

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07978

研究課題名(和文) 心臓におけるTRPM2チャネルの局在とその役割

研究課題名(英文) Localization and role of TRPM2 channel in the heart

研究代表者

清水 俊一 (Shimizu, Shunichi)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：60196516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TRPM2は細胞の形質膜に存在し、酸化ストレスにより活性化され細胞内にCa²⁺を輸送する陽イオンチャネルである。本研究では、心臓におけるTRPM2チャネルの発現分布及びその機能について明らかにすることを目的とした。

心臓においてTRPM2 mRNAの発現は右心房、特に大静脈洞近傍に局在していること、その心筋細胞でTRPM2活性が認められることを明らかにした。さらに、摘出心臓の灌流標本を用いた実験で、Gsタンパク質共役型受容体刺激、温度刺激による心拍数の増加に、TRPM2チャネルが促進的に関わっていること、さらに、虚血再灌流による不整脈の発生にTRPM2チャネルが関わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：TRPM2 is an oxidative stress-sensitive Ca²⁺-permeable channel. In this study, we examined the localization and the function of TRPM2 channels in the heart from mouse. In the heart, TRPM2 mRNA was expressed in right atrium, especially, around sinus venarum cavarum. In fact, the cells from around sinus venarum cavarum showed TRPM2 channel-dependent current induced by ADP-ribose. In the perfusion model of isolated heart, we found that TRPM2 channels are implicated in the increases of heart rate by the stimulation of adrenaline beta-1 receptor and the rising of temperature. Furthermore, we found that TRPM2 channel were also implicated in the induction of arrhythmia during cardiac ischemia-reperfusion.

研究分野：薬理学

キーワード：TRPM2チャネル 心臓 心機能 不整脈 虚血再灌流 心拍数

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における TRP 関連タンパクは、1980 年代後半からクローニングが進められ、現在までに 6 つのサブファミリーからなる、少なくとも 28 分子種より構成されていることが明らかにされている。これらの分子種は、長くその分子実態が不明であった膜電位に依存しない Ca^{2+} 透過性のイオンチャネル群を形成しており、受容体作動性 Ca^{2+} 流入、温度センサー、侵害受容など様々な機能を担っていることが示されている。TRPM2 は、2002 年に我々及び他のグループから相次いで形質膜に存在し、活性酸素種の 1 つである過酸化水素刺激や酸化ストレスにより産生される ADP-ribose により活性化されることが報告された Ca^{2+} 透過性チャネルである。TRPM2 活性化機構については多くの研究がなされ、TRPM2 は過酸化水素刺激により poly-ADP-ribose polymerase を介して産生される ADP-ribose (ADPR) が C 末端側に存在する Mut-T モチーフに結合することにより活性化されると考えられている。また、TRPM2 活性化は細胞質 Ca^{2+} の上昇や 36 以上の温度により促進されることが示されている (図 1)。

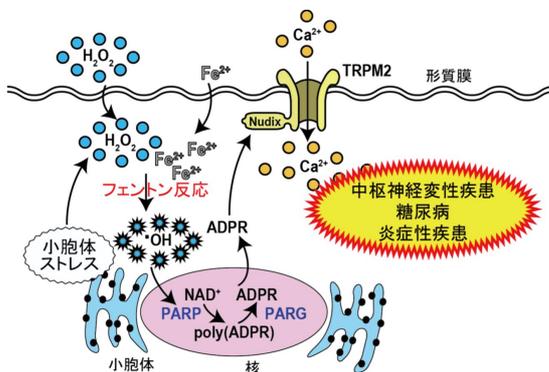


図 1 過酸化水素刺激による TRPM2 チャンネルの活性化機構

TRPM2 は、発見当初から酸化ストレスによる Ca^{2+} オーバーロードを惹起し、細胞死を誘発させる細胞死誘導チャネルであると考えられていた。一方、我々は単球/マクロファージにおいて、過酸化水素刺激によるケモカイン産生の亢進に TRPM2 が関わっていること、更に、TRPM2 欠損マウスを用いて、TRPM2 活性化が実験的潰瘍性大腸炎の増悪に関与していることを明らかにした。この報告は、生体内において TRPM2 の活性化が細胞死だけではなく、炎症性細胞の活性化に関わっていることを明らかにした世界初の報告となった。その後、脳虚血障害や神経因性疼痛にも TRPM2 の活性化が関わっていることが示されている。このように、TRPM2 は様々な炎症反応を基盤とする病態に関わることから、炎症性疾患治療薬の標的分子として注目されている。

2. 研究の目的

近年、我々は心臓の虚血 再灌流障害の増悪に、TRPM2 活性化が関与していることを示した。この機序として、主に好中球に存在する TRPM2 活性化を介した好中球の活性化が関わっていることを示したが、心臓にも低レベルの TRPM2 発現が認められた。事実、心室筋細胞の TRPM2 発現を示した報告がある。しかしながら、心臓における TRPM2 の役割はほとんど不明のままである。最近、予備実験として、心臓における TRPM2 の発現分布について、心臓を右心房、左心房、右心室及び左心室に分画し検討したところ、右心房に高い発現が認められた。右心房側にはペースメーカーが存在していることから、ペースメーカーの調節における TRPM2 の役割に興味を持たれる。また、TRPM2 は様々な炎症性疾患治療薬のターゲット分子として注目されていることから、心臓における TRPM2 の役割を明らかにすることは副作用の発現予測の観点からも重要である。そこで、本研究は心臓における TRPM2 の発現分布を明らかにし、心臓機能調節及び心臓障害における TRPM2 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物

実験には野生型 (WT) マウス (C57BL/6J) 及び TRPM2 欠損 (KO) マウスを自家繁殖し、雄性マウス (7~9 週齢, 体重 20~30 g) を使用した。尚、本研究で用いたすべての実験プロトコルは、帝京平成大学倫理委員会および横浜薬科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

摘出心臓の灌流

麻酔下でマウスより心臓を摘出し、直ちにランゲンドルフ灌流装置に装着し、定圧灌流を行った。心電図は、電極を心臓に装着することにより測定した。

電気生理学的実験

摘出した心臓を右心房、右心室、左心房及び左心室に分画し、酵素法により心筋細胞を単離した。その心筋細胞に微小ガラス電極を装着し、ホールセルパッチクランプにより電流を測定した。

4. 研究成果

心臓における TRPM2 の発現分布

マウスより摘出した心臓を脱血し、右心房、左心房、右心室及び左心室に分画した。それぞれの組織から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により TRPM2 mRNA 発現を調べた。その結果、右心房に TRPM2 mRNA の高発現が認められた (図 2)。

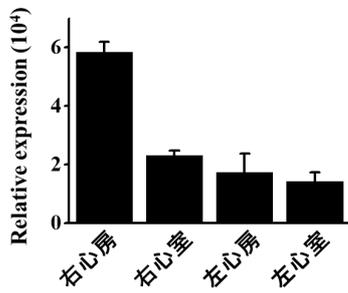


図2 心臓における TRPM2 mRNA の発現分布

心臓の右心房側には、ペースメーカーである洞房結節が存在する。そこで、洞房結節が存在する大静脈洞周辺部の組織切片を作製し、in situ ハイブリダイゼーション法により、TRPM2 mRNA の発現を検討した。WT マウスより作製した切片において、antisense により大静脈洞周辺部に陽性反応が認められたが、sense では認められなかった。また、洞房結節細胞のマーカーである BMP-10 antisense でも同様の部位に陽性反応が認められた。以上の結果より、マウス心臓において TRPM2 は、洞房結節に局在して発現している可能性が示された。

心臓における TRPM2 チャンネルの機能的発現

TRPM2 は、細胞内に ADPR を導入すると活性化される。そこで、電気生理学的手法（ホールセルパッチクランプ法）を用いて、WT 心臓と TRPM2 KO 心臓の大静脈洞周辺部組織から分離した心筋細胞において、TRPM2 チャンネルが機能的に発現しているか検討した。その結果、WT 心臓より調製した細胞では、ADPR 導入による電流が認められたが、TRPM2 KO 心臓では認められなかった。また、WT 心臓の左心室及び右心室から単離した心筋細胞では、ADP-ribose 導入による電流は、認められなかった。これらの結果は、大静脈洞周辺部組織の細胞において TRPM2 が機能的に発現していることを示している。また、前述した RT-PCR 法による TRPM2 mRNA の発現分布の結果とも一致していた。

