

《その他》

冠攣縮性狭心症患者由来 iPSC 細胞を用いた病態の解明; p122RhoGAP/DLC-1 と phospholipase C の役割

田中 真実¹⁾, 長内 智宏²⁾, 奥村 謙³⁾,
富田 泰史⁴⁾, 吉岡 利忠¹⁾

要旨:【背景と目的】我々は冠攣縮性狭心症患者 (CSA) の皮膚線維芽細胞の Phospholipase C (PLC) 活性が亢進していることを報告してきた。本研究は, 冠攣縮性狭心症のメカニズムを解明するために, CSA 患者および対照被験者の皮膚線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (iPSC) を樹立し, 更に, iPSC を平滑筋細胞 (SMC) に分化誘導させ, CSA の病態に関与する細胞内 Ca^{2+} 流入の分子機構を調べた。【方法と結果】細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は Fura-2 AM を使用し測定した。アセチルコリン (ACh) $10^{-4}M$ 誘導性の $[Ca^{2+}]_i$ は, 対照 iPSC 由来 SMC と比し CSA iPSC 由来 SMC で優位に上昇した (53 ± 10 versus $129 \pm 24 nM$, $p < 0.05$)。前処理ジルチアゼム $10^{-4}M$ では, 対照 iPSC 由来 SMC では $42 \pm 1 nM$ ($p < 0.05$), CSA iPSC 由来 SMC では $72 \pm 10 nM$ ($p < 0.01$) に抑制された。ウェスタンブロット解析の結果, TRPC3 および PLC- $\delta 1$ は差はなかったが, p122RhoGAP/DLC-1 および TRPC6 の蛋白発現は, 対照 iPSC 由来 SMC と比し CSA iPSC 由来 SMC で, それぞれ 2.60 ± 0.8 および 1.68 ± 0.28 倍増加していた ($p < 0.05$)。PLC 活性は, 対照 iPSC 由来 SMC に比し CSA iPSC 由来 SMC において有意に高かった (3.12 ± 1.28 倍, $p < 0.05$)。【結論】DLC-1 および TRPC6 タンパク質の過剰発現と PLC 活性の増強は, CSA 患者における細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加に寄与している。

この研究は, 弘前大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得て行った (整理番号: 2013-086)。

キーワード: 冠攣縮性狭心症, 人工多能性幹細胞 (iPSC), Phospholipase C, アセチルコリン

1) 弘前学院大学看護学部看護学科

2) 弘前大学大学院保健学研究科

3) 済生会熊本病院循環器内科

4) 弘前大学医学部循環器腎臓内科学講座

連絡先: 田中真実 〒036-8231 弘前市稔町20-7

Tel: 0172-31-7100, FAX: 0172-31-7101, E-mail: mtanaka@hirogaku-u.ac.jp

受理: 2021年3月12日

冠攣縮性狭心症患者由来iPS細胞を用いた病態の解明; p122RhoGAP/ DLC-1と phospholipase Cの役割
田中 真実¹⁾、長内 智宏²⁾、奥村 謙³⁾、富田 泰史⁴⁾、吉岡 利忠¹⁾

1)弘前学院大学看護学部看護学科、2)弘前大学大学院保健学研究科、3)済生会熊本病院循環器内科、4)弘前大学医学部循環器腎臓内科学講座

Backgrounds

- 冠攣縮性狭心症は冠動脈が一過性に攣縮することによって引き起こされる狭心症だが、冠攣縮の原因は未だ明らかにされていない。
- 冠攣縮性狭心症患者 (CSA) の皮膚線維芽細胞のPhospholipase C (PLC) 活性が約3倍亢進しており冠動脈の緊張度と相関している (*JACC 2000*)。
- 冠攣縮性狭心症患者の男性の約1割ではPLC- $\delta 1$ 遺伝子の257番目のアミノ酸であるアルギニンのヒスチジンへの変異 (R257H) が証明され、その活性は野生型と比べ有意に亢進している (*Circulation 2002*)。
- 冠攣縮性狭心症患者の皮膚線維芽細胞ではPLC- $\delta 1$ の活性化因子であるp122RhoGAP/ DLC-1 (DLC-1) の発現が亢進していることを証明し(*ATVB 2010*)、DLC-1過剰発現トランスジェニックマウスではWTに比べ冠攣縮性狭心症が高率に誘発する (*PLoS One 2015*)。

Objective

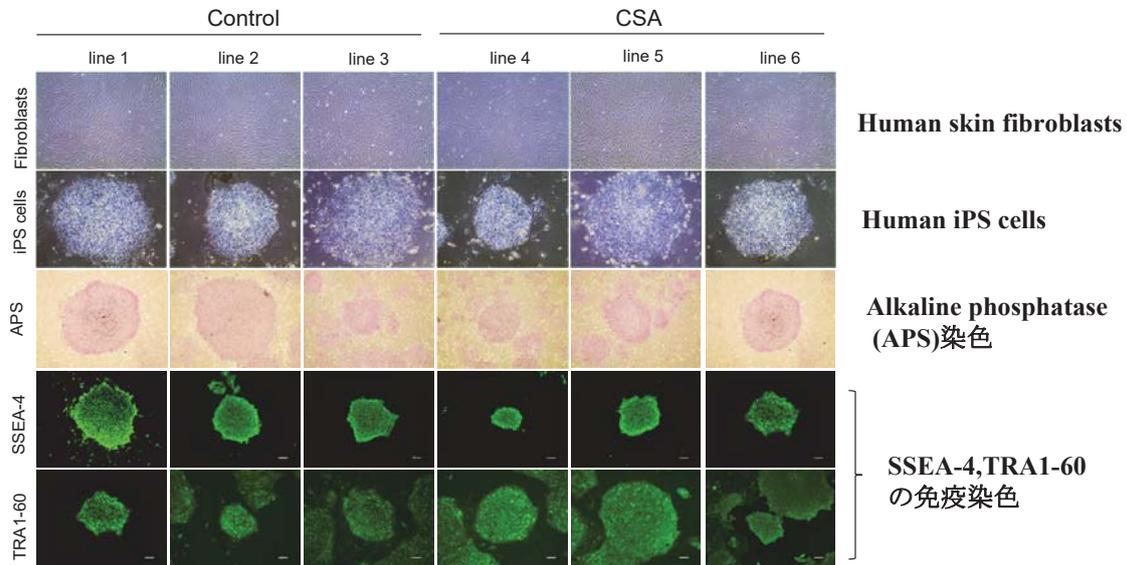
本研究は、冠攣縮性狭心症のメカニズムを解明するために、CSA患者(n=3)および対照被験者(n=3)の皮膚線維芽細胞から人工多能性幹細胞(iPSC)を樹立し、更に、iPSCを平滑筋細胞(SMC)に分化誘導させ、CSAの病態に関与する細胞内Ca²⁺流入の分子機構を調べた。

Materials and Methods

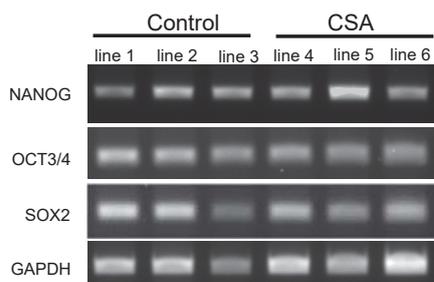
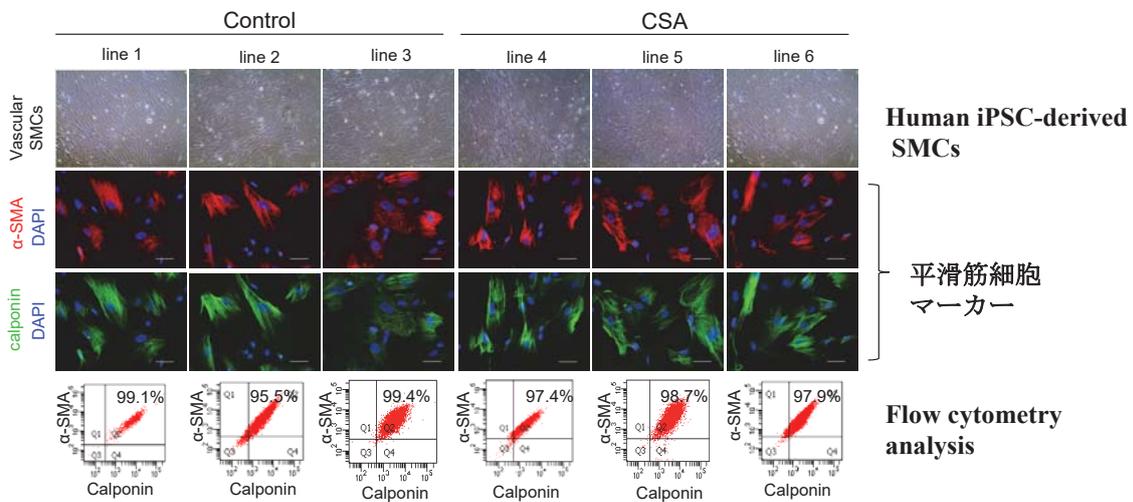
1. Cell culture:
 - ・ Skin fibroblasts [coronary spastic angina (CSA, n=3), control subjects (n=3)]
2. iPSC generation
 - ・ Episomal vectors (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, and pCXLE-hUL)
3. Differentiation of human iPSCs into SMCs
 - ・ Human iPSC-SMCs were derived using an embryoid body (EB) method.
4. Measurement of [Ca²⁺]_i:Fura-2 AM (excitation 340/380 nm, emission 510 nm)
5. Agonist : Acetylcholine (ACh)
6. Chemicals:
 - ・ Diltiazem (calcium channel blocker)
 - ・ 2-APB (TRP,IP₃Rチャネルの阻害剤)
 - ・ Thapsigargin (小胞体膜のCa²⁺-ATPase(SERCA)阻害剤)
7. PLC activity
 - ・ ³H- phosphatidyl inositol bisphosphate を用いて測定
8. Transfection genes:
 - ・ TRPC3 channel siRNA
 - ・ TRPC6 channel siRNA

Results

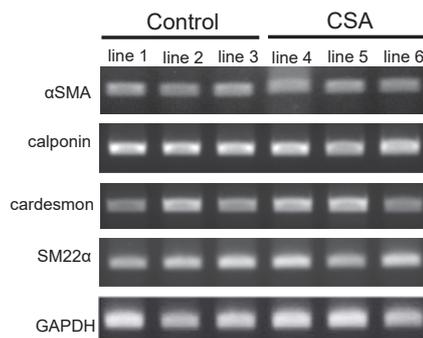
皮膚線維芽細胞からのヒトiPS細胞の樹立



ヒトiPS細胞から平滑筋細胞への分化誘導

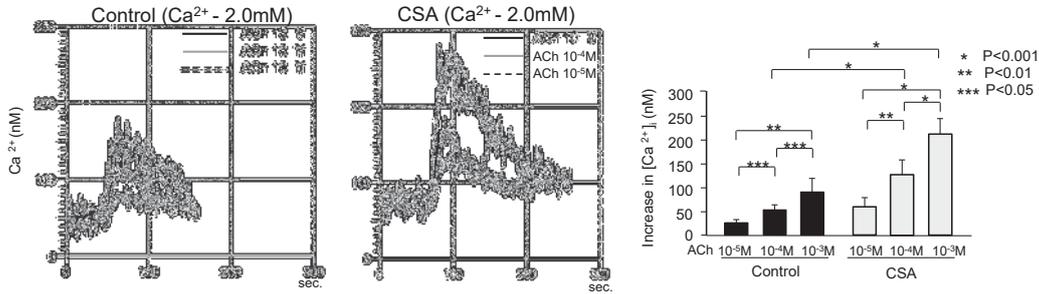


iPSC のNANOG, OCT3/4 and SOX2 mRNAのRT-PCR 解析

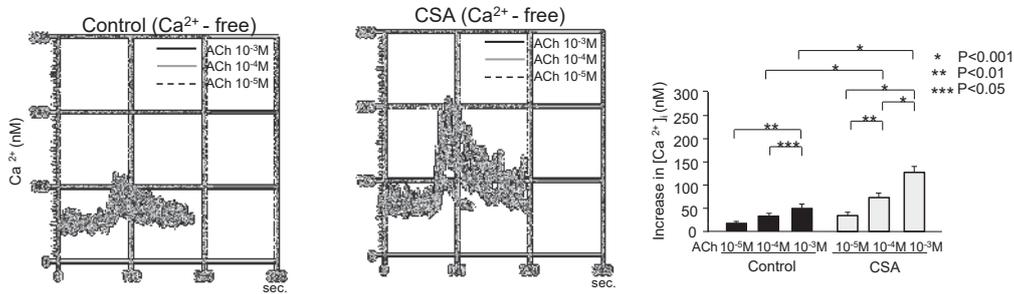


iPSC の平滑筋細胞マーカー α SMA, calponin, cardesmon, および SM22 α mRNAのRT-PCR 解析

ヒトiPSC由来SMCにおけるACh投与における細胞内カルシウム濃度の比較

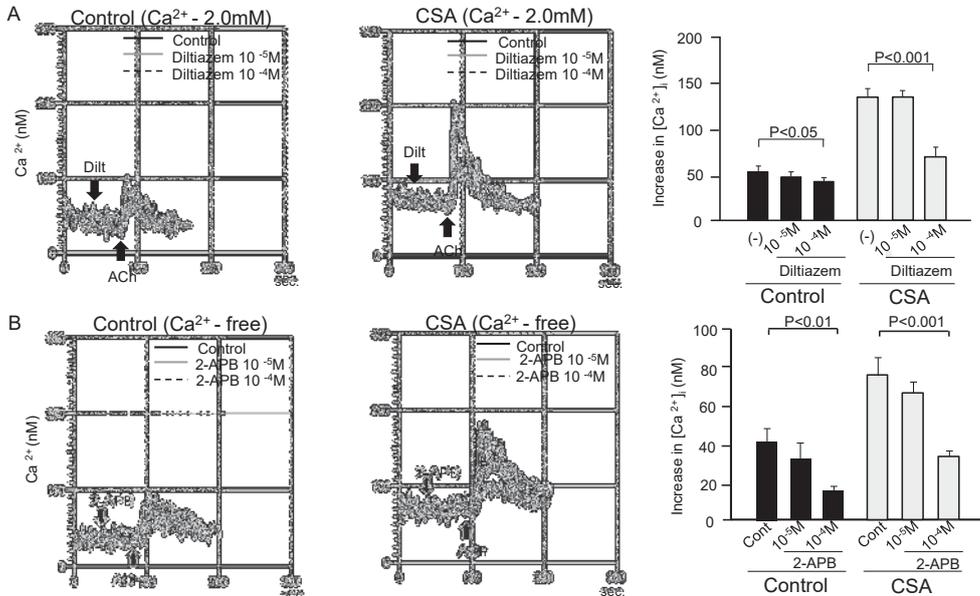


アセチルコリン (ACh) 10^{-4} M誘導性の $[Ca^{2+}]_i$ は、対照iPSC由来SMCと比しCSA iPSC由来SMCで有意に上昇した (53 ± 10 vs. 129 ± 24 nM, $p<0.05$)。



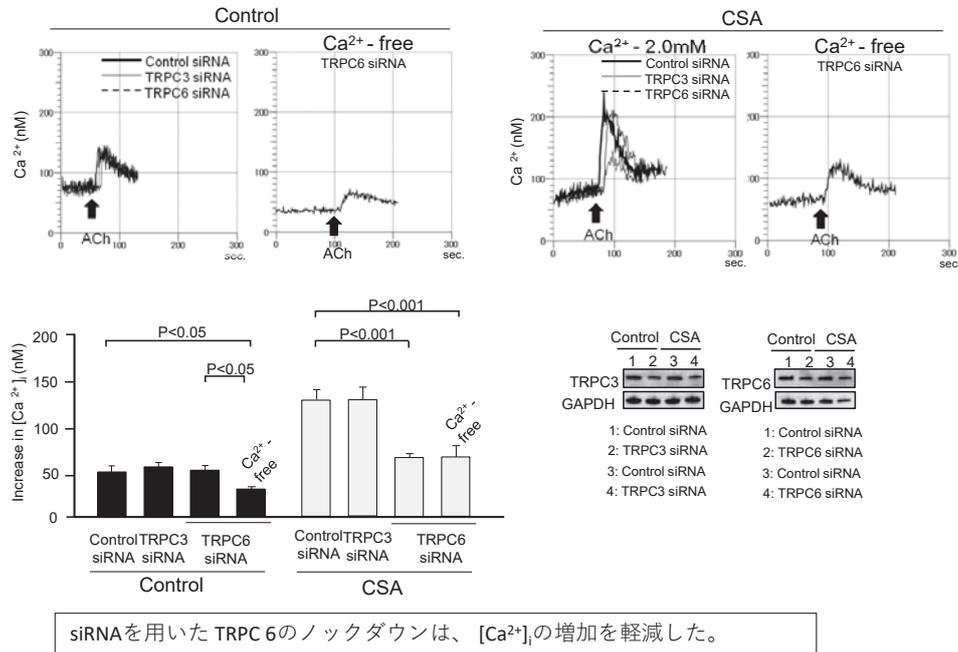
Ca^{2+} -free bufferを用いたときの $[Ca^{2+}]_i$ は、対照iPSC由来SMCよりCSA iPSC由来SMCにおいて有意に上昇した(ACh 10^{-4} M ; 72 ± 10 vs. 30 ± 5 nM, $p<0.001$)。

ヒトiPSC細胞由来SMCにおけるACh投与に対するジルチアゼムおよび2-APBの効果

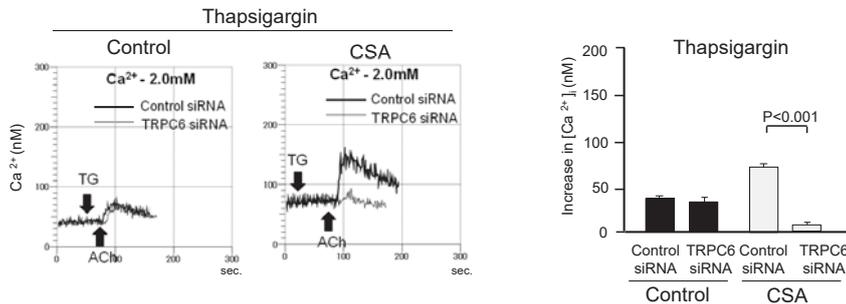


A: 前処理ジルチアゼム 10^{-4} Mでは、対照iPSC由来SMCでは 42 ± 1 nM ($p<0.05$)、CSA iPSC由来SMCでは 72 ± 10 nM ($p<0.01$) に抑制された。B: 小胞体からの Ca^{2+} リリースを評価するため、 Ca^{2+} フリー緩衝液を用い2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) 10^{-4} Mで前処理したときの、ACh 10^{-4} M誘導性の $[Ca^{2+}]_i$ は、対照iPSC由来SMCでは 41 ± 9 nM から 17 ± 3 nM ($p<0.01$)、CSA iPSC由来SMCでは 78 ± 9 nM から 36 ± 5 nM ($p<0.001$)となり両者とも有意に抑制された。

ヒト iPSC 由来 SMC における ACh 投与に対する TRPC3 siRNA および TRPC6 siRNA の効果

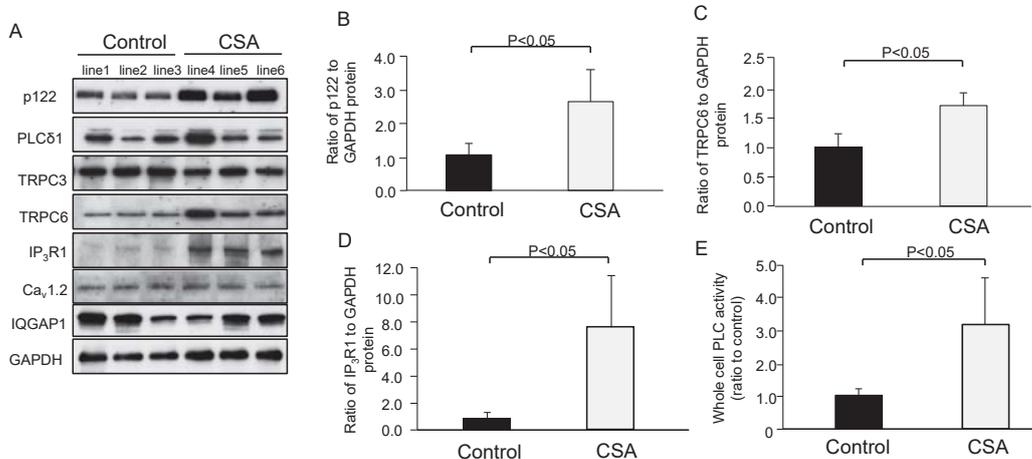


TRPC 6 siRNA ヒト iPS 細胞由来 SMC における ACh 投与に対する Thapsigargin の効果



TRPC 6 のノックダウンした細胞へ、Thapsigargin を添加すると、CSA iPSC 由来 SMC の $[Ca^{2+}]_i$ の増加をブロックした。

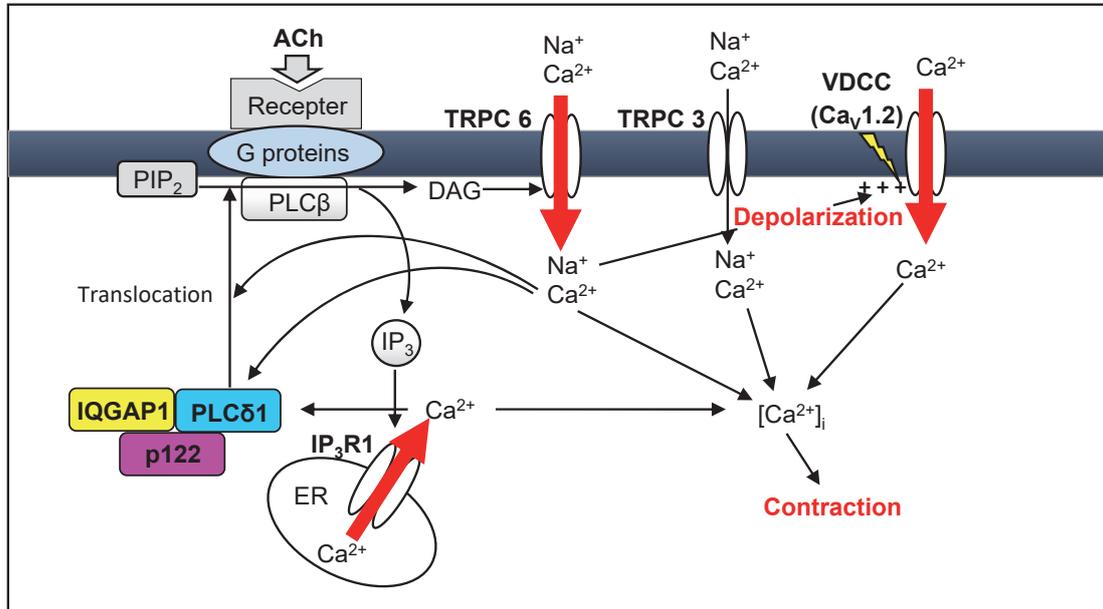
ヒト iPS 細胞由来 SMC における各種タンパク発現および PLC 活性



B, C, and D: p122、TRPC6 および イノシトール 1、4、5-三リン酸受容体 (IP₃R1) の蛋白発現は、対照 iPSC 由来 SMC と比し CSA iPSC 由来 SMC で、それぞれ 2.53 ± 0.88 、 1.75 ± 0.26 および 7.53 ± 3.78 倍増加していた ($p < 0.05$)。E: PLC 活性は、対照 iPSC 由来 SMC に比し CSA iPSC 由来 SMC において有意に高かった (3.12 ± 1.28 倍、 $p < 0.05$)。

Conclusions

p122RhoGAP/DLC-1およびTRPC6タンパク質の過剰発現とPLC活性の増強は、CSA患者における細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加に寄与している。



「なお、この研究は第61回日本平滑筋学会総会において学术交流優秀賞（ポスター賞）を受賞した」

Experimental study for elucidating mechanism of coronary spasm using iPSC; role of p122 RhoGAP / DLC-1 and phospholipase C

Makoto TANAKA¹⁾, Tomohiro OSANAI²⁾, Ken OKUMURA³⁾,
Hirofumi TOMITA⁴⁾ and Toshitada YOSHIOKA¹⁾

Abstract: Background: We previously reported that the activity of phospholipase C (PLC)- δ 1 and p122RhoGAP/DLC1 protein is enhanced in patients with coronary spastic angina (CSA). Here, we generated induced pluripotent stem cell (iPSC) from the skin fibroblasts, and differentiated these iPSC into smooth muscle cells (SMCs). We investigated molecular mechanism for the Ca^{2+} influx, which is involved in the pathogenesis of CSA.

Methods and Results: The ACh-induced influx of Ca^{2+} was measured using Fura-2 AM. ACh at 10^{-4}M -induced increase in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) levels from baseline: 52 ± 15 nM in the control iPSC-derived SMCs and 130 ± 33 nM in the CSA iPSC-derived SMCs ($p < 0.05$, $n = 6$). It was suppressed by diltiazem at 10^{-4}M to 42 ± 1 nM in the control iPSC-derived SMCs and to 72 ± 10 nM in the CSA iPSC-derived SMCs (both $p < 0.05$, $n = 6$). Western blot analysis showed that transient receptor potential cation channel 3 (TRPC3) and PLC- δ 1 protein expression were not different, but p122RhoGAP/DLC-1 and TRPC6 protein levels were significantly increased by 2.60 ± 0.98 times and 1.68 ± 0.28 times, respectively, in the CSA iPSC-derived SMCs as compared with control iPSC-derived SMCs (both $p < 0.05$). PLC activity was significantly higher (3.12 ± 1.28 times) in the CSA iPSC-derived SMCs than in the control iPSC-derived SMCs ($p < 0.05$).

Conclusions: p122RhoGAP/DLC-1 and TRPC6 protein overexpression and enhanced PLC activity contribute to the increased intracellular Ca^{2+} concentration in CSA patients.

Key words : coronary spastic angina (CSA), induced pluripotent stem cell (iPSC), phospholipase C, Acetylcholine

1) Department of Nursing, Hirosaki Gakuin University

2) Department of Nursing Science, Hirosaki University Graduate School of Health Science

3) Department of Biomolecular Science, Fukushima Medical University School of Medicine

4) Department of Cardiology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Contact information: Makoto Tanaka

20-7 MINORI-CHO, HIROSAKI 036-8213, JAPAN

Tel: 0172-31-7100, FAX: 0172-31-7101, E-mail: mtanaka@hirogaku-u.ac.jp