

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 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790702

研究課題名（和文） 心筋リモデリングにおける TRPC3/6 を介したシグナルクロストークの意義の研究

研究課題名（英文） Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart

研究代表者：木下秀之（Kinoshita Hideyuki）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：30467477

研究成果の概要（和文）：

受容体活性化型 Ca²⁺チャネルである TRPC3/6 は、NFAT-calcineurin 経路を活性化し、病的な心筋リモデリング促進に働くことが報告されている。本研究では、心保護作用を有するナトリウム利尿ペプチド-GC-A シグナルと、TRPC3/6-カルシニューリン-NFAT シグナルとのクロストークの存在とその分子機序の解析を行った。

各種培養細胞を用い、ナトリウム利尿ペプチド-GC-A 経路が、TRPC6 のリン酸化を介して NFAT 依存性転写活性や細胞内 Ca²⁺流入を抑制する事を明らかとし、さらに心肥大モデル動物である GC-A ノックアウトマウスやアンジオテンシン II 投与マウスにおける心肥大の心肥大を、TRPC の選択的阻害薬は抑制した。

さらに、TRPC 阻害による病的な心臓リモデリング抑制効果に関する検討を行い、ラット新生仔培養心筋細胞において、siRNA や阻害薬を用いた TRPC3/6 の阻害が、アンジオテンシン II やエンドセリン-1 刺激による自動発火頻度の増加、NFAT 依存性転写活性の更新、心筋細胞肥大を抑制した。また、生体内において TRPC3/6 複合体を阻害する効果を持つことが示されている、選択的 TRPC3 阻害薬である Pyrazole3 が、アンジオテンシン II の慢性投与にてみられる心肥大を抑制することを明らかとした。

以上結果は、ナトリウム利尿ペプチド-GC-A 経路と TRPC3/6-カルシニューリン-NFAT 経路とのクロストークが存在し、TRPC3/6 を標的とした治療が、病的な心臓リモデリングに対する新たな治療法となる可能性を示すものであると考える。

研究成果の概要（英文）：

Transient receptor potential subfamily C (TRPC) 6, receptor-operated Ca²⁺ channels, has been shown to be a positive regulator of calcineurin-NFAT signaling that drives pathologic cardiac remodeling. Cardiac natriuretic peptides, atrial and brain natriuretic peptides (ANP and BNP, respectively) are known to have anti-cardiac hypertrophy effects. Precise molecular mechanisms by which cardiac natriuretic peptides protect hearts against pathological cardiac hypertrophy still remain unclear. In this study to elucidate the molecular pathways, by which cardiac natriuretic peptides negatively regulate pro-hypertrophic signaling, we investigated effects of ANP on TRPC6/calcineurin/NFAT signaling.

In HEK293 cells expressing TRPC6, ANP dramatically inhibited TRPC6-mediated Ca²⁺ entry and cationic currents, and in rat neonatal ventricular myocytes (NRVM), ANP significantly inhibited ET-1-induced Ca²⁺ entry and NFAT activation. The inhibitory effect of ANP on TRPC6 was abolished in the presence of specific PKG inhibitors or by the substitution of alanine for threonine at 69th amino acid of TRPC6, which has been shown to be a PKG phosphorylation site.

In model mice lacking a common receptor for atrial and brain natriuretic peptides GC-A (GC-A KO), the expression of TRPC6 and RCAN1 was increased and BTP2 significantly attenuated the cardiac hypertrophy observed in GC-A KO without affecting blood pressure. BTP2 also inhibited AngII-induced cardiac hypertrophy in

mice.

In cultured neonatal rat ventricular myocytes, overexpression of TRPC6 increased basal and ET-1 induced NFAT-dependent RCAN1 promoter activity. BTP2 significantly and dose-dependently inhibited activation of the RCAN1 promoter, and attenuated hypertrophic response of cultured cardiac myocytes. Knocking-down of TRPC6 and 3 using siRNAs significantly inhibited ET-1- or Ang II-induced increases in Ca²⁺ oscillation, and knocking down either TRPC6 or 3 had a similar effect.

TRPC6 and 3 are known to form heteromultimeric cation channels. Pyrazole-3, a selective TRPC3 blocker, which can inhibit the ion channel activity of TRPC3/6 hetero-complex, also inhibited Ang- II induced cardiac hypertrophy in mice.

