

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860068

研究課題名(和文)肺高血圧症においてカルシウム感受性受容体と機能連関するカルシウムシグナルの同定

研究課題名(英文)Functional coupling between calcium-sensing receptor and ion channel in pulmonary hypertension

研究代表者

山村 彩(YAMAMURA, Aya)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40633219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症は、肺血管障害によって持続的に肺動脈圧が上昇する致死性疾患である。我々は肺動脈平滑筋におけるカルシウム感受性受容体の発現増加が、肺高血圧症の病態機構に関与していることを明らかにしてきた。本研究では、カルシウム感受性受容体と機能連関するカルシウム流入経路を検索した。その結果、特発性肺動脈性肺高血圧症の肺動脈平滑筋細胞における異常な細胞内カルシウム濃度上昇は、カルシウム感受性受容体とTRPCチャネルの機能的連関によることが示唆された。この機構が、特発性肺動脈性肺高血圧症患者の過剰なカルシウム流入や細胞増殖に関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sustained vasoconstriction and vascular remodeling due to pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC) proliferation are key pathogenic events for idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH). We have previously shown that calcium-sensing receptor (CaSR) is upregulated in IPAH-PASMCs and contributes to enhanced calcium response. In this study, we examined whether non-selective cation channel is involved in enhanced calcium influx followed by CaSR activation in IPAH-PASMCs. The expression levels of TRPC channel in IPAH-PASMCs were greater than in normal PASMCs. Knockdown of TRPC channel in IPAH-PASMCs with siRNA attenuated the CaSR-mediated calcium increase. In conclusion, the extracellular calcium-induced calcium increase due to functional coupling between CaSR and TRPC channel is a novel pathogenic mechanism contributing to the augmented calcium influx and excessive PASMC proliferation in IPAH patients.

研究分野：薬理学

キーワード：肺高血圧 カルシウム感受性受容体 イオンチャネル 血管 肺動脈 平滑筋

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症(pulmonary hypertension)は、肺血管の攣縮や肺血管壁の肥厚による血管内腔の狭小化、血栓形成による肺血管抵抗の上昇によって、持続的に肺動脈圧が上昇する進行性の血管疾患である。病態が進行すると血管壁の肥厚に伴って動脈壁全体が硬化し、肺血流量が低下して、右心室に負荷がかかるため右心不全に陥る。これまでに複数の肺高血圧発症因子が同定されているが、それらが複雑に関連しているため、未だに正確な発症機構は解明されていない(Hassoun et al., J Am Coll Cardiol, 2009; Morrell et al., J Am Coll Cardiol, 2009)。我々の研究グループでは、肺高血圧症患者から摘出した肺動脈平滑筋細胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs)において、静止時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>)が増加していること、ストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入(store-operated calcium entry, SOCE)が増強していること、受容体作動性Ca<sup>2+</sup>流入(receptor-operated calcium entry, ROCE)が増強していることを報告してきた(Lin et al., Circ Res, 2004; Yu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Yu et al., Circulation, 2009; Song et al., Pulm Circ, 2011)。しかし依然として、肺動脈平滑筋の生理機能や病態変化には、その他の経路不明なCa<sup>2+</sup>シグナルが関わっていることが推測されている。ごく最近、我々は、細胞内Ca<sup>2+</sup>動態に関する細胞膜上の機能性膜タンパク(イオンチャネル・受容体・トランスポーターなど)のうち、細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度を感知するCa<sup>2+</sup>感受性受容体(calcium-sensing receptor, CaSR)(Brown & MacLeod, Physiol Rev, 2001; Hofer & Brown, Nat Rev Mol Cell Biol, 2003; Magno et al., Endocr Rev, 2011)(図1)に着目し、肺動脈平滑筋の生理機能への寄与と肺高血圧症などの病態における発現変化および機能変化を解析した。

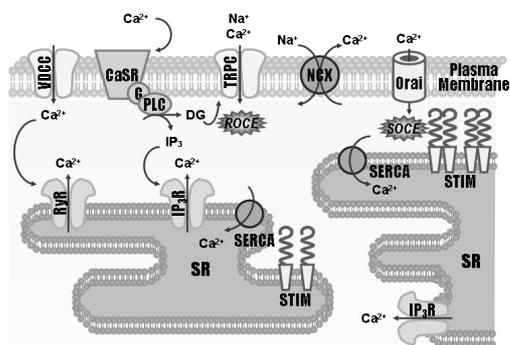


図1 細胞内Ca<sup>2+</sup>動態におけるCa<sup>2+</sup>感受性受容体の機能

略語: CaSR, Ca<sup>2+</sup>感受性受容体;  
 DG, ジアシルグリセロール;  
 G, Gタンパク; IP<sub>3</sub>, イノシトール-1,4,5-三リン酸;  
 IP<sub>3</sub>R, IP<sub>3</sub>受容体; NCX, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体;  
 PLC, ホスホリパーゼC; ROCE, 受容体作動性Ca<sup>2+</sup>流入;  
 RyR, リアノジン受容体;  
 SERCA, (筋)小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase;  
 SOCE, スストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入; SR, 筋小胞体;  
 TRPC, transient receptor potential canonical チャンネル;  
 VDCC, 電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル

特発性肺動脈性肺高血圧症(idiopathic pulmonary arterial hypertension, IPAH)の患者から単離したPSMCsにおいて、細胞外Ca<sup>2+</sup>誘発性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>上昇が認められた。このCa<sup>2+</sup>応答は、正常ヒト(肺高血圧症以外の肺疾患, Normal)もしくは慢性血栓塞栓性肺高血圧症(chronic thromboembolic pulmonary hypertension, CTEPH)患者由来のPSMCsでは観察されなかった(図2A)。IPAH-PSMCsでは、CaSRの発現が顕著に増加していた(図2B)。肺高血圧モデル動物(モノクローリン誘発性肺高血圧症ラット)においても、発現増加したCaSRとそれによる細胞外Ca<sup>2+</sup>誘発性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>上昇が観察された。また、肺高血圧症に特有の所見がCaSRの選択的阻害薬であるNPS2143によって、有意に抑制された(図2C)。以上より、CaSRの発現増加および機能増強が肺高血圧症の発症メカニズムに関与していること、CaSRの選択的阻害薬であるNPS2143が肺高血圧症の新規治療薬として有効であることを示した(Yamamura et al., Circ Res, 2012)。

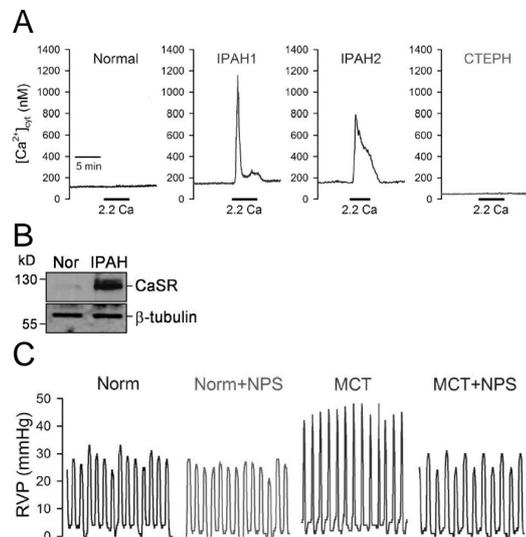


図2 肺高血圧症におけるCa<sup>2+</sup>感受性受容体の機能亢進

A: 正常ヒト(Normal)、特発性肺動脈性肺高血圧症患者(IPAH)、慢性血栓閉塞性肺高血圧症患者(CTEPH)から肺動脈平滑筋細胞を作製した。IPAH細胞において、細胞外Ca<sup>2+</sup>誘発性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇が認められた[Ca<sup>2+</sup>イメージング]。B: IPAH患者でCa<sup>2+</sup>感受性受容体の発現増加が認められた[ウェスタンブロット]。C: 肺高血圧モデル動物(MCT)において、肺高血圧症の指標である右心室圧(RVP)の上昇が観察された。この症状は、Ca<sup>2+</sup>感受性受容体の阻害薬であるNPS2143によって改善した。[in vivo 実験]

2. 研究の目的

CaSRの発現増加が肺高血圧症に関与していることを見出した(Yamamura et al., Circ Res, 2012)が、これだけでは肺高血圧症における異常な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>上昇を説明することはできない。すなわち、CaSRは主に細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度を感知するだけであり、IP<sub>3</sub>を介したCa<sup>2+</sup>遊離以外のCa<sup>2+</sup>シグナル経路が機能的に連関することによって、より大きな[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>上昇が実現すると考えられる。本研究では、CaSR

と機能連関する分子を検索し、その発現解析および機能解析を行い、CaSR を介した  $Ca^{2+}$  シグナル経路を同定した。

### 3. 研究の方法

#### (1) CaSR と共役する分子の機能解析

IPAH 患者、CTEPH 患者および対象群（肺高血圧症以外の肺疾患患者，Normal）より作製した培養 PSMCs を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  画像解析を行った。 $Ca^{2+}$  蛍光指示薬である fura-2/AM を培養細胞に負荷し、細胞外液（灌流液）の  $Ca^{2+}$  濃度を 0 mM から 2.2 mM に置換した時に生じる  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  増加を CaSR による  $Ca^{2+}$  シグナルとして測定した。

#### (2) CaSR と機能連関する分子の発現解析

IPAH 患者、CTEPH 患者および対象群（肺高血圧症以外の肺疾患患者，Normal）由来の PSMCs から総 RNA を抽出して、逆転写（RT）法により cDNA を作製した。定量的リアルタイム PCR 法により、細胞内  $Ca^{2+}$  動態に関連する分子の mRNA 発現量を比較解析した。また、同様の細胞株および肺動脈平滑筋組織からタンパク質を抽出して、ウェスタンブロット法により、細胞内  $Ca^{2+}$  動態に関連する分子のタンパク質発現量を比較解析した。

#### (3) CaSR を介した $Ca^{2+}$ シグナル経路の分子同定

CaSR と機能的に連関する分子の同定のため、網羅的に  $Ca^{2+}$  関連チャンネルを siRNA 法によりノックダウンして機能解析した。CaSR と機能連関する分子が、イオンチャンネル活性を有する場合には、ホールセルパッチクランプ法を適用し、電流解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) CaSR と機能連関する分子の薬理的解析

IPAH-PSMCs において、細胞外  $Ca^{2+}$  濃度を 0 mM から 2.2 mM に置換した際、CaSR を介した  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  増加が惹起された。この  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  増加は、一過性の初期相とそれに続く持続相から構成された。

IPAH-PSMCs において、CaSR を介した細胞外  $Ca^{2+}$  誘発性  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  上昇の持続相が、非選択的陽イオンチャンネルの阻害薬である  $La^{3+}$  によって抑制された。

IPAH-PSMCs において、受容体作動性  $Ca^{2+}$  チャンネルの活性化薬である 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG、ジアシルグリセロールアナログ) は、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$  を増加させた。また、約半数の細胞においては、 $Ca^{2+}$  オシレーションを誘発させた。一方、OAG は、Normal-PSMCs の  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  には影響を与えなかった。

#### (2) CaSR と機能連関する分子の検索

IPAH-PSMCs に高発現している  $La^{3+}$  感受性かつ OAG 感受性を有するイオンチャンネル分子を定量的リアルタイム PCR 法で網羅的に検索

した。その結果、非選択的陽イオンチャンネルである transient receptor potential canonical (TRPC) チャンネルの発現が、Normal-PSMCs よりも高かった。

また、ウェスタンブロット解析の結果、IPAH 患者由来の PSMCs および肺動脈平滑筋組織において、同じ TRPC チャンネルが、Normal 由来の PSMCs および肺動脈平滑筋組織よりも高発現していた。

IPAH-PSMCs において、TRPC チャンネルを siRNA 法でノックダウンさせると、CaSR を介した細胞外  $Ca^{2+}$  誘発性  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  上昇は、顕著に抑制された。

#### (3) CaSR と TRPC チャンネルの共発現系

Normal-PSMCs に CaSR と TRPC チャンネルを共発現させると、IPAH-PSMCs で観察される細胞外  $Ca^{2+}$  誘発性  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  増加を再現することが出来た。

さらに、IPAH-PSMCs で観察された細胞外  $Ca^{2+}$  によって活性化される非選択的陽イオンチャンネル電流も、Normal-PSMCs に CaSR と TRPC チャンネルを共発現させることによって再現された。

#### (4) まとめ

IPAH 患者の PSMCs における細胞外  $Ca^{2+}$  誘発性  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  上昇は、CaSR と TRPC チャンネルの機能的連関によることが示唆された。この分子機構が、IPAH 患者の過剰な  $Ca^{2+}$  流入や細胞増殖に関与している可能性が考えられる。

#### (5) おわりに

肺高血圧症の患者数は全世界で約 10 万人（国内では年間 100 万人に 1~2 人程度）と稀な疾患であるが、発症後の予後は極めて不良であり、5 年生存率は約 50% である。厚生労働省が定める特定疾患治療研究事業対象疾患（難病）に指定されている。肺高血圧症の発症機構は、完全には解明されていないため、本研究で明らかとなった新規  $Ca^{2+}$  シグナル経路は、その全体の機構解明につながると考えられる。

長年、肺高血圧症には適切な治療薬が存在せず、疾患の治療や患者の QOL (quality of life) の改善が不十分であった。最近になって、 $Ca^{2+}$  ブロッカーの他、プロスタグランジン ( $PGI_2$ ) 注射製剤 (エポプロステノール)、エンドセリン受容体拮抗薬 (ボセンタン)、ホスホジエステラーゼ (PDE5) 阻害薬 (シルデナフィル) など有効な治療薬が開発されてきているが、依然として十分な薬物治療が確立されたとは言い難く、新規の作用機序を持つ治療薬の開発が切望されている。そのため、本研究成果が治療方針の確立や新規分子を標的とした治療薬の開発に貢献できると考えられる。

### 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 10 件)

- (1) Smith KA, Voirit G, Tang H, Fraidenburg DR, Song S, Yamamura H, Yamamura A, Guo Q, Wan J, Pohl NM, Tauseef M, Bodmer R, Ocorr K, Thistlethwaite PA, Haddad GG, Powell FL, Makino A, Mehta D, Yuan JX. Notch activation of  $Ca^{2+}$  signaling mediates hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press (doi: 10.1165/rcmb.2014-02350C). 【査読有】
- (2) Song S, Yamamura A, Yamamura H, Ayon RJ, Smith KA, Tang H, Makino A, Yuan JX. Flow shear stress enhances intracellular  $Ca^{2+}$  signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(4):C373-C383 (2014) (doi: 10.1152/ajpcell.00115.2014). 【査読有】
- (3) Muto T, Usuda H, Yamamura A, Yoshida K, Ohashi A, Mitsui-Saitoh K, Sakai J, Sugimoto Y, Mizutani H, Nonogaki T, Hotta Y. Protective effects of fluvoxamine against ischemia/reperfusion injury in isolated, perfused guinea-pig hearts. *Biol Pharm Bull*, 37(5):731-739 (2014) (doi: 10.1248/bpb.b13-00552). 【査読有】
- (4) Yamamura A. Pathological function of  $Ca^{2+}$ -sensing receptor. *J Smooth Muscle Res*, 50:8-17 (2014) (doi: 10.1540/jsmr.50.8). 【総説】【査読有】
- (5) Yamamura H, Yamamura A, Ko E, Pohl N, Smith K, Zeifman A, Powell F, Thistlethwaite P, Yuan JX. Activation of notch signaling by short-term treatment with Jagged-1 enhances store-operated  $Ca^{2+}$  entry in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(9):C871-C878 (2014) (doi: 10.1152/ajpcell.00221.2013). 【査読有】
- (6) 山村彩. カルシウム感受性受容体の血管生理機能と病態発現変化. *血管*, 37(2):9-20 (2014) (URL: [http://jscr21.medic.mie-u.ac.jp/system/kyo\\_det.php?no=261](http://jscr21.medic.mie-u.ac.jp/system/kyo_det.php?no=261)). 【総説】【査読無】
- (7) Guo Q, Huang JA, Yamamura A, Yamamura H, Zimnicka AM, Fernandez R, Yuan JX. Inhibition of the  $Ca^{2+}$ -sensing receptor rescues pulmonary hypertension in rats and mice. *Hypertens Res*, 37(2):116-124 (2014) (doi: 10.1038/hr.2013.129). 【査読有】
- (8) 山村彩, 山村寿男, Yuan JX. 肺高血圧症における  $Ca^{2+}$  感受性受容体の機能亢進. *薬学雑誌*, 133(12):1351-1359 (2013) (doi: 10.1248/yakushi.13-00228-3). 【総説】【査読有】
- (9) Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voirit G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MSR, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A, Yuan JX. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel activity in pulmonary artery by upregulating  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v3.2$ . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305(2):L154-L164 (2013) (doi: 10.1152/ajplung.00313.2012). 【査読有】
- (10) Ko EA, Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Yamamura H, Yoo HY, Tang H, Smith KA, Sundivakkam PC, Zeifman A, Ayon RJ, Makino A, Yuan JX. Functional characterization of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells: Divergent effect of ROS. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304(11):C1042-C1052 (2013) (doi: 10.1152/ajpcell.00304.2012). 【査読有】

〔学会発表〕(計 16 件)

- (1) 山村彩. 肺動脈性肺高血圧症におけるニフェジピンの増悪効果. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 兵庫医療大学(神戸).
- (2) 山村彩. 肺動脈性肺高血圧症. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 20 日, 名古屋国際会議場(名古屋). 【シンポジウム講演】
- (3) 山村彩. 肺動脈性肺高血圧症. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 20 日, 名古屋国際会議場(名古屋). 【シンポジウム講演】
- (4) 山村彩. ニフェジピンは肺高血圧症で発現増加する  $Ca^{2+}$  感受性受容体を活性化する. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日, 名古屋国際会議場(名古屋).
- (5) 山村彩. モノクローリン誘発性肺高血圧症ラットにおけるニフェジピンの増悪効果. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2014, 2014 年 11 月 9 日, 静岡県立大学(静岡).
- (6) 山村彩. ジヒドロピリジン系  $Ca^{2+}$  チャネルブロッカーは肺高血圧症で機能亢進する  $Ca^{2+}$  感受性受容体を活性化する. 心血管膜輸送研究会 2014「心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略」, 2014 年 9 月 4 日, 生理学研究所(岡崎).
- (7) 山村彩. 肺高血圧症で機能亢進する  $Ca^{2+}$  感受性受容体はジヒドロピリジン系  $Ca^{2+}$  チャネルブロッカーによって活性化する. 第 56 回日本平滑筋学会総会, 2014

年 8 月 7 日, 新横浜プリンスホテル(横  
浜).

- (8) 山村彩.  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性受容体に対するジヒ  
ドロピリジン系  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルブロッカー  
の効果. 第 60 回日本薬学会東海支部大  
会, 2014 年 7 月 5 日, 鈴鹿医療科学大学  
(鈴鹿).
- (9) 山村彩. 肺動脈性高血圧における  $\text{Ca}^{2+}$ 感  
受性受容体と TRPC6 チャンネルの機能的連  
関. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3  
月 30 日, 熊本大学(熊本).
- (10) 山村彩. 肺高血圧症における  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性  
受容体と TRPC6 チャンネルの機能的共役.  
第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月  
19 日, 仙台国際センター(仙台).
- (11) 山村彩. 肺高血圧症における  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性  
受容体と TRPC6 チャンネルの機能的連関.  
第 91 回日本生理学会大会. 2014 年 3 月  
18 日, 鹿児島大学(鹿児島).【シンポジ  
ウム講演】
- (12) 山村彩. Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor  
function in idiopathic pulmonary  
arterial hypertension. 第 55 回日本平  
滑筋学会総会, 2013 年 8 月 6 日, 大雪ク  
リスタルホール(旭川).【受賞講演】
- (13) 山村彩. カルシウム感受性受容体と肺高  
血圧症. 第 55 回日本平滑筋学会総会,  
2013 年 8 月 6 日, 大雪クリスタルホール  
(旭川).【シンポジウム講演】
- (14) Aya Yamamura. Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing  
receptor function in idiopathic  
pulmonary arterial hypertension.  
International Union of Physiological  
Sciences 2013, July 23/2013,  
Birmingham (UK).
- (15) 山村彩. モノクロタリン誘発性肺高血圧  
症ラットにおけるカルシウム感受性受  
容体拮抗薬の効果. 第 123 回日本薬理学  
会近畿部会, 2013 年 7 月 12 日, ウィン  
クあいち(名古屋).
- (16) 山村彩. 肺高血圧症モデル動物における  
カルシウム感受性受容体拮抗薬の効果.  
第 59 回日本薬学会東海支部大会, 2013  
年 7 月 5 日, 名城大学(名古屋).

〔その他〕

ホームページ

<http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山村 彩 (YAMAMURA, Aya)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号: 40633219