

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 3 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度

課題番号：21590288

研究課題名（和文）

臓器線維化に関与する線維芽細胞の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の研究

研究課題名（英文）

Roles of fibroblast $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers in fibrosis

研究代表者

木村純子（KIMURA JUNKO）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10186322

研究成果の概要（和文）：

ラットの心臓から初代培養した線維芽細胞を用い、線維芽細胞に発現する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体（NCX）および非選択性陽イオンチャネルである transient receptor potential melastatin（TRPM2）チャネルの mRNA 発現量に対する低酸素の影響を調べた。線維芽細胞の培養皿をアネロパックを用いて 24 時間、 37°C のインキュベーター内で低酸素に暴露した後、mRNA を回収した。またこの時の線維芽細胞をホールセルクランプして膜電流を測定した。すると、低酸素暴露細胞ではコントロール細胞に比べて、膜電流が有意に増大していた。この電流は、 -20 mV 付近で逆転すること、トリクロマゾールで抑制されること、などから、TRPM2 の可能性が示唆された。そこで、TRPM2 の mRNA を RT-PCR 法で調べたところ、低酸素に暴露した線維芽細胞で、TRPM2 の発現量が有意に亢進していた。TRPM2 の siRNA を作用させた細胞を低酸素暴露すると、TRPM2 の mRNA 発現量の増加は顕著に抑制された。TRPM2 を活性化させる ADP リボースを電極内液に含めてホールセルクランプすると、低酸素暴露細胞の電流は ADP リボースなしの細胞に比べて有意に増大した。また fura-2 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、低酸素細胞の Ca^{2+} 濃度はコントロールより有意に高かった。TRPM2 を活性化させる H_2O_2 を細胞外に還流すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度は、低酸素細胞で有意に高くなった。以上から心臓の線維芽細胞は低酸素に暴露されると、TRPM2 チャネルが発現し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めることが分かった。また、低酸素暴露した線維芽細胞では、NCX の発現量は低下していた。これらの低酸素暴露の作用は線維芽細胞の機能を活性化し、心臓の線維化促進に関与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We studied the effect of hypoxia on the expression levels of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers and transient receptor potential melastatin (TRPM2) channels in cardiac fibroblasts obtained primarily from rat hearts. Cardiac fibroblasts were cultured under hypoxic condition for 24 hours using Aneropac. When the hypoxia-exposed cells were whole-cell clamped, significant increase in membrane current was observed. The current was a non-selective cation current and was inhibited by clotrimazole, indicating that current is likely TRPM2 current. mRNA analysis indicated increase in TRPM2 expression in hypoxia exposed fibroblasts. When siRNA was introduced in the cells, hypoxia did not increase the nonselective cation current nor TRPM2 mRNA. H_2O_2 is an activator of TRPM2. When hypoxia-exposed cells were fura-2 loaded, H_2O_2 ($300\ \mu\text{M}$) increased intracellular Ca^{2+} concentration significantly in hypoxia-exposed fibroblasts but not in normoxia-exposed control cells. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression was decreased by hypoxia exposure. We concluded that hypoxia increase TRPM2 expression but decrease $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression in cardiac fibroblasts. These phenomena may contribute to activation of fibroblasts and acceleration of fibrosis after hypoxia in the heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1)心臓 (2) 線維芽細胞 (3) 低酸素 (4) TRPM2
 (5) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (6) 過酸化水素 (7) 細胞内 Ca^{2+} (8) ラット

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は、コラーゲンなど細胞外マトリックス蛋白を産生し、組織の構造維持に重要である。しかし、線維芽細胞の過剰な増殖やマトリックス蛋白産生は、臓器を線維化させ、機能を障害する。線維化疾患のうち、肝硬変や肺線維症はよく知られているが、最近、心不全や腎不全などでも組織の線維化が起ることが分かってきた。しかし、そのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

最近、線維芽細胞に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX) が発現し、その発現量が細胞の活性化に伴い増加することから、NCX の線維化への関与が示唆されている。そこで、本研究では、心臓の線維芽細胞を培養し、①NCX は線維芽細胞の Ca^{2+} シグナル系および増殖に関与するか ②増殖刺激により線維芽細胞の NCX 発現量は変化するか。変化するならば、その機序は何か、を調べ、組織の線維化と NCX の関係を明らかにする。線維症の予防と治療を考える上で重要な結果を得る可能性がある。

