

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592304

研究課題名(和文)肺高血圧症におけるリアルタイムなカルシウム感受性測定による血管収縮機構の解明

研究課題名(英文)calcium sensitization in pulmoary hypertension

研究代表者

水野 祐介(MIZUNO, Yusuke)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：80433192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてMLCK sensorを用いたカルシウム感受性の亢進機序の検討する過程で、ラット肺高血圧モデルにおいてカルシウム感受性を亢進させるRHO-kinase経路のみならず、感受性を減弱させるMLCK自身のリン酸化状態も変化していることを見出した。このMLCKのリン酸化機序解明は新たな肺血管抵抗制御に関する手段をもたらす可能性がある。カルシウムに対する感受性を亢進させる機構のみならず、減弱させる機構を解明することで新たな肺高血圧治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the involvement of impaired calcium desensitization mechanism of MLCK by phosphorylation of MLCK in pulmoanry hypertension in rats. It is well known that calcium sensitization occurred during vascular contraction and in hyper-vasocontractile diseases. However, calcium desensitization mechanism in vasocura diseases is little known. The understanding of the desensitization mechanism may provide novel therapy for pulmonary hypertension.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔蘇生学

キーワード：肺高血圧症 MLCK リン酸化 desensitization

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は根本的な治療がなく、周術期の心血管イベントリスクを明らかに上昇させる。血管平滑筋収縮は、カルシウム依存性に Myosin light chain kinase (MLCK) が活性化し myosin regulatory light chain (RLC) をリン酸化することで始まり、これは平滑筋収縮の main stream である。MLCK のカルシウムに対する感受性は様々な経路で修飾されるが、肺高血圧症や脳血管攣縮、冠動脈スパズム等の血管過剰収縮には、カルシウム感受性亢進が関与しているとされる。申請者は MLCK 活性化状態を real-time で測定できる遺伝子導入マウスを用い、平滑筋収縮におけるカルシウムの関与は刺激の種類により異なり、Rho-kinase, PKC 活性化による RLC を脱リン酸化する myosin light chain phosphatase (MLCP) の抑制がカルシウム感受性亢進を来たすことを報告した。一方、肺高血圧治療に臨床的に使用されている血管拡張薬は全身血管も拡張させ、血圧、臓器還流圧も低下させる問題が常にあった。

2. 研究の目的

上記研究の発展的応用として肺高血圧症におけるカルシウム感受性亢進機序を検討することで、病的血管の異常カルシウム感受性亢進を抑制できれば、正常血管を拡張させず、病的過収縮のみ解除できると考えられた。しかし研究の過程で、MLCK センターは幅広い条件で使用するには更なる検討が必要なことが判明した。

一方、その過程で MLCK 活性を抑制するとされる MLCK 自体 (Ser1760site) のリン酸化が MCT 誘発肺高血圧ラットでは低下していることを見出した。リン酸化部位は MLCK の補酵素である calmodulin が MLCK に結合する部位に存在し、この部位のリン酸化は結合を阻害する結果 MLCK

活性が低下する。収縮刺激後の desensitization 機構として機能するとされるが、MCT 誘発肺高血圧モデルではこの MLCK 抑制機構が減弱していることが示唆され、今後新たな肺高血圧のターゲットとなる可能性を見出した。肺高血圧の機序解明においてカルシウム非依存性の収縮機構に関しては Rho-kinase のシグナルを含め多くの研究がなされているが、カルシウム依存性収縮機構である MLCK が desensitize される機構については報告が少なく、肺高血圧に関してはほとんど解明されていない。我々は、当初の MLCK センサーの使用方針を修正し、MLCK 活性を制御する MLCK リン酸化を肺高血圧モデルを用いて検討し、今後の肺高血圧治療の可能性を検討することとした。

3. 研究の方法

(1)モノクロタリン誘発肺高血圧モデル作成、右室圧、右心肥大評価。

8週齢雄 SD ラットにモノクロタリン 60mg/kg を皮下注射し肺高血圧モデルを作成した。4週間後に全身麻酔下に気管切開を行い陽圧換気で呼吸を維持した。頸静脈からカテーテルを右心まで挿入し、また大腿動脈にカテーテルを留置し、右心圧、体動脈圧を各々連続的にモニターした。モノクロタリン投与ラットでは右心圧、右心/左心重量比が正常ラットと比較し有意に上昇しており、肺高血圧モデルが作成されていることを確認した。

(2)カルシウム desensitization 機構：肺動脈における MLCK リン酸化状態測定。

肺動脈リング標本を収縮時、弛緩時に液体窒素により瞬間凍結した。また、リン酸化状態維持のため TCA 入りバッファーでホモジナイズし変性、沈殿させる。エーテルで TCA を除去し、

SDS サンプルバッファーに可溶化した。抗リン酸化抗体を用い western blot analysis により MLCK, MLCP サブユニット MYPT1 及び、CPI-17 のリン酸化状態を検出した。

