

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390080  
 研究課題名（和文） 筋変性疾患におけるトランスポータ・チャネルの病態的意義の解明と治療への応用  
 研究課題名（英文） Pathological roles of ion transporter/channel as therapeutic targets in muscle degenerative disease  
 研究代表者  
 若林 繁夫 (WAKABAYASHI SHIGEO)  
 国立循環器病センター研究所・循環分子生理部・部長  
 研究者番号：70158583

研究成果の概要（和文）：拡張型心肥大、心不全、筋ジストロフィーにおける細胞変性では共通して  $\text{Ca}^{2+}$  代謝異常が起こる。今回の研究で、 $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネル TRPV2 と  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体はその過程に重要な病態的役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We conclude that  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel TRPV2 and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE1 play important pathological roles in abnormal  $\text{Ca}^{2+}$ -handling commonly occurring in dilated cardiomyopathy, heart failure and muscular dystrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：分子細胞生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：循環器・高血圧、生体分子、蛋白質、トランスレショナルリサーチ、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症、筋ジストロフィー症（筋ジス）などの難治性疾患には決定的な治療法がなく、また虚血や高血圧などに起因する重症心不全を治療する究極的な治療法はない。こうした筋変性疾患を克服するために重要なことの一つは、疾患を生む原因を明らかにし、筋肉が変性して脱落する分子メカニズムを解明することであろう。本研究では、筋変性に伴って心筋、骨格筋に共通して起こる  $\text{Ca}^{2+}$  代謝異常と、それを引き起こすイオンチャネル・トランスポータの制御破綻に着目する。特に、 $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネル TRPV2 の生理的・病

態的役割の解明と治療薬の開発を中心として研究を進め、関連する P2 受容体や  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体の病態的意義を解明し、筋変性疾患を治療する方策を見出したい。

## 2. 研究の目的

(1) 筋ジスおよび拡張型心筋症における TRPV2 の病態的意義を明らかにする。TRPV2 の特異的阻害（ドミナントネガティブ変異、阻害化合物、阻害抗体）によって病態改善が起こるかどうかを検討する。

(2) 心筋は様々な外的ストレスに反応して

その代償作用として心肥大を起こすが、それが破綻すると心不全になる。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE1)活性化がこの過程に関与するかどうかを検証する。

(3) 筋ジスにおける Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の病態的意義を薬理実験で明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 現在、TRPV2 を特異的に阻害する方法はない。そこで、ドミナントネガティブ変異 TRPV2 を筋ジスマウス *mdx* に導入し、内在性の TRPV2 活性を阻害した時に病態が改善するかどうかを評価する。そのために、チャネルポア領域に導入した変異体を高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成して、*mdx* マウスと交配させる。

(2) NHE1 の恒常的活性化変異体を心筋ミオシンプロモータ制御下に心筋特異的に発現する Tg マウスを作成する。まるごと心臓の機能、単離した心筋細胞の生理機能や蛋白質リン酸化解析を行う。

(3) NHE1 特異的阻害剤カリポライドの薬理作用を筋ジス動物の個体および培養骨格筋細胞を用いて評価することにより、NHE1 の病態的意義を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 筋ジスにおける Ca<sup>2+</sup>透過チャネル TRPV2 の創薬標的としての有効性を確定するための研究を行った。これまでの研究から、筋ジスなどの筋変性疾患に共通する病態的特徴である持続的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が浮上し、それを起こす有力な候補蛋白質 TRPV2 (Ca<sup>2+</sup>透過性カチオンチャネル, transient

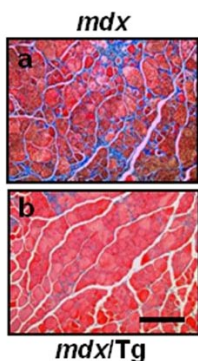


図1. 骨格筋切片のMT染色。筋ジス骨格筋(a)の繊維化はTRPV2ドミナントネガティブ変異体Tgマウスとの交配(b)によって著明に改善する。

potential V family, member 2)を同定してきた。TRPV2 は筋ジス骨格筋では細胞膜に濃縮して存在し活性化されているので、阻害すれば病態は改善することが期待されるが、特異的な阻害剤は同定されていない。そこで、TRPV2 のチャネル活

性を持たない変異体をドミナントネガティブとして用いて内在性の TRPV2 活性を抑えることにした。変異体を骨格筋に高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、筋ジスマウス *mdx* マウスと交配させると、期待通り *mdx* マウスの内在性 TRPV2 活性は著しく抑制された (Hum. Mol. Gen., 2009)。興味深いことに、この交配によって *mdx* の筋ジスの病態は大幅に改善された (図1) : 血中 CK 濃度、40-60%; グリップテスト、50-70%; 筋繊維径変数および中心核数、30-40%; アポトーシス、80%; 浸潤、90%; EBD 取り込み 80%。以上の結果は筋ジスにおける筋変性に TRPV2 による持続的細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が大きく関与すること、それを阻害することによって病態改善が起こることが明らかになった。すなわち、TRPV2 が優れた創薬標的になり得ることが確定した。また、TRPV2 を特異的に阻害する化合物をスクリーニングし薬理実験に供したところ、筋ジスと拡張型心筋症の病態の大幅な改善が見られた。

(2) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 NHE1 の病態的役割に関する研究を行った。そのためにまず、阻害ドメインを欠失させた活性化型 NHE1 を心臓に高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成した (Cir. Res., 2008)。NHE1Tg マウスの心臓は 20 日齢から有意な心筋細胞肥大を示し、40 日齢以降では筋細胞の壊死・脱落それに伴う繊維化など拡張型心筋症様の形態を呈した (図2)。心エコーでは fractional shortening が減少し収縮力の低下が認められた。このマウスのほとんどは 200 日までに心不全で死亡した。また、心肥大・心不全発症は NHE1 阻害剤であるカリポライドの投与によって抑制された。単離心筋細胞を用いた実験から、NHE1 活性化による pH<sub>i</sub> 上昇 (重炭酸がない時)、細胞内 Na<sup>+</sup>濃度上昇および弛緩・収縮期の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加が起こり、後者は CaMKII による PLB リン酸化に伴う SR の Ca<sup>2+</sup>取り込みの増加が関与することがわかった。また、Ca<sup>2+</sup>依存性心肥大シグナル分子、カルシニユリンおよび CaMKII の著明な活性化が認められ、その下流

正常マウス Tgマウス

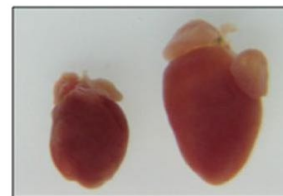
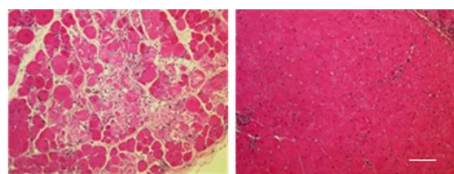


図2. NHEのトランスジェニック (Tg) マウスでは著明な心肥大・心不全が起こる。NHE阻害剤カリポライドは病態を著明に改善する。NHEが心不全治療の優れた標的になりうることを示している。

シグナルである NFATc の部分的な核内移行および HDAC4 の核外移行がカリポライド依存的に起こることが判明した。結論として、NHE1 の活性化は細胞内  $\text{Na}^+$  濃度上昇に伴って心肥大・心不全を起こす  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを惹起させるのに充分であることがわかった。NHE1 の活性化は i)  $\text{Na}^+$  上昇とそれに伴う  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの増大、ii)  $\text{pH}_i$  上昇による細胞増殖系シグナルの活性化を起こすと考えられていたが、特に生理的な環境下では  $\text{pH}_i$  上昇はほとんど起こらず、前者のメカニズムが重要であることが判明した点は意義深い。

(3) 筋ジスにおける  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 NHE の病態的役割を検討した。ジストロフィン欠損で筋ジスを発症するマウス (*mdx*) またはサルコグリカン欠損で筋ジスと心筋症を発症するハムスター (BI014.6) において、NHE の阻害剤が筋変性の病態を改善することを見出した(図 3) (Am. J. Pathology, 2007)。筋ジス動物から調製した筋細胞を用いて、NHE 阻害剤の筋変性保護メカニズムを検討した。筋細胞への全  $\text{Na}^+$  取り込みの大部分 (65%以上) が NHE の特異的阻害剤で抑制されたことにより筋細胞における  $\text{Na}^+$  流入に NHE の寄与が大きいこと、そして NHE を介する流入が筋ジス筋細胞で上昇していることが判明した。また筋ジス筋細胞では、コントロールに比べて  $[\text{Na}^+]_i$  上昇、 $\text{pH}_i$  の上昇、NHE 活性の  $\text{pH}_i$  依存性のアルカリ側へのシフトも観察されたことにより、NHE 活性が有意に上昇していることが判明した。筋ジス筋細胞では外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上げるとコントロールでは観察されない  $\text{Ca}^{2+}$  流入の上昇が認められるが、この上昇はカリポライドであらかじめ処理することにより抑制され、また同じ処理により伸展刺激による筋ジス筋細胞からの CK 漏出も抑制された。これらの結果から、筋変性に導く細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に NHE の恒常的な活性化が大きく寄与することがわかった。他方、筋ジスの骨格筋からは機械的なストレスによって ATP が過剰に流出し、さらにストレッチ刺激によって ATP 遊離が促進された。ATP 受



*mdx* マウス                      *mdx* マウス  
+cariporide投与

図3. 骨格筋切片のH&E染色像。NHEインヒビター、cariporideを経口投与した*mdx*マウスでは、筋変性、繊維化が著明に抑制されている。

容体 (P2) のアンタゴニスト、スラミンは NHE 活性を抑えると同時に筋ジスの病態を改善

した。これらの結果から、筋ジス骨格筋における過剰な機械刺激が ATP 遊離→P2 リセプター活性化→NHE 活性化→細胞内  $\text{Na}^+$  濃度上昇→NCX 活性変化→細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇というカスケードを駆動し、筋変性に導くと考えられる(図 4)。NHE 阻害剤の病態改善効果は、筋ジスの骨格筋で起こるイオン代謝異常の一断面を浮上させるとともに新しい治療戦略を考える重要なステップになると思われる。

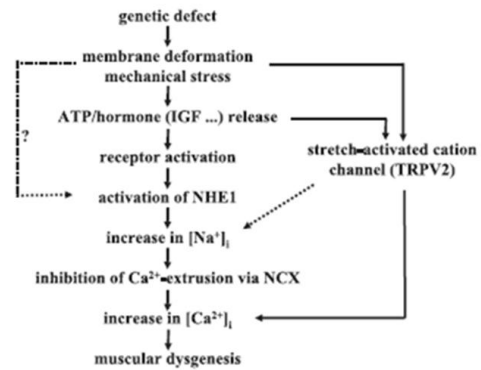


図4. 筋ジストロフィーにおける筋変性に至るシグナル伝達経路。TRPV2活性化による  $\text{Ca}^{2+}$  流入と NHE1-NCX 系による  $\text{Ca}^{2+}$  引き出しの阻害が細胞変性の引き金となる持続的細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇をもたらすと考えられる。

