

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590849

研究課題名(和文) 内皮機能異常における TRP チャンネルの役割

研究課題名(英文) Pathological role of TRP channels in endothelial dysfunction

研究代表者

渡邊 博之(WATANABE HIROYUKI)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：80323145

研究成果の概要：

内皮機能異常では、NO産生の低下が知られているが、そのイオンメカニズムはわかっていない。私達は、シェアストレスによる内皮TRPV4チャンネルの活性化にPLA2 下流のアラキドン酸代謝物が内因性アゴニストとして働くことを示した。また、ヒト冠動脈内皮細胞にアンジオテンシンIIによる動脈硬化刺激を与え傷害内皮細胞モデルを作製し、同モデルでのNO産生低下にTRPV4の発現低下が寄与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：内皮機能異常、動脈硬化、transient receptor potential channel

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化危険因子の存在下において、内皮は炎症反応などをかいし動脈硬化形成を促進する形質を発現することが知られていたが、最近の臨床試験の結果から、内皮機能の障害がさらに心不全の病態や予後とも深く関連することが明らかとなった。心不全患者においては、とくに内皮依存性血管拡張反応が低下していることが証明されており、実際の臨床では内皮機能をいかに正常に保

つかが心血管イベントの予後規定因子になると考えられている。

(2) 血管内皮細胞は、細胞外からの種々の刺激にたいし autocrine/paracrine factor を動因して血管の恒常性を維持しているが、その反応の多くは Ca 依存性の細胞内シグナルをかいしている。その Ca 流入経路となる受容体活性化 Ca チャンネル (RACs) の分子実体は不明であったが、近年、これら RACs の

分子候補として transient receptor potential (TRP) チャンネルが発見された。

(3) TRP チャンネルは、1989年 *Drosophila* から初めてクローニングされた。その後多くの哺乳類 TRP ホモログが発見され、それら陽イオンチャンネルは TRP スーパーファミリーとして位置づけられている。TRP スーパーファミリーはアミノ酸配列や分子構造の類似性から TRPC, TRPV, TRPM のほか TRPN, TRPP, TRPML, TRPA に大別される。

(4) 私達は、TRP チャンネル一つである TRPV4 チャンネルのクローニングに関わったほか、Phorbol 誘導体の  $4\alpha$ PDD が TRPV4 チャンネルの特異的な ligand であること、EETs (epoxyeicosatrienoic acids)、アラキドン酸などの炎症性物質が TRPV4 チャンネルの内因性アゴニストであることを明かにした。さらに、私達は血管内皮における TRPV4 チャンネルの活性化が生理的範囲内の熱変動で制御されることで、末梢血管での温度依存性血管拡張反応に寄与していることを発見したほか、TRPV5, V6 チャンネルの電気生理学的特性を明らかにするなど、以前より TRP チャンネル生理機能の解明に関わっている。また、最近ドイツのグループから内皮の TRPV4 が shear stress を感受するメカノセンサーとして働き、NO や EDHF 産生に寄与しているという興味深い結果が報告された。しかし、国内外を通じて、心血管病態での内皮機能異常と TRP チャンネルの異常がどのように関連しているかは明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、高血圧、心不全の病態において、TRP チャンネル発現異常あるいは機能異常が起こっているという仮説をたて、それを実証することを目的とする。また、動脈硬化進展における TRP チャンネルの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

