

令和元年6月13日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15585

研究課題名(和文) 継続的運動負荷に対する心臓の順応とその維持による心保護効果獲得機構の解明

研究課題名(英文) Cardiovascular protective effect by adaptation and maintenance in response to continuous exercise training

研究代表者

富田 拓郎(沼賀拓郎)(Tomita, Takuro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教)

研究者番号：60705060

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)：多くの疾患において予防・治癒促進に運動が有効であることが明らかにされ、その内容を明らかにすることで、新しい治療法の開発につなげる努力が続けられている。循環器系疾患においても運動による疾患病態の予防・予後改善効果が広く認知されているが、なぜ運動が循環器疾患に有効であるかは未解明である。本研究では、非選択的カチオンチャネルTRPC3/TRPC6に注目し、心臓および血管組織における病態形成において、これらチャネルが果たす役割を明らかにした。そのうえで自発運動が心臓・血管組織において与える疾患予防効果・予後改善効果におけるこれらタンパク質の寄与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動が健康寿命に与えるよい影響は社会的にも認知され、疾患の予防および予後改善のため、積極的な運動が進められている。しかしながら、特に循環器疾患患者においては、運動することのリスクも認められ、そのため十分な運動ができない患者も多い。そのため、運動を模倣する薬剤開発に対する社会的ニーズは非常に高い。運動模倣薬の開発においては、運動の健康増進効果に潜む分子メカニズムを解明し、創薬標的となる分子の同定が極めて重要である。本研究では、TRPC3/C6チャネルの抑制が運動の疾患予防・予後改善効果に重要であることを強く示唆し、これらが運動模倣薬創出に向けた新たな創薬標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It has been widely accepted that physical exercise has many beneficial effect regarding disease protection and prognosis. Therefore, understanding the mechanism underlying the beneficial effect of exercise would be applied to the development for exercise mimetic therapies. In this study, we have demonstrated that non-selective cation channels TRPC3/C6 play a critical role in cardiovascular pathogenesis. The result of this study strongly implied the suppression of these cation channels underlying beneficial effect of voluntary exercise.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：心筋細胞 血管平滑筋 TRPCチャネル 運動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの疾患において予防・治癒促進に運動が有効であることが明らかにされ、その全容を明らかにすることで、新しい治療法の開発につながる努力が続けられている。循環器系疾患においても心臓リハビリテーションとして運動による疾患病態の軽減・予防が進められている。しかしながら、なぜ運動が循環器疾患に有効であるかは未解明である。

これまでに研究代表者は、慢性的なストレスによる心臓の硬化(線維化)の病態進行メカニズムの研究を進めてきた。その分子基盤の一つとして、細胞膜受容体と関連して活性化する非選択的カチオンチャネル canonical transient receptor potential 3 (TRPC3)が様々な外的ストレスによる心臓での活性酸素種(ROS)生成に関与することを見出した。そしてTRPC3は、ROS産生酵素であるNADPH oxidase 2 (Nox2)を相互作用を介して安定化し、それによるNox2の発現上昇および過剰なROS産生が心不全の病態を進行させることを明らかにした。さらに両タンパク質の薬理的阻害は心不全に対する予防効果を持つことを明らかにした。心臓においては、TRPC3のホモログであるTRPC6もまた多く発現している。これまでの検討からTRPC6はTRPC3のカウンターとして機能し、ストレス下においては、TRPC6の発現が上昇し、TRPC3-Nox2間の機能連関に対して負の制御を果たしていることを明らかにしてきた。

これらの知見から、慢性的ストレスにより惹起される循環器疾患に対する運動の予防あるいは予後改善においてTRPC3-Nox2の機能連関を阻害する機構があるのではないかと研究代表者は予測した。

2. 研究の目的

本研究では、運動の循環器疾患の予防あるいは予後改善効果における分子機構の解明の一環として、TRPC3-Nox2の機能連関によるROSの産生への影響およびTRPC6の活性化による影響があるのではないかと推測し、運動によるTRPC3、TRPC6、Nox2の機能制御機構を解析する。