#### 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 7 件)

- ① Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Shigekawa, M., Wakabayashi, S.: Dominant-negative inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. **Hum. Mol. Gen.** 査読有, Vol.18/No.5, 2009, pp.824-834
- ② Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Wakabayashi, S.: Activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 1 is sufficient to generate  $\text{Ca}^{2+}$  signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. **Circ. Res.** 査読有, Vol.103/No.8, 2008, pp.891-899
- ③ Iwata, Y., Katanosaka, Y., Hisamitsu, T., Wakabayashi, S.: Enhanced  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange activity contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy via involvement of P2 receptors. **Am. J. Pathol.** 査読有, Vol.171/No.5, 2007, pp.1576-1587

[学会発表] (計 11 件)

- ① Wakabayshi, S., Nakamura-Nishitani, T.Y., Iwata, Y.: Molecular and functional aspects of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1: Relevance in cardiac hypertrophy and heart failure. 第36回国際生理学会 2009年7月30日 京都国際会議場
- ② Iwata, Y., Wakabayashi, S.: Amelioration of muscular dystrophy by dominant-negative inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx via TRPV2. 第36回国際生理学会 2009年7月30日 京都国際会議場
- ③ 中村(西谷)友重、岩田裕子、若林繁夫: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の活性化は心肥大・心不全を引き起こす: 細胞内イオン代謝と分子機構の解析 第85回日本生理学会大会 2008年3月26、京王プラザホテル東京

[図書] (計3件)

- ① 中村(西谷)友重、古林創史、久光 隆、岩田裕子、若林繁夫: 創薬研究者必見! - 最新トランスポーター研究2009 “遺伝子医学MOOK 12” 2009, pp.255-261
- ② 若林繁夫、岩田裕子、中村(西谷)友重、久光 隆、ベンアマー・モフ: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の構造・機能と病態的意義 循環器病研究の進歩 通巻47号, 2007, pp.73-82
- ③ 若林繁夫、久光 隆、モフ・ベンアマー、中村(西谷)友重、岩田裕子: 動物細胞 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体: 分子から疾患まで 生化学 79巻6号, 2007, pp.579-587

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

- ①  
名称: 抗 TRPV2 抗体  
発明者: 岩田裕子、若林繁夫  
権利者: (財)ヒューマンサイエンス振興財団  
種類: 特願  
番号: 特願 2010-1676  
出願年月日: 2010年1月28日  
国内外の別: 国内
- ②  
名称: TRPV2 の部分ペプチド  
発明者: 岩田裕子、若林繁夫  
権利者: (財)ヒューマンサイエンス振興財団  
種類: 特願  
番号: 特願 2009-186219  
出願年月日: 2009年8月11日  
国内外の別: 国内
- ③  
名称: 目的物質精製用タグおよび精製用タグを用いた目的物質の精製方法  
発明者: 若林繁夫  
権利者: (財)ヒューマンサイエンス振興財団  
種類: 特願  
番号: 特願 2007-130239

出願年月日: 2007年5月16日  
国内外の別: 国内

- ④  
名称: トランスジェニック非ヒト動物  
発明者: 岩田裕子、西谷友重、若林繁夫  
権利者: (財)ヒューマンサイエンス振興財団  
種類: 特願  
番号: 特願 2007-123514  
出願年月日: 2007年5月8日  
国内外の別: 国内

○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 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若林 繁夫 (WAKABAYASHI SHIGEO)  
国立循環器病センター研究所  
循環分子生理部・部長  
研究者番号: 70158583

### (2) 研究分担者

岩田 裕子 (IWATA YUKO)  
国立循環器病センター研究所  
循環分子生理部・室長  
研究者番号: 80171908  
西谷 友重 (NISHITANI TOMOE)  
国立循環器病センター研究所  
循環分子生理部・室長  
研究者番号: 50393244  
久光 隆 (HISAMITSU TAKASHI)  
国立循環器病センター研究所  
循環分子生理部・室員  
研究者番号: 50327946  
古林 創史 (KOBAYASHI SOUSHI)  
国立循環器病センター研究所  
循環分子生理部・流動研究員  
研究者番号: 50511531  
(H20~H21)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: