

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590814

研究課題名 (和文) 血管平滑筋の病的リモデリングに関与するイオンチャネルの同定とその機能解析

研究課題名 (英文) Identification and its functional analysis of ion channels involving in pathophysiologic remodeling of vascular smooth muscle

研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA TOSHIAKI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50227790

研究成果の概要 (和文)：

血管平滑筋細胞は、正常の状態では、収縮型フェノタイプであり、主に収縮・弛緩機構に特化した細胞で、血圧を調整し、末梢組織への血流を確保する役目を果たしている。一方、動脈硬化巣あるいはバルーン障害などの病変血管では、血管平滑筋は筋原繊維に乏しく、また高い遊走能や増殖能 (増殖型フェノタイプ) を示すことが多い。この結果、動脈硬化巣では、血管の再構築 (リモデリング) が引き起こされ、血管中膜層の肥厚が生じると考えられる。我々は、培養ヒト及びウサギ大動脈平滑筋細胞には、 I_{Na} が発現すること、さらに、このチャネルは、SCN9A 遺伝子にてコードされた Nav1.7 から構成されて、これが、細胞の遊走と食食に関与すること、さらに、ウサギでのバルーン傷害モデルで傷害 48 時間後の血管中膜の平滑筋細胞にも SCN9A は発現しており、これは血管中膜での細胞の遊走や食食を介して内膜増殖に関与している可能性があることなどを報告した。一方、リソフォスファチジルコリン (LPC) および血清アミロイド A (SAA) はいずれも冠動脈疾患においてその血中濃度が上昇することが報告されているが、近年、これらの物質は疾患のマーカーとしての役割のみならず、物質そのものが粥状硬化を促進する作用があることが示唆されている。しかし、その具体的な分子生物学的作用については不明な点が多い。そこで、さらに、LPC 及び SAA のヒト冠動脈平滑筋に対する作用について、TRP チャネルおよびシグナル伝達経路という観点から検討した。その結果、LPC および SAA による細胞内へのカルシウムイオン流入には TRP チャネルが関与していること、さらに、これが、ヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走および ICAM-1 等の接着因子発現といった機能に関与している可能性があることなどを報告した。このように、冠動脈疾患を含めた動脈硬化性疾患の新しい治療の標的として、チャネルの阻害薬という可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Voltage-gated Na^+ channel currents ($I(Na)$) are expressed in several types of smooth muscle cells. We evaluated the expression of $I(Na)$, its functional role, pathophysiology in cultured human (hASMCs) and rabbit aortic smooth muscle cells (rASMCs), and its association with vascular intimal hyperplasia. In whole cell voltage clamp, $I(Na)$ was observed at potential positive to -40 mV, was blocked by tetrodotoxin (TTX), and replacing extracellular Na^+ with N-methyl-D-glucamine in cultured hASMCs. In contrast to native aorta, cultured hASMCs strongly expressed SCN9A encoding Na(V)1.7, as determined by quantitative RT-PCR. $I(Na)$ was abolished by the treatment with SCN9A small-interfering (si)RNA ($P < 0.01$). TTX and SCN9A siRNA significantly inhibited cell migration ($P < 0.01$, respectively) and horseradish peroxidase uptake ($P < 0.01$, respectively). TTX also significantly reduced the secretion of matrix metalloproteinase-2 6 and 12 h after the treatment ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). However, neither TTX nor siRNA had any effect on cell proliferation. L-type Ca^{2+} channel current was recorded, and $I(Na)$ was not observed in freshly isolated rASMCs, whereas TTX-sensitive $I(Na)$ was recorded in cultured rASMCs. Quantitative RT-PCR and immunostaining for Na(V)1.7 revealed the prominent expression of SCN9A in cultured rASMCs and aorta 48 h after balloon injury but not in native aorta. These studies showed that $I(Na)$ is expressed in cultured and diseased

conditions but not in normal aorta. The Na(V)1.7 plays an important role in cell migration, endocytosis, and secretion. Na(V)1.7 is also expressed in aorta after balloon injury, suggesting a potential role for Na(V)1.7 in the progression of intimal hyperplasia. In addition, serum amyloid A (SAA), an acute-phase protein, and lysophosphatidylcholine (LPC), an oxidized LDL component, contribute to physiological processes of atherosclerosis and cardiovascular disease. However, the effects of SAA/LPC on human coronary artery smooth muscle cells (hCASMCs) have not been fully investigated. Therefore, I examined the effects of SAA/LPC on Ca^{2+}/Mg^{2+} mobilization and its underlying mechanisms in hCASMCs. We showed that SAA/LPC activate Ca^{2+} influx in hCASMCs; SAA activates it via PTX-sensitive G-protein, PLC and TRPC pathways, where TRPC4 may be involved. On the other hand, LPC may activate it via TRPM7 independently of these pathways. Thus, TRP protein appears to be a target molecule of Ca^{2+} signaling in hCASMCs elicited by SAA/LPC, which may play roles in coronary muscle dysfunction under the pathophysiological and inflammatory conditions such as atherosclerosis. These results provide a possibility of ion channel blockers as a therapy for atherosclerotic diseases such as coronary artery diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 循環器内科

キーワード：vascular smooth muscle, voltage-gated Na channel, migration, proliferation, patch-clamp, balloon injury, coronary smooth muscle, Ca channel

1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋細胞は、冠動脈、大動脈などの血管における主要な筋細胞である。正常の状態では、収縮型フェノタイプであり、主に収縮・弛緩機構に特化した細胞で、血圧を調整し、末梢組織への血流を確保する役目を果たしている。一方、血管平滑筋は、循環動態の変化などの病的な状態に応じて、その分化の度合いや性質を自在に変える高い柔軟性をもつことが知られている。動脈硬化巣あるいはバルーン障害などの病変血管では、血管平滑筋は筋原繊維に乏しく、また高い遊走能や増殖能（増殖型フェノタイプ）を示すことが多い。この結果、動脈硬化巣では、血管の再構築（リモデリング）が引き起こされ、血管中膜層の肥厚が生じると考えられる。また、血管の病的リモデリングは、高血圧症や糖尿病合併症の病態生理においても極めて重要である。こうした血管リモデリングに関わる血管平滑筋フェノタイプの変化（形質変化）についてのメカニズムについては、基礎・臨床両面から生化学的な検討が多く行われているが、イオンチャネルなどの生理学的な検討

は少ない。近年、分子生物学的手法の導入により、心筋などに発現するイオンチャネルの機能と構造に関しては、急速に明らかになってきた。また、心不全、心肥大などの病態において、さまざまなチャネルの異常が明らかとなっており、さらに、疾患を引き起こす直接原因としてイオンチャネルの構造異常による機能異常も解明されつつある。血管平滑筋においても、冠動脈のスパズム、原発性肺高血圧などにおいて K^+ チャネルの異常などが報告されているが、平滑筋に発現するイオンチャネルの機能と構造、さらにその病態生理学的意義に関してはいまだ不明の点が多い。

2. 研究の目的

本研究目的は、血管平滑筋に特異的に発現する I_{Na} の同定ならびに生理学的意義、さらに、病態との関連につき明確にすることを目的とする。さらに、これまで血管平滑筋のリモデリングに関与すると報告されてきたイオンチャネルにも着目し、それぞれの血管平滑筋の病的リモデリングにおける役割についても検討する。

3. 研究の方法

1) ヒト及びウサギの培養大動脈平滑筋細胞に発現する電位依存性Na⁺チャンネル(I_{Na})についての電気生理学的及び分子生物学的検討—ウサギの大動脈を急性単離した細胞ならびに培養した細胞で、I_{Na}の発現の有無、ならびに、その分子的本体を同定する。さらに、電位依存性Na⁺チャンネルと細胞周期との関係についても検討する

2) 培養血管平滑筋細胞に発現する電位依存性Na⁺チャンネル(I_{Na})の生理的意義についての検討：電気生理学的ならびに2次元画像解析による検討—培養細胞に発現するI_{Na}の生理的意義について、パッチクランプ法を用いた電気生理学的検討ならびに細胞内Na⁺、Ca²⁺濃度に及ぼす効果につき検討する。細胞内Ca²⁺に及ぼす効果はfura-2 AMを用い、細胞内Na⁺に及ぼす効果は、sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI)-AMを用い、2次元画像解析ならびにCAF-100にて検討する。さらに、細胞の増殖、遊走、さらに、endocytosis、分泌などに対する効果についても検討する。特異的なSCN mRNAに対するanti-senseを作成するなど詳細に検討する。さらに、endocytosis、MMP-2その他の分泌に及ぼす効果についても検討する。

3) 各種病態における平滑筋のNa_v1.7及びそれをコードするSCN9A mRNA発現についての検討—SCN9A mRNAは、購入したヒト培養平滑筋細胞（ヒト気管支平滑筋、冠動脈平滑筋、肺動脈平滑筋、大動脈平滑筋）とnativeな平滑筋（ヒト気管支平滑筋組織、大動脈平滑筋組織）のtotal RNAを購入し比較する。ウサギでのバルーン傷害モデルでの検討も実施する。

4) LPC及びSAAのヒト冠動脈平滑筋に対する作用について、TRPチャンネルおよびシグナル伝達経路という観点から検討した。

4. 研究成果

培養ヒト及びウサギ大動脈平滑筋細胞には、I_{Na}が発現すること、さらに、このチャンネルは、SCN9A遺伝子にてコードされたNav1.7から構成されていることが判明した。一方、生体内の正常な大動脈平滑筋においては発現していなかった。ヒト大動脈平滑筋細胞にてSCN9AにてコードされたNav1.7は細胞の遊走と食食に関与したが、増殖には関与しなかった。さらに、ウサギでのバルーン傷害モデルで傷害48時間後の血管中膜の平滑筋細胞にてもSCN9Aは発現しており、これは血管中膜での細胞の遊走や食食を介して内膜増殖に関与している可能性が考えられた。このことからナトリウムチャンネルを抑制することが、内膜増殖や動脈硬化に対して治療上での標的となりうる可能性が示唆された。このI_{Na}は、培養気管

