

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16008

研究課題名（和文）病態特異的タンパク質複合体の形成原理の解明と筋萎縮性疾患への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the formation principle of pathologically specific protein complexes and application to amyotrophic diseases

研究代表者

西山 和宏（Nishiyama, Kazuhiro）

九州大学・薬学研究院・講師

研究者番号：60810116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、筋萎縮性疾患におけるTRPC3-Nox2複合体の役割を明らかにした。mdxマウスに対するイブジラストの有効性の検証を行った。イブジラスト投与はmdxマウスのヒラメ筋の仮性肥大を減少させたが、野生型マウスの体重や筋重量に影響を与えなかった。イブジラストはmdxマウスの筋萎縮マーカーMuRF1発現量を低下させた。イブジラストはmdxマウスのHanging timeと筋損傷マーカー値を改善した。以上のことから、筋萎縮性疾患においてTRPC3-Nox2複合体が関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、mdxマウスにイブジラストを投与することでSMの重量が減少した。また、筋萎縮マーカーであるMuRF1の発現量が減少した。加えて筋損傷の指標であるCK値が低下することが明らかとなった。さらに、筋力の試験であるHanging wire testの成績がイブジラスト投与により改善したことから、イブジラストが筋損傷や筋力の低下を抑制していることが示唆された。本研究の結果からTRPC3チャンネルの関与が示唆されている疾患モデルに対する治療効果を検討することで、治療法の確立とともに病態メカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the role of the TRPC3-Nox2 complex in amyotrophic disease. We verified the effectiveness of ibudilast for mdx mice. Ibudilast administration reduced pseudohypertrophy of the soleus muscle in mdx mice, but did not affect body weight or muscle weight in wild-type mice. Ibudilast reduced the expression of MuRF1, a marker for muscle atrophy in mdx mice. Ibudilast improved Hanging time and muscle damage marker levels in mdx mice. These results indicate that the TRPC3-Nox2 complex may be involved in amyotrophic disease.

研究分野：薬理学

キーワード：TRPC3 NOX2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉の標的となりうるタンパク質の中には、正常時の機能と病態時の機能が異なるものが存在する。その機能変容のメカニズムとして注目されているのがタンパク質 - タンパク質間相互作用 (PPI) である。申請者は、受容体作動性 / 脂質作動性カチオンチャンネル transient receptor potential canonical (TRPC) 3 の心臓リモデリングにおける役割に着目し、TRPC3 と活性酸素生成酵素 (NADPH oxidase (Nox)2) との複合体形成を介した過剰な活性酸素の産生がマウス・ラットの心筋細胞萎縮や間質の線維化を形成する引き金となることを見出してきた。また、独自にスクリーニング系を構築し、TRPC3-Nox2 複合体形成を強く阻害する既承認薬 (イブジラスト) を同定した。興味深いことに、TRPC3-Nox2 複合体形成による筋萎縮は心臓だけにとどまらず、同じ赤筋である骨格筋 typeI 線維の萎縮にも関与する可能性が新たに示されてきた。そこで本研究では、哺乳動物個体の赤筋萎縮 (衰弱) に着目し、その根底にある病態特異的 PPI (TRPC3-Nox2 複合体) の形成機構を解明する。これにより、病態特異的 PPI 阻害を主眼とする筋萎縮性疾患の新たな治療ストラテジーの構築を目指す。

2. 研究の目的

Transient receptor potential (TRPC) タンパク質は、神経液性因子受容体刺激やジアシルグリセロール産生によって開口活性化し、細胞外の物理的・化学的情報を細胞内に伝達する Ca^{2+} 透過型チャンネルタンパク質として知られているが、他のシグナルタンパク質と複合体を形成し、酸化・リン酸化へのシグナル変換・増幅を制御する足場的役割も担っている。

当研究グループは、心不全の原因となる筋萎縮や線維化の形成過程において、TRPC3 と活性酸素 (ROS) 産生酵素 NADPH oxidase (Nox2) との複合体形成を伴う過剰な ROS の産生が関与することを明らかにした。さらに、細胞外の ATP を介した P2Y2 受容体 (P2Y2R) の活性化が複合体形成に寄与することを示した。加えて、TRPC3-Nox2 複合体を評価する独自のスクリーニング系を構築し、既承認薬を用いたスクリーニングにより、PDE4 阻害剤であるイブジラストが TRPC3-Nox2 複合体形成を阻害することを見出し、イブジラストが抗がん剤による筋萎縮を抑制することを明らかにした。

一方で、筋ジストロフィーは、筋線維の破壊・変性 (筋壊死) と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性の筋疾患である。疾患の原因となるタンパク質が多数発見されているが、筋萎縮の形成過程における病態特異的タンパク質間相互作用は明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない。筋ジストロフィーでは、細胞からの ATP 放出が亢進しており、細胞外の ATP 濃度が上昇していることや Nox2 活性が異常亢進していることが知られており、TRPC3-Nox2 複合体形成が病態発症の起点となっている可能性が高い。そこで本研究ではイブジラストの筋ジストロフィーに対する有効性を検証し、TRPC3-Nox2 複合体の筋ジストロフィーにおける役割を明らかにした。

3. 研究の方法

1, 野生型 C57BL/10 およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル (X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx)) マウス (4 週齢) にイブジラスト (10 mg/kg/day) を含んだ浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込むことで持続投与した。4 週間後のマウス臓器重量、筋力 (Hanging Wire test) 血中パラメーターを測定した後、遺伝子発現量の評価、近接ライゲーションアッセイ (PLA) による TRPC3-Nox2 複合体形成率の評価を行った。

2, 難治性疾患である非アルコール性肝炎 (NASH) について TRPC3 および TRPC6 チャンネルの関与を遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

4. 研究成果

1-1. イブジラストは mdx マウスの筋力と CK 値を改善する

筋力を測定する Hanging Wire test を実施した。投与 2 週間目の測定ではすべての群で有意な差が認められなかったが、4 週間目での測定で、イブジラストを投与した mdx マウスで vehicle を投与した mdx マウス、投与 2 週間目のイブジラストを投与した mdx マウスと比較して有意に Hanging time の延長がみられた (図 1-A)。また、mdx マウスでは筋損傷の指標である血中のクレアチンキナーゼ (Creatine Kinase: CK) 値が顕著に増加した一方、イブジラスト投与群では vehicle 群に比べ CK 値が有意に低下した (図 1-B)。

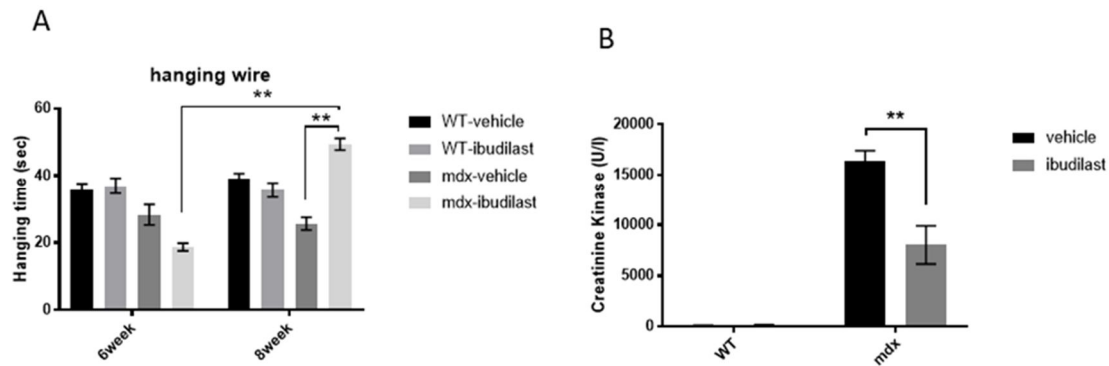


図 1. イブジラスト投与後の mdx マウスにおける筋力と筋損傷の評価
 (A)6 週齢 (投与 2 週目) 8 週齢 (投与 4 週目) の時点で Hanging wire test を行った。(B)筋損傷マーカーであるクレアチンキナーゼ(CK)値を測定した。誤差範囲は標準誤差で示した。検定は Two-way ANOVA による Tukey 検定を用いた。 $P^{**}<0.01$, $n=5$

1-2.イブジラストは mdx マウスの筋萎縮マーカー MuRF1 発現量を低下させるが、C57BL/10 マウスの炎症・筋萎縮マーカーの遺伝子発現に影響を与えない

mdx マウスの vehicle 群とイブジラスト群の遺伝子発現を比較した。炎症マーカーである、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 の発現量は両群間で有意な差は認められなかった。筋萎縮マーカーとして知られる MuRF1 (muscle RING finger protein 1) の発現量はイブジラスト群で有意に減少していた。一方、同じく筋萎縮マーカーとして知られる Atrogin-1 は両群間で有意な差は認められなかった。線維化の指標である α -SMA と COL1A1 も、両群間で有意な差は認められなかった。

C57BL/10 マウスの vehicle 群とイブジラスト群の遺伝子発現を比較した。炎症マーカー、筋萎縮マーカーは両群間で有意な差は認められなかった。 α -SMA は両群間で有意な差は認められなかったが、COL1A1 の発現はイブジラスト群で減少した。

1-3.イブジラストは mdx マウスのヒラメ筋における TRPC3-Nox2 複合体形成を阻害する

近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay; PLA) により、TRPC3 と Nox2 が複合体を形成しているか検討した。その結果、野生型コントロール群に比べ、mdx の vehicle 群では特に筋細胞の萎縮・浸潤が顕著にみられる領域において PLA ドット (顆粒状の陽性シグナル) の数が増加した。さらに、イブジラストを投与した mdx マウス群では、vehicle 群で増加傾向にあったシグナルの数が減少した (図 2)。

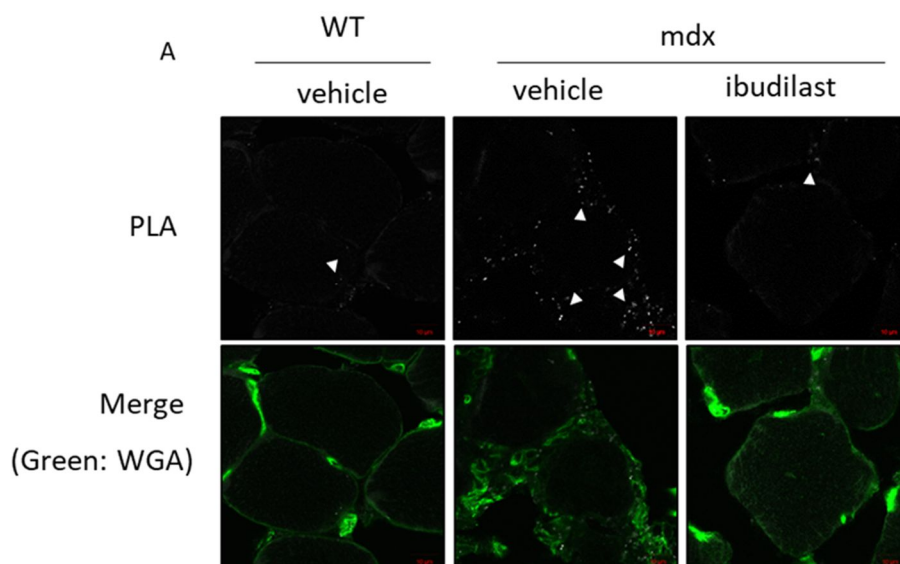


図 2. TRPC3-NOX2 複合体形成阻害の評価
 TRPC3 と NOX2 に対して近接ライゲーションアッセイ(PLA)を行った。検出されたドットを矢頭で示す。WT-Vehicle 群、mdx-vehicle 群、mdx-ibudilast 群で比較した。

2, 血中パラメーターや肝臓組織の脂肪化、線維化を評価したが、WT および TRPC3 KO、TRPC6 KO の間に、明確な差は認められなかった。したがって、TRPC3 および TRPC6 は NASH の病態形成に関してはあまり関与しないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimoda Kakeru, Nishimura Akiyuki, Sunggip Caroline, Ito Tomoya, Nishiyama Kazuhiro, Kato Yuri, Tanaka Tomohiro, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Tsuda Makoto, Nishida Motohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Modulation of P2Y6R expression exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10(1),13926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70956-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Motohiro, Tanaka Tomohiro, Mangmool Supachoke, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Canonical Transient Receptor Potential Channels and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid and Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 124 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12997/jla.2020.9.1.124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama Kazuhiro, Tanaka Tomohiro, Nishimura Akiyuki, Nishida Motohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 TRPC3-Based Protein Signaling Complex as a Therapeutic Target of Myocardial Atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1874467213666200407090121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama Kazuhiro, Toyama Chiemi, Kato Yuri, Tanaka Tomohiro, Nishimura Akiyuki, Nagata Ryu, Mori Yasuo, Nishida Motohiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Deletion of TRPC3 or TRPC6 Fails to Attenuate the Formation of Inflammation and Fibrosis in Non-alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 431 ~ 436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部 愛杜、西山 和宏、田中 智弘、西村 明幸、加藤 百合、西田 基宏
2. 発表標題 ミトコンドリア品質管理を標的とした炎症性腸疾患治療
3. 学会等名 臨床薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村明幸、西田基宏、西山和宏、加藤百合、田中智弘
2. 発表標題 活性イオウによる心筋の頑健性制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------