3. 研究の方法

ラットの心臓の線維芽細胞の初代培養法：Wistar ラットから心臓を摘出し、組織片をコラゲナーゼ処理し、培地中に分散させる。この操作で心筋は死滅するが、線維芽細胞は生き残り増殖する。細胞が十分増えたところで回収し、mRNA と蛋白を抽出した。またホールセルクランプ法で膜電流を測定した。

4. 研究成果

ラットの心臓から初代培養した線維芽細胞を用い、線維芽細胞に発現する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX) および非選択性陽イオンチャンネルで

ある transient receptor potential melastatin (TRPM2) チャンネルの mRNA 発現量に対する低酸素の影響を調べた。線維芽細胞の培養皿をアネロパックを用いて 24 時間、37 °C のインキュベーター内で低酸素に暴露した後、mRNA を回収した。またこの時の線維芽細胞をホールセルクランプして膜電流を測定した。すると、低酸素暴露細胞ではコントロール細胞に比べて、膜電流が有意に増大していた。この電流は、-20 mV 付近で逆転すること、トリクロマゾールで抑制されること、などから、TRPM2 の可能性が示唆された。そこで、TRPM2 の mRNA を RT-PCR 法で調べたところ、低酸素に暴露した線維芽細胞で、TRPM2 の発現量が有意に亢進していた。TRPM2 の siRNA を作用させた細胞を低酸素暴露すると、TRPM2 の mRNA 発現量の増加は顕著に抑制された。TRPM2 を活性化させる ADP リボースを電極内液に含めてホールセルクランプすると、低酸素暴露細胞の電流は ADP リボースなしの細胞に比べて有意に増大した。また fura-2 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、低酸素細胞の Ca^{2+} 濃度はコントロールより有意に高かった。TRPM2 を活性化させる H_2O_2 を細胞外に還流すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度は、低酸素細胞で有意に高くなった。以上から心臓の線維芽細胞は低酸素に暴露されると、TRPM2 チャンネルが発現し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めることが分かった。また、低酸素暴露した線維芽細胞では、NCX1 の発現量は低下していた。これらの低酸素暴露の作用は、線維芽細胞の機能を活性化し、心臓の線維化促進に関与する可能性がある。

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 3 件)

Kenji Takahashi, Kazuho Sakamoto, Junko Kimura. Hypoxic stress induces transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel expression in adult rat cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci.* 118,186-197, 2012.

Kazuho Sakamoto, Ikuo Wada, Junko Kimura. Inhibition of Rab1 GTPase and endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking underlies statin's toxicity in rat skeletal myofibers. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 338,62-69, 2011.

木村純子 長期ニコチン受容体刺激により誘発される生体機能変化: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の発現量の変化. *医学のあゆみ.* 237, 62-69, 2011

[学会発表] (計 5 件)

Hypoxic stress induces TRPM2 channel expression in adult rat cardiac fibroblasts. Kenji TAKAHASHI, Kazuho SAKAMOTO and Junko KIMURA, The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, *J. Pharmacol. Sci.*: 115, Suppl. I, 264P (2011)

Selective inhibition of cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current by YM-244769, a novel benzyloxyphenyl derivative. YAMASHITA Kanna, WATANABE Yasuhide, KIMURA Junko, YAMAKAWA Tomomi, KITA Satomi, YAMADA Toshiki, YAMAMOTO Shintaro and IWAMOTO Takahiro. The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. *J. Pharmacol. Sci.*: 115, Suppl. I, 264P (2011)

Effects of intrarenal administration on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 1 inhibitor SEA0400 in rats. YATABE Midori, YATABE Junichi, WATANABE Tsuyoshi and KIMURA Junko
The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. *J. Pharmacol. Sci.*: 115, Suppl. I, 212P (2011)

Inhibitory effect of β -hydroxybutyric acid on Ca^{2+} current under beta-adrenergic stimulation in guinea pig ventricular myocytes. KURIHARA Masato, AKAMA Youichi and KIMURA Junko. The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society. *J. Pharmacol. Sci.*: 115, Suppl. I, 155P (2011)

[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

木村純子 (KIMURA JUNKO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10186322

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: