

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月2日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590276

研究課題名（和文） 心室頻拍のトリガー発生に対する TRPC チャンネルの活性化の関与

研究課題名（英文） Roles of TRPC channel activation in the induction of ventricular tachycardias

研究代表者

弘瀬 雅教 (HIROSE MASAMICHI)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：40273081

研究成果の概要（和文）：

活性化型のG protein  $\alpha_q$ を一過性に強発現した、心肥大・心不全誘発トランスジェニックマウス( $G\alpha_q$  TG)は、高頻度に心室性期外収縮を発生し、心室頻拍も誘発した。TRPCチャンネル阻害薬であるSK&F96365は、この心不全下で誘発された心室性期外収縮の数と心室頻拍を有意に抑制した。またジアシルグリセロール類似物である1-oleoyl-2-acyl-sn-glycerol (OAG)は、正常マウス(WT)と比較して $G\alpha_q$  TGマウスのランゲンドルフ心において、有意に心室性期外収縮の数を増加させ、心室性頻拍を誘発させた。このOAGの効果は、SK&F96365の投与により抑制された。単一心筋のパッチクランプにおいて $G\alpha_q$  TGマウスの心室筋は、早期後脱分極によるtriggered activityを誘発した。このtriggered activityの誘発は、SK&F96365の投与により抑制された。この結果は、心不全に伴う心室頻拍発生のトリガーに、TRPCチャンネルの関与を示唆している。K-ATPチャンネル開口薬のニコランジルの慢性投与は、32週齢の $G\alpha_q$  TGマウスにおいて心不全を改善し、心室性期外収縮の発生頻度も有意に減少させたが、心室筋の両タンパク (TRPC3とTRPC6) の発現量増加を改善させることはできなかった。また、ニコランジル急性投与は、 $G\alpha_q$  TGマウス心室筋の活動電位幅を有意に短縮した。以上の結果から、心不全に伴う心室頻拍のトリガー発生には、心室筋のTRPC3、6タンパク発現量の増加が重要な役割を持っているが、TRPC3、6タンパク発現量の増加だけでは、心室頻拍のトリガーは発生しないことが示唆された。左心室拡張期圧を上昇させた時の心室性期外収縮の数は、WTマウスと比較して $G\alpha_q$  TGマウスのランゲンドルフ心で有意に増加していた。この左心室拡張期圧の上昇による心室性期外収縮の発生頻度の増加は、SK&F96365の投与によって有意に減少した。この結果から、心不全に伴う左室拡張末期圧の上昇は心室頻拍のトリガー発生（心室性期外収縮の発生）を増加させ、これにはTRPCチャンネルが関与していることが示唆された。本研究から、新規抗不整脈薬開発としてのTRPCチャンネル阻害薬の可能性について新しい知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Premature ventricular contraction (PVC) and/or VT were frequently observed in transgenic mice with transient cardiac expression of activated G protein  $\alpha_q$  ( $G\alpha_q$ -TG; Model of HF) mice but not in  $G\alpha_q$ /DGK $\zeta$ -TG and wild-type (WT) mice ( $p < 0.01$ ). SK&F96365, a canonical transient receptor potential (TRPC) channel blocker, decreased the number of PVC and prevented VT in anesthetized  $G\alpha_q$ -TG mice ( $p < 0.05$ ). 1-oleoyl-2-acyl-sn-glycerol (OAG), a diacylglycerol analogue, increased the number of PVC in isolated  $G\alpha_q$ -TG hearts compared with WT hearts and induced VT in  $G\alpha_q$ -TG hearts ( $p < 0.01$ ). SK&F96365 decreased the number of PVC and prevented VT in isolated  $G\alpha_q$ -TG hearts ( $p < 0.01$ ) even in the presence of OAG. Early afterdepolarization (EAD)-induced

