

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08034

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療標的としてのTRPC6, CNP経路の研究

研究課題名(英文) Potential significance of TRPC3/6 and CNP as novel therapeutic targets of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

木下 秀之(Hideyuki, Kinoshita)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：30467477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Ca²⁺チャネルの一種であるTRPC3とTRPC6の肺高血圧症への関与について、遺伝子改変マウス、阻害剤であるPyr3, Pyr4を用いて検討した。TRPC3/6の阻害は肺動脈圧と右室重量を有意に改善し、肺組織における肺動脈中膜の肥厚を抑制し、その下流としてcalcineurin-NFAT系路であることが示唆された。さらに肺高血圧症におけるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の意義を検討した。血管内皮特異的GC-B KO群と血管内皮特異的CNP KO群では、肺高血圧症動物モデルにおける肺高血圧症の悪化を認めた。以上より上記経路が肺高血圧症における新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患である肺高血圧症の発症・進展メカニズムの探索として、従来あまり指摘されていなかった、受容体刺激により活性化されるCaチャネルであるTRPC3/6や、ナトリウム利尿ペプチドの一種であるCNPの肺高血圧の病態における関与や、そのメカニズムを明かした。さらに、上記の経路を標的とした治療が肺高血圧症の発症・進展を抑制する可能性を明らかとし、今後の新規治療薬の開発の可能性のある研究結果であったと考える。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary hypertension (PH) is a disease with a poor prognosis, and the further therapeutic agent is required. We analyzed the effect of classic transient receptor potential channel 3/6 (TRPC3/6), and C-type natriuretic peptide (CNP), one of natriuretic peptide family in the progression of pulmonary hypertension.

TRPC channels inhibitor improved pulmonary hypertension on PH animal models. And also, we analyzed the CNP plays a protective role in the development of PH via endothelial GC-B through inhibiting endothelin-1 and inflammatory signals involvement. These data suggest that inhibition of TRPC3/6 and CNP could be the novel therapeutic agent for PH.

研究分野：心不全

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 病的な心臓リモデリング 受容体活性化型Caチャネル ナトリウム利尿ペプチド

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(以下 PAH)は以前は希少疾患と考えられていたが、最近では膠原病をはじめ他疾患に PAH が合併する事が知られ、PAH の頻度が以前考えられていたよりも多いことが認識されてきている。PAH は最近の肺血管拡張薬による治療成績の改善が報告されているものの、依然予後不良の疾患症候群であり、病態解明に基づく新規治療標的の同定が望まれている。

PAH の発症・進展は、肺動脈平滑筋の異常収縮・増殖による病的肺動脈リモデリングが原因であり、肺動脈内皮細胞の機能異常によるエンドセリン-1 などの体液性因子の活性化と、それに引き続く肺動脈血管平滑筋細胞における病的 Ca^{2+} シグナルの亢進による病的シグナルの活性化が重要な役割を担っていると考えられるが、その詳細な機序は依然不明な点が多い。近年、液性因子や機械的刺激により引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 流入を担うイオンチャンネルの分子実体が TRPC family イオンチャンネルである事が明らかとなった。本申請研究の研究分担者である桑原は、エンドセリン-1 等により活性化される受容体活性化型 Ca^{2+} チャンネルである TRPC6 が、種々の心肥大モデル動物や、ヒト拡張型心筋症の心室において発現が亢進し、病的な心筋リモデリングに関与することを明らかにした(Kuwahara K, et al. J Clin Invest. 2006)。心筋細胞において病的な心臓リモデリング抑制効果が報告されている ANP・BNP が、共通の受容体である guanylyl cyclase-A(GC-A)を介してその下流の cGMP - PKG 経路を活性化し、TRPC6 を直接リン酸化することにより TRPC6 の機能を抑制的に制御している事を明らかとし、神経体液性因子を介した病的な心臓リモデリングに TRPC6 が非常に重要な働きをし、TRPC6 阻害が治療標的となり得る可能性を明らかとした (Kinoshita H, Kuwahara K, et al. Circ Res. 2010)。

近年、PAH 患者の肺動脈平滑筋細胞において TRPC6 の発現が亢進し (Ying Yu et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004) 特発性 PAH において TRPC6 遺伝子発現亢進につながる TRPC6 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型が、PAH 発症頻度と相関する事も報告され、PAH の発症・進行における TRPC6 の役割に注目が集まっている。

さらに申請者らの研究グループは、以前よりナトリウム利尿ペプチドによる心血管系への関与の研究を行っており、血管機能制御における血管 CNP - GC-B システムの意義を検討してきた。ナトリウム利尿ペプチド family である CNP は GC-B 受容体を介して cGMP 産生を増加させ、血管内皮特異的 CNP ノックアウトマウス(CNPecKO)を作製し解析したところ、CNPecKO では有意に对照群より血圧が上昇しており、血管内皮由来血管弛緩反応が低下し、血管内皮でのエンドセリン-1 発現亢進を認めた。一方で血管平滑筋特異的 GC-B ノックアウトマウス(GC-B smcKO)では血圧が正常であり、血管内皮依存性血管弛緩反応も正常に保たれていた。以上より、生理的条件下では血管内皮由来 CNP は血管平滑筋ではなく、血管内皮に作用してエンドセリン-1 発現を低下させ、エンドセリン-1 の分泌低下が血管平滑筋を介して血圧制御に働いている可能性を明らかとした (Nakao, kinoshita, Nakagawa, Kuwahara et al. Hypertension. 2017)。

近年、肺動脈動物モデルにおいて CNP 投与が肺高血圧症の進行を抑制する可能性が報告されたが (T. Itoh et al. Am J Respir Crit Care Med. 2004) CNP による肺高血圧進行抑制効果が、血管内皮細胞を介しているのか、血管平滑筋細胞への直接作用が依然不明であり、さらにその下流シグナルについても明かとなっていない。

以上、本申請研究では、PAH の発症進展に関与すると考えられる 2 つの病的シグナル経路である、TRPC6/3 - Ca^{2+} シグナル経路および CNP - GC-B 経路の病態生理学的意義とそこに関わる分子機序を明らかにすると同時に、その治療標的としての可能性を検討する。

2. 研究の目的

本申請研究では、PAH の発症進展に関与すると考えられる 2 つの病的シグナル経路である、TRPC6/3 - Ca^{2+} シグナル経路および CNP - GC-B 経路の病態生理学的意義とそこに関わる分子機序を明らかにすると同時に、その治療標的としての可能性を検討した。

3. 研究の方法

肺高血圧動物モデルとして、マウスにおける Monocrotaline-pyrrole 誘発肺高血圧モデル、及び低酸素誘発肺高血圧モデルを使用した。Monocrotaline-pyrrole 誘発肺高血圧モデル、及び低酸素誘発肺高血圧モデルにおいて、TRPC6 や TRPC3 のノックアウト、さらに TRPC3/TRPC6 ダブルノックアウトを作成し、肺動脈圧の測定、肺組織の評価、右室肥大の解析にて肺高血圧症の評価を行った。また、TRPC3/6 の阻害作用を有する Pyrazole3(Pyr3), Pyrazole4(Pyr4)を用いて、肺高血圧動物モデルでの評価を行った。

さらに肺組織の mRNA, タンパクレベルの解析を行い、TRPC3、TRPC6 の下流シグナルの検討を行った。また、ヒト特発性肺動脈性肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞において Pyr3, Pyr4 を用いて、肺動脈血管平滑筋細胞における細胞増殖能の検討を行った。

肺高血圧症における内因性 CNP-GC-B 経路の役割を明らかにするために、血管内皮特異的 CNP ノックアウトマウス(ecCNP-cKO)と、血管内皮特異的 GC-B ノックアウトマウス(ecGC-B-cKO)、血管平滑筋特異的 GC-B ノックアウトマウス(smGC-B-cKO)を作成し、monocrotaline pyrrole 投与や低酸素による肺高血圧刺激に対する効果を検討した。

4. 研究成果

マウスの Monocrotaline-pyrrole 誘発肺高血圧モデル、及び低酸素誘発肺高血圧モデルのいずれの肺高血圧モデルにおいても、TRPC3/TRPC6 ダブルノックアウト群では肺動脈圧と右室重量を有意に改善し、肺組織における肺動脈中膜の肥厚を抑制した。また、Monocrotaline 誘発肺高血圧モデルラット、Monocrotaline-pyrrole 誘発肺高血圧モデルマウスにおいて、Pyr3, Pyr4 投与により、肺動脈圧上昇や右室重量の増加を有意に改善し、肺組織における肺動脈中膜の肥厚を抑制した。以上のことから、複数の肺高血圧動物モデルにおいて TRPC6/3 の阻害が肺高血圧症の発症・進展を抑制するという結果が得られた。

次に、TRPC6/3 の下流シグナルを検討するも目的で、肺組織での mRNA やタンパク発言の評価を行った。肺高血圧動物モデルでは、肺における RCAN-1 の発現亢進を認め、TRPC6/3 の阻害薬や遺伝的ノックアウトにより、RCAN-1 の発現亢進が抑制されていることを確認した。RCAN-1 は calcineurin-NFAT 経路の活性化により発現が亢進する事が、以前より報告されていることから、以上結果は、TRPC6/3 阻害による肺高血圧進展の抑制効果が calcineurin-NFAT 系路の抑制を介している可能性を示す結果であると考えられた。

さらに、ヒト特異性肺動脈性肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞において PDGF による細胞増殖能の増加に対する TRPC6/3 阻害の効果を検討したところ、Pyr3, Pyr4 は PDGF による細胞増殖を用量依存的に抑制した。

以上より、TRPC3/6 の阻害が、肺動脈性肺高血圧症の発症・進展を抑制する可能性が明らかとなり、肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療法として有用である可能性が考えられた。

次に CNP - GC-B 経路の肺高血圧症への関与を検討した。マウスの Monocrotaline-pyrrole 誘発肺高血圧モデル、及び低酸素誘発肺高血圧モデルのいずれの肺高血圧モデルにおいて、血管内皮特異的 CNP ノックアウトマウス(ecCNP-cKO)と、血管内皮特異的 GC-B ノックアウトマウス(ecGC-B-cKO)では、肺高血圧モデルマウスにおける肺高血圧症・右室肥大の出現・悪化が抑制されていた。ただし興味深いことに、血管平滑筋特異的 GC-B ノックアウトマウス(smGC-B-cKO)においては、肺高血圧マウスモデルにおける肺高血圧症の悪化に対する抑制効果を認めなかった。以上の事は、CNP - GC-B 経路が肺高血圧動物モデルにおいて、肺高血圧症発症進展に対して抑制的に作用しており、その作用は肺動脈血管平滑筋ではなく、肺動脈血管内皮の GC-B を介していることが示唆された。

さらに培養肺動脈血管内皮細胞における、CNP - GC-B 経路の下流シグナルの検討を行ったところ、CNP 投与により、PDGF 負荷や低酸素刺激によるエンドセリン-1, IL-6 の遺伝子発現増加が抑制された。この結果は、CNP - GC-B 経路の肺高血圧症抑制効果が、従来から肺高血圧症の発症・進展因子と言われているエンドセリン-1 や炎症性サイトカインである IL-6 の抑制を介していることを示唆する結果であると考えられた。

以上の結果から CNP の肺動脈性肺高血圧症発症・進展に対する効果は、肺動脈血管平滑筋細胞における血管内皮の GC-B を介し、下流シグナルとして、エンドセリン-1 や IL-6 を介し、保護的に作用している可能性が示唆された。

今回の研究結果より、TRPC6/3 の阻害や、CNP - GC-B 経路の刺激が、肺動脈性肺高血圧症に対する、新規治療となる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Hideyuki Kinoshita, Hiromu Yanagisawa, Kenji Moriuchi, Hideaki Inazumi, Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, Takeshi Kimura
2. 発表標題 Macitentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension with Lung Disease.
3. 学会等名 The 16th International Conference of Endothelin (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下秀之
2. 発表標題 肺高血圧診療のpitfall
3. 学会等名 第 84回日本循環器学会学術集会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiromu Yanagisawa, Yasuaki Nakagawa, Kenji Moriuchi, Hideaki Inazumi, Hideyuki Kinoshita, Toshio Nishikimi, Miku Oya, Kazuwa Nakao, Koichiro Kuwahara, Takeshi Kimura.
2. 発表標題 Endothelial CNP-GC-B system plays a protective role in the development of pulmonary hypertension.
3. 学会等名 第 4 回日本循環器学会基礎研究フォーラム(BCVR)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森内健史 木下秀之 中川靖章 西田基宏 森泰生 中村一文 錦見俊雄 稲住英明 柳澤洋 大矢未来 中尾一和 桑原宏一郎 木村剛
2. 発表標題 TRPC3/TRPC6チャネルを標的とした新規肺高血圧症治療の検討
3. 学会等名 第4回J-ISCN年次学術集会 国際心血管薬物療法学会日本部会 (J-ISCN)
4. 発表年 2019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	桑原 宏一郎 (Kawahara Koichiro) (30402887)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究 分担者	中川 靖章 (Nakagawa Yasuaki) (70452357)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

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
---------	---------