

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08537

研究課題名(和文) 洞房結節細胞のCav1.3-TRPM4機能連関と持続性内向き電流の分子機構の解明

研究課題名(英文) Potential link between Ca²⁺-activated cation TRPM4 channels and Ist in cardiac pacemaker cells

研究代表者

豊田 太 (Toyoda, Futoshi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90324574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の洞房結節細胞に観察される持続性内向きNa電流(Ist)の発生にL型CaチャネルCav1.3が関与することを発見した。しかしながら、「Cav1.3がどのような機序でNa電流を発生させるか」という本質的な問題を解決する必要がある。本研究では、Ca依存性NaチャネルであるTRPM4とCav1.3が機能的に連関しIstを発生する可能性を検討した。TRPM4阻害薬によるIstの抑制、さらにIst発生中の細胞内Ca上昇を観察した。しかしながら、TRPM4ノックアウトマウスでも野生型動物と同様にIstは記録された。結論的に、Cav1.3がTRPM4と機能連関によりIstを発生する可能性は否定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続性内向きNa電流(Ist)は心拍リズムの調整に強く関与することが示唆されており、その分子機構の解明は心臓の拍動リズムの仕組みという根源的な問いにも触れる生理学的に重要な課題である。本研究は、持続性内向きNa電流(Ist)の分子機構としてひとつのもっともらしい可能性を検証する試みである。結果として当該仮説は否定されたが、Istの分子機構の全容解明に向けて着実な一歩となる。重症心不全や心房細動といった心臓疾患ではリズムコントロールが重要である。Istの分子機構の解明は創薬への可能性を開き、臨床に還元され得る展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported that L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels are required for the generation of a dihydropyridine-sensitive Na⁺ current, previously described as the sustained inward current, Ist, in heart pacemaker cells. However, currently available recombinant Cav1.3 channels are highly selective for Ca²⁺ and it remains a challenge to elucidate the molecular mechanism allowing Cav1.3 channels to generate a Na⁺ conductance. In the present study, we show that Ist is inhibited by 9-phenanthrol and flufenamic acid, both are known to block TRPM4 Ca²⁺-activated cation channels. In addition, simultaneous measurements of whole-cell membrane currents and intracellular Ca²⁺ revealed that Ist activation was accompanied by a sustained elevation of intracellular Ca²⁺. However, patch-clamp measurements of Ist were not affected by TRPM4 gene ablation. In conclusion, we failed to provide the evidence for the potential link between TRPM4 and Ist.

研究分野：生理学

キーワード：心臓 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

洞房結節細胞に存在する持続性内向き Na^+ 電流 (I_{st}) は心臓のペースメーカー活動に寄与することが示唆されているものの、その分子機構は明らかでない。最近、我々は、遺伝子改変マウスを用いて、L型 Ca^{2+} チャンネルの洞房結節領域特異的アイソフォームである $\text{Cav}1.3$ が I_{st} の発生に寄与することを明らかにした (Toyoda *et al.*, 2017)。しかしながら、この発見は「L型 Ca^{2+} チャンネルがどのように Na^+ 電流を発生するのか」という本質的な問題を含んでいる。

TRPM4 は細胞内 Ca^{2+} に依存して活性化される Na^+ チャンネルであり、洞房結節を含む心臓刺激伝導系に強く発現している。ヒトの遺伝子変異による TRPM4 の機能低下あるいはノックアウトマウスでは伝導障害が引き起こされることが知られており、薬剤による TRPM4 の抑制は徐脈を呈する。しかしながら、TRPM4 と I_{st} との関連は未だ検討されていない。

2. 研究の目的

$\text{Cav}1.3$ を Ca^{2+} 流入と TRPM4 が機能的に関連して I_{st} を発生する可能性を検証することを目的にする。

3. 研究の方法

- 1) パッチクランプ実験で種々の TRPM4 遮断薬が I_{st} に及ぼす影響を調べる。
- 2) 膜電流と細胞内 Ca^{2+} の同時計測を行い、 I_{st} 発生中の細胞内 Ca^{2+} 動態を明らかにする。
- 3) TRPM4 ノックアウトマウスを用いてパッチクランプ実験を行い TRPM4 と I_{st} の関連を直接的に検証する。

4. 研究成果

1) I_{st} に及ぼす TRPM4 遮断薬 (9-phenanthrol ならびに flufenamic acid) の影響

マウスの心臓から単離した洞房結節細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して誘発した I_{st} に及ぼす 9-phenanthrol ならびに flufenamic acid の効果を図 1 に示す。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0.1 mM に設定して L型 Ca^{2+} 電流を最小化し、脱分極刺激を与えて I_{st} を誘発した。L型 Ca^{2+} 電流の遮断薬である Nifedipine を投与すると I_{st} は消失した。同様に 9-phenanthrol ならびに flufenamic acid も I_{st} を素早くほぼ完全に抑制した。

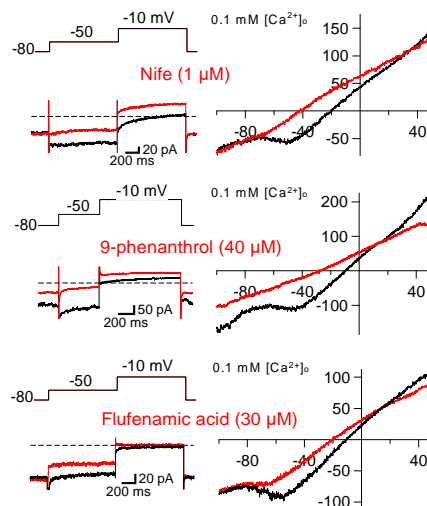


図 1

I_{st} was elicited either by voltage command square pulses (left) or by ramp pulses (right) before (black trace) and during application (red trace) of nifedipine, 9-phenanthrol or flufenamic acid. Note that 9-phenanthrol inhibited not only I_{st} but also a linear background current.

一方、9-phenanthrol ならびに flufenamic acid の L型 Ca^{2+} 電流への影響を調べたところ、いずれの薬剤も、 $\text{Cav}1.2$ ならびに $\text{Cav}1.3$ を異種発現した細胞、さらに洞房結節細胞において、同電流への抑制作用が観察された (図 2)。これらの事実から、 I_{st} と TRPM4 の関連を薬理的に示すことが困難であることが判明した。

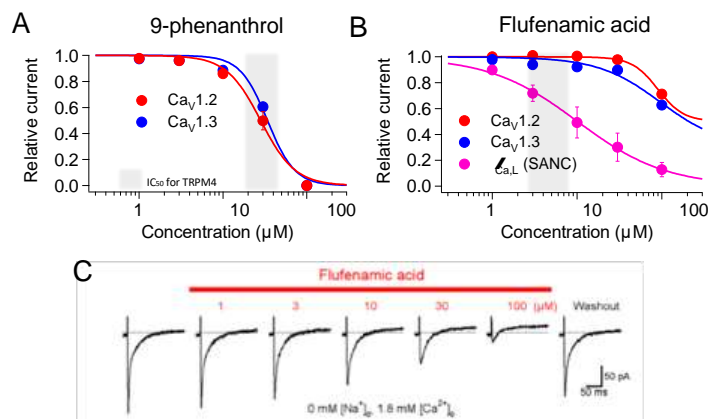


図 2

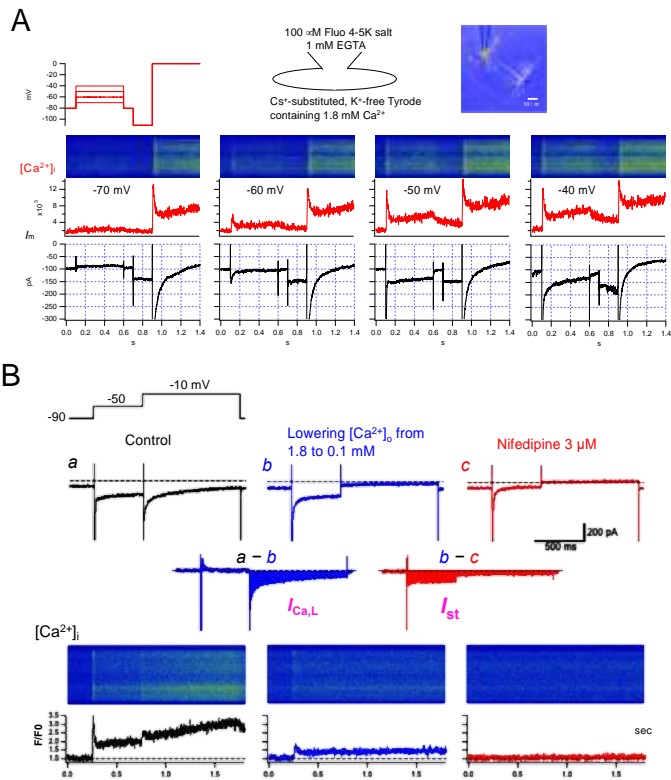
Dose-response relationships of L-type Ca^{2+} channel block by 9-phenanthrol (A) and flufenamic acid (B). Ca^{2+} currents were elicited in HEK cells transfected with either rat $\text{Ca}_V1.2$ or $\text{Ca}_V1.3$. Native $I_{\text{Ca,L}}$ was recorded from mouse SAN cells in the TEA^+ -substituted, Na^+ -free external condition (C).

2) I_{st} の発生と細胞内 Ca^{2+} 動態

マウスの単離洞房結節細胞にパッチクランプ法を適用し、ガラス電極を介して Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fluo-4 を細胞内投与した。同細胞に膜電位固定を行い I_{st} を記録するとともに、共焦点レーザー照射を行いラインスキャンモードで細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を同時にモニターした (図 3)。保持電位 -80 mV から -60 mV に脱分極すると、 I_{st} が誘発するとともに細胞内 Ca^{2+} の持続的な上昇が観察された。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 1.8 mM から 0.1 mM に低下させると、 I_{st} はほとんど影響されなかったが、細胞内 Ca^{2+} シグナルは消失しないものの大幅に減弱した。さらに Nifedipine を投与すると、 I_{st} ならびに細胞内 Ca^{2+} シグナルともに消失した。これらの実験から、 I_{st} 誘発の背景に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はあるものの、定量的な因果関係を明らかにすることはできなかった。

図 3

(A) Simultaneous measurements of $[Ca^{2+}]_i$ concentrations (line scan images and average intensity levels of each line) and whole-cell membrane currents. Cell was held at -80 mV and given depolarizing pulses to test potentials between -70 and -40 mV, followed by a depolarizing step to 0 mV to fully activate L-type Ca^{2+} channels. (B) Changes in $[Ca^{2+}]_i$ concentrations during I_{st} recordings before (a) and after (b) reducing $[Ca^{2+}]_o$ from 1.8 to 0.1 mM and subsequent application of 3 mM nifedipine (c).



3) TRPM4 ノックアウトマウスにおける I_{st}

I_{st} と TRPM4 の因果関係を薬理学実験や細胞内 Ca^{2+} 計測実験で明確に示すことが困難であったため、TRPM4 ノックアウトマウスにおける I_{st} の有無を確認する実験を当該マウスを所有する Mangoni 博士 (CNRS, IGF、モンペリエ、フランス) の研究室に赴き遂行した。結果、TRPM4 ノックアウトマウスにおいても I_{st} は存在し (図 4)、その大きさも野生型マウスと有意な差はないことが判明した。

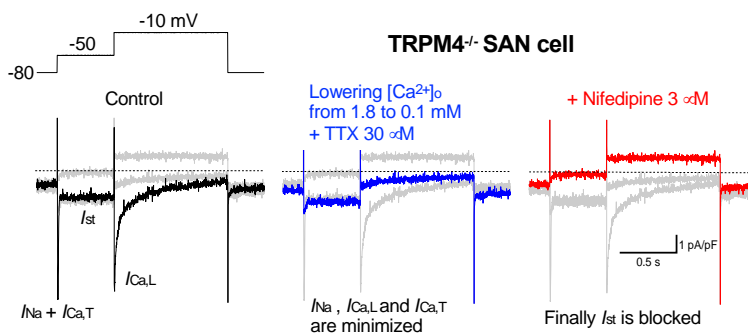


図 4

Representative whole-cell patch-clamp recordings of I_{st} in SAN cells isolated from a TRPM4^{-/-} mouse. The Cs⁺-rich pipette solution containing 5 mM EGTA was used. During experiments, the funny current (I_f) was continuously blocked by addition of 5.4 mM CsCl in the external solution.

以上の結果から、 $Ca_v1.3$ が TRPM4 と機能連関することで、 I_{st} を誘発するという可能性はないと結論され、全く別の機構が関与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toyoda Futoshi, Mesirca Pietro, Dubel Stefan, Ding Wei-Guang, Striessnig Joerg, Mangoni Matteo E., Matsuura Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 CaV1.3 L-type Ca ²⁺ channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na ⁺ current	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08191-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toyoda Futoshi, Wei-Guang Ding, Matsuura Hiroshi	4. 巻 470
2. 論文標題 Heterogeneous functional expression of the sustained inward Na ⁺ current in guinea pig sinoatrial node cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-017-2091-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 豊田 太・野間昭典・丁 維光・松浦 博
2. 発表標題 CaV1.3L型カルシウムチャネルのCa ²⁺ およびNa ⁺ 透過機構
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 (誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toyoda F, Ding WG, Matsuura H
2. 発表標題 Potential link between Ca ²⁺ -activated TRPM4 channels and Its in mouse cardiac pacemaker
3. 学会等名 9th FAOPS Congress, 2019, Kobe (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田 太、丁 維光、松浦 博
2. 発表標題 心臓ペースメーカー細胞のL型Ca ²⁺ チャネルはNa ⁺ 電流を誘発して拍動リズムの形成に寄与する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toyoda F, Ding WG, Matsuura H
2. 発表標題 A potential link between L-type Ca _v 1.3 channel and TRPM4 Ca ²⁺ -activated nonselective cation channel in cardiac pacemaker cells
3. 学会等名 第95回日本生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松浦 博 (Matsuura Hiroshi) (60238962)	滋賀医科大学・医学部・理事 (14202)	
研究分担者	林 維光 (Ding Wei-Guang) (80242973)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	CNRS	INSERM	モンペリエ大学	