triggered activity was frequently observed in single Gαq-TG ventricular myocytes. Moreover, SK&F96365 prevented the EAD-induced triggered activity. These results suggest that TRPC channels participate in VT induction in failing hearts. Chronic nicorandil administration, ATP-sensitive K channel opener, improved heart failure and decreased the number of PVC in Gαq-TG mice. However, it did not improve the increased protein expression levels of TRPC channels 3 and 6. Acute nicorandil administration shortened ventricular monophasic action potential duration in Langendorff-perfused Gαq-TG mouse hearts at age of 32 weeks. These results suggest that the increased protein expression levels of TRPC channels do not necessarily induce VT. Increases in left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) significantly increased the number of PVC in isolated Gαq-TG hearts compared with WT hearts. SK&F96365 decreased the number of PVC in isolated Gαq-TG hearts even in the presence of increased LVEDP. These results suggest that TRPC channels participate in VT induction in failing hearts with the increased LVEDP. This study provides new information regarding the possibility of the development of a new anti-arrhythmic drug.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：心血管・血液

#### 1. 研究開始当初の背景

GTP-binding protein coupled receptor (GPCR)-ホスホリパーゼC (PLC)系の活性化は心肥大や心不全の進展に重要であり、心室頻拍の発生にも関与している。一方、このGPCR-PLC系の活性化は、diacylglycerol (DAG)を介して種々のTRPCチャネルを活性化する事がわかっている。またTRPCチャネルのサブタイプであるTRPC3とTRPC6の活性化は、陽イオンの細胞内流入を起し、膜電位を脱分極させ心筋肥大を引き起こすことが報告されている。心室頻拍の発生にはトリガーと基質が必要であるが、このTRPCチャネルの活性化は、細胞内への陽イオンの流入により膜電位を脱分極させるため、不整脈のトリガーを発生させる可能性がある。特にTRPCチャネルタンパク発現量が増加した病態では、その

可能性は非常に高くなると考えられる。また最近の研究で、TRPC3チャネルとNa<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換機構が連動して働くとの報告もあり、TRPC3チャネルの活性化による細胞内カルシウム増加が、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換機構の働きを介したさらなる膜電位の脱分極を引き起こし、トリガーを発生させる可能性もある。しかし、TRPCチャネルの活性化が心室頻拍のトリガー発生に関与しているか、また関与している場合どのTRPCチャネルが中心的に関与しているかについての報告はない。我々は、活性化型のG protein αqを一過性に強発現し、PLCの活性化された心肥大・心不全誘発トランスジェニックマウス(Gαq TG)を用い、心房筋のリモデリングと心房細動の発生について報告したが、このモデルの肥大心室筋で心室頻拍が発生する事や、TRPC3とTRPC6チャネルタンパ

クの発現量が増加していることも発見している。このモデルを用いて心室頻拍の解析をおこなうことにより、TRPCチャンネルの活性化が心室頻拍のトリガー発生に作用していること、またTRPC3とTRPC6チャンネルのどちらの活性化がよりトリガー発生に重要かを明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、心肥大・心不全に伴う心室頻拍発生のトリガーに、TRPCチャンネルの活性化が直接関与しているかについて検討することにより、心不全誘発心室性不整脈の治療のための新しい戦略を探索することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 心室頻拍のトリガー発生に対するTRPCチャンネルの活性化の関与を生体位心で検討

実験方法：正常マウス（BDF1マウス）および活性化型のG protein  $\alpha_q$ を一過性に強発現した心肥大・心不全誘発トランスジェニックマウス(G $\alpha_q$  TG)を麻酔下に人口呼吸管理とし、心臓超音波検査を施行し、左心室短縮率を測定した。次に体表面心電図で心室性不整脈（心室頻拍や心室性期外収縮）の発生を確認後、TRPCチャンネル阻害薬を大腿静脈から投与してその発生が抑制されるか検討した。