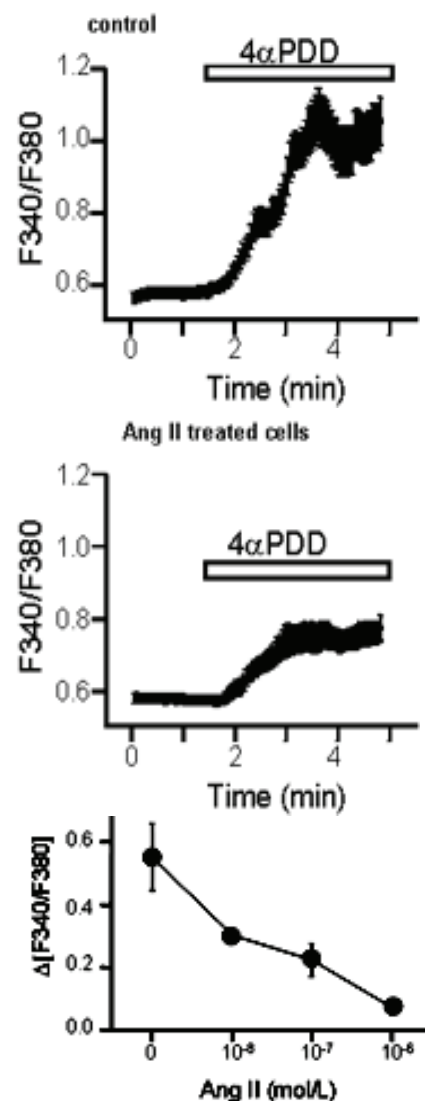
ヒト冠動脈内皮細胞に動脈硬化刺激として

アンギオテンシン II を慢性投与し傷害内皮細胞モデルを作製した。同モデルにおける、Ca 流入反応を Fura-2/AM を蛍光指示薬として用い測定、TRPV4 電流はパッチクランプ法にて、TRPV4 タンパク発現は western blotting にて、NO 産生は DAF-FM を用いて測定した。

## 4. 研究成果

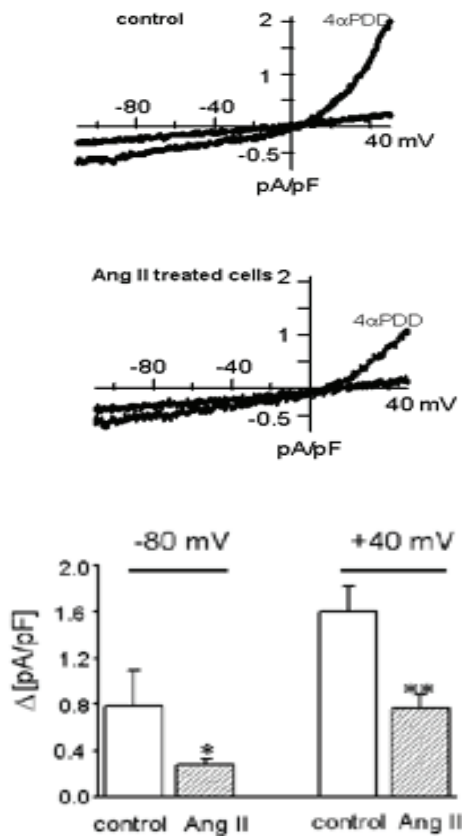
(1) アンギオテンシン II を慢性投与した傷害内皮での TRPV4 をかいた Ca 流入反応をみるために、TRPV4 の特異的的刺激薬である  $4\alpha$ PDD を用いた。図 1 に示すように傷害内皮では Ca 濃度上昇反応は抑えられており、その抑制効果はアンギオテンシン II の濃度に依存して現れた。

図 1



(2) 傷害内皮細胞で TRPV4 活性が低下していることを直接検討するため、パッチクランプ法で 4aPDD 誘発性非選択的陽イオン電流を測定した。図 2 に示すように 4aPDD により +10 mV に逆転電位を持つ外向き整流特性の非選択的陽イオン電流 (TRPV4 電流) が誘発されたが、傷害内皮ではその電流振幅は有意に減少していた。

図 2



(3) TRPV4 活性の低下のメカニズムを調べるため、傷害内皮細胞での TRPV4 タンパク発現を western blotting にて検討した。

図 3

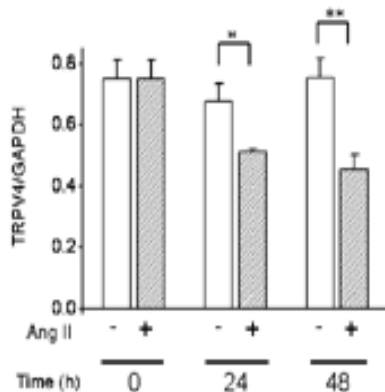
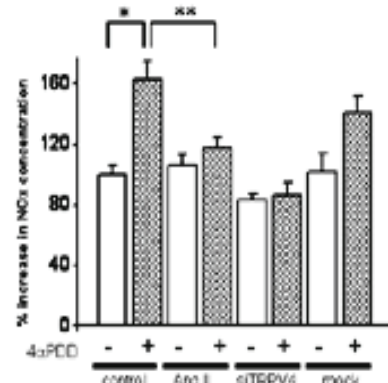


図 3 に示すように、24 時間以上のアンジオテンシン II 慢性投与では、有意に TRPV4 タンパク発現が低下していた。

(4) (1) ~ (3) で示された TRPV4 チャンネル活性の低下が、NO 産生の低下につながるかを検討するため、DAF II を用いて NOx を測定した。図 4 に示すように、コントロールでは 4aPDD により NO 産生は増加するが、傷害内皮細胞ではその NO 産生増加はほとんど見られず、siRNA にて TRPV4 をノックダウンしたときと同程度であった。

図 4



(5) 以上から傷害内皮細胞ではシェアストレスセンサーである TRPV4 のダウンレギュレーションとそれに続く NO 産生の低下が起きていることが明らかとなった。これらの結果は、TRPV4 チャンネルの内皮機能異常への関わりを明らかにしたものであり、今後临床上、TRPV4 チャンネルをターゲットとした新たな内皮機能改善薬の開発に道を開くものと思われる。

(6) その他 TRP チャンネルが動脈硬化進展に寄与することを明らかにした研究成果として、以下のことを報告した。

血管平滑筋細胞の増殖は、動脈硬化の発症に深く関与することが知られている。現在、临床上最も多く用いられている。現在、临床上最も多く用いられている降圧薬であるアムロジピンには、平滑筋増殖抑制作用があることが報告されているが、その詳細な細胞内メカ

ニズムはわかっていなかった。私達は、ヒト冠動脈平滑筋細胞を用いて、アムロジピンが TRP チャンネルに属する TRPP1/P2 複合体の活性を制御することで、P21waf1 の発現増加をもたらし、抗平滑筋細胞増殖作用を発揮することを明らかとした。この結果は、Ca 拮抗薬の新たな抗動脈硬化作用と、TRP チャンネルの動脈硬化への関わりをあきらかにしたものであり、今後臨床上、新たな抗動脈硬化治療開発につながるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件) すべて査読有

① Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Ono K, Ito H. The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ. J.* 73(3):419-27, 2009

② Koyama T, Ono K, Watanabe H, Ohba T, Murakami M, Iino K, Ito H. Molecular and Electrical Remodeling of L-and T-type Ca<sup>2+</sup> Channels in Rat Right Atrium with Monocrotaline Induced Pulmonary Hypertension. *Circ. J.* 73(2):256-63, 2009

③ Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channels and cardiovascular disease *Pharmacology & Therapeutics.* 118(3):337-51, 2008

④ Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Radovanovic M, Iino K, Ishida M, Tosa S, Ono K, Ito H. Amlodipine inhibits cell proliferation via PKD1-related pathway *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369(2):376-81, 2008

[学会発表] (計 8 件)

① Munehisa Y, Watanabe H, Ono K, Ohba T, Ito H. Down-regulation of TRPV4 in angiotensin II treated human coronary

endothelial cells; an insight into the mechanism of endothelial dysfunction. 第 73 回日本循環器学会総会, 2009 年 3 月, 大阪

② 渡邊博之, 大場貴喜, 村上 学, 尾野恭一, 伊藤 宏. 循環器・呼吸器疾患における TRP チャンネルの役割. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年, 3 月, 横浜

③ Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Ono K, Ito H. Amlodipine induces p21(Waf1/cip1) through PKD1-related pathway in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. 第 25 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会, 2008 年 12 月, 横浜

④ Munehisa Y, Watanabe H, Ono K, Ito H. The role of TRPV4 channel in the mechanism of angiotensin II-induced endothelial dysfunction. 第 25 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会, 2008 年 12 月, 横浜

⑤ Munehisa Y, Watanabe H, Ono K, Ohba T, Nobori K, Murakami M, Ito H. Ionic mechanisms underlying angiotensin II induced endothelial dysfunction in human coronary endothelial cells; a role of TRPV4 channel 米国心臓協会 (AHA) 学術集会 2008 年 11 月 8~12 日ニューオーリンズ・米国

⑥ Munehisa Y, Watanabe H, Ono K, Ohba T, Nobori K, Murakami M, Ito H. Involvement of TRPV4 channel in endothelial dysfunction. 第 12 回 Molecular Cardiovascular Conference, 2008 年 9 月, 北海道

⑦ 渡邊博之. 血管メカノセンサーとしての TRP チャンネル. 第 50 回日本平滑筋学会総会, 2008 年, 7 月, 弘前

⑧ Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Hasegawa

H, Ito H. Novel Mechanisma for the  
Anti-proliferative Effect of Amlodipine  
in Human Coronary Artery Smooth Muscle  
Cells. 第 72 回日本循環器学会総会・学術  
集会, 2008 年 3 月, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 博之 (WATANABE HIROYUKI)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号: 80323145

(2) 研究分担者

伊藤 宏 (ITO HIROSHI)

秋田大学・医学部・教授

研究者番号: 10232464

村上 学 (MURAKAMI MANABU)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号: 80302090

(3) 連携研究者

大場 貴喜 (OHBA TAKAYOSHI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 80431625