心拍数調節における TRPM2 チャンネルの役割

心拍数調節における TRPM2 の役割を明らかにするために、アドレナリン β_1 受容体刺激薬である isoproterenol 導入による心拍数の変化を WT 心臓と TRPM2 KO 心臓で比較した（図3）。灌流温度を 38 から 30 に下げると、WT 心臓と TRPM2 KO 心臓共に心拍数が減少した。次に、灌流温度 30 において、WT 心臓に 10 nM isoproterenol を導入すると、心拍数の著しい増加が認められた。一方で、TRPM2 KO 心臓においても、isoproterenol の導入により、心拍数は増加したが、その増加は WT 心臓と比較して低かった。

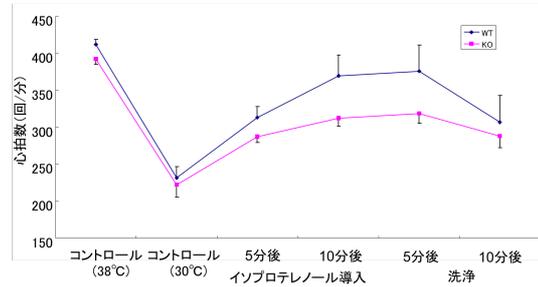


図3 アドレナリン β_1 受容体刺激による心拍数の変化における TRPM2 チャンネルの影響

TRPM2 チャンネルは、温度感受性であることが知られており、温度を上昇させると活性化されることが報告されている。そこで、灌流温度を 30 から 42 刻みで 42 まで上昇させ、心拍数の変化を測定した。その結果、WT 心臓、TRPM2 KO 心臓共に温度の上昇とともに心拍数が増加し、42 において、WT 心臓の方が TRPM2 KO 心臓よりも心拍数の増加が大きかった。

以上の結果より、心臓において TRPM2 チャンネルは、Gs 共役型受容体であるアドレナリン β_1 受容体刺激や温度上昇による心拍数の増加に関与していることが明らかとなった。

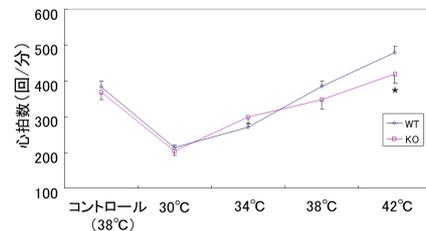


図4 灌流温度上昇による心拍数の変化における TRPM2 チャンネルの影響

心臓の虚血再灌流による不整脈の発生における TRPM2 チャンネルの役割

TRPM2 チャンネルは、活性酸素刺激により活性化される。また、組織の虚血再灌流時には、活性酸素が産生され、組織障害や不整脈の誘発にかかわっている。そこで、虚血再灌流による不整脈の発生に TRPM2 チャンネルが関わっているか、WT 心臓と TRPM2 KO 心臓を比較することにより検討した。虚血は、摘出心臓の灌流を 20 分間停止することにより誘導し、再灌流時の不整脈の発生を R-R 間隔を指標に測定した。その結果、WT 心臓で認められた不整脈の発生が、TRPM2 KO 心臓では著しく抑制されることを見出した。

まとめ

TRPM2 チャンネルは、心臓において右心房、特に大静脈洞周辺に局在して発現していることが認められた。また、TRPM2 チャンネルは、Gs タンパク質共役型受容体刺激および温度上昇による心拍数の増加、さらに虚血再灌流による不整脈の発生に関与しているようである。

5. 主な発表論文等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 俊一 (SHIMIZU, Shunichi)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：60196516

(2) 研究分担者

戸田 雄大 (TODA, Takahiro)
帝京平成大学・薬学部・講師
研究者番号：30573852

根来 孝治 (NEGORO, Takaharu)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：70218270

(3) 研究協力者

沼田 朋大 (NUMATA, Tomohiro)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：20455223