### (2) G $\alpha_q$ TGマウスのランゲンドルフ心における心室性不整脈の発生とTRPCチャンネル活性化薬および阻害薬の効果の検討

実験方法：正常マウスおよびG $\alpha_q$  TGマウスを麻酔下に心臓を摘出しランゲンドルフ心を作製した。心電図を記録しながらTRPCチャンネル阻害薬であるSK&F96365およびジアシルグリセロール類似物である1-oleoyl-2-acyl-sn-glycerol (OAG)を灌流液に投与して心室性不整脈の発生を検討した。

### (3) G $\alpha_q$ TGマウスの単離心室筋の特性を検討

実験方法：G $\alpha_q$  TGマウスの心臓を酵素的に処理して心室筋を単離した後、単一心筋のパッチクランプ法によりSK&F96365の投与前後で活動電位を記録した。

### (4) 心不全誘発心室性不整脈発生とTRPC3, 6チャンネルの関係を検討

実験方法：G $\alpha_q$  TGマウスに対し、心不全改善効果のあるK-ATPチャンネル開口薬のニコランジルおよびアンジオテンシンII type1受容体拮抗薬のオルメサルタンを24週間慢性投与して、32週齢時にTRPC3とTRPC6の

両タンパクの発現量、心臓超音波検査、体表面心電図検査をおこなった。

### (5) 左室拡張末期圧の上昇による心室頻拍のトリガー発生におけるTRPCの関与を検討

8週齢の正常マウスを麻酔下に開胸して大動脈球部にて縮窄術をおこない、圧負荷心不全マウスを作製。手術6週後に体表面心電図、心臓超音波検査を施行。正常マウスと比較してこれに対し、32週齢の活G $\alpha_q$  TGマウスでは、心室性期外収縮発生が、有意に増加していた。上記圧負荷マウスは、正常マウスと比較して超音波M-modeにて測定した左室短縮率が有意に低下していたが、左心室拡張末期圧の上昇は明らかではなかった。正常マウス、圧負荷心不全マウスおよびG $\alpha_q$  TGマウスのランゲンドルフ心を作製してSK&F96365の投与前後で左心室拡張期圧を上昇させて心電図を記録した。

## 4. 研究成果

### (1) 活性化型のG protein $\alpha_q$ を一過性に強発現した心肥大・心不全誘発トランスジェニックマウス(G $\alpha_q$ TG)の生体位心における心室性不整脈の発生とTRPCチャンネル阻害薬の効果

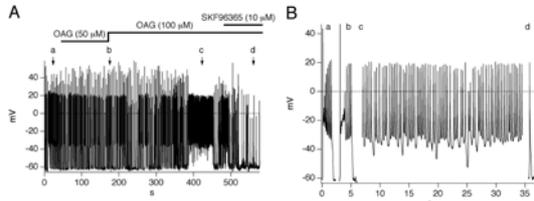
麻酔下の活性化型のG protein  $\alpha_q$ を一過性に強発現したPLCの活性化された心肥大・心不全誘発トランスジェニックマウス(G $\alpha_q$  TG)は、心臓超音波検査にて正常マウスと比較して有意な左室短縮率の低下を認めた。またG $\alpha_q$  TGマウスでは、高頻度に心室性期外収縮が認められ、心室頻拍も発生した。TRPCチャンネル阻害薬であるSK&F96365は、この心不全下で誘発された心室性期外収縮の数と心室頻拍を有意に抑制した。

### (2) G $\alpha_q$ TGマウスのランゲンドルフ心における心室性不整脈の発生とTRPCチャンネル阻害薬の効果

G $\alpha_q$  TGマウスのランゲンドルフ心では、高頻度に心室性期外収縮が認められ、心室頻拍も発生した。TRPCチャンネル阻害薬であるSK&F96365は、この心室性期外収縮の数と心室頻拍を有意に抑制した。ジアシルグリセロール類似物である1-oleoyl-2-acyl-sn-glycerol (OAG)は、正常マウス(WT)のランゲンドルフ心と比較してG $\alpha_q$  TGマウスのランゲンドルフ心において有意に心室性期外収縮の数を増加させ、心室性頻拍を誘発させた。このOAGの効果は、SK&F96365の投与により抑制された。