支平滑筋細胞においても発現しているが副腎皮質ステロイド(dexamethasone)は、このチャンネルに発現を抑制することが判明した。一方、リソフォスファチジルコリン(LPC)および血清アミロイドA(SAA)はいずれも冠動脈疾患においてその血中濃度が上昇することが報告されているが、近年、これらの物質は疾患のマーカーとしての役割のみならず、物質そのものが粥状硬化を促進する作用があることが示唆されている。しかし、その具体的な分子生物学的作用については不明な点が多い。そこで、LPC及びSAAのヒト冠動脈平滑筋に対する作用について、TRPチャンネルおよびシグナル伝達経路という観点から検討した。その結果、LPCおよびSAAによる細胞内へのカルシウムイオン流入にはTRPチャンネルが関与していること、さらに、これが、ヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走およびICAM-1等の接着因子発現といった機能に関与している可能性があることなどを報告した。このように、冠動脈疾患を含めた動脈硬化性疾患の新しい治療の標的として、特異的なTRPチャンネルの阻害薬という可能性が示唆された。TRPチャンネルもまた、冠動脈平滑筋のリモデリングに関与していることが報告されており、今後、さらに詳細に検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件) うち査読付論文 計 (8) 件

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

① Tanaka T, Ikeda K, Yamamoto Y, Iida H, Kikuchi H, Morita T, Yamasoba T, Nagai R, Nakajima T. Effects of serum amyloid A and lysophosphatidylcholine on intracellular calcium concentration in human coronary artery smooth muscle cells. International Heart Journal (in press)

② Nakajima T, Kurano M, Hasegawa T, Takano H, Iida H, Yasuda T, Fukuda T, Madarame H, Uno K, Meguro K, Shiga T, Sagara M, Nagata T, Maemura K, Hirata Y, Yamasoba T, Nagai R. Pentraxin3 and hsCRP are independent inflammatory markers released during high-intensity exercise. Eur J Appl Physiol 2010; 110: 905-913.

③ Sahara M, Sata M, Morita T, Nakajima T, Hirata Y, Nagai R. A Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Enhances Angiogenesis Through a Protein Kinase

G-Dependent Hypoxia-Inducible Factor-1/Vascular Endothelial Growth Factor Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jul;30(7):1315-24.

④ Oguri A, Tanaka T, Iida H, Meguro K, Takano H, Oonuma H, Nishimura S, Morita T, Yamasoba T, Nagai R, Nakajima T. Involvement of CaV3.1 T-type calcium channels on cell proliferation in mouse preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* . 2010 Jun;298(6):C1414-423.

⑤ Matsuyama N, Tsutsumi T, Kubota N, Nakajima T, Suzuki H, Takeyama Y. Direct action of an angiotensin II receptor blocker on angiotensin II-induced left atrial conduction delay in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2009; 32: 721-26.

⑥ K Meguro, H Iida, H Takano, T Morita, M Sata, R Nagai, T Nakajima. Function and Role of Voltage-Gated Sodium Channel (Na_v1.7) Expressed in Aortic Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H211-219.

⑦ T Nakajima, N Kubota, T Tsutsumi, A Oguri, H Imuta, T Jo, H Oonuma, M Soma, K Meguro, H Takano, T Nagase, T Nagata. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009;156: 420-431.

⑧ Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci.* 2008; 82:1210-5.

[学会発表] 計 (5) 件

① The 57th American College of Sports Medicine (Baltimore, Maryland, USA: 2010/6/1-5) Madarame H, Kurano M, Takano H, Iida H, Sato Y, Ohshima H, Abe T, Ishii N, Morita T, Nakajima T. Low-intensity resistance exercise with blood flow restriction does not activate coagulation system in young men.

② The Scientific Sessions, American Heart Association 2010 (Chicago, Illinois, USA; 2010/11/13-17) Nakajima T, Kurano K, Takano H, Iida H, Fukuda

T, Meguro K, Shiga T, Sagara T, Maemura K, Hirata Y, Yamasoba T, Nagai R. Acute high-intensity exercise releases myeloperoxidase and pentraxin3 from peripheral neutrophils in healthy subjects.

③18th Scientific Meeting of the European Society of Hypertension (Berlin, Germany: 2008/6/14-19). Meguro K, Iida H, Takano H, Morita T, Sata M, Nagai R, Nakajima T. Function and Role of Voltage-Gated Sodium Channel (Na_v1.7) Expressed in Aortic Smooth Muscle Cells.

④ 第72回日本循環器学会総会・学術集2008. 3.28 (福岡): Function and Role of Voltage-gated Sodium Channel (NaV1.7) Expression in Aortic Smooth Muscle Cells. Meguro K, Iida H, Takano H, Morita T, Sata M, Nagai R, Nakajima T.

⑤ 第17回日本循環薬理学会(2007.11.30 神戸) 大動脈平滑筋細胞に発現する電位依存性ナトリウムチャンネル (Na_v1.7) の機能とその役割 目黒健太郎、佐田政隆、永井良三、中島敏明

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA TOSHIAKI)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：50227790

(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：