuno, Yoh Sugawara and Takahisa Goto
2. 発表標題 Roles and Mechanism of Protein Kinase D in Vasoconstriction
3. 学会等名 Experimental Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥真哉 長嶺祐介 菅原陽 水野祐介 後藤隆久
2. 発表標題 モノクローリン誘発肺高血圧症ラットの肺動脈におけるprotein kinase Dの役割の解明
3. 学会等名 第26回 日本心臓血管麻酔学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	古賀 資和 (KOGA Motokazu) (00637233)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701)	
研究分担者	渡辺 至 (WATANABE Itaru) (20534142)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	川上 裕理 (KAWAKAMI Hiromasa) (90407958)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関