All these results suggest that inhibition of TRPC6 is an important component, by which cardiac natriuretic peptides/GC-A/cGMP/PKG pathway protects the hearts from pathological cardiac remodeling, and blockade of TRPC6 could be an novel therapeutic strategy for preventing pathological cardiac remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
2011年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

現在、治療法の進歩にもかかわらず、依然心血管病による死亡原因の占める割合は大きく、新規治療法の開発が求められている。現在、心血管病の発症進展のメカニズムとして、心筋細胞や血管平滑筋細胞などの心血管構成細胞における病的組織リモデリングが重要であり、特に Calcineurin-NFAT 経路に代表される Ca 依存性ストレスシグナルが心肥大・心不全などの病的な心筋リモデリングの発症・進展に寄与することが知られている。

2. 研究の目的

受容体活性型 Ca²⁺チャネルである TRPC3/6 は、種々の心肥大モデル動物やヒトの拡張型心筋症の心臓で発現が亢進し、NFAT-calcineurin 経路を活性化し、病的な心筋リモデリング促進に働くことが報告されている。本研究では、心保護作用を有するナトリウム利尿ペプチド-GC-A シグナルと、TRPC3/6-カルシニューリン-NFAT シグナルとのクロストークの存在とその分子機序の解析を行った。

3. 研究の方法

各種培養細胞また、モデル動物を用い、TRPC3/6-カルシニューリン-NFAT シグナルとナトリウム利尿ペプチド-GC-A シグナルのクロストークの存在とその分子機序の解析を行い、さらに TRPC 阻害による病的な心臓リモデリング抑制効果の検討を行う。

4. 研究成果

TRPC6 を発現した HEK293 細胞にて、ANP は TRPC6 由来の Ca²⁺流入と陽イオン電流を強く抑制した。また、ラット新生仔心室筋細胞をアンギオテンシン II やエンドセリン-1 刺激や TRPC6 を過剰発現した際に見られる NFAT 依存性転写活性の亢進、自動発火頻度の増加を、ANP は抑制した。これら抑制効果は、PKG 阻害薬や PKG によるリン酸化部位を変異させた TRPC6 変異体で消失した。以上の結果は、ナトリウム利尿ペプチド-GC-A 経路が、TRPC6 のリン酸化を介して NFAT 依存性転写活性や細胞内 Ca²⁺流入を抑制する事を示している。

また、GC-A ノックアウトマウスは高血圧と心肥大を示し、その心室において TRPC6 の遺伝子発現が増加しており、TRPC の選択的阻害薬である BTP2 投与にて、血圧非依存性に心肥大の改善を認めた。さらにアンギオテンシ

ンII投与マウスにおける心肥大も BTP2 投与は抑制した。

次に、TRPC 阻害による病的心臓リモデリング抑制効果に関する検討を行った。ラット新生仔培養心筋細胞において、siRNA を用いた TRPC3/6 の阻害が、アンジオテンシン II やエンドセリン-1 刺激による自動発火頻度の増加を抑制し、Pyr2 がエンドセリン-1 刺激や、TRPC6 の過剰発現による RCAN1 の発現亢進を抑制し、心筋細胞肥大を抑制することを明らかにした。

TRPC には 1-7 のサブタイプが存在し、TRPC3/6 は生体内でヘテロ 4 量体を形成しており、TRPC3 の選択的な阻害は、TRPC3/6 複合体を阻害する効果を持つことが示されている。選択的 TRPC3 阻害薬である Pyrazole3 (Pyr3) が、アンジオテンシン II の慢性投与にてみられる心肥大を、Pyr2 の場合と同様に抑制することを明らかとした。

以上結果より、ナトリウム利尿ペプチド-GC-A 経路と TRPC3/6-カルシニューリン-NFAT 経路とのクロストークの存在が明らかとなり、さらに TRPC3/6 を標的とした治療が、病的心臓リモデリングに対する新たな治療法となる可能性を示唆する結果であると考えられる。

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 6 件)

- (1) Nishikimi T, Kinoshita H, Kuwahara K, (他 7 名), The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. Heart 2012; 98(2): 152-161, 査読無
- (2) Hata L, Murakami M, Kuwahara K, Kinoshita H, (他 13 名), Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. Journal of Cellular and Molecular Cardiology, 2011; 56(6), 972-981, 査読有
- (3) Kinoshita H, Kuwahara K, (他 14 名), Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. Circulation Research, 2010; 106: 1849-1860, 査読有
- (4) Takano M, Kinoshita H, (他 4 名), Pathophysiological remodeling of mouse cardiac myocytes expressing dominant negative mutant of neuron restrictive silencing factor. Circulation Journal, 2010; 74: 1849-1860. 査読有
- (5) Kuwahara K, Kinoshita H, (他 7 名). Myocardin-related transcriptional factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. Molecular and Cellular Biology, 2010; 30: 4134-4148. 査読有
- (6) Small EM, Kuwahara K, Kinoshita H, (他 7 名). Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. Circulation Research, 2010; 107: 294-304. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- (1) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. TRPC3/6 Ion Channels as potentially Novel Therapeutic Targets against Pulmonary Arterial Hypertension. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2012. 3. 17, 福岡国際会議場・福岡
- (2) Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. Inhibition of HCN Overexpressed in Failing Heart of Dilated Cardiomyopathy Mouse Model by Ivabradine Prevents Sudden Arrhythmic Death. Scientific Session of the American Heart Association 2011, 2011. 11. 13, Orlando, USA
- (3) Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. N-Type Ca²⁺ Channel Blocker is Effective to Prevent Sudden Cardiac Death in Mice with Heart Failure. Scientific Session of the American Heart Association 2011, 2011. 11. 15, Orlando, USA
- (4) 山田優子、桑原宏一郎、木下秀之、他. 拡張型心筋症・不整脈死モデルマウスにおける N 型 Ca チャネル阻害の有用性の検討. 第 34 回日本高血圧学会総会, 2011. 10. 22, 栃木県総合文化センター・宇都宮
- (5) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. A Case of Severe Chronic Heart Failure Successfully Controlled with Long Term Administration of Tolvaptan: a V(2)-specific Vasopressin Receptor Antagonists, 第 15 回日本心不全学会

- 学術集会, 2011.10.15, 鹿児島市民文化ホール・鹿児島
- (6) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. TRPC3/6 as Potentially Novel Therapeutic Targets for The Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. 第 15 回日本心不全学会 学術集会, 2011.10.14, 鹿児島市民文化ホール・鹿児島
- (7) Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. Inhibition of HCN Overexpressed in Failing Heart of Dilated Cardiomyopathy Mouse Model by Ivabradine Prevents Sudden Arrhythmic Death. 第 28 回日本心電学会 学術集会, 2011.9.22, ヒルトン福岡シーホーク・福岡
- (8) Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. N-Type Ca²⁺ Channel Blockade Prevents Sudden Death in Mice with Heart Failure. 第 28 回日本心電学会 学術集会, 2011.9.19, ヒルトン福岡シーホーク・福岡
- (9) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. Blockade of TRPC6 is a Novel Therapeutic Approach Against Pathological Cardiac Hypertrophy. Congress of the European Society of Cardiology 2010, 2011.8.31, Paris, France
- (10) 木下秀之、桑原宏一郎、他. 受容体活性化型 Ca²⁺チャネル TRPC3/6 阻害の病的な心肥大抑制効果. 第 84 回日本内分泌学会 学術集会, 2012.4.22, 神戸国際会議場・神戸
- (11) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling Pathway Inhibits TRPC6-Mediated Pro-Hypertrophic Signaling in the Hearts. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism March, 2010.4.1, Nara, Japan
- (12) Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. Essential role of p300 in maintaining mitochondrial gene expression and cell survival in the postnatal heart. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism. 2010.4.1, Nara, Japan
- (13) Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. Rho and actin dynamics-dependent nuclear translocation of MRTF-A is a common molecular mechanisms underlying both mechanical stretch- and neurohumoral stimulation -induced cardiac hypertrophy. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism, 2010.4.1, Nara, Japan
- (14) Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, 他. T-type Ca²⁺ channel blockade improved survival and arrhythmogenicity in the mouse model of myocardial infarction. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism, 2010.4.1, Nara, Japan
- (15) Yuko Yamada, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, 他. N-Type Ca²⁺ Channel Blockade Prevents Sudden Death in Mice With Heart Failure. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism, 2010.4.1, Nara, Japan
- (16) 木下秀之、桑原宏一郎、他. 新規心肥大治療法としての TRPC 阻害の効果. 日本臨床分子医学会学術集会, 2010.4.9, 東京
- (17) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. T-type Ca²⁺ Channel Blockade Improved Cardiac Autonomic Nervous System Imbalance and Reduced Sudden Death in Mice Model of Chronic Heart Failure. Congress of the European Society of Cardiology 2010, 2010.8.30, Stockholm
- (18) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara, 他. Blockade of TRPC Channel Prevents Pathological Cardiac Hypertrophy. Scientific Session of the American Heart Association 2010, 2010.11.14, Chicago
- (19) Hideyuki Kinoshita, Koichiro Kuwahara Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling Pathway Inhibits TRPC6-Mediated Pro-Hypertrophic Signaling in the Hearts. Scientific Session of the American Heart Association 2010, 2010.11.15, Chicago
- (20) Hideyuki Kinoshita, 他. Koichiro Kuwahara Blockade of TRPC6 is a novel therapeutic approach against pathological cardiac remodeling. 第 14 回日本心不全学会 学術集会, 2010.10.8, 東京
- (21) 木下秀之、桑原宏一郎、他. T-Type Ca²⁺ Channel Blockade Prevents Sudden

- Death in Mice With Heart Failure. 第
27 回 日本心電学会学術集会,
2010.10.9, 大分
(22) 木下秀之、桑原宏一郎, 他. 新規心
肥大治療法としての TRPC 阻害の効果.
臨床分子医学会, 2010.4.11, 東京

[その他]
ホームページ等
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/jpn/research/cardio.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下秀之 (KINOSHITA HIDEYUKI)
京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：30467477