

令和元年6月19日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08546

研究課題名(和文) AT1受容体 アレスチンバイアスアゴニストの強心作用の解析と小児心不全治療応用

研究課題名(英文) The impact of a beta-arrestin-biased AT1 receptor agonist on positive inotropic effect in the immature heart

研究代表者

柏原 俊英 (Kashihara, Toshihide)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：20552334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は近年、マウス新生児の心室筋細胞でアンジオテンシン が、興奮収縮連関の要であるL型Ca²⁺チャネルを強く活性化させること、これがAT1受容体/ アレスチン2を介した経路によることを見出した。本研究では、AT1受容体 アレスチンバイアスアゴニストのTRV027が幼若心筋で強心作用を発揮するかどうかと、これの幼若期の心不全への治療効果を評価した。その結果、TRV027が、L型Ca²⁺チャネル活性を増増させ、Ca²⁺トランジェントを増大させることで強心作用を示すこと、及び幼少期の心不全に有効である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児心不全の治療は、その研究の遅れから成人の治療法に基づいて行われている。残念ながらこれまでの薬物療法では、患者の生命予後を改善していない。小児と成人の循環生理特性は異なる点が多いため、小児にあった新たな作用機序の心不全治療薬が強く望まれている。研究代表者はこれまでに、アンジオテンシンII受容体 アレスチン信号が未熟な心臓に特異的に強心作用を発揮する可能性を見出した。本研究では、この信号を活性化する作動薬が強心作用を示し、未熟期の心不全を改善する可能性を見出した。本研究より、新しい小児心不全治療のヒントが得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Although angiotensin II is well known to cause hypertension and cardiac hypertrophy in the adult heart, it plays important roles in cardiovascular regulation in the perinatal period. I demonstrated previously that angiotensin II increases L-type Ca²⁺ channel activity through AT1 receptor/ -arrestin2 signaling in immature but not adult cardiomyocytes, suggesting that angiotensin II exerts a positive inotropic effect in the immature heart. Here I investigated the effect of TRV027, a -arrestin-biased AT1 receptor agonist, on positive inotropic effect and its potential for pediatric heart failure using heart failure model mouse. TRV027 increased L-type Ca²⁺ channel activity and Ca²⁺ transient in immature cardiomyocytes through the same mechanism as angiotensin II. Experiments that treatment with TRV027 to mice with failing heart in the pediatric period showed that TRV027 had tendency to improve cardiac function of these mice.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心不全 強心作用 心機能 アンジオテンシン L型カルシウムチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児心筋症の 54% を占める拡張型心筋症は、高頻度に心不全に移行する難治性慢性疾患である。しかし本邦において小児の心臓移植は大変困難であり、薬物療法が依然重要である。しかし、小児では成人におけるような心不全治療薬の大規模臨床試験が殆どなされておらず、原則的にその薬物療法は成人の薬物療法の踏襲である。また小児心不全患者の心臓移植を伴わない 5 年生存率は 50% 以下である。したがって、成人の循環特性とは大きく異なる小児の循環特性に合った新しい心不全治療薬の開発が強く望まれる。

研究代表者は近年、マウス新生児の心室筋細胞でアンジオテンシン (AII) が、興奮収縮連関の要である L 型 Ca^{2+} チャネル活性を倍増させることを見出した。この反応は、成熟心室筋細胞では起こらなかった。さらに研究代表者は、この反応が AT_1 受容体を介すること、心肥大や心不全を誘発する $\text{G}_{q/11}$ 蛋白質を介さないこと、心保護作用を有する アレスチン 2 を介することも見出した。即ち AII は、成熟動物における心不全の悪化因子とは異なり、幼若動物では心臓を保護しながら収縮力を増強させる重要な循環調節因子であると考えられた。そこで本研究では、 $\text{G}_{q/11}$ 信号を抑制するが アレスチン信号を活性化させる AT_1 受容体 アレスチンバイアスアゴニストの TRV027 が、幼若動物で強心作用を示すか否か、またこのアゴニストが幼若期に心不全を呈する遺伝子改変マウスの生命予後を改善するか否か、を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

心室筋細胞の $\text{Ca}_v1.2$ L 型 Ca^{2+} チャネル (LTCC) は、興奮収縮連関の始動に働く重要な分子であり、その活性の増大は心収縮力の増大に繋がるため心不全治療の標的となり得る。

研究代表者は近年、マウス新生児の心室筋細胞でアンジオテンシン (AII) が、L 型 Ca^{2+} チャネル活性を倍増させることを見出した。研究代表者は、この制御機構を詳しく調べた結果、新生児マウスの心室筋細胞では AII が、 AT_1 アンジオテンシン受容体 (AT_1R) を介して CK2^{β} を活性化し、LTCC 活性を倍増させることを見出した。この反応は、成熟心室筋細胞では起こらなかった。さらに研究代表者は、この反応が AT_1 受容体を介すること、心肥大や心不全を誘発する $\text{G}_{q/11}$ 蛋白質を介さないこと、心保護作用を有する アレスチン 2 を介することも見出した。即ち AII は、成熟動物における心不全の悪化因子とは異なり、幼若動物では心臓を保護しながら収縮力を増強させる重要な循環調節因子であると考えられた。そこで本研究では、 $\text{G}_{q/11}$ 信号を抑制するが アレスチン信号を活性化させる AT_1 受容体 アレスチンバイアスアゴニストの TRV027 が、幼若動物で強心作用を示すか否か、またこのアゴニストが幼若期に心不全を呈する遺伝子改変マウスの生命予後を改善するか否か、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 未熟心筋細胞を用いた TRV027 の強心作用の解析

新生児マウスの単離心室筋細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fluo-4 を負荷し、TRV027 がカルシウムトランジェントに与える影響を検討した。

未熟心筋細胞の特徴を有するマウス不死化心房筋細胞株 HL-1 を用いて、TRV027 が LTCC を活性化させるかどうかパッチクランプ法で検討した。

HL-1 細胞に CK2^{β} の shRNA をレンチウイルスベクターで導入し、 CK2^{β} のノックダウンが TRV027 による LTCC 活性化に与える効果を検討した。

新生児マウスの単離心室筋細胞を用いてパッチクランプ法でカフェイン誘導性 Na-Ca 交換体電流を測定し、TRV027 が筋小胞体のカルシウム含量に与える影響を検討した。

(2) AII と TRV027 の in vivo での強心作用の解析

生後 3 - 5 日の新生児及び成体マウスに Saline、AII 又は TRV027 を皮下投与し、心エコーでこれらのマウスの心拍数 (HR) 及び左室内径短縮率 (FS) を測定し、心機能を評価した。麻酔下のマウスに交感及び副交感神経系の影響を除去するためプロプラノールとアトロピンを加え、心エコーを行った。

(3) 幼若期の心不全に対する TRV027 の効果の解析

幼若期より心不全を呈する拡張型心筋症 (DCM) ノックインマウス (cTnT^{K210} マウス) に対する TRV027 の有効性を検討した。生後 5 日目から野生型 (WT) 又は DCM マウスに Saline 又は TRV027 を 1 日 1 回皮下投与し、生存曲線を調べた。また、21 日投与後のこれらマウスの心機能を心エコーで評価した。

4. 研究成果

研究代表者は近年、マウス新生児の心室筋細胞で AII が、LTCC 活性を倍増させ、カルシウムトランジェントを増大させることを見出した。そこで、始めに TRV027 が AII と同じ機序でカルシウムトランジェントを増大させるかどうか調べた。

図1 TRV027はL型カルシウムチャネルを活性化させてカルシウムトランジェントを増加させる

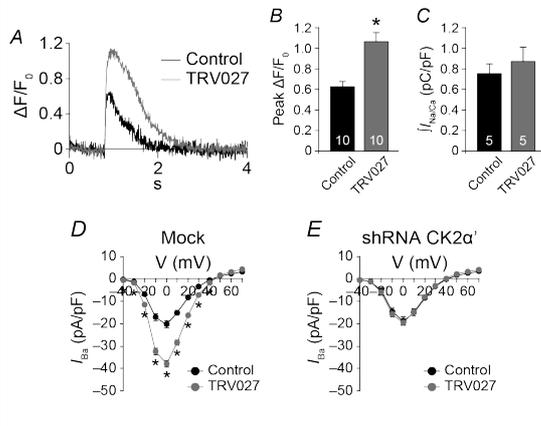


図2 TRV027の幼若期及び成熟期の心機能への効果

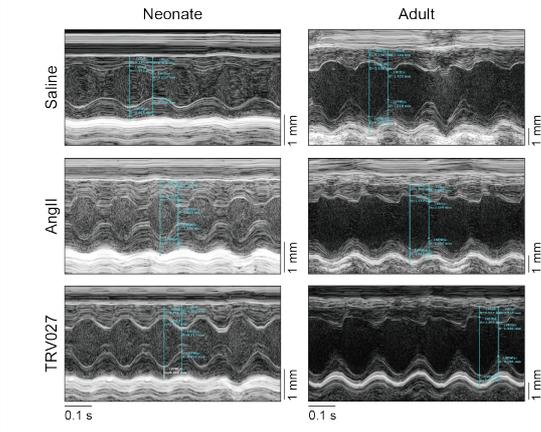


図3 TRV027の未熟心臓の左室内径短縮率と心拍数への効果

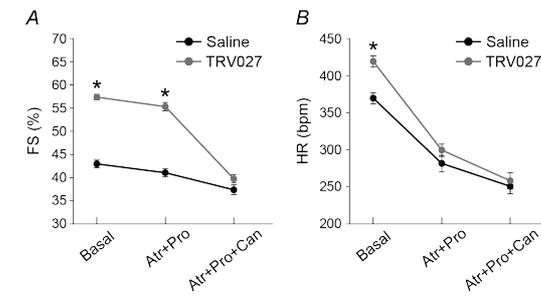
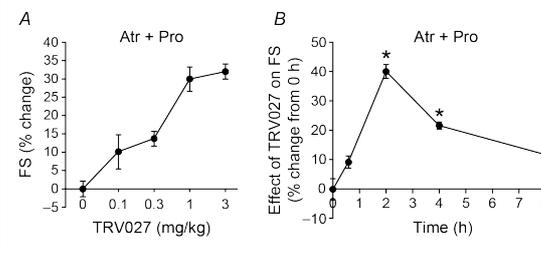


図4 TRV027の用量反応曲線と反応時間曲線



の心機能を改善し、生存率を高める可能性が示された。

本研究は、AT₁受容体 アレスチンバイアスアゴニストのTRV027が、未熟マウスで強心作用を示すことを明らかにした。これは、TRV027がCK2⁺を介してLTCC活性を倍増させ、カルシウムトランジェントを増大させることにより生じることを明らかにした。さらに本研究は、TRV027が幼少期の心不全に有効である可能性を示した。本研究結果を基に、AT₁受容体 アレスチンバイアスアゴニストを利用した新たな小児心不全治療法の開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Guo X*, Kashihara T*, Nakada T, Aoyama T, Yamada M. * indicates the same contribution. (2018) PDGF-induced migration of synthetic vascular smooth muscle cells through

3 μM の TRV027 は、新生児マウスの心室筋細胞の筋小胞体カルシウム含量を変えずに、カルシウムトランジェントの最大値を有意に増大させた(図 1A-C)。

3 μM の TRV027 は、LTCC の電流電圧曲線を有意に増大させた(図 1D)。この TRV027 の効果は CK2⁺ のノックダウンで完全に消失した(図 1E)。これより、TRV027 は AII と同じく AT₁受容体/ アレスチン 2/ CK2⁺ を介して LTCC 活性を倍増させ、カルシウムトランジェントを増大させることが示唆された。

次に、新生児及び成体マウスに Saline、AII 又は TRV027 を皮下投与し、心エコーでこれらのマウスの心拍数及び左室内径短縮率を測定し、心機能を評価した。AII (3 mg/kg) と TRV027 (3 mg/kg) はいずれも新生児マウスの HR と FS を増大させたが、成体マウスの心機能には影響しなかった(図 2)。これより、AT₁受容体 アレスチン経路の活性化が未熟心臓特異的に心収縮能を亢進することが示唆された。

TRV027 が心臓へ直接作用するのかそれとも交感・副交感神経系を介して作用するのか明らかにするため、交感・副交感神経系を薬理的に抑制して検討した。その結果、TRV027 はプロプラノールとアトロピン存在下でも有意に FS を増大した(図 3A)。この TRV027 による FS の増大は AT₁ 受容体阻害薬のカンデサルタンで完全に抑制された。一方、TRV027 の HR への効果はプロプラノールとアトロピンで消失した(図 3B)。これより、TRV027 は、直接心臓に作用して心収縮力増大させるが、交換・副交感神経系を介して間接的に HR を増大させることが示唆された。

プロプラノールとアトロピン存在下における TRV027 の FS への効果は、0.1 mg/kg/day からほぼ最大反応を示す 3 mg/kg/day まで濃度依存的に増大した(図 4A)。また、3 mg/kg の TRV027 の強心作用は 2 時間をピークに少なくとも 8 時間持続した(図 4B)。

WT マウスと DCM マウス (cTnT K210(+)) マウス) に、幼少期より持続的に Saline 又は 3 mg/kg/day の TRV027 を投与して、これらのマウスの生存率及び心機能を評価した。個体数が少なく統計による評価は出来なかったが、DCM マウスにおいて生存率は Saline 群に比べ TRV027 群の方が高い傾向にあった。心エコーによる心機能解析を行った結果、DCM-TRV027 群の方が DCM-Saline 群に比べ心拍出量と左室内径短縮率が高い傾向にあった。これらの結果から、TRV027 は DCM マウス

c-*Src*-activated L-type Ca²⁺ channels with full-length CaV1.2 C-terminus. *Pflugers Arch.* Jun;470(6):909-921. doi: 10.1007/s00424-018-2114-3.

Kashihara T, Nakada T, Kojima K, Takeshita T, Yamada M. (2017) Angiotensin II activates Ca_v 1.2 Ca²⁺ channels through β -arrestin2 and casein kinase 2 in mouse immature cardiomyocytes. *J Physiol.* 1;595(13):4207-4225. 査読有 doi: 10.1113/JP273883.

[学会発表](計 11 件)

Toshihide Kashihara, Xiaoguang Guo, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada
PDGF induces migration of synthetic vascular smooth muscle cells through c-*Src*-dependent activation of full-length CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels 18th WORLD CONGRESS OF BASICAL PHARMACOLOGY 2018年7月1日~2018年7月6日 京都府京都市国立京都国際会館

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada Angiotensin II increases Ca²⁺ transients by activating CaV1.2 Ca²⁺ channels through casein kinase 2 in immature cardiomyocytes 第95回日本生理学会大会 2018年3月28日~2018年3月30日 香川県高松市サンポートホール高松

柏原俊英、郭曉光、中田勉、山田充彦 PDGFはc-*Src*依存性に全長型CaV1.2L型Ca²⁺チャンネルを活性化して血管平滑筋細胞を遊走させる 第138回日本薬理学会関東部会 2018年3月10日 東京都港区慶應義塾大学薬学部

Toshihide Kashihara Angiotensin II increases twitch Ca²⁺ transients by activating L-type CaV1.2 Ca²⁺ channels in immature cardiomyocytes 心血管代謝週間2017 2017年12月8日~2017年12月10日 大阪府大阪市大阪国際交流センター

柏原俊英、郭曉光、中田勉、山田充彦 心室筋活動電位中のL型Ca²⁺チャンネル電流波形を決める分子機構の解析 第27回日本循環薬理学会 2017年12月1日 愛知県名古屋市ウインクあいち

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada The molecular mechanism by which angiotensin II activates CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels in immature cardiomyocytes 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (国際学会) 2017年10月22日~2017年10月26日 兵庫県淡路市淡路夢舞台国際会議場

柏原俊英、郭曉光、中田勉、山田充彦 c-*Src*による平滑筋型CaV1.2L型Ca²⁺チャンネル活性化の分子機構の解析 第136回日本薬理学会関東部会 2017年7月8日 東京都文京区東京医科歯科大学

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada Angiotensin II activates CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels in immature cardiomyocytes 第94回日本生理学会大会 2017年3月28日~2017年3月30日 静岡県浜松市浜松アクトシティコンgresセンター

Toshihide Kashihara, Xiaoguang Guo, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada Platelet-derived growth factor activates CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels through c-*Src* in vascular smooth muscle cells 第90回日本薬理学会年会 2017年3月15日~2017年3月17日 長崎県長崎市長崎ブリックホール

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada Stimulation of AT1 angiotensin receptors activates CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels through β -arrestin2 and casein kinase 2 in immature cardiomyocytes Biophysical Society 61st Annual Meeting (国際学会) 2017年2月12日~2017年2月15日 New Orleans, LA, US

柏原俊英、中田勉、山田充彦 幼若心筋細胞でアンジオテンシンIIがCa²⁺チャンネルを活性化させる分子機構の解明 第26回日本循環薬理学会 2016年12月2日~2016年12月2日 長野県松本市信州大学医学部附属病院