運動の健康増進効果には、急性に与える影響と慢性的に与える影響の二つがあることがこれまでの知見から推測されてきた。そこで慢性的に与える影響がどのような時間経過によって獲得されるのかを解析することにより、エピゲノミックな変化が心臓や血管組織において起こっている可能性を検討する。

また、運動を与えることによる効果が、心臓および血管組織においてどのような影響を与えるかをTRPC3、TRPC6ノックアウトマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

マウスを滑車付きケージ内でさまざまな期間において飼育することで、自発的な運動を施す。その後、運動期間中あるいは運動期間後に抗がん剤ドキシソルピシンを腹腔内から投与する。ドキシソルピシンは容量依存的に重篤な心毒性を惹起することが知られている。また運動の処置により、心毒性が低下することも知られている。ドキシソルピシン投与による心機能を超音波画像診断により解析し、その後心臓を摘出し、心臓内で上昇する分子について、発現解析を行った。

自発運動を負荷したマウス心臓からタンパク質を抽出し、TRPC3-Nox2機能連関を阻害する内因性因子の探索を行った。

血管組織における運動負荷の健康増進効果については、マウスの下肢虚血モデルを採用した。運動負荷したマウスあるいはコントロールに対して左大腿動静脈を結紮し、左足のみ血流を遮断した。その後、左足の血流の回復をレーザースペックル血流計を用いて非侵襲的に経時観察を行った。3週間後、左足腓腹筋およびヒラメ筋を摘出し、組織染色や、生化学的解析に用いた。

血管平滑筋におけるTRPC6機能の解析の為、マウスの大動脈から血管平滑筋を単離し、in vitroでの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 心臓における高血糖ストレスへのTRPC6チャネルによる抵抗機構の解明

TRPCタンパク質は受容体作動性チャネルの分子実体であり、様々な疾患・病態においてTRPCタンパク質の発現増加が報告されている。特に心血管系では、心肥大に相関して脂質活性化型のTRPCチャネルタンパク質(TRPC3とTRPC6)が発現増加する。我々は最近、TRPC3の発現増加がチャネル活性非依存的にNADPH oxidase 2 (Nox2)のプロテアソーム分解を抑制することで活性酸素生成を増強し、結果的に心臓の線維化(硬化)や心筋萎縮を引き起こすことを明らかにした。一方、TRPC6は様々な負荷により強く発現増加することが知られているものの、病態との因果関係についてはよくわかっていなかった。そこで本研究では、高血糖による心筋TRPC6タンパク質発現増加が心不全発症リスクに及ぼす影響を、TRPC3-Nox2タンパク質複合体との相互作用の視点から検討した。

ストレプトゾトシン誘発高血糖モデルマウス的心臓においてTRPC6発現量が増加し、Nox2発現量は低下していた。生化学的解析から、TRPC3とTRPC6はともにNox2と複合体を形成することを明らかにした。しかしながらTRPC6はNox2発現量を増加させなかった。逆に、TRPC3/C6両者をNox2と共発現させると、TRPC3/C6-Nox2三者複合体は形成されたものの、TRPC3によるNox2発現上昇は打ち消された。以上から、高血糖による心筋TRPC6発現増加は、TRPC3-Nox2複合体形成を阻害することでNox2発現量の増加を抑制し、高血糖時の心不全リスク軽減に働くことが示唆された(発表論文)。

(2) ドキソルピシン心筋症における TRPC3-Nox2 複合体の役割

ドキソルピシン (DOX) は様々な悪性腫瘍に有効な抗腫瘍薬である一方で、重篤な心毒性が副作用として問題視されている。当部門では、DOX 誘発性の左心室拡張には TRPC3-Nox2 の機能連関が重要であることを明らかにしてきた。これまでに、自発的運動が DOX の心毒性を軽減する効果があることが明らかにされていた。そこで、運動負荷による TRPC3-Nox2 の機能連関への影響および心臓における TRPC3-Nox2 機能連関の生理的な意義の解明を行った。その結果、運動負荷は心臓における TRPC3 及び Nox2 のタンパク質発現量を低下させることを明らかにした。また左心室における圧 - 容量曲線の解析から、自発的運動群のマウスにおいて、心臓は非運動群のマウスに比べて、より柔軟になり、容量負荷に伴う駆出力の上昇も亢進していることを明らかにした。この結果と一致して、TRPC3 の欠損マウスにおいても、野生型マウスに比べて、左心室の柔軟性の向上および心機能の亢進が確認できた。以上の結果は、TRPC3-Nox2 の機能連関は、生理的条件下においては、筋原性に心臓の柔軟性制御に関わる重要な役割を果たしていることを強く示唆した (発表論文)。

(3) TRPC5-eNOS 共役による心肥大制御機構の解明

心筋細胞における Ca^{2+} 依存性転写因子 NFAT (nuclear factor of activated T cells) の活性化は心肥大を起こすことが知られている。ノルアドレナリン、アンジオテンシン II、エンドセリン 1 など様々なリガンド刺激で NFAT が活性化され、心肥大が誘発されることが報告されている一方で、NFAT を最も強く活性化するアデノシン 5'-三リン酸 (ATP) は心肥大を全く誘発しない。その機序として、プリン作動性 P2Y2 受容体の下流で TRPC5 チャネルの活性化を介した一酸化窒素 (NO) の産生増加が関与することを見出した。TRPC5 は内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) と機能共役することで、ATP 刺激による NFAT 依存的な心肥大誘導シグナルを負に制御することが明らかとなった (発表論文)。

(4) TRPC6 の抑制による血管平滑筋分化の促進

運動負荷は、下肢虚血後の血流回復を有意に促進することが知られていた。運動負荷の与え方による血流回復の効果を検討するため、まず下肢虚血手術前に自発運動を 1 週間マウスに与えて、下肢虚血後の血流回復が与える影響を解析した。その結果、1 週間後には血流がほぼ完全に回復していた。次に、自発運動を下肢虚血後 1 週間後に与えて同様に検討した。その結果、虚血後の自発運動においても血流の回復効果が確認された。免疫組織学的に、血流回復の機序を解析した結果、自発運動を虚血後に与えた条件下において、新生血管数の上昇により血流が回復したのではなく、血管平滑筋に被覆された成熟血管数が上昇していることに血流回復の促進が起因していることが明らかになった。我々は、血管平滑筋に多く発現する TRPC6 のノックアウトマウスに下肢虚血を施すと、自発運動群とよく似た表現型が観察されることを明らかにした。以上の知見から、TRPC6 の血管平滑筋における抑制が、運動後の血流回復に重要であると推測し、TRPC6 の抑制の、血管平滑筋にける重要性を解析した。特に注目したのが、血管平滑筋の表現型スイッチである。

その結果、TRPC6 欠損細胞は野生型細胞に比べて、収縮型の表現型への移行が促進されることを明らかにした。多くの細胞において、細胞膜は固有の膜電位を有していることが知られていた。これまでの報告から、増殖能の高い細胞においては、より高い膜電位を有し、最終分化した細胞は低い膜電位を有する傾向があることが示唆されてきた。transfoming growth factor β 1 (TGF β 1) を増殖型の血管平滑筋に投与すると、増殖型の表現型に移行すると同時に、細胞膜電位が低下することを明らかにした。TRPC6 欠損細胞においては、TGF β 1 の投与は野生型細胞に比べてより膜電位を低下させることを明らかにした。血管平滑筋の分化においては、シグナル分子 Akt のリン酸化による活性化が重要であることが知られていた。そこで TGF β 1 刺激後の Akt の活性化を野生型細胞と TRPC6 欠損細胞で比較した結果、TRPC6 欠損細胞において Akt の活性化が上昇していることを明らかにした。TRPC6 の欠損において観察された、これら細胞膜電位の低下と Akt の活性化の上昇をつなぐシグナル分子として、リン脂質脱リン酸化酵素である phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) に注目した。PTEN は Akt の活性化に必要となるリン脂質 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP $_3$) を低下させる Akt の負の制御因子である。PTEN の活性化には基質の存在する細胞膜への局在が重要であることが知られていた。我々は、TGF β 1 の投与は、PTEN の膜局在を抑制する効果があることを明らかにし、この抑制効果は細胞膜電位を高くしておくことと阻害されることを明らかにした。以上の結果から、TRPC6 の欠損は細胞膜電位を低下させ、それにより PTEN が細胞膜から脱落しやすくなり、負の制御から解放されることで Akt の活性化が上昇し、収縮型への表現型の移行が促進されることを明らかにした (発表論文)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Numaga-Tomita, T., Shimauchi, T., Oda, S., Tanaka, T., Nishiyama, K., Nishimura, A.,

Birnbaumer, L., and Nishida, M. (2019) TRPC6 regulates phenotype switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential-dependent coupling with PTEN. *FASEB J* (in press) doi: 10.1096/fj.201802811R. 査読あり

Sunggip, C., Shimoda, K., Oda, S., Tanaka, T., Nishiyama, K., Mangmool, S., Nishimura, A., Numaga-Tomita, T., and Nishida, M. (2018) TRPC5-eNOS Axis Negatively Regulates ATP-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Frontiers in pharmacology* 9, 523 doi: 10.3389/fphar.2018.00523 査読あり

Shimauchi, T., Numaga-Tomita, T., Ito, T., Nishimura, A., Matsukane, R., Oda, S., Hoka, S., Ide, T., Koitabashi, N., Uchida, K., Sumimoto, H., Mori, Y., and Nishida, M. (2017) TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI insight* 2 pii: 93358 doi: 10.1172/jci.insight.93358. 査読あり

Oda, S., Numaga-Tomita, T., Kitajima, N., Toyama, T., Harada, E., Shimauchi, T., Nishimura, A., Ishikawa, T., Kumagai, Y., Birnbaumer, L., and Nishida, M. (2017) TRPC6 counteracts TRPC3-Nox2 protein complex leading to attenuation of hyperglycemia-induced heart failure in mice. *Scientific reports* 7, 7511 doi: 10.1038/s41598-017-07903-4. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

富田拓郎、島内 司、小田紗耶香、西村明幸、西田基宏 (2018 年) NO 依存的 TRPC6 リン酸化による下肢虚血後の血管成熟制御 第 18 回日本 NO 学会合同学術集会

富田拓郎、島内 司、北島直幸、小田紗耶香、西村明幸、西田基宏 (2018 年) 病的心臓リモデリングにおける TRPC3-Nox2 の機能連関の重要性の解明 第 95 回日本生理学会大会

富田拓郎、島内司、小田紗耶香、西村明幸、西田基宏 (2018 年) TRPC タンパク質のチャネル活性非依存的な役割とその病態生理学的意義 日本薬学会第 138 年会 シンポジウム口演

Takuro Numaga-Tomita, Naoyuki Kitajima, Akiyuki Nishimura, and Motohiro Nishida (2017 年) Positive regulation of Nox2 by TRPC3 channel mediates mechanical stress-induced cardiac fibrosis. 2017 Annual Spring Scientific Conference of the KSC

富田拓郎、北島直幸、西村明幸、西田基宏 (2017 年) TRPC3-Nox2 機能連関による ROS 産生と心臓リモデリング. 第 17 回日本 NO 学会学術集会

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ベンゾイソオキサゾール化合物

発明者：永田龍、森泰生、西田基宏、森誠之、富田拓郎

権利者：大阪大学、京都大学、大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類：特許

番号：PCT/JP2019/18082

出願年：2019/04/26

国内外の別： 海外

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：