

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293018

研究課題名(和文) TRPC3 / 6 複合体チャネル形成による心筋ホメオスタシス制御機構の解析

研究課題名(英文) Study on the regulation of cardiac homeostasis by formation of TRPC3/6 channel protein complex

研究代表者

西田 基宏 (Nishida, Motohiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90342641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの生命活動は血液体肺循環によって維持されており、これを支えているのが心筋、血管平滑筋、骨格筋などの筋細胞である。我々は筋細胞に共通する恒常性維持機構として細胞の静止膜電位を規定するイオンチャネル(TRPC3/6)に着目し、ヒト心血管疾患モデルマウスを用いて、TRPC3/6チャネルの阻害が虚血や高血圧などのストレスに対する抵抗性獲得につながる新たな創薬戦略となることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Human living activity is maintained by systemic and pulmonary blood circulation, and muscular cells, including cardiomyocytes, vascular smooth muscle cells, and skeletal muscle cells, predominantly support this system. We focused on transient receptor potential canonical 3 and 6 heterotetramer channels (TRPC3/6), a non-selective cation-permeable channel that regulates resting membrane potential in cells, and found that inhibition of TRPC3/6 channel activities in muscular cells will be a new strategy for the prevention of our cardiovascular system from ischemic and hypertensive stresses, using mouse models for human cardiovascular diseases.

研究分野：薬理学

キーワード：心血管疾患 チャネル 恒常性 活性酸素 創薬 レジリエンス

1. 研究開始当初の背景

形質膜越えのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 流入によって生じる Ca^{2+} シグナリングは、細胞の恒常性維持において極めて重要な役割を果たしている。申請者は、心不全の進行に付随して起こる心臓の形態構造改変 (リモデリング) と Ca^{2+} シグナリングの関係に注目してきた。心筋細胞の肥大 (心肥大) には、 Ca^{2+} 依存性の転写因子活性化による心肥大遺伝子の発現誘導が必要であるものの、通常の収縮運動に必要な電位依存性の Ca^{2+} 流入 (興奮収縮連関) では肥大遺伝子の発現が誘導されないことから、興奮収縮連関とは異なる新たな Ca^{2+} 流入経路の存在が示唆されている (興奮転写連関)。申請者は、心不全を全身の代償性反応の結果生じる内分泌疾患として捉える近年の治療指針を基盤に、交感神経系やレニン・アンジオテンシン系の亢進による神経液性因子を介した受容体作動性の Ca^{2+} 流入が心肥大を制御することを明らかにしてきた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009, 2011; Circ. Res. 2010; EMBO J. 2006, 2008; J. Biol. Chem. 2007, 2010)。特に、受容体作動性 Ca^{2+} 流入を担うチャネルの分子実体がジアシルグリセロール (DAG) 感受性の transient receptor potential canonical (TRPC) チャネル (TRPC3 と TRPC6 のヘテロ 4 量体) であり、TRPC3/C6 チャネルの阻害が心不全の進行に付随して起こる心臓リモデリング (心肥大や線維化) を抑制することを見出した点は極めて意義深い。しかし、病態時の心臓において TRPC3 と TRPC6 がそれぞれ独立した機構で心不全に寄与することが明らかになってきたことで、逆に正常の心臓において何故 TRPC3/C6 チャネルがヘテロ 4 量体を形成するのかという疑問が浮上してきた。

2. 研究の目的

本研究では、TRPC3/C6 ヘテロ 4 量体チャネル形成が心筋細胞外マトリックス恒常性維持に必要であり、TRPC3/C6 チャネルリモデリングが心不全の引き金となることを示すことで、心臓の動的恒常性維持における TRPC3/C6 複合体形成の役割を確立させることを目的とした。具体的には以下の 3 つについて取り組むことにした。

- ・ TRPC3/C6 複合体チャネルのアミノ酸センシングの分子基盤とその生理的意義の解明
- ・ TRPC3-NADPH oxidase 複合体形成による心臓老化制御機構の解析
- ・ TRPC6-PDE3 複合体形成による心血管リモデリング制御機構の解析

3. 研究の方法

・ HEK293 細胞にマウス TRPC3, TRPC6 および TRPC3/6 チャネルを一過的に過剰発現させ、各アミノ酸に対する応答を fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の経時的变化により評価する。チャネル活性を増加または減少させ

たアミノ酸については、パッチクランプ法によりその作用が直接的な効果かどうか確認する。アミノ酸による TRPC3/6 チャネル活性化の表現型として、野生型マウスと TRPC3/6 欠損マウスの心臓を用いて mTOR 活性、タンパク合成、オートファジーなどを評価し、TRPC3/6 チャネルのアミノ酸作動性をもつ生理的意義を示す。

・ TRPC3 または TRPC6 欠損マウスに大動脈狭窄による圧負荷を施し、心機能解析および酸化/糖化ストレス・線維化・老化を野生型マウスのそれと比較解析する。また、下肢虚血モデルを用いて、副側血行路の発達障害に対する TRPC3/6 チャネルの役割を調べる。

4. 研究成果

・ TRPC3 および TRPC6 チャネルを単独に発現させてもアミノ酸混合液に対して何ら応答を示さなかったものの、TRPC3 と TRPC6 を共発現させた細胞においてのみアミノ酸混合液処置に対して有意な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を示した。各アミノ酸に対する TRPC3/6 チャネルに対する効果を調べた結果、細胞外基質の構成成分となるアミノ酸 (proline, hydroxyl-proline など) を処置したときだけ TRPC3/6 チャネル活性が増加することがわかった。野生型マウス、TRPC3 または TRPC6 欠損マウスの心臓をそれぞれ摘出し、タンパク質発現解析を行ったところ、mTOR 活性に差はなかったものの、オートファジーの指標である LC3-II の発現量が TRPC3 および TRPC6 欠損心臓において有意に増加していることがわかった。以上の結果より、心臓において TRPC3/6 ヘテロ 4 量体チャネルはオートファジーの負の制御因子として働く可能性が示された。

・ 圧負荷誘発性の慢性心不全は、TRPC3 または TRPC6 欠損によって有意に抑制された。心臓の形態解析を行ったところ、野生型マウスのそれと比べて圧負荷による心重量の増大 (心肥大) は全く抑制されなかったものの、間質の線維化とそれに伴う心臓の硬化が有意に抑制されることがわかった。詳細な解析の結果、TRPC3 欠損マウスでは酸化ストレスが顕著に抑制されるのに対し、TRPC6 チャネルでは全く抑制されず、両者の心不全抑制の機序は異なる可能性が示された。そこで、TRPC3 チャネルに焦点を絞り、酸化ストレスとの関係を調べた結果、心臓に発現する TRPC3 タンパク質は細胞膜上の活性酸素生成酵素である NADPH oxidase 2 (NOX2) やプロテインキナーゼ C と相互作用し、NOX2 発現を安定化させる作用をもつことが新たに明らかになった (Biochem. J., 2016; Nature Commun., under revision)。一方、TRPC6 チャネルは心線維芽細胞に特に多く発現しており、線維芽細胞の筋分化を負に制御していることがわかった。以上の結果から、TRPC3 と TRPC6 チャネルはともに心臓リモデリングの仲介分子として働くことが明らかになっ

たものの、その作用機序は異なっており、病態時には必ずしも TRPC3 と TRPC6 がヘテロ 4 量体チャンネルを形成しているわけではないことも明らかとなった。

・マウスの大腿動脈を結紮し下肢虚血を行った後の虚血ストレス抵抗性(レジリエンス)における TRPC3/6 チャンネルの役割を解析した。野生型および TRPC3 欠損マウスにおいては、下肢虚血後の末梢血流増加量が 40% に停滞し、末梢循環障害(PAD)が起こっていることが確認された。一方、TRPC6 欠損マウスでは 70% 以上の有意な血流回復が観察された。そこで、腓腹筋における TRPC3, TRPC6 タンパクの発現を免疫染色により調べたところ、TRPC6 は血管平滑筋に特異的に発現していることが観察された。そこで、血管平滑筋細胞特異的プロモーターの下流に野生型 TRPC6 遺伝子をコードしたコンストラクトを作成し、TRPC6 欠損マウスに導入したところ、下肢虚血後の副側血行路の発達および末梢循環改善効果が完全に消失した。下肢虚血後の新生血管数は各群間で差はなく、成熟血管数と平均血管径のみ TRPC6 欠損マウス腓腹筋で有意に増加していたことから、血管平滑筋細胞の TRPC6 チャンネルが下肢虚血後の血管成熟の負の制御因子として働くことが明らかとなった(J Clin. Invest., under revision)。

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. Sawamura S, Hatano M, Takada Y, Hino K, Kawamura T, Tanikawa J, Nakagawa H, Hase H, Nakao A, Hirano M, Rotrattanadumrong R, Kiyonaka S, Mori MX, Nishida M, Hu Y, Inoue R, Nagata R, Mori Y. Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds. *Mol Pharmacol.* 89(3), 348-363 (2016). doi: 10.1124/mol.115.102863. (査読有)
2. Mangmool S, Denkaew T, Phosri S, Pinthong D, Parichatikanond W, Shimauchi T, Nishida M. Sustained β AR stimulation mediates cardiac insulin resistance in a PKA-dependent manner. *Mol Endocrinol.* 30(1), 118-132 (2016). doi: 10.1210/me.2015-1201. (査読有)
3. Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 58(2), 1-8 (2016). doi: 10.3164/jcfn.15-111. (査読有)
4. Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems J-M, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, Nishida M*. The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension. *Sci. Signal.* 2016 Jan 19;9(411):ra7. doi: 10.1126/scisignal.aac9187. (*corresponding author) (査読有)
5. Numaga-Tomita T, Nishida M*, Putney JW Jr. and Mori Y*. TRPC3 amplifies B cell receptor-induced ERK signaling via protein kinase D-dependent Rap1 activation. *Biochem J.* 2016 Jan 15;473(2):201-210. doi: 10.1042/BJ20150596. (査読有)
6. Gentry LR, Nishimura A, Cox AD, Martin TD, Tsygankov D, Nishida M, Elston TC, Der CJ. Divergent Roles of CAAX Motif-signaled Posttranslational Modifications in the Regulation and Subcellular Localization of Ral GTPases. *J Biol Chem.* 290(37), 22851-22861 (2015). doi: 10.1074/jbc.M115.656710. (査読有)
7. Shinkai Y, Abiko Y, Ida T, Miura T, Kakehashi H, Ishii I, Nishida M, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Reactive Sulfur Species-Mediated Activation of the Keap1-Nrf2 Pathway by 1,2-Naphthoquinone through Sulfenic Acids Formation under Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol.* 28(5), 838-847 (2015). doi: 10.1021/tx500416y. (査読有)
8. 西田 基宏, 森泰生, "RSS による G タンパク質/TRP シグナル制御" 細胞工学, 34(4), 366-371 (2015). (査読無)
9. 西田 基宏, 西村明幸, "心臓レジリエンスを制御する酸素シグナリング" 実験医学(増刊), 33(10), 1562-1567 (2015). (査読無)
10. 西田 基宏, 島内司, "ガス様シグナルの破綻と疾患" 医学のあゆみ, 254(5), 334-338 (2015). (査読無)
11. 森泰生, 森誠之, 西田 基宏 カルシウムシグナルの基本機構とその可能性 Clin Calcium. 25(1):47-58. doi: CliCa15014758. Review. Japanese. (2015 年 1 月). (査読無)
12. Nishida M, Toyama T, Kumagai Y, Numaga-Tomita T. Establishment of a novel therapeutic strategy for heart failure based on the mechanism underlying maintenance of redox homeostasis by reactive sulfur species. *Yakugaku Zasshi.* 134(12):1239-1243 (2014). (査読無)
13. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca^{2+} channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure. *Cardiovasc. Res.* 104(1):183-93 (2014). doi:

- 10.1093/cvr/cvu185. (査読有)
14. **Nishida M***, Toyama T, Akaike T. Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 73: 10-7 (2014). doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.003. (査読有)
 15. 北島直幸, **西田基宏** 心臓における TRP チャネルの多様な役割 実験医学 Vol.32, No.4, 527-533 (2014). (査読無)
 16. Watari K, Nakaya M, **Nishida M**, Kim KM, Kurose H. β -arrestin2 in infiltrated macrophages inhibits excessive inflammation after myocardial infarction. *PLoS One.* 8(7):e68351 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0068351. (査読有)
 17. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, **Nishida M**, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Commun.* 4, 1532 (2013). doi: 10.1038/ncomms2540. (査読有)
 18. **Nishida M**, Ishikawa T, Saiki S, Sunggip C, Aritomi S, Harada E, Kuwahara K, Hirano K, Mori Y, Kim-Mitsuyama S. Voltage-dependent N-type Ca^{2+} channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434(2), 210-216 (2013). (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.040.
 19. Chen W, Oberwinkler H, Werner F, Gaßner B, Nakagawa H, Feil R, Hofmann F, Schlossmann J, Dietrich A, Gudermann T, **Nishida M**, Del Galdo S, Wieland T, Kuhn M. Atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of microcirculatory endothelial Ca^{2+} and permeability response to histamine involves cGMP-dependent protein kinase I and TRPC6 channels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33(9), 2121-2129 (2013). doi: 10.1161/ATVBAHA.113.001974. (査読有)
 20. Sawa T, Ihara H, Ida T, Fujii S, **Nishida M**, Akaike T. Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. *Nitric Oxide* 34, 10-18 (2013). doi: 10.1016/j.niox.2013.04.004. (査読有)
 21. Akaike T, **Nishida M**, Fujii S. Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide. *J. Biochem.* 153(2), 131-138 (2013). doi: 10.1093/jb/mvs145. (査読有)
 22. Sunggip C, Kitajima N & **Nishida M***. Redox control of cardiovascular homeostasis by Angiotensin II. *Curr. Pharm. Des.* 19(17), 3022-3032 (2013). doi: 10.2174/1381612811319170008#sthash.NqN

- 2w5iE.dpuf. (査読有)
23. **西田基宏** 酸化ストレスによるレドックス恒常性異常と心筋リモデリング 医学のあゆみ Vol.247, No.9, 875-878 (2013). (査読無)
 24. **西田基宏**, 角田将明, 北島直幸 TRP チャネルの生理機能と病態生理 *Clinical Calcium* 23(4), 561-568 (2013). (査読無)
 25. 北島直幸, **西田基宏** 硫化水素のケミカルバイオロジー 日薬理誌 Vol. 141, 350-351 (2013). (査読無)
 26. **西田基宏**, 澤智裕 硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用 **生化学** みにれびゅーVol.85, No.11, 996-999 (2013) (査読無)

[学会発表](国際学会招聘 計4件)

1. **Nishida M**, Numaga-Tomita T, Shimauchi T, Matsukane R, Nishimura A. Imitation of kinesitherapy by inhibition of TRPC6 channel activities. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015). Oct 16-17, 2015. Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto, Japan.
2. **Nishida M**. Negative regulation of cardiac remodeling by S-polythiolation of G proteins. 2nd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecule. Aug31-Sep1, 2015. Showa Pharmaceutical University, Machida, Tokyo, Japan.
3. **Nishida M**. Covalent modification of H-Ras by nitric oxide-derived reactive species underlies development of chronic heart failure in mice. 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology (WCP2014), 13-18 July, 2014, Cape Town, South Africa.
4. **Nishida M**. Role of TRPC channels in mechano-chemo transduction in hearts. The 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia (Sep 12-15, 2013, Oxford, the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland).

*国内学会(シンポジウム講演、一般口頭発表、ポスター発表) 計36件

[図書](計1件)

1. **Nishida M**, Kuwahara K, Kozai D, Sakaguchi R, Mori Y. TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets. *Innovative Medicine: Basic Research and Development* (Springer Open, edited by Nakao K, Minato N and Uemoto S), ISBN 978-4-431-55651-0 (eBook) 195-218 (2015). DOI 10.1007/978-4-431-55651-0_17.

[産業財産権]
出願状況(計1件)

名称：D r p 1 重合阻害剤
発明者：西田基宏、石川達也
権利者：自然科学研究機構、味の素株式会社
種類：用途特許（国際出願）
番号：PCT/JP2015/082688
出願年月日：平成 27 年 11 月 20 日
国内外の別： 国外

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/circulation/>

6．研究組織

(1)研究代表者

西田 基宏（Nishida, Motohiro）

大学共同利用機関法人

自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・

岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：9 0 3 4 2 6 4 1

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし