

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890237
 研究課題名（和文） 心室伝導障害治療に向けた心線維芽細胞における電位伝導機能解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of ion conduction with primary-cultured cardiac fibroblasts.
 研究代表者
 波多野 紀行
 愛知学院大学・薬学部・講師
 研究者番号：50454319

研究成果の概要：

ラット心臓より単離・培養した心線維芽細胞に TRPV4 mRNA が発現していることを明らかにした。また TRPV4 選択的アゴニストである 4 α -PDD により誘発される細胞内 Ca²⁺濃度上昇および非選択的カチオン電流が、TRPV 遮断薬ルテニウムレッドおよび TRPV4 選択的 siRNA により抑制されることを明らかにした。以上の結果は、心線維芽細胞において TRPV4 が機能的に発現していることを明示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1320000	0	1320000
2008 年度	1170000	351000	1521000
年度			
年度			
年度			
総計	2490000	351000	2841000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：心不全、イオンチャネル、心線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

老年人口の増加および生活習慣の欧米化により我が国の心疾患罹患率は上昇傾向にある。様々な心疾患の終末像である慢性心不全は薬物療法・非薬物療法が飛躍的に進歩した現在においても、その予後は依然不良である。慢性心不全患者の死因の約半数を持続性心室頻拍や心室細動といった不整脈による突然死が占める。このような致死性不整脈は心室内における伝導障害により引き起こされることが多い。慢性心不全患者の重症例の約 4 割は何らかの心室伝導障害を有し、心室

伝導障害は慢性心不全の予後決定因子の一つであると考えられている。心不全患者において心筋細胞の脱落、心線維芽細胞の分化・増殖、細胞外マトリックス産生増大といった心リモデリングの進行が心室伝導障害を増悪させる。近年、この心室伝導障害の形成には心線維芽細胞が大きく寄与していることが明らかになってきた (Brown et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2005)。

心線維芽細胞は心臓において心筋細胞数に匹敵するほど多く存在し、心臓に存在する非興奮性細胞の 90%以上を占める。心線維芽

細胞は心筋細胞の周囲に配置され、細胞外マトリックスを産生し、恒常的に拍動を繰り返すという心機能に非常に適合した立体構造の構築に寄与している。健常時には心筋細胞と協調しながら組織構造を形成している心線維芽細胞だが、長期間に及ぶ過剰な機械的負荷や神経液性因子の曝露によりその性質は大きく変化する (Baudino et al., Am. J. Physiol., 2006)。細胞増殖が盛んになり、収縮型フェノタイプである筋線維芽細胞への分化が促進され、細胞外マトリックス産生量の増大や心室伝導障害が誘発される。

しかしながら、心室伝導障害と心線維芽細胞の直接的な関係は未だ不明である。これは、心筋細胞に比べて心線維芽細胞の電気生理学的特性の解析が非常に遅れているためであり、心線維芽細胞が心筋活動電位伝播に直接影響を与えることができるかといった基本的な疑問に対する確証もまだ得られていない。

2. 研究の目的

心リモデリングが進行した慢性心不全時においては心線維芽細胞の細胞数は増加することから、心筋活動電位伝播に与える影響も大きくなると考えられ、病態時における心室伝導障害メカニズムの詳細な解明のためにも心線維芽細胞の電気生理学的特性を知ることが必須である。

そこで、本研究では心線維芽細胞にパッチクランプ法を適用してその電気生理学的性質を解明し、心伝導における心線維芽細胞の寄与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ラット心臓から酵素処理により単離した心線維芽細胞を 10% 非働化 FCS 含有 DMEM/F12 培地により培養した。すべての実験において、48-72 時間培養した心線維芽細胞を使用した。

心線維芽細胞は心筋細胞とは異なり、基本的な電気生理学的性質や発現しているイオンチャネル・トランスポーターの種類がほとんど分かっていない。そこで、心線維芽細胞におけるイオンチャネル・トランスポーター発現プロファイルを心線維芽細胞由来 cDNA を用いた定量的 RT-PCR 法で明らかにした。また、定量的 RT-PCR 法により mRNA の発現が確認できたイオンチャネルに関しては、特異的抗体を用いた細胞免疫染色法により、そのタンパク発現を明らかにした。

次に、心線維芽細胞におけるイオンチャネルの機能を解析するため、細胞に Fura2-AM を負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を観察した。心線維芽細胞の膜電流解析は細胞にホールセルパッチクランプ法を適用することにより行った。

心線維芽細胞におけるイオンチャネル機能発現をより明確に示すために、標的タンパク質特異的な siRNA を用いたノックダウン法を用いた。標的タンパク質に特異的な siRNA を心線維芽細胞にトランスフェクションし、標的タンパク質の mRNA 発現解析および機能解析 (細胞内 Ca^{2+} 濃度解析・膜電流解析) を行った。

4. 研究成果

定量的 RT-PCR 法を用いて心線維芽細胞のイオンチャネル・トランスポーター発現プロファイルを作成した。その結果、心線維芽細胞においては非選択的カチオンチャネルに分類される Vanilloid Type 4 Transient Receptor Potential (TRPV4) の mRNA が豊富に発現していることが明らかになった (図 1A)。TRPV4 は細胞膜伸展刺激、低浸透圧刺激、温度刺激、アラキドン酸代謝物、プロトン、ホルボールエステルなど様々な刺激に応答する多刺激受容イオンチャネルであることが知られている。心線維芽細胞は心筋細胞の周囲に存在し、心肥大時には膜伸展刺激など物理的な刺激に曝露されやすいと考えられている。また虚血性心疾患やうつ血性心不全時においては、細胞外の pH 変化や浸透圧変化に曝されると考えられている。そのため、多刺激受容イオンチャネルである TRPV4 が心線維芽細胞に機能発現することを明らかにすることは、病態時における心線維芽細胞の電気生理学的特性を理解する上で必須であると考え、以下の実験を行った。

まず TRPV4 タンパク発現を明らかにするために TRPV4 特異的抗体を用いた細胞免疫染色を行った。その結果、心線維芽細胞において TRPV4 タンパク質が発現していることが明らかになった (図 1B)。

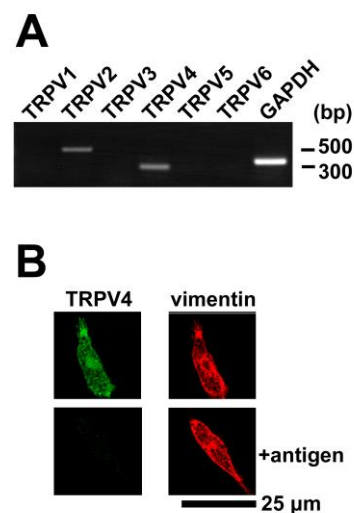


図 1. A: RT-PCR 法による TRPV4 mRNA 発現解析結果、B: 細胞免疫染色法による TRPV4 タンパク発現解析結果

TRPV4 は非選択的カチオンチャンネルであり、細胞内へ Ca^{2+} を流入することが可能なイオンチャンネルである。そこで、心線維芽細胞に Fura2-AM を負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を観察した。まず各種 TRPV チャンネルアゴニスト投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。TRPV1 選択的アゴニストである 10 μM capsaicin 投与によっては細胞内 Ca^{2+} 濃度に変化はなかったが、TRPV4 選択的アゴニストである 4 α -PDD、および TRPV4 の生体内活性物質と考えられているアラキドン酸の投与により濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察された。心線維芽細胞における 4 α -PDD 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の 50%有効濃度は 0.44 μM であり、文献により報告されている値に近い結果となった。また、この 4 α -PDD 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は細胞外 Ca^{2+} の除去、TRPV チャンネル非選択的遮断薬である 10 μM ルテニウムレッド添加、100 μM Gd^{3+} 添加により抑制されたが、L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル選択的遮断薬 3 μM ニカルジピン添加あるいはタブシガルギン処置による細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇により抑制されなかった (図 2)。これらの結果は、心線維芽細胞において TRPV4 チャンネルが機能的に発現していることを明確に示している。

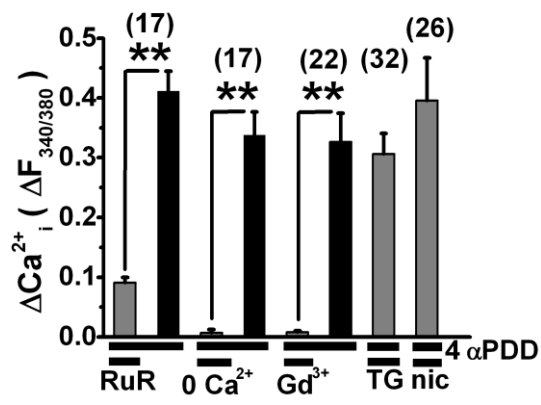


図 2. 1 μM 4 α -PDD 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する各種阻害薬の作用。RuR: ルテニウムレッド、TG: タブシガルギン、nic: ニカルジピン

次に、心線維芽細胞にパッチクランプ法を適用して、3 μM 4 α -PDD 投与により惹起される電流を観察した。この 4 α -PDD 誘発電流の逆転電位は、計算により算出された非選択的カチオン電流の逆転電位とほぼ同じ値であったことから、非選択的カチオン電流であると考えられた。また、この 4 α -PDD 誘発非選択的カチオン電流は 10 μM ルテニウムレッド添加により抑制された。

TRPV4 には選択的な遮断薬が存在しないため、薬理的に TRPV4 の存在を示すことは困難である。そこで TRPV4 選択的 siRNA を心線維芽細胞にトランスフェクションし、4 α -PDD によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および非選択的カチオン電流に対する TRPV4 選択的 siRNA の効果について検討した。TRPV4 特異的 siRNA をトランスフェクションした心線維芽細胞群 (siRNA) はネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションした心線維芽細胞群 (ncRNA) と比較して、4 α -PDD によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および非選択的カチオン電流が有意に減少していた (図 3、図 4)。

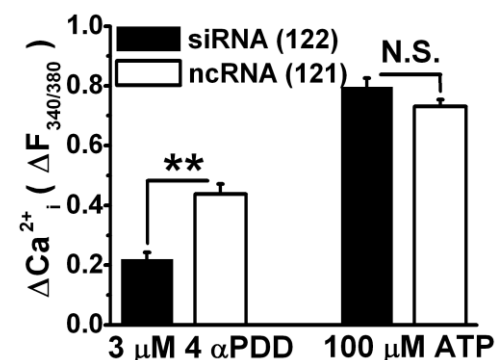


図 3. TRPV4 選択的 siRNA による 4 α -PDD 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の減少。100 μM ATP 投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関して変化は見られなかった。

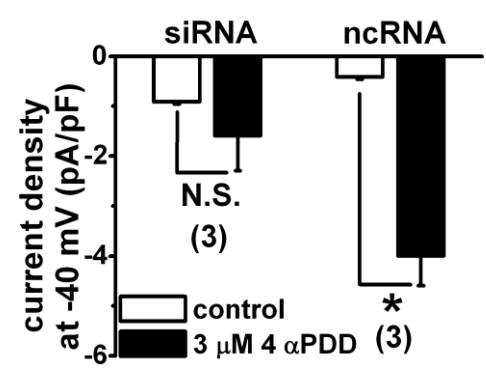


図 4. TRPV4 選択的 siRNA による 4 α -PDD 誘発非選択的カチオン電流の減少。薬物非存在下 (control) と 3 μM 4 α -PDD 存在下の -40mV における電流密度を比較した結果、ncRNA 処置群でみられた有意な差が、TRPV4 特異的 siRNA 処置群では見られなかった。

以上の結果は、心線維芽細胞において TRPV4 が機能的に発現していることを明確に示している。

健常時、心線維芽細胞は心筋組織が規則的に収縮弛緩を繰り返すために必要な収縮構造を構築するために機能しているが、心不全などの病態時には不整脈を惹起する心伝導障害を生み出す原因になりうる細胞である。肥大化した心臓では多くの心線維芽細胞が増殖し、一部の心線維芽細胞は平滑筋型収縮タンパク質を多く発現する筋線維芽細胞へと分化している。肥大心では心線維芽細胞の細胞膜伸展刺激は増大し、また心虚血状態において心線維芽細胞は pH や浸透圧の変化に曝露されると考えられる。これらの物理学的な刺激により活性化される TRPV4 は心線維芽細胞において刺激受容センサーとしての役割を果たしている可能性がある。

今後は心線維芽細胞において活性化した TRPV4 を介した細胞内への Ca^{2+} 流入が心線維芽細胞の増殖・分化において果たす役割について更に詳細な解析を行っていく予定である。

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 3 件)

1. R. Tanaka, K. Muraki, S. Ohya, H. Yamamura, N. Hatano, Y. Itoh, Y. Imaizumi. TRPV4-Like Non-selective Cation Currents in Cultured Aortic Myocytes. *J. Pharmacol. Sci.* 108 179-189 (2008) 査読有

2. R. Tanaka, K. Muraki, S. Ohya, Y. Itoh, N. Hatano, Y. Imaizumi. Cell-culture-dependent change of Ca^{2+} response of rat aortic myocytes to sphingosine-1-phosphate. *J. Pharmacol. Sci.* 108 434-442 (2008) 査読有

3. R.A. Rose, N. Hatano, S. Ohya, Y. Imaizumi, W.R. Giles. C-type natriuretic peptide activates a non-selective cation current in acutely isolated rat cardiac fibroblasts via natriuretic peptide C receptor-mediated signalling. *J. Physiol.* 580 255-274 (2007) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 波多野紀行、ラット心線維芽細胞における TRP channel を介した Ca^{2+} 流入、日本薬学会東海支部大会、2008 年 7 月 5 日、名古屋

2. 波多野紀行、短期培養 cardiac fibroblast における ATP 誘発クロライド電流、日本薬学会東海支部大会、2007 年 7 月 7 日、名古屋

3. 波多野紀行、短期培養 cardiac fibroblast における ATP 誘発クロライド電流、日本薬理学会近畿部会、2007 年 6 月 15 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野 紀行

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：50454319

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者