

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09137

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療標的としてのTRPC6, MRTF-Aの意義

研究課題名(英文) Blockade of TRPC6/3 is a Novel Therapeutic Approach Against Pulmonary Arterial Hypertension

研究代表者

木下 秀之 (Kinoshita, Hideyuki)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：30467477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心不全発症や進展に関係するアンジオテンシンIIやエンドセリン-1などの受容体刺激で活性化される、受容体活性化型CaチャンネルであるTRPC6/3に関し、TRPC6/3阻害による肺動脈性肺高血圧症発症・進展抑制効果について検討した。肺高血圧症モデルマウス・ラットにおいて、TRPC6/3阻害効果を有する薬剤を投与し、肺動脈圧の上昇と右室肥大の抑制を認めた。またTRPC3および6の各種ノックアウトマウスにおいても、肺高血圧刺激に対し肺動脈圧の上昇や右室肥大の抑制を認めた。以上結果よりTRPC6/3を標的とした治療が肺高血圧症抑制に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of transient receptor potential subfamily C (TRPC) 6/3 in pulmonary arterial hypertension. In mice and rat model of pulmonary hypertension, blockade of TRPC6/3 significantly inhibited elevation of pulmonary arterial pressure and right ventricular hypertrophy. These results suggest that Blockade of TRPC6/3 could be a novel therapeutic strategy for preventing pulmonary arterial hypertension.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 心不全

### 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(以下 PAH)は、依然予後不良の疾患症候群であり、病態解明に基づく新規治療標的の同定が望まれる。PAH の発症・進展においては、肺動脈平滑筋の異常収縮・増殖により病的な肺動脈リモデリングが進行することが知られ、エンドセリン-1 などの体液性因子の活性化とそれに引き続く肺動脈平滑筋細胞における病的シグナルの活性化が重要な役割を担う。血管平滑筋細胞における病的  $Ca^{2+}$ 流入の増加が肺動脈平滑筋細胞の増殖・遊走を亢進させ、肺血管リモデリングに関与していると考えられているが、その詳細な機序は依然不明な点が多い。

近年、液性因子や機械的刺激により引き起こされる細胞内  $Ca^{2+}$ 流入を担うイオンチャンネルの分子実体が TRPC family イオンチャンネルである事が明らかとなり、PAH 患者の肺動脈平滑筋細胞において TRPC6 の発現が亢進し、さらに特発性 PAH において TRPC6 遺伝子発現亢進につながる TRPC6 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型が、PAH 発症頻度と相関する事も報告され、PAH の発症・進行における TRPC6 の役割に注目が集まっている。

### 2. 研究の目的

**当申請研究では、薬理学的あるいは遺伝学的な TRPC6/3 阻害による肺動脈性肺高血圧症発症・進展の抑制や、右心不全・右室肥大抑制に対する効果を生理学的、生化学的、分子生物学的側面から多面的に解析し、PAH 発症・進展における TRPC6/3 の役割とその分子機序を明らかにすると同時に、治療標的としての意義の検討を行うことを目標とした。**

### 3. 研究の方法

本研究では、TRPC6/3- $Ca^{2+}$ 経路の肺動脈リモデリング、肺高血圧症の発症・進展における役割とその分子機序、さらには治療標的としての意義を明らかにする目的で、以下の実験を行った。

・TRPC6 および3 ノックアウトマウスにおけるモノクローリンピロール誘発性肺高血圧モデルの作成と解析

・TRPC 阻害薬のモノクローリンピロール誘発性 PAH モデルマウスおよびモノクローリン誘発性 PAH モデルラットにおける効果の解析

・培養肺動脈平滑筋細胞を用いた TRPC3/6 の肺動脈リモデリングにおける意義とその分子機序の解明

### 4. 研究成果

モノクローリンピロール誘発性肺高血圧モデルマウスや、モノクローリン(MCT)誘発肺高血圧モデルラットに対し、TRPC3/6/7 阻害薬である Pyrazole 4 (Pyr4) 及び TRPC3 の選択的阻害薬である Pyrazole 3 (Pyr3) の肺高血圧症に対する効果を検討した。上記肺高血圧モデル動物でみられた右室/左室+心室

中隔重量比の増大、肺動脈圧の上昇、肺動脈での中膜肥厚を Pyr4 及び Pyr3 は有意に抑制した。さらに下流シグナルの探索にて、calcineurin-NFAT 経路の下流である RCAN1 の mRNA 発現を検討したところ、MCT 誘発肺高血圧モデルラットで上昇している RCAN1 の発現が、Pyr4、Pyr3 投与により抑制された。

次に Pyr4、Pyr3 の効果を遺伝子的に再現するため、TRPC3 ノックアウトマウス(TRPC3 KO)、TRPC6 ノックアウトマウス(TRPC6 KO)、TRPC3/TRPC6 ダブルノックアウトマウス(TRPC3/C6 dKO)を用いて肺高血圧モデルを作成した。野生型マウス(WT)において MCTp を投与すると、肺動脈圧の上昇、右室肥大、肺動脈での中膜肥厚を認めたが、MCTp を投与した TRPC3 KO、TRPC6 KO、TRPC3/C6 dKO 群では上記反応が軽減していた。

以上結果より、TRPC3/6 阻害が肺動脈性肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

### 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. Rare variants in RNF213, a susceptibility gene for moyamoya disease, are found in patients with pulmonary hypertension and aggravate hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. Kobayashi H, Kabata R, Kinoshita H, Morimoto T, Ono K, Takeda M, Choi J, Okuda H, Liu W, Harada KH, Kimura T, Youssefian S, Koizumi A. *Pulm Circ.* 2018 Jul-Sep;8(3):2045894018778155.

2. Mir30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, Tsutamoto T, Kinoshita H, Nakao K, Cho K, Inazumi H, Okamoto H, Nishida M, Kato T, Fukushima H, Yamashita JK, Wijnen WJ, Creemers EE, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T.

*J Am Heart Assoc.* 2017 Feb 10;6(2).  
3. Endothelium-Derived C-Type Natriuretic Peptide Contributes to Blood Pressure Regulation by Maintaining Endothelial Integrity. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Minami T, Kuwabara Y, Yamada C, Yamada Y, Tokudome T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Nakao YM, Yasuno S, Ueshima K, Sone M, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. *Hypertension.* 2017 Feb;69(2):286-296.

4. Outcomes of various transplant procedures (single, sparing, inverted) in

living-donor lobar lung transplantation. Date H, Aoyama A, Hijiya K, Motoyama H, Handa T, Kinoshita H, Baba S, Mizota T, Minakata K, Chen-Yoshikawa TF.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2017 Feb;153(2):479-486.

5. The renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and lethal arrhythmias in mice with non-ischaemic cardiomyopathy. Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kinoshita H, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Honjo H, Kamiya K, Nakao K, Kimura T. Cardiovasc Res. 2016 Jan 1;109(1):162-73.

6. Pro-B-type natriuretic peptide is cleaved intracellularly: impact of distance between O-glycosylation and cleavage sites. Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N, Ikeda M, Tabei K, Fujishima A, Takayama K, Akimoto K, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kinoshita H, Tsutamoto T, Ishimitsu T, Kangawa K, Kuwahara K, Nakao K. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015 Sep 15;309(6):R639-49.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 第65回日本心臓病学会学術集会 平成29年10月30日 大阪 木下秀之、柳澤洋、吉藤元、北野一樹、田中宗和、今田一彰、吉田雅晴、辰島正二郎、森内健史、稲住英明、斎藤成達、中川靖章、尾野亘、木村剛。当院における左心疾患を合併した強皮症関連肺動脈性肺高血圧症の臨床的特徴

2. 第21回日本心不全学会学術集会 平成29年10月14日 秋田

田中宗和、木下秀之、柳澤洋、森内健史、斎藤成達、中川靖章、桑原宏一郎、尾野亘、木村剛。Acute Effects of Inhaled Iloprost in Pulmonary Arterial Hypertension Patients with Lung Disease

3. 第21回日本心不全学会学術集会 平成29年10月14日 秋田

柳澤洋、木下秀之、桑原宏一郎、吉藤元、森内健史、稲住英明、斎藤成達、中川靖章、尾野亘、木村剛。Clinical features of the Systemic Sclerosis associated Pulmonary Arterial Hypertension with Left Heart Disease

4. 第61回 日本リウマチ学会総会・学術集会 ランチョンセミナー 平成29年4月21日 福岡 木下秀之 肺高血圧症治療が変わる～セレキシパグの可能性を踏まえて～

5. 第57回日本呼吸器学会学術講演会 ランチョンセミナー 平成29年4月22日 東京 木下秀之 呼吸器疾患を合併した肺動脈性肺高血圧症～循環管理の3つのポイント～

4. 第81回 日本循環器学会学術集会 平成

29年3月18日 金沢 H. Kinoshita, T. Fujita, T. Handa, H. Yanagisawa, K. moriuchi, H. Inazumi, N. Saito, Y. Nakagawa, Kuwahara, K. Ono, T. Kimura. Prediction of Poor Outcome after PAH Targeted Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension Patients with Lung Disease

5. **AHA BCVS2016 Jul 18-21.2016 Phoenix, Arizona, USA**

Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Chinatsu Yamada, Hideaki Inazumi, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura

Unprocessed proBNP secretion is regulated by MiR30-GALNTs axis dependent O-glycosylation in the pathological myocardium..

6. **AHA Scientific Session 2016 2016.11.13-16 New Orleans, Louisiana, USA**

Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Hideaki Inazumi, Kenji Moriuchi, Takao Kato, Naoto Minamino, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura Secretion of proBNP is regulated by MiR30-GALNTs axis dependent O-linked glycosylation in the pathological myocardium.

7. Complex Cardiovascular Therapeutics (CCT) 2016 2016年10月21日 神戸 木下秀之 Guideline of the treatment of CTEPH

8. Complex Cardiovascular Therapeutics (CCT) 2016 2016年10月21日 神戸 木下秀之 CTEPH に対する経皮的肺動脈拡張術 (BPA) と薬物治療の治療効果の比較検討

9. 第20回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 第33回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016) 第20回日本適応医学学会学術集会 3学会合同 イブニングセミナー3 2016年12月16日(金) 東京

木下秀之 肺高血圧症治療の新たな展望～PGI2を考える～

10. **第80回 日本循環器学会学術集会 2016.3.18-20 仙台** Shintaro Yamagami,

Hideyuki Kinoshita, Hideki Motoyama, Kyoko Hijiya, Akihiro Aoyama, Yoyofimi Chin, Akira Tshujimura, Hiromu Yanagisawa, Chinatsu Yamada, Takeru Makiyama, Yasuaki Nakagawa, Satoshi Shizuta, Koichiro Kuwahara, Koh Ono, Hiroshi Date, Takeshi Kimura Survival prospects of Patients with Pulmonary Artery Hypertension Referred for Lung Transplantation

11. **第80回 日本循環器学会学術集会 2016.3.18-20 仙台** Hideyuki Kinoshita,

Koichiro Kuwahara, Hiromu Yanagisawa, Hajime Yoshifuji, Chinatsu Yamada,

Yoshihiro Kuwabara, Yasuaki Nakagawa, Takeru Makiyama, Satoshi Shizuta, Koh Ono, Takesyi Kimura Pulmonary Edema in Patients with Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension receiving Pulmonary Vasodilator Therapies.

12. 第4回日本肺循環学会(JPCS)第3回日本肺高血圧学会(JPHS)合同学術集会 2015年10月3日(土)~4日(日) 東京 米田智也、木下秀之、中島康弘、本山秀樹、土屋恭子、青山晃博、陳豊史、桑原宏一郎、木村剛、伊達洋至、一山智 重症PAHにおける肺移植術後急性期の右室および左室機能の検討

13. 第4回日本肺循環学会(JPCS)第3回日本肺高血圧学会(JPHS)合同学術集会 2015年10月3日(土)~4日(日) 東京 藤田啓誠、木下秀之、半田知宏、谷澤公伸、室繁郎、佐藤晋、山田千夏、中川靖章、静田聡、桑原宏一郎、木村剛 当院におけるILD-PHに対する肺血管拡張療法の効果の検討

ステーションコンファレンス東京、東京  
14. 第80回日本循環器学会学術集会 2016.3.18-20 仙台 C. Yamada, K. Kuwahara, H. Kinoshita, Y. Nakagawa, T. Nihikimi, T. Kimura, K. Nakao Renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic remodeling in mice with heart failure and sudden arrhythmic death

15. 第79回日本循環器学会学術集会 ランチョンセミナー 2015年4月24日-26日 大阪 木下秀之 肺高血圧症の最新治療戦略 -病態に応じた治療法の選択-

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下秀之 (Kinoshita Hideyuki)  
京都大学大学院医学研究科 地域医療システム学講座  
研究者番号: 30467477

### (2) 研究分担者

桑原宏一郎 (Kuwahara Koichiro)  
信州大学医学部 循環器内科学講座 教授  
研究者番号: 30402887

### (3) 連携研究者

森泰生 (Mori Yasuo)  
京都大学大学院工学研究科 教授  
研究者番号: 80212265  
西田基宏 (Nishida Motohiro)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構 教授  
心臓シグナル研究部門  
研究者番号: 90342641

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

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: