

平成22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間： 2007～2009  
 課題番号：19689003  
 研究課題名（和文） 心不全に関わるG蛋白質シグナリング経路の解析と新たな治療標的の探索  
 研究課題名（英文） Analysis of G protein signaling pathways involved in the development of heart failure and discovery of the novel therapeutic target.  
 研究代表者  
 西田基宏（NISHIDA MOTOHIRO）  
 九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
 研究者番号：90342641

研究成果の概要（和文）：細胞膜上の受容体と共役する三量体G蛋白質の役割に着目し、Gq蛋白質シグナリングが心肥大形成に、G12蛋白質シグナリングが線維化の誘導に関わることを見出した。また、Gq蛋白質の下流で活性化されるCa<sup>2+</sup>シグナリングを制御する新たな標的分子としてTRPCチャネルを、G12蛋白質シグナリングを活性化するトリガー受容体としてP2Y<sub>6</sub>受容体を同定した。さらに、これら標的分子の阻害が心不全を抑制することをマウス心臓を用いて初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We focused on the roles of heterotrimeric G proteins coupling with receptors on the plasma membrane, and found that G<sub>q</sub> protein signaling participates in the development of myocardial hypertrophy while G<sub>12</sub> protein signaling participates in the development of cardiac fibrosis. In addition, we identified that TRPC channels mediate G<sub>q</sub>-induced activation of Ca<sup>2+</sup> signaling, and P2Y<sub>6</sub> receptor triggers activation of G<sub>12</sub> protein signaling. Furthermore, we found that inhibition of these targets improves heart failure in *in vivo* mouse hearts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学一般・生物系薬学

キーワード：薬理学・心不全・シグナル伝達・G蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は現在、交感神経系やレニン・アンジオテンシン系の亢進により生じる内分泌疾患だと理解され、治療法も確立されつ

つある。それでもなお心不全の生命予後は極めて悪く、新たな治療薬や画期的な早期診断法の開発が望まれている。心不全の進

行に伴って起こる心臓の形態変化(心肥大や線維化)は、アンジオテンシン(Ang) II による G 蛋白質共役型受容体を介したシグナル伝達経路の活性化により惹起される。申請者は、G 蛋白質シグナリングと心肥大および線維化との関連に着目し、心筋細胞の G<sub>q</sub> 蛋白質を介した Ca<sup>2+</sup>シグナリング経路の活性化が心肥大に、G<sub>12/13</sub> 蛋白質を介した活性酸素(ROS)産生が線維化に関与する可能性を見出してきた。具体的には、心肥大を制御する Ca<sup>2+</sup>感受性の転写因子 (nuclear factor of activated T cells: NFAT) の上流で Ca<sup>2+</sup>シグナルを制御する標的分子として、ジアシルグリセロール活性化カチオンチャンネル (TRPC3/TRPC6) を同定した。また、Ang II 刺激によって生じる活性酸素の生成に G<sub>12</sub> ファミリー (G<sub>12/13</sub>) 蛋白質が関与することを、初代培養心筋細胞を用いて明らかにした。しかし、細胞レベルで得られた結果が本当に個体レベルでも起こりうるかどうかはわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の4つについて検討を行った。

- (1) TRPC の阻害が心機能に影響を与えずに心肥大を抑制するかどうか個体レベルで検証する。
- (2) G<sub>12/13</sub> 活性化と心臓リモデリングとの関係を明らかにする。
- (3) AT1 受容体の発現調節における活性酸素の役割を明らかにする。
- (4) 心線維芽細胞における NFAT 活性化の生理的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) TRPC3/TRPC6 および NFAT-GFP 融合タンパクを発現させた細胞を用いて Ca<sup>2+</sup>イメージング、NFAT 局在などの測定を行

い、TRPC チャンネルを選択に阻害する化合物を見つけ出す。候補となるいくつかの化合物が、血行動態に影響を与えないかどうか確認した後、至適濃度の化合物を浸透圧ポンプに含めて、腹腔内より一ヶ月間の持続投与を行う。投与 4 日後、外科的に大動脈狭窄を行い、圧負荷をかける。4 週間後、心エコーイメージング・カテーテルによる心機能測定・心重量測定・線維化測定(コラーゲン染色)を行い、心肥大および機能低下が抑制されているかどうか調べる。抑制がみられた場合、心肥大マーカー遺伝子の発現が抑制されるかどうか real time RT-PCR により確認する。

- (2) p115-RGS を心筋特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作出し、圧負荷により誘発される心臓リモデリングおよび心機能障害が抑制されるかどうか調べる。また、ラット新生仔心室筋細胞をシリコンチャンバーディッシュ上で培養し、機械伸展負荷を与え G<sub>12/13</sub> の活性を測定する。G<sub>12/13</sub> の活性は直接測定するのが困難であることから、下流で活性化される低分子量 G 蛋白質 Rho の活性で調べる。Rho 活性化は、活性型 Rho とのみ特異的に結合する基質 (Rhotekin)を用いた pull down assay により評価する。心筋細胞に発現する受容体のうち、G<sub>12/13</sub> と共役する受容体に焦点を絞り、受容体拮抗薬(できればインバーサゴニスト)を処置することで伸展刺激による Rho 活性化が抑制されるかどうか検討する。抑制された受容体については、遺伝子をクローニングし、HEK293 細胞株に発現させ、G<sub>12/13</sub> 蛋白質と共役するかどうか特異的基質(phosphatase5 の TPR ドメイン)を用いた pull down assay

により評価する。

- (3) ラット心線維芽細胞の AT1R のプロモーター領域および 3'-UTR 領域をクローニングする。AT1 受容体のプロモーター領域には NF- $\kappa$ B, AP-1 など ROS 感受性の転写因子結合配列が存在することから、Luciferase reporter assay 法により ROS により活性化される転写因子を特定する。
- (4) NFAT の恒常的活性型変異体または ATP 受容体刺激による心線維芽細胞の形態変化や遺伝子発現変化を解析し、線維化に対する関与を検討する。

#### 4. 研究成果

- (1) TRPC3 チャンネルを選択的に阻害する化合物 (pyrazole-3) を新たに同定した。Pyrazole-3 は、Ang II 刺激や機械的伸展刺激によって誘発される初代培養心筋細胞の肥大応答を濃度依存的に抑制した。また、Pyrazole-3 は、血圧や心拍数に全く影響を及ぼさない用量でマウスの大動脈狭窄で誘発される心肥大および心機能障害を有意に抑制することを明らかにした。一方、TRPC3/6 チャンネル活性はプロテインキナーゼ A (PKA) や PKG によりリン酸化を受けることでも抑制されることが分かった。ホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) 阻害剤は PKG 依存的に TRPC6 チャンネルの Thr69 残基をリン酸化し、チャンネル活性を抑制することを見出した。さらに、Thr69 を Ala に置換した TRPC6 変異体を心筋細胞に発現させたところ、PDE5 阻害剤による心肥大抑制効果が完全に抑制されることが明らかとなった。
- (2) p115-RGS を心筋特異的に発現させたトランスジェニック (p115-RGS-Tg) マウスに大動脈狭窄を行った結果、圧負荷により誘発される心肥大は抑制されないものの、線維化だけが有意に抑制された。また、線維化に伴って生じる心拡張機能障害も  $G\alpha_{12/13}$  の阻害によって抑制された。心筋細胞の機械的伸展刺激により、 $G\alpha_{12/13}$  および Rho の活性化が観察され、これらはプリン作動性 P2Y<sub>6</sub> 受容体を阻害することで完全に抑制された。機械的伸展刺激による P2Y<sub>6</sub> 受容体の活性化には、細胞内から遊離した ATP と UDP に依存しており、これらは pannexin-1 ヘミチャンネルを介して細胞外に放出される可能性が示された。さらに、P2Y<sub>6</sub> 受容体

阻害剤を投与したマウスに圧負荷を施したところ、心臓の肥大は抑制されないものの線維化および拡張機能障害が有意に改善された。以上の結果から、P2Y<sub>6</sub> 受容体が圧負荷による心臓の線維化のトリガーとして働くことが初めて明らかとなった (図 1)。

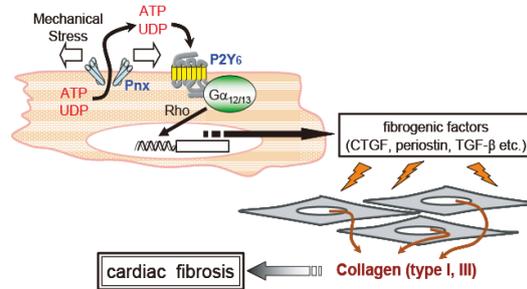


図 1 圧負荷による心臓線維化のメカニズム (文献④参照)

- (3) AT1 受容体の発現調節は主に転写因子 NF- $\kappa$ B によって制御されていた。三量体 Gi ファミリー蛋白質の薬理的阻害剤として用いられている百日咳毒素 (Pertussis toxin: PTX) を処置したところ、AT1 受容体の顕著な増加が観察された。このメカニズムには、Toll 様受容体 (TLR4) を介した低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化および NADPH oxidase を介した活性酸素の生成による NF- $\kappa$ B の活性化が関与していた。PTX による Rac および NF- $\kappa$ B の活性化は 2 相性であり、遅い相での活性化には interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の生成を介した IL-1 $\beta$  受容体-Rac シグナリングの増幅機構が関与することも明らかにした。
- (4) 心線維芽細胞にエンドセリン-1 刺激を行うと、TRPC6 チャンネルの発現量が増加した。このメカニズムには、 $G_{12/13}$  蛋白質を介した低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化とそれに続く NADPH oxidase を介した活性酸素の生成と c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が関与していた。心線維芽細胞における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の持続的上昇および NFAT の活性化は、エンドセリン-1 刺激によって誘発される線維化応答 (筋線維芽細胞への分化・細胞外基質タンパクの合成) を抑制した。高濃度のエンドセリン-1 刺激は、TRPC6 チャンネルを活性化することにより細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を誘発したが、低濃度の刺激では TRPC6 チャンネルの活性化は認められなかった。この結果は、エンドセリン-1 刺激による TRPC6 チャンネルの活性化がエンドセリン-1 受容体を介した線

維化誘導シグナルに対するネガティブフィードバック制御機構として働く可能性を示している (図2)。

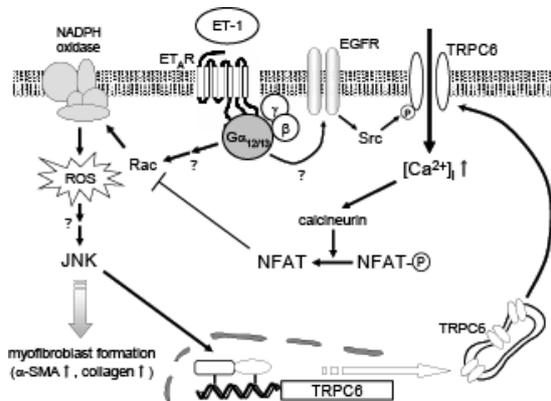


図2 TRPC6によるエンドセリン(ET-1)受容体を介した線維化応答に対する負の制御機構(文献①参照)

#### 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 25 件)

- ① Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y & Kurose H. G $\alpha_{12/13}$ -mediated upregulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through NFAT activation. *J. Biol. Chem.* 282, 23117-23128 (2007).
- ② Kusano Y, Horie S, Shibata T, Satsu H, Shimizu M, Hitomi E, Nishida M, Kurose H, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Uchida K. Keap1 regulates the constitutive expression of GST A1 during differentiation of Caco-2 cells. *Biochemistry* 47: 6169-77 (2008).
- ③ Shibata T, Nakahara H, Kita N, Matsubara Y, Han C, Morimitsu Y, Iwamoto N, Kumagai Y, Nishida M, Kurose H, Aoki N, Ojika M, Uchida K. A food-derived synergist of NGF signaling: Identification of protein tyrosine phosphatase 1B as a key regulator of NGF receptor-initiated signal transduction. *J Neurochem.* 107: 1248-1260 (2008).
- ④ Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T & Kurose H. P2Y $_6$  Receptor-G $\alpha_{12/13}$  Signaling in Cardiomyocytes Triggers Pressure Overload-induced Cardiac Fibrosis.

*EMBO J.* 27: 3104-3115 (2008).

- ⑤ Yano T, Itoh Y, Kawamura E, Maeda A, Egashira N, Nishida M, Kurose H, Oishi R. Amphotericin B-Induced Renal Tubular Cell Injury is Mediated by Na $^+$  Influx through Ion-Permeable Pores and Subsequent Activation of MAP Kinases and Elevation of Intracellular Ca $^{2+}$ . *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 1420-1426 (2009).
- ⑥ Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I and Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 5400-5405 (2009).
- ⑦ Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S, Kato K, Katano M, Mori E, Kurosaki T, Inoue R, Hikida M, Putney JW Jr, and Mori Y. Ca $^{2+}$  influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC $\beta$  and ERK activation in B cells. *J Cell Sci.* 123: 927-938 (2010).
- ⑧ Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima K, Ide T, Inoue R and Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr $^{69}$  is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J. Biol. Chem.* (in press).
- ⑨ Nishida M, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Sumimoto H, Sato Y and Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type1 receptors through TLR4-mediated Rac activation. *J. Biol. Chem.* (in press).
- ⑩ Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M & Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 958-967 (2007). Review.
- ⑪ Nishida M & Kurose H. Roles of TRP channels in the development of cardiac hypertrophy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 378: 395-406 (2008). Review.
- ⑫ Nakaya M, Ohba M, Nishida M & Kurose H. Determining the activation of Rho as an index of coupling to G $_{12/13}$ . Chapter for "Receptor Signal Transduction Protocols" as part of the Humana Press "Methods in Molecular Biology" series, Vol. 83, 2010.
- ⑬ Nishida M, Ohba M, Nakaya M & Kurose H. Heterotrimeric G proteins in heart failure. *Heart Failure: Symptoms, Causes and Treatment Options.* (Nova Science Publishers) in press.

- ⑭ 黒瀬等、**西田基宏** TRP チャネルと心疾患 生化学 Vol. 79, No.10 (2007、日本生化学会)
- ⑮ **西田基宏**、小野原直哉、井上隆司、森泰生、黒瀬等 アンジオテンシン II で誘発される心肥大の分子機構—TRP 蛋白質を巡って 日本臨床生理学会雑誌 Vol. 37, No.4 (2007、日本臨床生理学会)
- ⑯ 黒瀬等、**西田基宏** イオンチャネルと心疾患—心肥大形成と TRPC-NFAT シグナリング 医学のあゆみ Vol. 223, No.6 (2007、医歯薬出版)
- ⑰ **西田基宏**、上村綾、仲矢道雄、黒瀬等 機械的伸展刺激により活性化される G タンパク質共役型受容体の解析 表面 Vol. 46, No.3 (2008、広信社)
- ⑱ **西田基宏** 心不全治療の新たな標的としての TRPC チャネル 日本薬理学雑誌 Vol. 132, No.8, 130-131 (2008)
- ⑲ 黒瀬等、**西田基宏** AT1 受容体を介する心肥大形成における TRPC チャネルの役割 医学のあゆみ Vol.228, No.5, 395-399 (2009).
- ⑳ **西田基宏** TRP チャネルタンパク質の新たな機能と病態生理 (序文) 日薬理誌 Vol.134, No.3, 115 (2009).
- 21 **西田基宏**、佐藤陽治、仲矢道雄、黒瀬等 G タンパク質共役型受容体—TRPC チャネルタンパク複合体形成による心肥大シグナル制御 日本薬理学雑誌 Vol.134, No.3, 131-136 (2009).**西田基宏**、仲矢道雄、黒瀬等 G<sub>12/13</sub> タンパク質による活性酸素シグナリング 実験医学 増刊 Vol.27, No.15 (2009).
- 22 **西田基宏** カルシウムシグナリング研究の最前線 ~電位非依存性カルシウムチャネルの様々な生理・病理機能~ (序文) YAKUGAKU ZASSHI Vol. 130, No. 3, 279-280 (2010).
- 23 **西田基宏**、渡辺健太、仲矢道雄、黒瀬等 ジアシルグリセロール感受性 TRPC チャネルを介した心肥大誘導のメカニズム YAKUGAKU ZASSHI Vol.130, No.3, 295-302 (2010).
- 24 清中茂樹、加藤賢太、**西田基宏**、森泰生 TRPC チャネルを標的とした新規 Ca<sup>2+</sup>拮抗薬の創製 YAKUGAKU ZASSHI Vol.130, No.3, 303-311 (2010).
- 25 **西田基宏**、大場三奈、仲矢道雄、黒瀬等 三量体G蛋白質シグナリングを介した心不全発症の分子機構 日本薬理学雑誌 (2010, in press).
- [学会発表] (計 20 件)
- ① **Nishida M.**, Nakaya M & Kurose H. Role of TRPC channels in agonist-induced cardiac hypertrophy. 2007' International Symposium for Pharmaceutical Sciences. (2007, Nagasaki). 招聘シンポジウム
- ② **Nishida M.** Extracellular nucleotides trigger pressure overload-induced cardiac fibrosis through P2Y<sub>6</sub>R-Gα<sub>12/13</sub> signaling pathways. KUSCR Japan/Korea Conference on Cellular Signaling 2008. (2008, Fukuoka) 招聘シンポジウム
- ③ **Nishida M.**, Sato Y, Uemura A, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Inoue K & Kurose H. P2Y<sub>6</sub> receptor-Gα<sub>12/13</sub> signaling triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. Fukuoka Purine 2009 (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka) 招聘シンポジウム
- ④ **Nishida M.** TRPC channels as a new therapeutic target for heart failure. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009, July 29<sup>th</sup>, Kyoto). ランチョンセミナー
- ⑤ **Nishida M.** Down-regulation of angiotensin receptors by S-nitrosylation of NF-κB. Society for Free Radical Research (SFRR) International. Free Radical School in Japan 2009 (Joetsu Kokusai Ski Resort, Sep 3<sup>rd</sup>, Nagano). 教育講演
- ⑥ **Nishida M.**, Uemura A, Nakaya M & Kurose H. Purinergic P2Y<sub>6</sub> Receptor in Cardiomyocytes Initiates Pressure Overload-induced Cardiac Fibrosis. 2009' International Symposium for Pharmaceutical Sciences. (2009, Nov 5<sup>th</sup>, Fukuoka). 招聘シンポジウム
- ⑦ **Nishida M.** Role of diacylglycerol-activated TRPC channels in the development of heart failure. The 6<sup>th</sup> Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. (2009, Nov. 25<sup>th</sup>, Huis Ten Bosch, Nagasaki, Japan). 招聘シンポジウム
- ⑧ **Nishida M.** Diacylglycerol-activated TRPC channels as a new therapeutic target of heart failure. The 9<sup>th</sup> International Symposium on 'Recent Trends in Pharmaceutical Sciences'. (2010, Feb 4<sup>th</sup>, Yeungnam University, Gyeongsan, Korea). 招聘シンポジウム
- ⑨ **西田基宏** (2007年11月) 第279回情報計算化学生物(CBI)学会研究講演会「心不全治療の新たな標的としての TRPC チャネル」 招聘シンポジウム
- ⑩ **西田基宏**、大串真理子、須田玲子、仲矢道雄、黒瀬等 (2008年12月) 生化学会・分子生物学会合同大会 BMB2008 (神戸) 「S-ニトロシル化修飾によるアンジオテンシン受容体の調節機構」 シンポジウム

- ム
- ⑪ **西田基宏**、佐藤陽治、仲矢道雄、井上隆司、森泰生、黒瀬等 (2009年3月) 第82回日本薬理学会年会 (横浜) 「受容体-TRPC チャンネルの機能的共役による心肥大シグナル制御」 シンポジウム
  - ⑫ **西田基宏**、佐藤陽治、井上隆司、森泰生、黒瀬等 (2009年3月) 日本薬学会第129年会 (京都) 「心臓の病的肥大におけるTRPC チャンネルの役割」 シンポジウム
  - ⑬ **西田基宏**、仲矢道雄、黒瀬等 (2010年3月) 第83回日本薬理学会年会 (大阪) 「S-ニトロシル化修飾によるアンジオテンシン受容体シグナリングの調節」 シンポジウム
  - ⑭ **西田基宏**、黒瀬等、渡辺健太、清中茂樹、森泰生 (2010年3月) 第83回日本薬理学会年会 (大阪) 「心肥大を仲介するTRPC チャンネル」 シンポジウム
  - ⑮ **西田基宏**、西岡絹恵、有吉麻里奈、仲矢道雄、黒瀬等 (2010年3月) 日本薬学会第130年会 (岡山) 「TRPC チャンネルのリン酸化による血管緊張性の制御」 シンポジウム
  - ⑯ **西田基宏** (2010年3月) 京都大学先端医工学研究ユニットH21年度研究発表交流会 (京都) 「心不全を制御する三量体G蛋白質」 招聘シンポジウム
  - ⑰ **西田基宏**、小野原直哉、井上隆司、住本英樹、佐藤陽治、森泰生、長尾拓、黒瀬等 (2007) 第80回日本薬理学会年会 (名古屋) 「アンジオテンシン II による心筋細胞の肥大応答における TRPC3/TRPC6 チャンネルの関与」 一般講演 (優秀発表賞受賞)
  - ⑱ **西田基宏**、仲矢道雄、黒瀬等 (2009) 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム (東京) 「百日咳毒素によるアンジオテンシン受容体発現増加のメカニズム」 一般講演
  - ⑲ **Nishida M**, Onohara N & Kurose H.  $G\alpha_{13}$ -TRPC6-NFAT signaling pathway negatively regulates cardiac myofibroblast formation. XIX World Congress of the ISHR Bologna (June 2007, Italy) ポスター発表
  - ⑳ **Nishida M**, Ogushi M, Suda R, Nakaya M & Kurose H. Heterologous down-regulation of angiotensin type1 receptor by purinergic P2Y<sub>2</sub> receptor stimulation. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009, July, Kyoto). ポスター発表

[その他]  
ホームページ等

<http://210.233.60.66/~chudoku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田基宏 (NISHIDA MOTOHIRO)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：90342641