(3)カルシウム sensitization 機構：肺動脈における MLCK リン酸化状態測定。

(2)で取得した組織を用い MLCP サブユニット MYPT1 及び、CPI-17 のリン酸化状態を検出した。

(4)肺血管リング標本を用いた張力測定と細胞内カルシウム濃度測定。

肺動脈リング標本に fura-2 張力測定用 transducer にマウントし、これを蛍光顕微鏡下に設置した。340nm と 380nm 各々の波長で励起された蛍光を測定し、細胞内カルシウム濃度を算出した。

4. 研究成果

(1)モノクロタリン誘発肺高血圧モデルの評価。

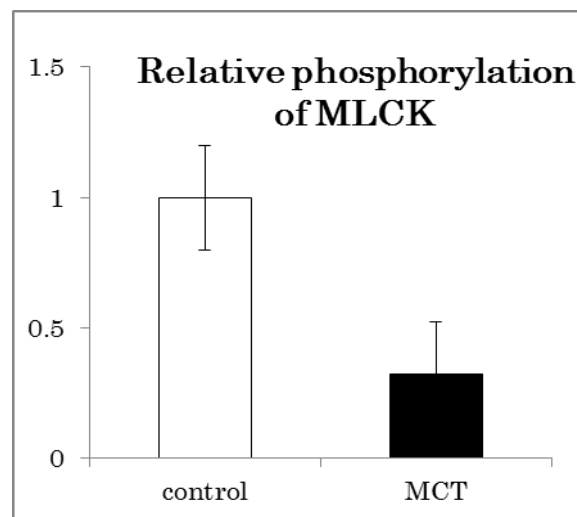
右心圧、右心/左心重量比はモノクロタリン投与ラットは正常ラットと比較し投与4週間後、有意に上昇しており、肺高血圧モデルが作成されていることを確認した。

(2)、(3)カルシウム desensitization 及び sensitization 機構

本研究において、MCT ラットでは resting 状態及び KCl, phenylephrine による収縮状態において MLCK s1760 部位のリン酸化が正常ラットと比較して有意に減少していた。MLCK の s1760 部位のリン酸化により補酵素である calmodulin の結合が阻害される。これにより MCT ラットでは desensitization 機構が減弱し MLCK 活性が resting 状態で正常より高く保たれていると思われた。各種収縮刺激において

MLCK のリン酸化は経時的に増加するとされる。収縮状態でも MCT ラットでは desensitization が起きにくいことが示唆された。MLCK をリン酸化する酵素として protein kinase A, p21 activated kinase, calmodulin kinase II 等が in vitro では示唆されている。平滑筋組織においては膀胱等で収縮時に MLCK のリン酸化が示されているが、肺動脈リングにおいては詳細な殆ど報告がなかった。上記酵素の各阻害剤を用い、MLCK をリン酸化する酵素を解明することで肺動脈の tension を制御できると考えられた。

一方、カルシウム感受性を亢進させると考えられている MLCP サブユニット MYPT1 のリン酸化は MCT ラットで増加が認められた。また CPI-17 のリン酸化も亢進していた。



本研究において MLCK sensor を用いたカルシウム感受性の亢進機序の検討を計画したが、その過程で肺高血圧ラットモデルにおいて、カルシウム感受性を亢進させる RHO-kinase 経路のみならず、感受性を減弱させる MLCK 自身のリン酸化状態も変化していることを見出した。当初の計画を修正することとなったが、MLCK のリン酸化機序解明は新たな肺血管抵抗制御に関する手段をもたらす可能性がある。カルシウムに対

する感受性を亢進させる機構のみならず、
減弱させる機構を解明することで新たな肺
高血圧治療法の開発につながる可能性があ
る。

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 1 件)

“ Involvement of increased protein
arginine methyltransferases 2 and
decreased dimethylarginine
dimethylaminohydrolases in impaired
NOS activity in pulmonary
hypertension in rats ” Yusuke Mizuno,
Nobuhiro Shinbori, Takahisa Goto.
European Journal of Anaesthesiology
(Volume 31, Supplement 52, June
2014) 査読有

[学会発表](計 1 件)

Euroanesthesia 2014,6.1 Stockholm
Sweden “ Involvement of increased
protein arginine methyltransferases
2 and decreased dimethylarginine
dimethylaminohydrolases in impaired
NOS activity in pulmonary
hypertension in rats ” Yusuke Mizuno,
Nobuhiro Shinbori, Takahisa Goto

[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

水野 祐介 (MIZUNO Yusuke)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号: 80433192

(2)研究分担者

川上 裕理 (KAWAKAMI Hiromasa)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 90407958

渡邊 至 (WATANABE Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号: 20534142

馬場康子 (BABA Yasuko)

横浜市立大学・市民総合医療センター・講
師

研究者番号: 80453041

(3)連携研究者

()

研究者番号：