

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590254  
 研究課題名（和文） イノシトールリン脂質による血管カルシウム輸送制御とその病態学的意義  
 研究課題名（英文） Physiological role of calcium transport system regulated by phosphatidylinositol  
 研究代表者  
 喜多 紗斗美（KITA SATOMI）  
 福岡大学・医学部・講師  
 研究者番号：10461500

研究成果の概要（和文）：本研究では、高血圧や動脈硬化などの心血管病発症の分子機序として、イノシトールリン脂質制御を受ける動脈  $Ca^{2+}$  輸送系（特に NCX1 輸送体、TRPC チャンネル）の役割について調べた。私たちは、これら輸送タンパクの遺伝子改変マウスおよび阻害薬を用いた実験により、血管平滑筋細胞での NCX1 輸送体および TRPC3/6 チャンネルの機能連関を介する  $Ca^{2+}$  輸送機構が、交感神経系（ $\alpha_1$  受容体）を介した血圧調節に重要な役割を果たすことを示した。さらに、NCX1<sup>+/-</sup>マウスの下肢虚血後の血流回復が野生型マウスよりも増強されたことから、虚血時の血管新生に NCX1 を介する  $Ca^{2+}$  輸送機構が重要であることが示された。これら病態時にはイノシトールリン脂質シグナルの亢進が関わっている可能性があり、それに基づく  $Ca^{2+}$  輸送機構の活性化が病態形成に関与することが推察された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the role of NCX1 and TRPC3 in cardiovascular diseases (hypertension, arteriosclerosis), we generated TRPC3-transgenic (Tg) mice by overexpressing the wild-type and dominant negative TRPC3 using the smooth muscle  $\alpha$ -actin promoter. Using these mice, we showed that NCX1 and TRPC3 may predominantly play an important role in  $\alpha_1$ -adrenoreceptor agonist-induced vascular responses and blood pressure regulation. Furthermore, we found that blood recovery after unilateral hindlimb ischemia was significantly augmented in NCX1<sup>+/-</sup> mice compared with that in wild-type mice, suggesting that NCX1 is involved in ischemia-induced angiogenesis.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学・一般

キーワード：脂質キナーゼ、血管リモデリング、脂質代謝異常、シグナル伝達、薬理学

#### 1. 研究開始当初の背景

種々の脂質キナーゼ・ホスファターゼが制御するイノシトールリン脂質代謝で産生さ

れる各種ホスホイノシチドはそれぞれ固有の機能を有し、多様な生理反応に関与している。これまでに、PI3K の活性欠失型変異体高

発現マウスにおいて運動による心肥大が抑制されること (Shioi *et al.* PNAS 2003)、また PI3K の逆反応を媒介する PTEN の欠損マウスで内発性の心肥大が認められることが報告されている (Crackower *et al.* Cell 2002)。これらの知見は、PI3K による Akt の活性化、それに続く GSK3 $\beta$ -NFAT 系の誘導が重要な心肥大シグナルとなることを示している。また、血管系において、PI3K は脱分極時や  $\alpha_1$  受容体刺激時に Rho やミオシンフォスファターゼを活性化し、血管機能を調節していること (Yoshioka *et al.* Mol Pharmacol 2007)、さらに PI3K-Akt 経路は血管内皮細胞の増殖・分化を制御することにより血管新生に関わることが報告されている (Jiang & Liu. BBA 2008)。

一方、PI(4,5)P<sub>2</sub> はイオン輸送体やイオンチャンネルに直接相互作用し、それらの活性を制御することが報告されている (Hilgemann Pflugers Arch 2007; Tucker & Baukowitz J Gen Physiol 2007)。例えば、NCX1 は分子内の XIP 領域に PIP<sub>2</sub> が結合すると Ca<sup>2+</sup> 輸送活性が亢進する。また、TRPC チャンネルは受容体刺激時のホスホリパーゼ C が PIP<sub>2</sub> を分解して IP<sub>3</sub> と DAG を産生するイノシトールリン脂質代謝回転により活性化される。しかし現在、心血管系、特に血管系における Ca<sup>2+</sup> 輸送系の PIP<sub>2</sub> 制御機構の生理的役割および種々心血管病における病態学的意義については未だほとんど解っていない。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者は、1 型 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交換体 (NCX1) の活性型変異体 (PIP<sub>2</sub> 高親和性変異体) の心筋特異的高発現マウスが心筋 Ca<sup>2+</sup> 代謝異常により拡張型心筋症様の心障害を呈することを発見した。さらに、そのマウス心臓に PIP5K $\alpha$  (PIP<sub>2</sub> 産生酵素) の抑制型変異体を導入すると、その病態が劇的に改善されることを観察した。これらの知見は、Ca<sup>2+</sup> 輸送系の PIP<sub>2</sub> 制御機構が心臓の構造と機能の維持に重要であることを示している。本研究では、これまでの研究成果を血管系にさらに発展させ、NCX1 輸送体および TRPC チャンネルの血管特異的遺伝子改変マウス、PIP5K 分子種欠損マウスおよび薬理的ツールを用いて、血管機能および血管リモデリングにおける動脈 Ca<sup>2+</sup> 輸送系の PIP<sub>2</sub> 制御機構の生理的役割を解明する。特に、血管アゴニスト刺激時や

虚血障害時のイノシトールリン脂質シグナルを介する NCX1 輸送体および TRPC チャンネルの病態学的役割に注目する。そしてその結果より、Ca<sup>2+</sup> 輸送系の PIP<sub>2</sub> 制御機構の破綻に関わる心血管病 (高血圧、動脈硬化、心不全など) の分子機序を心臓および血管の両面から統合的に理解し、新たな心血管病治療戦略を考察する。

## 3. 研究の方法

独自に作出した NCX1、TRPC3、TRPC6、PIP5K の各種遺伝子改変マウスを用いて、ACTH 誘発性 (Dostanic-Larson I *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2005) および PHAII 型高血圧モデル (Yang SS *et al.* Cell Metab, 2007)、下肢虚血モデル (Matsui Y *et al.* Med Bull Fukuoka Univ, 2011) を作製し、心血管病における NCX1 輸送体および TRPC チャンネルの病態学的役割について解析した (PIP5K $\alpha$  および PIP5K $\beta$  の遺伝子欠損マウスは筑波大学・金保安則教授より供与)。また、これら遺伝子改変マウスの腸間膜動脈の筋原性収縮を CCD カメラ観察下の細動脈灌流システム (0~120mmHg 可変) を用いて計測した (Iwamoto T, Kita S *et al.* Nat Med. 2004)。

## 4. 研究成果

(1) マウス腸間膜細動脈における筋原性収縮および  $\alpha_1$  アゴニスト収縮における NCX1 および TRPC3/6 活性の影響

NCX1 および TRPC3/6 のイオン輸送機能と血圧調節について調べるため、種々の血管平滑筋特異的高発現マウス (NCX1、TRPC3、TRPC6、TRPC3-DN、TRPC6-DN) および NCX1 遺伝子欠損マウス (NCX1<sup>-/-</sup>) を用いてアゴニスト収縮および筋原性収縮反応について解析した。その結果、腸間膜動脈の  $\alpha_1$  受容体刺激収縮反応が NCX1<sup>+/-</sup> マウスや TRPC3 および TRPC6 のドミナントネガティブ変異体マウス (TRPC3-DN、TRPC6-DN) で抑制されるが、5-HT 受容体刺激収縮反応では影響されないことを見出した。さらに Fura-PE3 を用いて、同収縮反応時の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化をモニターしたところ、収縮反応に対応した細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化が観察された。一方、腸間膜細胞脈の筋原性収縮は NCX1<sup>+/-</sup> マウスや TRPC3-DN マウスで抑制されるが、TRPC6-DN マウスでは影響されない。これらの結果は、アゴニスト刺激依存性に Ca<sup>2+</sup> 動員に関わるイオン輸送分子の構成が異

なることを示唆している。また、上述したように、NCX1 輸送体および TRPC チャンネルはイノシトールリン脂質代謝回転により活性化されることが知られている。そこで、アゴニスト刺激特異的にイノシトールリン脂質シグナルが誘導され、それに基づいて NCX1 輸送体および TRPC チャンネルの活性化が引き起こされる可能性も推察される。

## (2) ACTH 誘発性および PHAII 型高血圧における NCX1 の役割

NCX1<sup>+/-</sup>マウスを用いて ACTH 誘発性高血圧モデルを作製したところ、NCX1<sup>+/-</sup>マウスでの血圧上昇は野生型マウスに比べて軽度であった。また、NCX 阻害薬は ACTH 誘発性高血圧に対して顕著な降圧作用を示したことから、ACTH 誘発性高血圧の発症に NCX1 が関与する可能性が示された。また、D561A 変異 WNK4 ノックインマウスは、偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI)患者と同様に、高血圧、高カリウム血症、代謝性アシドーシス等の症状を示すことが知られているが (Cell Metab, 2007)、この高血圧マウスに NCX 阻害薬の処置あるいは NCX1 遺伝子欠損の導入を施すと高血圧は有意に改善した。これらの結果は、NCX 阻害薬がクッシング症候群や PHAI 型患者の高血圧治療に臨床応用できる可能性を示している。

## (3) マウス虚血誘導血管新生における NCX1 輸送体の役割

NCX1<sup>+/-</sup>マウスの下肢虚血モデルを用いて、血管新生における NCX1 の役割を調べた。その結果、NCX1<sup>+/-</sup>マウスに下肢虚血を施すと、虚血側大腿部の血流回復が野生型マウスに比べて有意に増強した。eNOS の関与を検討するために、eNOS 阻害薬である L-NAME を下肢虚血マウスに 4 週間投与したところ、NCX1<sup>+/-</sup>マウスの血流回復効果は顕著に抑制された。このように、NCX1<sup>+/-</sup>マウスの下肢虚血モデルにおいて側副血流の増強が認められ、この機序には eNOS の発現増加・活性化の関与が示唆された。NCX1 の機能低下は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加を引き起こし、Ca<sup>2+</sup>依存性に eNOS を活性化することにより、NO 産生を亢進させる可能性が推察された。さらに、虚血下肢において、PI3K による Akt の活性化が観察された。これは、虚血下肢におけるイノシトールリン脂質シグナルの亢進を意味しており、それに

基づく NCX1 輸送体の活性化が下肢虚血の病態に関与する可能性が考えられた。

以上の結果より、各種心血管病 (高血圧、動脈硬化、虚血障害) にはイノシトールリン脂質シグナルが密接に関わっており、それに基づく Ca<sup>2+</sup>輸送機構 (NCX1 輸送体、TRPC チャンネル) の活性化が病態形成に密接に関わっている可能性が考えられた。現在、PIP5K 遺伝子改変マウスを用いて、この詳細な分子機序について解明を進めている。イノシトールリン脂質代謝酵素や Ca<sup>2+</sup>輸送機構 (NCX1 輸送体、TRPC チャンネル) に対する調節薬は、新たな心血管病治療薬の創薬標的として興味深い。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Morimoto N<sup>†</sup>, Kita S<sup>†</sup> (<sup>†</sup>co-first authors), Shimazawa M, Namimatsu H, Tsuruma K, Hayakawa K, Mishima K, Egashira N, Iyoda T, Horie I, Gotoh Y, Iwasaki K, Fujiwara M, Matsuda T, Baba A, Komuro I, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Hara H. Preferential involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger type-1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 429(3-4):186-190, 2012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.114
- ② Azuma YT, Nishiyama K, Kita S, Komuro I, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger 2-heterozygote knockout mice display decreased acetylcholine release and altered colonic motility in vivo. *Neurogastroenterol Motil*, 24(12):e600-610, 2012. 査読有  
DOI: 10.1111/nmo.12029
- ③ Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin Exp Nephrol*, 16(4):530-538, 2012. 査読有  
DOI: 10.1007/s10157-012-0590-x
- ④ Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S,

- Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogihara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T, Takeshima H. TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance. *Cell Metab*, 14(2):231-241, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.cmet.2011.05.011
- ⑤ Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H. Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(10):2278-2286, 2011. 査読有  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221010
- ⑥ Yamamoto S, Kita S, Iyoda T, Yamada T, Iwamoto T. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: cardiac hypertrophy and cell-volume regulation. *J Pharmacol Sci*, 116(4):343-349, 2011. 査読有  
DOI: 10.1254/jphs.10R31FM
- ⑦ Matsui Y, Kita S, Iyoda T, Katsuragi T, Komuro I, Iwamoto T, Ohjimi H. Role of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger type 1 (NCX1) in the angiogenesis induced by Lipo-PGE1 in murine hindlimb ischemia model. *Med Bull Fukuoka Univ*, 38(2):77-84, 2011. 査読有
- ⑧ Yamamoto S, Iyoda T, Kita S, Yamada T, Iwamoto T. OSU-03012, a novel celecoxib derivative, induces cell swelling and shortens action potential duration in mouse ventricular cells. *Biomed Res*, 31(6):413-417, 2010. 査読有  
DOI: 10.2220/biomedres.31.413
- ⑨ Murata H, Hotta S, Sawada E, Yamamura H, Ohya S, Kita S, Iwamoto T, Imaizumi Y. Cellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in urinary bladder smooth muscle from transgenic mice overexpressing  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *J Pharmacol Sci*, 112(3):373-377, 2010. 査読有  
DOI: 10.1254/jphs.09319SC
- [学会発表] (計 15 件)
- ① Kita S,  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization mechanisms through TRPCs and NCX1 in regulation of vascular tonus. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡
- ② Kita S, Preferential involvement of NCX1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013 年 2 月 4 日、Philadelphia (米国)
- ③ 喜多紗斗美、マウス腸間膜細動脈の筋原性収縮および  $\alpha_1$  アゴニスト収縮における TRPC3/6 の役割、第 65 回日本薬理学会西南部会、2012 年 11 月 23 日、熊本
- ④ Kita S, Involvement of TRPC3 and TRPC6 channels in myogenic tone regulation of murine mesenteric arteries. 第 35 回日本分子生物学会大会、2012 年 12 月、福岡
- ⑤ 後藤雄輔、Vascular NCX1 contributes to hypertension in pseudohypoaldosteronism type II and cushing's syndrome models. 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都
- ⑥ Kita S, Vascular  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger type-1 contributes to hypertension in pseudohypoaldosteronism type II and Cushing's syndrome models. Biophysical Society 56th Annual Meeting, 2012 年 2 月 29 日、San Diego (米国)
- ⑦ Kita S, The role of NCX1 in pseudohypoaldosteronism type II and ACTH-induced hypertension. 第 34 回日本分子生物学会大会、2011 年 12 月 14 日、神奈川
- ⑧ 喜多紗斗美、ACTH 誘発性および PHAII 型高血圧における NCX1 の役割、第 64 回日本薬理学会西南部会、2011 年 11 月 20 日、福岡
- ⑨ 喜多紗斗美、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体をめぐるトランスポートソーム、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、神奈川
- ⑩ Yamamoto S, Caveolin-3 regulates the volume-regulated anion channel in mouse ventricular cells. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society, 2011 年 3 月 7 日、Baltimore (米国)
- ⑪ 喜多紗斗美、心不全発症における PIP5 キナーゼの役割について、平成 22 年度生理研研究会、2010 年 11 月 5 日、愛知
- ⑫ 喜多紗斗美、PIP5 キナーゼのイオン輸送体制御を介する心肥大のメカニズム、第 4 回トランスポーター研究会九州部会、2010 年 9 月 11 日、長崎
- ⑬ 喜多紗斗美、Role of functional coupling between TRPC3 and NCX1 in sympathetic vasoconstriction. 第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 21 日、岩手
- ⑭ Iyoda T,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger and oxidative stress in

aldosterone-induced cardiac remodeling. XXth ISHR World Congress 2010 KYOTO, 2010年5月14日、京都

- ⑮ Kita, S., Cardiac-specific overexpression of NCX1.1 mutant induces dilated cardiomyopathy in mice. XXth ISHR World Congress 2010 KYOTO, 2010年5月14日、京都

[図書] (計1件)

- ① 金井好克/竹島浩/森泰生/久保義弘、京都  
広川書店、トランスポートソームの世界、  
2011、471

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

喜多 紗斗美 (KITA SATOMI)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号：10461500

### (2) 研究分担者

山本 信太郎 (YAMAMOTO SHINTARO)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：40336110

### (3) 連携研究者

伊豫田 拓也 (IYODA TAKUYA)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号：80465715