

## 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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590205

研究課題名（和文） 心筋虚血再灌流傷害の発生における TRPC チャンネルの役割の検討

研究課題名（英文） Functional role of the transient receptor potential canonical (TRPC) channels in the development of cardiac ischemia/reperfusion injury

研究代表者

松浦 博 (MATSUURA HIROSHI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60238962

研究成果の概要（和文）：心筋虚血再灌流傷害は再灌流時に発生する細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷に起因していることが知られている。本研究課題では、この細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷に、心筋細胞膜の TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) チャンネルを通る  $Ca^{2+}$  流入が関与していることを、単離マウス心臓のランゲンドルフ灌流法、ならびに単離マウス心室筋細胞に対する細胞内  $Ca^{2+}$  イメージング法を用いて明らかにした。臨床の場では、急性心筋梗塞に対する再疎通療法の際に虚血再灌流傷害が発生しうることが知られているが、本研究成果は、その予防や治療に TRPC チャンネル阻害の有効性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）： $Ca^{2+}$  overload has been implicated in the pathogenesis of ischemia/reperfusion injury in the heart. The present investigation used Langendorff perfusion method of mouse hearts and fluorescence  $Ca^{2+}$  imaging of mouse ventricular myocytes and revealed that the transient receptor potential canonical (TRPC) channels mediate the  $Ca^{2+}$  entry responsible for  $Ca^{2+}$  overload during the reperfusion of ischemic myocardium. These observations indicate that TRPC channel blockade could provide potential new avenues to develop strategies for protecting the heart during reperfusion of ischemic myocardium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャンネル・トランスポーター・能動輸送

## 1. 研究開始当初の背景

心筋を栄養する冠状動脈の狭窄・閉塞により虚血に陥った心筋を救済するには血流の再開（再灌流）が必須であるが、虚血心筋の再灌流は必ずしもよい結果を伴うとは限らず、

逆に収縮機能の回復遅延（気絶心筋, stunned myocardium）、不整脈（再灌流不整脈, reperfusion arrhythmias）、さらには心筋細胞死（致死性再灌流傷害, lethal reperfusion injury）などの心筋傷害を伴うことが知られている（虚血再灌流傷害）。すなわち、虚血

時に発生した心筋傷害が血流の再開（再灌流）により更に増悪することがあると考えられている。これらの虚血再灌流傷害のうち、再灌流直後に発生する急激な心筋細胞死を特徴とする致死性再灌流傷害は、虚血再灌流傷害の中でも最も重篤なものであり、再灌流時に急速に発生する心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷 ( $\text{Ca}^{2+}$  overload) による不可逆的過拘縮 (irreversible hypercontracture) として出現する。致死性再灌流傷害は実験動物だけでなくヒトの心筋においても発生することが知られており、臨床的観点からも、その発生機転の解明や予防・治療法の開発は急務と考えられている。しかし現在までのところ、この致死性再灌流傷害を引き起こす細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷に関与する分子・細胞基盤は十分には明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、近年新しく同定された  $\text{Ca}^{2+}$  透過型の細胞膜陽イオン輸送チャネルファミリーである TRPC (transient receptor potential canonical) チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入が、致死性再灌流傷害の発生に関わっているという我々の仮説を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

致死性再灌流傷害の発生における TRPC チャネルの関与・役割を、ランゲンドルフ灌流下のマウス心臓ならびに酵素処理によって得られたマウス単離心室筋細胞を用いて検討を行った。

i) マウス心臓を用いた実験：ランゲンドルフ灌流下のマウス心臓に 30 分間の全虚血、続いて 60 分間の再灌流を行い、左心房から挿入したバルーンカテーテルを用いて左心室機能（拡張期圧、収縮期圧）を解析した。

ii) マウス心室筋細胞を用いた実験： $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 (fluo-3) を負荷した心室筋細胞を正常タイロイド液で灌流して安定化させた後、虚血時を模倣した MI (metabolic inhibition) Tyrode 液（正常 Tyrode 液から  $\text{Ca}^{2+}$  とグルコース除去し、さらに ATP 産生を抑制する目的で 2,4-dinitrophenol と 2-deoxyglucose を加えた）で 10 分間灌流して、続いて再灌流時を想定して正常タイロイド液で灌流した。そのとき、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度および細胞形態の計測を行い、致死性再灌流傷害の発生を評価した。さらに灌流液中に TRPC チャネル阻害剤や抗 TRPC 抗体を投与して、TRPC

チャネルの関与・役割を解析した。さらに、iii) パッチクランプ法、免疫細胞化学法を用いて TRPC チャネルタンパク質の発現・機能・局在を解析した。

## 4. 研究成果

i) ランゲンドルフ灌流下のマウス心臓では、30 分間の全虚血の後の再灌流により部分的にしか回復しない左心室機能（発生圧および拡張末期圧）が、再灌流直後に TRPC チャネル阻害剤である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB,  $5 \mu\text{M}$ ) もしくは  $\text{LaCl}_3$  ( $10 \mu\text{M}$ ) を投与しておくことと有意な回復（発生圧の上昇と拡張末期圧の低下）の改善が認められた。

ii) マウス心臓から酵素処理により単離した心室筋細胞に蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 (fluo-3) を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のイメージング解析を行った実験では、虚血時を模倣した MI (metabolic inhibition) Tyrode 液（正常 Tyrode 液から  $\text{Ca}^{2+}$  とグルコース除去し、さらに ATP 産生を抑制する目的で 2,4-dinitrophenol と 2-deoxyglucose を加えた）から正常 Tyrode 液へ変換時に約 60% の細胞において、急激な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇と細胞拘縮が発生した（図 1）。この細胞拘縮の発生は、TRPC チャネル阻害剤 (2-APB,  $\text{LaCl}_3$ ,  $\text{GdCl}_3$ , SKF-96365) や抗 TRPC1 抗体を投与すると、有意に減少した。

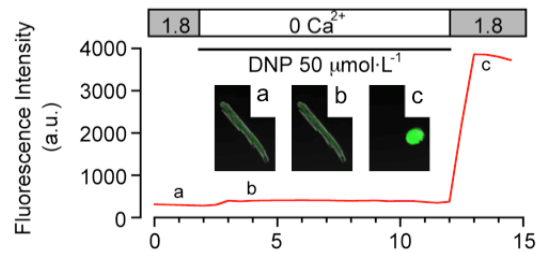


図 1. 細胞灌流液を MI Tyrode 液から正常 Tyrode 液に代えたときに発生したマウス心室筋細胞の拘縮

iii) パッチクランプ法を用いて、マウス心室筋細胞に筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase の抑制剤であるタプシガルギンを投与すると、直線上の電流-電圧関係を示し、2-APB でブロックされる電流が記録できた。よって、TRPC チャネル電流の存在が確認された（図 2）。

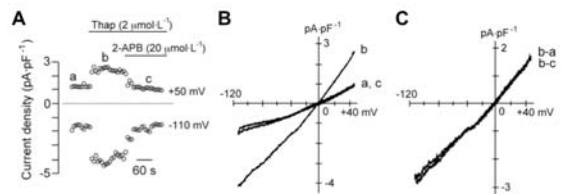


図 2. パッチクランプ法により記録したマウス心室筋細胞の TRPC 電流

また、免疫細胞化学法により、細胞膜に多く発現している TRPC1, TRPC3, TRPC4 の存在が確認された（図 3）。

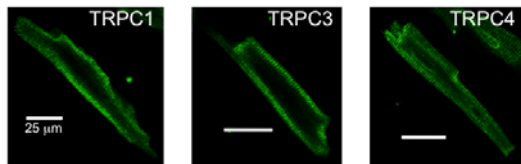


図3. マウス心室筋細胞における TRPC1, TRPC3, TRPC4 の発現

これらの実験結果は、心筋虚血再灌流傷害の原因となる細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷に TRPC チャネルを通る  $Ca^{2+}$  流入が関与しているということを示唆するものである。

臨床では、急性心筋梗塞に対する再疎通療法の際に虚血再灌流傷害が発生しうることが知られているが、本研究成果は、その予防や治療に TRPC チャネル阻害の有効性を示唆するものである。今後は、虚血再灌流時における TRPC チャネルの細胞・分子レベルでの活性化機転の解明を目指して検討を進め、その成果を臨床の場における心筋虚血再灌流傷害の予防・治療法の構築に役立てたい。

#### 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 26 件)

1. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2013). Sevoflurane Protects Ventricular Myocytes against Oxidative Stress-induced Cellular  $Ca^{2+}$  Overload and Hypercontracture. *Anesthesiology* (in press). 査読あり
2. Wu J, Ding W-G, Zhao J, Zang W-J, Matsuura H, Horie M (2013). Irbesartan-mediated  $AT_1$  receptor blockade attenuates hyposmotic-induced enhancement of  $I_{Ks}$  current and prevents shortening of action potential duration in atrial myocytes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* (in press). 査読あり
3. Omatsu-Kanbe M, Matsuura H (2013). Ischemic survival and constitutively active autophagy in self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs): characterization of a new subpopulation of heart cells. *J Physiol Sci* 63:17-29. 査読あり
4. Nakajima T, Wu J, Kaneko Y, Ashihara T, Ohno S, Irie T, Ding W-G, Matsuura H, Kurabayashi M, Horie M (2012). KCNE3 T4A as the genetic basis of Brugada-pattern electrocardiogram. *Circ J* 76:2763-2772. 査読あり
5. Kojima A, Matsuura H (2012). Electrophysiological Importance of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors. *Circ J* 76:2746-2747. 査読あり
6. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2012). Presence of store-operated  $Ca^{2+}$  entry in C57BL/6J mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *Br J Anaesth* 109:352-360. 査読あり
7. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2012). Inhibitory effects of sevoflurane on pacemaking activity of sinoatrial node cells in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol* 166:2117-2135. 査読あり
8. Kimura H, Zhou J, Kawamura M, Itoh H, Mizusawa Y, Ding W-G, Wu J, Ohno S, Makiyama T, Miyamoto A, Naiki N, Wang Q, Xie Y, Suzuki T, Tateno S, Nakamura Y, Zang W-J, Ito M, Matsuura H, Horie M (2012). Phenotype Variability in Patients Carrying KCNJ2 Mutations. *Circ Cardiovasc Genet* 5:344-353. 査読あり
9. Hoshino S, Omatsu-Kanbe M, Nakagawa M, Matsuura H (2012). Postnatal developmental decline in  $I_{K1}$  in mouse ventricular myocytes isolated by the Langendorff perfusion method: comparison with the chunk method. *Pflügers Arch* 463:649-668. 査読あり
10. Kumagai K, Imai S, Toyoda F, Okumura N, Isoya E, Matsuura H, Matsusue Y (2012).  $17\beta$ -Oestradiol inhibits doxorubicin-induced apoptosis via block of the volume-sensitive  $Cl^-$  current in rabbit articular chondrocytes. *Br J Pharmacol* 166:702-720. 査読あり
11. Wu J, Ding W-G, Matsuura H, Horie M (2012). Regulatory mechanisms underlying the modulation of GIRK1/GIRK4 heteromeric channels by P2Y receptors. *Pflügers Arch* 463:625-633. 査読あり
12. Han X, Yan DM, Zhao XF, Matsuura H, Ding W-G, Li P, Jiang S, Du BR, Du PG,

- Zhu X (2012). GHGKHKNK octapeptide (P-5m) inhibits metastasis of HCCLM3 cell lines via regulation of MMP-2 expression in vitro and in vivo studies. *Molecules* 17:1357-1372. 査読あり
13. Omatsu-Kanbe M, Yamamoto T, Matsuura H (2011). Autophagy is constitutively active in normal mouse sino-atrial nodal cells. *Acta Histochem Cytochem* 44:223-231. 査読あり
  14. Tsuji-Wakisaka K, Akao M, Ishii TM, Ashihara T, Makiyama T, Ohno S, Toyoda F, Dochi K, Matsuura H, Horie M (2011). Identification and functional characterization of KCNQ1 mutations around the exon 7-intron 7 junction affecting the splicing process. *Biochim Biophys Acta* 1812:1452-1459. 査読あり
  15. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2011). Sevoflurane protects ventricular myocytes from Ca<sup>2+</sup> paradox-mediated Ca<sup>2+</sup> overload by blocking the activation of transient receptor potential canonical channels. *Anesthesiology* 115:509-522. 査読あり
  16. Ohno S, Zankov DP, Ding W-G, Itoh H, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Hattori T, Miyamoto A, Naiki N, Hancox JC, Matsuura H, Horie M (2011). KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4:352-361. 査読あり
  17. Himeno Y, Toyoda F, Matsuura H, Noma A (2011). Reply to "Letter to the editor: 'Validating the requirement for beat-to-beat coupling of the Ca<sup>2+</sup> clock and M clock in pacemaker cell normal automaticity'". *Am J Physiol* 300:H2325- H2326. 査読あり
  18. Li P, Ninomiya H, Kurata Y, Kato M, Miake J, Yamamoto Y, Igawa O, Nakai A, Higaki K, Toyoda F, Wu J, Horie M, Matsuura H, Yoshida A, Shirayoshi Y, Hiraoka M, Hisatome I (2011). Reciprocal control of hERG stability by Hsp70 and Hsc70 with implication for restoration of LQT2 mutant stability. *Circ Res* 108:458-468. 査読あり
  19. Himeno Y, Toyoda F, Satoh H, Amano A, Cha CY, Matsuura H, Noma A (2011). Minor contribution of cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients to the pacemaker rhythm in guinea pig sinoatrial node cells. *Am J Physiol* 300:H251-H261. 査読あり
  20. Ding W-G, Toyoda F, Ueyama H, Matsuura H (2011). Lysophosphatidylcholine enhances I<sub>Ks</sub> currents in cardiac myocytes through activation of G protein, PKC and Rho signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 50:58-65. 査読あり
  21. Oka Y, Itoh H, Ding W-G, Shimizu W, Makiyama T, Ohno S, Nishio Y, Sakaguchi T, Miyamoto A, Kawamura M, Matsuura H, Horie M (2010). Atrioventricular block-induced *Torsades de Pointes* with clinical and molecular backgrounds similar to congenital long QT syndrome. *Circ J* 74:2562-2571. 査読あり
  22. Nakamura H, Ding W-G, Sanada M, Maeda K, Kawai H, Maegawa H, Matsuura H (2010). Presence and functional role of the rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current in left and right atria of adult mice. *Eur J Pharmacol* 649:14-22. 査読あり
  23. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2010). Ca<sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 161:1734-1750. 査読あり
  24. Toyoda F, Ding W-G, Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Horie M, Matsuura H (2010). Characterization of the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I<sub>Kr</sub>, in HL-1 mouse atrial myocytes. *J Membr Biol* 235:73-87. 査読あり
  25. Omatsu-Kanbe M, Yamamoto T, Mori Y, Matsuura H (2010). Self-beating atypically shaped cardiomyocytes survive a long-term postnatal development preserving expression of fetal cardiac genes in mice. *J Histochem Cytochem* 58:543-551. 査読あり
  26. Wu J, Shimizu W, Ding W-G, Ohno S, Toyoda F, Itoh H, Zang W-J, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Nademanee K, Brugada J, Brugada P, Brugada R, Vatta M, Towbin JA, Antzelevitch C, Horie M.

(2010). KCNE2 modulation of Kv4.3 current and its potential role in fatal rhythm disorders. *Heart Rhythm* 7:199-205. 査読あり

[学会発表] (計 14 件)

1. Xie Y, Ding W-G, Matsuura H. Calmodulin potentiates IKs in guinea-pig SA node cells by activating  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Mar 27-29, 2013, Tokyo, Japan.
2. Kumagai K, Imai S, Toyoda F, Maeda T, Kubo M, Matsuura H, Matsusue Y. COX-2 selective blocker inhibits the TNF-induced apoptosis in isolated rabbit articular chondrocytes. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Mar 27-29, 2013, Tokyo, Japan.
3. Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Requirement of autophagy in the development and ischemic tolerance of self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs), a new subpopulation of heart cells. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Mar 27-29, 2013, Tokyo, Japan.
4. Ding W-G, Xie Y, Toyoda F, Bai JY, Matsuura H. The improved effect of hypothermic cultivation on the functional expression of human cardiac Kv1.5 channels. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Mar 27-29, 2013, Tokyo, Japan.
5. Toyoda F, Ding W-G, Matsuura H. Positive correlation between  $I_{st}$  and  $I_{Ca,L}$  in guinea-pig sinoatrial node cells. The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Mar 27-29, 2013, Tokyo, Japan.
6. Hasegawa K, Ohno S, Itoh H, Hattori T, Makiyama T, Toyoda F, Ding W-G, Chinushi M, Matsuura H, Horie M. Novel KCNQ1 missense mutation associated with juvenile-onset atrial fibrillation. American Heart Association Annual Meeting. Nov 3-7, 2012, Los Angeles, USA.
7. Aiba T, Toyoda F, Makita N, Matsuura H, Hagiwara N, Sumitomo N, Kamakura S, Shimizu W. Biophysical properties of Na channel in the S5-S6 high risk LQT3 mutations of the long QT syndrome. American Heart Association Annual Meeting. Nov 3-7, 2012, Los Angeles, USA.
8. 松浦 博, Zankov DP, 堀江 稔. 心房筋伸展による  $AT_1$  受容体を介した緩徐活性型遅延整流性  $K^+$  電流 ( $I_{Ks}$ ) の増大 – 心房細動の  $AT_1$  受容体遮断薬によるアップストリーム治療のメカニズム – 第 41 回日本心脈管作動物質学会, シンポジウム「イオンチャネル研究の最先端」平成 24 年 2 月 11 日, 秋田.
9. Hoshino S, Nakagawa M, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Postnatal developmental changes in the TRPC channels in mouse cardiomyocytes, The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of Association for European Paediatric Cardiology, May 18-21, 2011, Granada, Spain.
10. Hoshino S, Nakagawa M, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Rapidly activating delayed rectifier  $K^+$  current during post-natal development in mouse ventricle, The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of Association for European Paediatric Cardiology, May 18-21, 2011, Granada, Spain.
11. Hoshino S, Matsuura H, Omatsu-Kanbe M. Post-natal developmental changes in the TRPC channels in mouse heart. The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, May 19, 2010, Morioka, Japan.
12. Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) survive a long-term post-natal development whole preserving the expression of fetal cardiac gene in mice. The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, May 19, 2010, Morioka, Japan.
13. Matsuura H, Omatsu-Kanbe M. Presence and properties of atypically-shaped cardiomyocyte derived from ventricular tissue of mouse heart. The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, May 19, 2010, Morioka, Japan.
14. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Sevoflurane protects cardiomyocyte from  $Ca^{2+}$  paradox by preserving SR  $Ca^{2+}$  and blocking TRPC channel. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, Oct 16, 2010, San Diego, USA.

〔図書〕(計1件) 吉田不空雄, 松浦 博,  
森川茂廣. 医系物理学基礎. 三恵社 2012  
年3月30日

〔その他〕

ホームページ等

滋賀医科大学研究情報データベース  
<http://www.shiga-med.ac.jp/db/index.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松浦 博 (MATSUURA HIROSHI)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60238962

### (2) 研究分担者

小嶋 亜希子 (KOJIMA AKIKO)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50447877

尾松 万里子 (OMATSU MARIKO)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80161397

林 維光 (Wei-Guang Ding)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80242973

### (3) 連携研究者

なし