### (3) G $\alpha_q$ TGマウスより単離された心筋の特性

単一心筋のパッチクランプにおいてGαq TGマウスの心室筋は、早期後脱分極による triggered activityを誘発した。この triggered activityの誘発は、SK&F96365の投与により抑制された。またOAG投与により triggered activityの誘発頻度が上昇したが、これはSK&F96365の投与により抑制された(下図A, B)。



これらの結果は、心肥大・心不全に伴う心室頻拍発生のトリガーに、TRPCチャネルの関与を示唆しており、新しい抗不整脈薬の開発の可能性を与えたと言える。

#### (4) 心不全誘発心室性不整脈発生とTRPC3, 6チャネルの関係

心室性不整脈を引き起こしてくる32週齢のGαq TGマウスの心臓において、TRPC3とTRPC6の両タンパクの発現量が増加していた。興味ある事に、K-ATPチャネル開口薬のニコランジルの慢性投与は、心臓超音波検査においてGαq TGマウスの有意な左室短縮率の改善を示し、心室性期外収縮の発生頻度も有意に減少させたが、心室筋の両タンパク (TRPC3とTRPC6) の発現量増加を改善させることはできなかった。また、ニコランジル急性投与は、Gαq TGマウス心室筋の活動電位幅を有意に短縮した。さらにアンジオテンシンII typeI受容体拮抗薬のオルメサルタン慢性投与も、Gαq TGマウスの左室短縮率を改善し、心室性期外収縮の発生頻度も有意に減少させたが、このオルメサルタンの慢性投与では、ニコランジルの慢性投与と違い、心室筋のTRPC6タンパクの発現量を有意に減少させた。しかし、TRPC3タンパクの発現量に対しては、優位な抑制を示さなかった。以上の結果から、心肥大・心不全に伴う心室頻拍のトリガー発生には、心室筋のTRPC3, 6タンパク発現量の増加が重要な役割を持っているが、TRPC3, 6タンパク発現量の増加だけでは、心室頻拍のトリガーが発生するとは限らないことが示唆された。これらの結果は、新しい抗不整脈薬の開発としてのTRPCチャネル阻害薬の可能性について新しい知見となった。

平成21-22年度の研究から、心不全で誘発される心室性不整脈には、TRPCチャネルの活性化が重要な役割を持っている事が示めされたが、単にTRPC3, 6タンパクの発現量の増加だけでは、心室性不整脈の発生

は引き起こされない事が示唆された。これまでの他の研究から、TRPC3, 6チャネルは、単に細胞膜の伸展によって活性化されることが知られている一方、不全心では左心室拡張末期圧の上昇があり、この事によって左心室の伸展が起こっている可能性がある。そこで平成23年度は、心室性期外収縮発生に対し、TRPC3, 6チャネルタンパク量の増加に加えて何が必要かをについて、TRPC3, 6チャネルタンパク量増加しているGαq TGマウスとTRPC6チャネルタンパク量のみが増加している圧負荷心不全モデルマウスを用いて検討した。

#### (5) 左室拡張末期圧の上昇による心室頻拍のトリガー発生におけるTRPCの関与

大動脈球部を狭窄させた圧負荷心不全マウスでは、正常マウスと比較して体表面心電図上心室性期外収縮の発生に差はなかった。これに対し、32週齢の活Gαq TGマウスでは、心室性期外収縮発生が、有意に増加していた。上記圧負荷マウスは、正常マウスと比較して超音波M-modeにて測定した左室短縮率が有意に低下していたが、左心室拡張末期圧の上昇は明らかではなかった。圧負荷マウスおよびGαq TGマウスのランゲンドルフ心において、左心室拡張期圧を上昇させた時の心室性期外収縮の数は、WTマウスのランゲンドルフ心と比較して、有意に増加していた。さらに、圧負荷マウスとGαq TGマウスのランゲンドルフ心で左心室拡張期圧の上昇による心室性期外収縮の数増加を比較したところ、Gαq TGマウスで有意に高かった。この左心室拡張期圧の上昇による心室性期外収縮の発生頻度の増加は、TRPCチャネル阻害薬(SK&F96365)の投与において、有意に減少した。これらの結果から、心肥大・心不全に伴う左室拡張末期圧の上昇が、心室頻拍のトリガー発生(心室性期外収縮の発生)を増加させ、これにはTRPCチャネルが関与していることが示唆された。またTRPC3, 6チャネル蛋白発現量の増加は、この拡張末期圧の上昇による心室頻拍のトリガー発生の増加に重要である事が示唆された。この結果から、新規抗不整脈薬開発としてのTRPCチャネル阻害薬の可能性について新しい知見が得られた。

#### 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2件)

① Hirose M, Takeishi Y, Niizeki T, Nakada T, Shimojo H, Kashihara T, Horiuchi-Hirose M, Kubotac I, Mende U, Yamada M.

Diacylglycerol kinase  $\zeta$  inhibits ventricular tachyarrhythmias in a mouse model of heart failure: Roles of canonical transient receptor potential (TRPC) channels. *Circ J* 査読あり 2011;75:2333-2342.

② 弘瀬 雅教、堀内 美和、中田 勉、柏原 俊英、矢野志春、柴崎 利英、生 暁娜、山田 充彦：心不全誘発モデルマウスに対するニコランジル慢性投与の効果. *Ther Res* 31: 288-290, 2010

[学会発表] (計 7 件)

① Hirose M, Takeishi Y, Shimojo H, Kashihara T, Nakada T, Mende U, Hongo M, and Yamada M: Nicorandil inhibits  $G_{\alpha_q}$ -induced chronic heart failure in transgenic mice. American Heart Association BCVS 2011, 2011 年 7 月、アメリカ (ニューオーリンズ)

② 弘瀬雅教、竹石恭知、柏原 俊英、中田 勉、山田充彦：Nicorandil inhibits  $G_{\alpha_q}$ -induced chronic heart failure in transgenic mice. 第 75 回日本循環器学会総会、2011 年 3 月、横浜

③ 弘瀬雅教、竹石恭知、下条久志、柏原 俊英、中田 勉、中山貢一、山田充彦：Olmесartan inhibits atrial remodeling in a mouse model of chronic heart failure. 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月、横浜

④ Hirose M, Takeishi Y, Shimojo H, Kashihara T, Nakada T, Mende U, Hongo M, and Yamada M: Olmesartan inhibits  $G$  protein  $\alpha_q$ -induced atrial remodeling in transgenic mice. 83th American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010 年 11 月、アメリカ (シカゴ)

⑤ 弘瀬 雅教：ニコランジルの慢性投与は、 $G_q$ -蛋白遺伝子改変マウスにおいて心不全誘発心室性不整脈の発生を抑制する。第 61 回日本薬理学会北部会、2010 年 9 月、札幌

⑥ Hirose M, Takeishi Y, Shimojo H, Nishio A, Nakada T, Kubota I, Mende U, Hongo M, Matsumoto K, and Yamada M: Nicorandil Inhibits Ventricular Remodeling and Arrhythmias in a Mouse Model of Chronic Heart Failure. 82th American Heart Association Scientific Sessions 2009, 2009 年 11 月アメリカ (オーランド)

⑦ Hirose M, Takeishi Y, Niizeki T, Horiuchi-Hirose M, Nakada T, Kubota M, Ulrike M, Yamada M :Activation of TRPC channels participates in the induction of ventricular arrhythmias in a mouse model of congestive heart failure. *Heart Failure* 2009 and The Annual Congress of ISHR European section 2009 年 5 月、フランス (ニース)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

弘瀬 雅教 (HIROSE MASAMICHI)  
岩手医科大学・薬学部・教授  
研究者番号：

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

中田 勉 (NAKADA TSUTOMU)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：70452141

竹石 恭知 (TAKEISHI YASUCHIKA)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40272067