

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18883

研究課題名(和文) プリン作動性受容体P2Y6の機能多様性と心臓リモデリングにおける役割

研究課題名(英文) Functional diversity and cardiac roles of purinergic P2Y6 receptor

研究代表者

西村 明幸 (Nishimura, Akiyuki)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：00457152

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)：心血管系の組織は様々な負荷に対して、自身の機能を一定に保つために構造や形態を変化させる(リモデリング)。しかしながら負荷が慢性化し、組織構造の変化が過度に起こると組織の機能は破綻し様々な病態を引き起こす。今回、我々は心臓や血管の病的なリモデリングにおけるプリン作動性受容体P2Y6Rの役割について検討を行った。特に血管において、P2Y6Rは血圧調節に関与する生理活性ペプチドであるアンジオテンシンIIの受容体AT1Rと複合体を形成し、加齢に伴うP2Y6R-AT1R複合体の増加が高血圧を誘導することを見出した。本研究成果は、加齢高血圧による心血管リスクの予防・治療法開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular remodeling which refers to the changes in size, structure and function of tissues, is important for homeostasis. However, excess remodeling leads irreversible dysfunction of tissues, resulting cardiovascular diseases. Here, we investigated the role of purinergic P2Y6 receptor (P2Y6R) on cardiovascular remodeling. In vascular system, angiotensin II (Ang II) functions as a physiological regulator of blood pressure, but it also play a major role in the pathological hypertension. P2Y6R forms heterodimer with Ang II type 1 receptor (AT1R). Developmentally increased P2Y6R-AT1R heterodimer promoted Ang II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells and hypertension. These results suggest that increased formation of P2Y6R-AT1R heterodimer with age may increase the likelihood of hypertension.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 シグナル伝達 心血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

心血管系の組織は虚血や高血圧といった様々な外的負荷に対して、自身の機能を一定に保つために構造や形態を変化させる。この負荷に対して組織構築に形態的・構造的変化が生じることをリモデリングと呼ぶ。リモデリングは負荷に適応するための応答(代償応答)として働く一方で、負荷が慢性化すると線維化や老化といった不可逆的なリモデリング応答(非代償応答)によって組織機能が破綻し、心不全といった病態を引き起こす。代償応答から非代償応答へと切り替わっていく過程において、負荷に対する組織応答性の変化がどういったメカニズムを介して起こっているのかは詳しくわかっていない。

プリン作動性 G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞外に放出された ATP や ADP といったヌクレオチドをリガンドとする細胞膜受容体であり、痛みや神経伝達における重要性が古くからよく知られていた。我々はこれまでに圧負荷により病的な心肥大が進行するとプリン作動性 GPCR の 1 種である P2Y₆R の発現が上昇してくるを見出した。本研究では、「心血管リモデリングにおける P2Y₆R の機能解析を通して、代償応答から非代償応答へと至るメカニズムの解明」を目指し研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 加齢に伴うアンジオテンシン II (Ang II) 応答性の変化における P2Y₆R の役割。血管は非常に弾力性のある組織であり、収縮と弛緩を繰り返すことで血液の流れを調節している。しかしながら加齢によって血管が固く構造変化(リモデリング)すると高血圧となる。昇圧作用を示す生理活性ペプチドである Ang II は血管を収縮させることで血液循環の恒常性に重要な役割を担っている一方、その慢性的な活性化は血管リモデリングを引き起こすことで高血圧を誘導する。Ang II は血管中膜を構成する血管平滑筋細胞を肥大化させることで血管リモデリングを引き起こすが、胎児由来の血管平滑筋細胞において Ang II は肥大応答ではなく増殖応答を引き起こす。血管平滑筋細胞の加齢に伴う Ang II 応答性の変化がどのようなメカニズムで起こっているのかを明らかにすることは高血圧リスクの軽減につながると思われる。そこで我々は P2Y₆R が加齢に伴う Ang II 応答性の変化に関与しているかについて検証を行った。

(2) P2Y₆R のリガンド非依存的活性化機構とその生理的意義。P2Y₆R は細胞外の UDP により活性化され、様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。一方、我々はこれまでに P2Y₆R を過剰発現させた心筋細胞を伸展刺激すると P2Y₆R が活性化されることを見出している。即ち、P2Y₆R は従来のヌクレ

オチド受容体としての機能に加えメカノセンサー分子として機能すると予想された。そこで、P2Y₆R のリガンド応答性と物理刺激応答性がどのようなメカニズムで制御されているのかを細胞外基質環境の違いから検証すると共に、心臓リモデリング時における代償応答と非代償応答に対する各応答性の役割についても検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと P2Y₆R 欠損マウスの Ang II 応答性の比較解析。8 週齢のオス野生型マウスと P2Y₆R 欠損マウスに浸透圧ポンプを用いて 4 週間 Ang II の慢性投与を行った。血圧、心拍数はテールカフ法を用いて週に一度測定した。4 週間後、マウスを解剖し、下行大動脈を単離した。パラフィン切片を作成し、血管の形態学的(血管中膜肥厚、線維化)解析を行うことで血管リモデリングを評価した。

(2) P2Y₆R による Ang II シグナル制御の分子メカニズム解析。P2Y₆R と Ang II 受容体(AT1R)の複合体形成は免疫沈降実験に加え、Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)法を用いて評価した。そこで AT1R にドナー分子(Rluc)、P2Y₆R にアクセプター分子(YFP)を融合したコンストラクトを作成し測定に使用した。AT1R のインターナリゼーションは免疫染色と BRET 法から評価した。

(3) 加齢依存的 P2Y₆R-AT1R 複合体形成の生理学的意義。ラット胎児(E17.3)、新生児(P1)、成体(P30)から血管平滑筋細胞を単離、培養した。レトロウイルスを用いた過剰発現系、siRNA を用いた発現抑制系から P2Y₆R の発現変動が AT1R 下流シグナル及び細胞応答に及ぼす効果を検討した。細胞応答としては増殖応答を ³H-Thymidine 取り込み、肥大応答を ³H-Leucine 取り込み系を用いてそれぞれ評価した。

(4) P2Y₆R のリガンド非依存的活性化機構の解析。シリコンチャンバー上に細胞を播種、培養した後に、一過性の 20% 伸展刺激を加えた時のカルシウム変動を Fura-2 を用いてイメージングした。シリコンチャンバーにコートする細胞外マトリックスの種類を変化させることで、リガンド刺激、機械伸展刺激による P2Y₆R の活性化に対する各種細胞外マトリックスの影響を検討した。

(5) 心臓の病的リモデリングに対する P2Y₆R のリガンド非依存的活性化機構の役割。機械伸展刺激による活性化のみを抑制する P2Y₆R RGD 変異体を P2Y₆R 欠損マウスにレスキューすることでリガンド非依存的活性化機構の役割について検討を行った。心筋細

胞に特異的に発現するように cTnT プロモーターで P2Y₆R 遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を作製した。この AAV を P2Y₆R 欠損マウス由来の胎児 (生後 5 日) 腹腔内に注入した。8 週まで飼育した後に浸透圧ポンプを用いてイソプロテレノールを 4 週間慢性投与することで心肥大を誘導した。1 週間おきに心エコー検査を行うと共に、4 週後に心カテテル検査を行うことで心機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 加齢に伴う Ang II 応答性の変化における P2Y₆R の役割。まず、野生型、P2Y₆R 欠損マウスの Ang II 応答性を比較するために、それぞれのマウスに Ang II を慢性投与した時の血圧変化を 4 週間観察した。その結果、P2Y₆R では Ang II 投与による血圧上昇が有意に抑制されていた。次に、Ang II 投与 4 週間後のマウスから下行大動脈を単離し形態観察を行った。P2Y₆R 欠損マウスでは野生型マウスに比べ Ang II 投与による血管中膜の肥厚が抑制されていた (図 1)。一方、血管中膜内の核の数には変化が見られなかったことから、P2Y₆R 欠損マウスでは血管中膜を構成する血管平滑筋細胞の肥大応答が抑制されていると考えられた。また、Ang II 投与による血管中膜の線維化応答も P2Y₆R 欠損マウスでは抑制されていた。

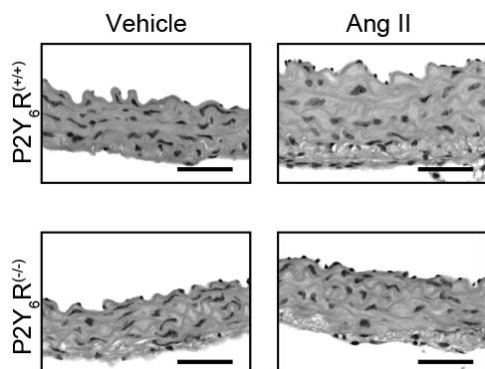


図 1. 野生型、P2Y₆R 欠損マウスの Ang II 投与後の血管中膜肥厚

P2Y₆R が Ang II による血管平滑筋細胞の肥大応答を抑制するのかを *in vitro* の実験系により検証した。野生型、P2Y₆R 欠損マウスから単離した血管平滑筋細胞の肥大応答を比較したところ、欠損マウス由来の細胞では Ang II による肥大応答は抑制されていた。また、Ang II による細胞内カルシウム応答も抑制されていることから、P2Y₆R が欠損することで AT1R-G_q-カルシウムシグナル伝達経路が抑制されることが示された。

次に、P2Y₆R が AT1R-G_q-カルシウムシグナル伝達経路をどのようにして制御しているのかについて検討を行った。GPCRs はヘテロ二量体を形成することで受容体機能を

制御することが知られていることから、P2Y₆R が AT1R とヘテロ二量体を形成するかを検証した。免疫沈降実験と BRET 実験から P2Y₆R は細胞膜上で AT1R とヘテロ二量体を形成していることが明らかとなった。Ang II や UDP といったリガンドがヘテロ二量体化に与える効果を検証したが、リガンドで受容体を活性化しても二量体形成能には影響が見られなかった。一方、P2Y₆R のアンタゴニストとして報告されている MRS2578 はヘテロ二量体形成を阻害した。そこで、野生型マウスに Ang II と共に MRS2578 を慢性投与したところ、Ang II による血圧上昇、血管中膜肥厚が有意に抑制されたことから、Ang II 誘発性高血圧における P2Y₆R-AT1R 複合体形成の重要性がマウス個体レベルで明らかになった。

次に、P2Y₆R-AT1R 複合体が AT1R の機能に与える影響について検討した。通常、リガンドにより活性化された GPCRs は βアレスチンと結合して細胞質ヘインターナリゼーション (脱感作) されると共に、βアレスチンを介したシグナルが活性化される。P2Y₆R と複合体を形成した AT1R は βアレスチンと結合できず受容体のインターナリゼーション及び βアレスチン依存性シグナルが抑制された。P2Y₆R-AT1R 複合体では受容体の脱感作が阻害されることで G_q-カルシウムシグナル経路が増幅されたと考えられる。一方、AT1R 単量体では受容体の脱感作作用により G_q-カルシウム経路が減弱する代わりに βアレスチンを介したシグナル経路が増強された。即ち、P2Y₆R と複合体を形成することで AT1R の下流シグナルが βアレスチン経路から G タンパク質経路に切り替わることが明らかとなった。

次に、血管平滑筋細胞における AT1R 下流の G タンパク質シグナル、βアレスチンシグナルの役割について検討を行った。マウス成体由来の血管平滑筋細胞では Ang II は肥大応答を引き起こすのに対して、胎児由来の細胞では増殖応答を引き起こす。それぞれの応答がどのようなシグナル経路を介しているか検討したところ、肥大応答には G_q-カルシウム経路が、増殖応答には βアレスチン経路が関与していることが明らかとなった。

最後に、発生時期の異なる血管平滑筋細胞において Ang II 下流シグナルが変化するメカニズムに P2Y₆R が関与しているのかについて検討を行った。胎児由来と成体由来の血管平滑筋細胞で AT1R の発現量には変化が見られないのに対して、P2Y₆R の発現量は発生に伴い増加した。P2Y₆R を発現抑制した成体由来の血管平滑筋細胞では、Ang II 刺激による肥大応答が抑制され、増殖応答性を獲得した。一方、胎児由来の血管平滑筋細胞に P2Y₆R を過剰発現すると増殖応答が抑制され、肥大応答性を獲得した。即ち、発生に伴う P2Y₆R-AT1R 複合体の増加が、増殖応答から肥大応答への Ang II の細胞応答性の変

化を決定していることが示された(図2)。また、P2Y₆Rの発現量は1年齢の老齢マウスでさらに増加しており、加齢に伴うP2Y₆R-AT1R複合体の増加が加齢高血圧症に関与することが考えられ、P2Y₆R-AT1R複合体が高血圧症の新たな標的となる可能性が示された。

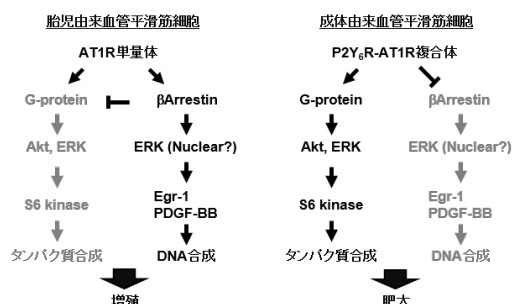


図2. P2Y₆R-AT1R複合体によるAng II下流シグナル伝達経路の変化

(2) P2Y₆Rのヌクレオチドリガンド非依存的活性化機構。P2Y₆Rを過剰発現させたラット心臓横紋筋細胞株 H9c2 細胞をストレッチチャンパー上に播種し、20%の伸展刺激を加えると細胞内カルシウムの変動が見られる。また、この活性化現象は P2Y₆R の細胞外領域に存在する RGD モチーフに依存している。それ故に、RGD モチーフを介した細胞外領域との相互作用が P2Y₆R の物理刺激応答性に関与していると予想された。そこで、伸展刺激による P2Y₆R の活性化に対する各種細胞外マトリックスの効果を検討した。コラーゲンコートをしたチャンパーでは非常に高頻度で P2Y₆R の物理刺激応答性が確認できたのに対して、非コートのチャンパー下では P2Y₆R の物理刺激応答性が消滅した。一方、P2Y₆R の UDP 応答性は非コートチャンパーでは確認できるのに対して、コラーゲンコート下では確認できなかった。非常に興味深いことに、RGD モチーフに変異を加えた P2Y₆R ではコラーゲンコート下でも UDP 応答性が維持されていることから、RGD モチーフを介した細胞外領域との相互作用が P2Y₆R のヌクレオチドリガンド応答能、物理刺激応答能を制御していることが示唆された。

(3) 心臓の病的リモデリングに対する P2Y₆R の関与。我々はこれまでに P2Y₆R 欠損マウスに大動脈狭窄による圧負荷刺激を加えると生存率が著しく減少すること、また生存したマウスの心機能は大きく低下していることを見出してきた。即ち、P2Y₆R は心臓の圧負荷への適応に重要であると考えられた。P2Y₆R の物理刺激応答性が心臓リモデリングに与える影響を検討するために、P2Y₆R 欠損マウスに P2Y₆R 野生型、物理刺激応答能が欠失した RGD 変異体をそれぞれレスキュー

した。当初、これらのマウスに大動脈狭窄による圧負荷刺激を行うことを予定していたが、予備実験から圧負荷後のマウスの生存率が低く(30%以下)、生存マウスで心機能を評価するためには非常に大量のマウスを準備する必要が考えられたため、別の方法にて心臓リモデリングを誘導することを検討した。そこで、β作動薬であるイソプロテレンール慢性投与による心肥大に対する P2Y₆R 欠損マウスの影響を調べたところ、生存率の低下は見られずに心機能だけが有意に低下した。そこで各種 P2Y₆R レスキューマウスにイソプロテレンールを投与し心機能変化を測定した。P2Y₆R 野生型のレスキューで心機能が改善したことから、β作動薬による心臓リモデリングに P2Y₆R が関与することが示された。一方、P2Y₆R RGD 変異体のレスキューによっても心機能が改善されたことから、P2Y₆R の物理刺激応答性はβ作動薬による心臓リモデリングに関与していないと考えられた(図3)。

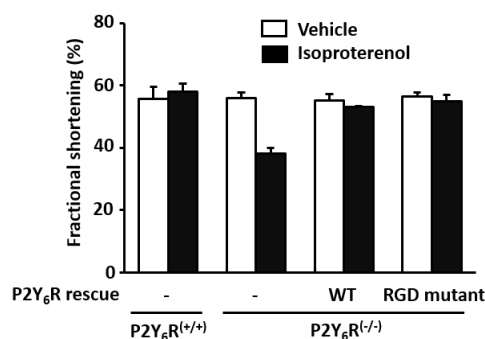


図3. P2Y₆R 欠損及び RGD 変異体のレスキューがβ作動薬による心機能変化に及ぼす影響

P2Y₆R の物理刺激応答能の意義を評価するためには圧負荷刺激モデルで再評価することが必要である。今後、狭窄する血管を現在の横行大動脈から腹部大動脈に変更する、現在よりも緩く狭窄するなどして圧負荷の度合いを変化させることで P2Y₆R 欠損マウスの生存率を改善していく。

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 8 件)

1) C. Sunggip, A. Nishimura, K. Shimoda, T. Numaga-Tomita, M. Tsuda and M. Nishida, "Purinergic P2Y₆ receptors: A new therapeutic target of age-dependent hypertension" *Pharmacol. Res.* 120, 51-59 (2017). 査読あり

Doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.013

2) A. Nishimura and M. Nishida, "Purinergic signaling in cardiovascular system" *Nihon Yakugaku Zasshi* 149, 84-90 (2017) 査読あり

Doi: 10.1254/fpj.149.84

3) M. Nishida, A. Nishimura, T. Matsunaga, H. Motohashi, S. Kasamatsu, and T. Akaike, "Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells" *Free Radic. Biol. Med.* S0891-5849, 30033-3 (2017) 査読あり

Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024

4) T. Numaga-Tomita, N. Kitajima, T. Kuroda, A. Nishimura, K. Miyano, S. Yasuda, K. Kuwahara, Y. Sato, T. Ide, L. Birnbaumer, H. Sumimoto, Y. Mori and M. Nishida, "TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis" *Sci. Rep.* 6:39383 (2016). 査読あり

Doi: 10.1038/srep39383.

5) N. Kitajima, T. Numaga-Tomita, M. Watanabe, T. Kuroda, A. Nishimura, K. Miyano, S. Yasuda, K. Kuwahara, Y. Sato, T. Ide, L. Birnbaumer, H. Sumimoto, Y. Mori and M. Nishida, "TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling" *Sci. Rep.* 6:37001 (2016). 査読あり

Doi: 10.1038/srep37001.

6) A. Nishimura, C. Sunggip, H. Tozaki-Saitoh, T. Shimauchi, T. Numaga-Tomita, K. Hirano, T. Ide, J-M. Boeynaems, H. Kurose, M. Tsuda, B. Robaye, K. Inoue and M. Nishida, "The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension" *Science Signal.* 9, ra7 (2016). 査読あり

Doi: 10.1126/scisignal.aac9187.

7) LR Gentry, A. Nishimura, A.D. Cox, T.D. Martin, D. Tsygankov, M. Nishida, T.C. Elston and C.J. Der, "Divergent roles of CAAX motif-signaled posttranslational modifications in the regulation and subcellular localization of Ral GTPases" *J. Biol. Chem.* 290, 22851-22861 (2015) 査読あり

Doi: 10.1074/jbc.M115.656710

8) M. Torii, D. Kojima, A. Nishimura, H. Itoh and Y. Fukada, "Light-dependent activation of G proteins by two isoforms of chicken melanopsins" *Photochem Photobiol Sci.* 14, 1991-1997 (2015) 査読あり

Doi: 10.1039/c5pp00153f

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 西村明幸、島内司、石川達也、富田拓郎、西田基宏 "Drp1-細胞骨格の相互作用による心筋ミトコンドリアの品質管理" 第 26 回日本循環薬理学会 2016 年 12 月 2 日 信州大学 (長野県、松本市)

2) 西村明幸、Caroline Sunggip、富田拓郎、西田基宏 "加齢に伴う AT1R-P2Y6R 複合体形成によるアンジオテンシン II 誘発性高血圧の制御" 第 63 回中部日本生理学会 2016 年 11 月 4 日 岡崎コンファレンスセンター(愛知県、岡崎市)

3) Akiyuki Nishimura, Caloline Sunggip, Takuro Numaga-Tomita, Motohiro Nishida. "Developmentally upregulated P2Y6 receptor promotes angiotensin II-induced hypertensive signaling" International and Interdisciplinary Symposium 2016 2016 年 7 月 11 日 東京医科歯科大学(東京都、文京区)

4) Akiyuki Nishimura, Tomoya Ito, Takuro Numaga-Tomita, Motohiro Nishida "Redox-dependent regulation of H-Ras palmitoylation" 第 9 回国際 NO 学会 2016 年 5 月 22 日 仙台国際センター(宮城県、仙台市)

5) 西村明幸、Caroline Sunggip、富田拓郎、西田基宏 "アンジオテンシン II 誘発性高血圧症に対する P2Y6 受容体の役割" 第 128 回日本薬理学会近畿部会 2015 年 11 月 20 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市)

〔図書〕(計 1 件)

1) 西村明幸、西田基宏 米国科学振興協会 Japanese Scientists in Science Signaling 2016 「シグナリングに載った日本人研究者」 2017 2 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 明幸 (Nishimura Akiyuki)
生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：00457152