

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2010

課題番号：20390025

研究課題名 (和文) 心肥大形成における電位非依存性カチオン非選択的なトリップ・チャンネルの役割解析

研究課題名 (英文) Roles of Voltage- and cation-independent TRPC channels in cardiac hypertrophy

研究代表者

黒瀬 等 (KUROSE HITOSHI)

九州大学・大学院薬学研究院・薬効安全性学

研究者番号：10183039

研究成果の概要 (和文)：

以前、我々は単離したラット新生仔心室筋細胞を用いアンジオテンシン II 受容体やエンドセリン受容体刺激による心肥大応答に Gq タンパク質-ホスホリパーゼ C 系の活性化によって生じたジアシルグリセロールが、電位非依存性でカチオン非選択的な Transient Receptor Potential canonical channel 3 (TRPC3) および TRPC6 を介して Ca²⁺流入を引き起こし、流入した Ca²⁺が肥大応答に必須の役割を果たしていることを示した。しかし、この結果は単離した心室筋細胞を用い、受容体刺激による心肥大応答を指標とした *in vitro* の系であった。そこで、TRPC3 あるいは TRPC6 の関与を個体レベル (*in vivo*) の圧負荷モデルで示すことを試みた。圧負荷モデルは、ヒトでの持続した高血圧を模倣するとされているマウスの実験系であり、圧負荷にさらされた心臓は肥大を生じる。TRPC3 に選択的な阻害剤 Pyr3 が合成されていることから Pyr3 を入手し、大動脈狭窄により心臓に負荷をかけた (圧負荷) マウスにポンプを用いて投与した。その結果、Pyr3 を投与したマウスでは、圧負荷による心肥大形成 (心筋細胞の表面積増大、心肥大マーカー遺伝子 ANP の発現上昇) が抑制されていた。また、心肥大に伴って生じる心機能 (短縮率 FS: fractional shortening) の低下が抑制されていた。次に、TRPC6 は cGMP 依存性リン酸化酵素によりリン酸化されると機能が低下することから、細胞内 cGMP 濃度を上昇させるホスホジエステラーゼ 5 (PDE5: cGMP を選択的に分解する PDE) 阻害剤シルデナフィルを用いて検討した。この結果、シルデナフィルを投与したマウスでは、圧負荷による心肥大形成が抑制された。また、各種心肥大マーカー遺伝子の発現が抑制されていた。さらに、TRPC6 のリン酸化を抗リン化抗体を用いてウエスタンブロットにて測定すると、シルデナフィル投与によって増加していることが示された。これらの結果は、*in vitro* のみでなく *in vivo* においても TRPC3/TRPC6 を介した Ca²⁺流入が心肥大形成に重要な役割を果たしていることを示していた。

研究成果の概要 (英文)：

We have reported that angiotensin II or endothelin-1 stimulation induce hypertrophic responses through transient receptor potential canonical channel 3 (TRPC3) and TRPC6-mediated Ca²⁺ influx using rat neonatal cardiomyocytes. TRPC3/TRPC6 are voltage-independent and cation-non-selective ion channels, and activated by diacylglycerol generated by Gq-stimulated phospholipase C activation. However, these results were obtained from *in vitro* cell system using receptor stimulation of cardiomyocytes isolated from newborn rats. It is essential to demonstrate the importance of TRPC3/TRPC6 in *in vivo* hypertrophy model. Therefore, we have examined whether TRPC3/TRPC6 are involved in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. Pressure overload is considered as a mouse model of chronic human hypertension, and induces cardiac hypertrophy. As the compound Pyr3 that selectively inhibits TRPC3 was available, we obtained it and administered to pressure overloaded mice. Pressure overload is applied by transverse aortic constriction procedure (TAC), and Pyr3 is administered by osmotic mini-pump. Pressure overload-induced hypertrophy was inhibited in Pyr3-treated mice as compare to wild type mice, which was as assessed by increased size of cardiomyocytes and increased expression of ANP. Furthermore, cardiac function such as fractional shortening is improved by the treatment with Pyr3. Next, we also examined the involvement

of TRPC6 in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. As the function of TRPC6 is inhibited by phosphorylation of TRPC6, we used a cGMP-selective phosphodiesterase (phosphodiesterase type 5: PDE5) inhibitor, sildenafil, for the increase in cardiac cGMP content. The treatment with sildenafil inhibited cardiac hypertrophy by pressure overload. The increased expression of various marker genes of hypertrophy was inhibited by the treatment with sildenafil. In sildenafil-treated mice, anti-phospho-TRPC6 antibody revealed that TRPC6 was phosphorylated at a specific site that is essential for TRPC6-mediated Ca^{2+} influx. These results suggest that TRPC3/TRPC6-mediated Ca^{2+} influx plays an important role in cardiac hypertrophy in vivo as well as in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：心肥大、TRPC チャンネル、リン酸化、cGMP、ホスホジエステラーゼ阻害剤、圧負荷

1. 研究開始当初の背景

心臓は持続的に過剰な負荷にさらされると、その負荷に打ち勝つために肥大して対応しようとする。すなわち負荷にさらされると代償性に肥大する。肥大した心臓は、負荷が取り除かれないとやがて代償機構が破綻し心不全へと移行する。心不全は、5年生存率が50%程度と低く、また心不全患者に有効性を示す薬も開発の余地が残されている。したがって、心肥大の制御が心不全の治療につながることから、盛んに心肥大のメカニズムが解析されている。この心肥大の過程に電位非依存性でカチオン非選択的な Transient Receptor Potential canonical channel 3 (TRPC3) および TRPC6 が重要な役割を果たしていることがいくつかの研究室より報告されていた。TRPC3/TRPC6 を介して流入した Ca^{2+} が Ca^{2+} 依存性の転写因子 Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) の活性化を引き起こし、心肥大に関わる遺伝子の発現を亢進させるというスキームが考えられた。

cGMP 選択的ホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) の阻害剤であるシルデナフィルは、TAC 処置による心肥大形成を阻害することがすでに報告されていた。さらに、TRPC3 の 11 番目の Thr は cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKG) によってリン酸化され、このリン酸化により TRPC3 の機能が阻害されることが示された。TRPC6 のアミノ末端には TRPC3 と同様

に PKG でリン酸化される Thr が存在している。したがって、心筋細胞内で cGMP 濃度が上昇し PKG の活性が上昇すると、TRPC3/TRPC6 がリン酸化され、これらチャンネルを介した Ca^{2+} 流入が阻害される可能性がある。

TRPC3 および TRPC6 の心肥大形成への関与は、我々の新生仔心室筋細胞を用いた実験や海外のグループにより行われた心筋細胞チャンネルを過剰発現させたマウスの解析による結果で、野生型マウスが圧負荷にさらされたときに内在性の TRPC3/TRPC6 が心肥大に関与しているという証拠は得られていなかった。

2. 研究の目的

TRPC3/TRPC6 が心肥大に関与していることを in vivo で示すことを目的とした。この目的のためにいくつかのアプローチがいくつか存在する。(1) 組織特異的ノックアウトマウスの作成と解析、(2) 選択的な化合物を用いた解析、および(3) TRPC3 あるいは TRPC6 を選択的に修飾し機能阻害を引き起こす化合物あるいは薬を用いた解析を行うことである。組織特異的ノックアウトマウスの作成は強力なアプローチであるものの、マウスの作成には高額の研究費と時間が必要なこと、一方 TRPC3 あるいは TRPC6 を選択的に阻害する化合物が利用可能なことから、(2) と (3) の化合物を用いたアプローチをとることとした。

3. 研究の方法

(1) TRPC3 の心肥大における関与は、TRPC3 を選択的に阻害する化合物 Pyr3 を用いて以下のことを行い検討した。

①横行大動脈を狭搾し心臓に圧負荷をかける (TAC と略す)。野生型および TAC 処置したマウス (C57BL6J) に、Pyr3 (0.1mg/kg/day) あるいは Pyr3 を溶かしている溶媒 (ポリエチレングリコール) を、浸透圧ポンプを用いて投与する。

②TAC 処置後 1 週間での心臓の大きさ、心肥大マーカー遺伝子の発現、心エコーによる心臓の形態および機能の測定を行う。

③in vitro の心筋細胞を用いて、アンジオテンシン II 刺激による心肥大応答 (NFAT の活性、BNP の発現誘導) に対する Pyr3 の効果を検討する。

(2) シルデナフィルは cGMP 選択的なホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) の阻害剤であり、TAC 処置による心肥大形成を阻害することが報告されている。TRPC3 は cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKG) によりリン酸化され、Ca²⁺流入が阻害されることも知られている。そこで、TRPC3 と同じような位置に PKG によってリン酸化される Thr (Thr65) を持つ TRPC6 も PKG のリン酸化により機能が阻害されると考えられる。そこで、PDE5 阻害剤シルデナフィルが TRPC6 のリン酸化を引き起こすのか、また TRPC6 のリン酸化が圧負荷による心肥大形成に抑制的に働くのか、以下のことを行い検討した。

①シルデナフィルが TRPC6 の機能を阻害することを、TRPC6 を HEK293 細胞に発現させ検討する。

②TRPC3 とのアミノ酸配列の相同性から、TRPC6 のアミノ末端より 69 番目の Thr は PKG によってリン酸化される可能性がある。リン酸化を検出するため、Thr がリン酸化されたペプチドを抗原に抗リン酸化抗体を作成する。

③抗リン酸化抗体を用いて、TRPC6 が cGMP リン酸化依存性にリン酸化されること、およびリン酸化により機能が阻害されるか検討する。

④TAC 処置 1 週間後の心肥大はシルデナフィルにより抑制されることが示されている。この条件で TRPC6 がリン酸化されているのか検討する。シルデナフィル (100mg/kg/day) は 1 日 1 回経口投与とする。

4. 研究成果

(1) TRPC3 を選択的に阻害する化合物 Pyr3 を利用し、TAC 処置によって引き起こされる心肥大における TRPC3 の関与を検討する。

①Pyr3 を投与しておく、TAC 処置による心肥大形成 (心臓/体重 (あるいは脛骨の長さ) の比、心筋細胞の大きさの増大、ANP の発現上昇) が抑制された。

②TAC 処置によって生じる心肥大に伴う短縮率 (FS: Fractional Shortening) の減少が抑制された。すなわち、心肥大に伴って生じる心機能の低下が、心肥大形成が抑制されたことと相まって減弱した。

③新生仔心室筋細胞をアンジオテンシン II やエンドセリン-1 刺激すると心肥大応答 (NFAT の活性、BNP の発現誘導) が引き起こされる。細胞では ANP よりも BNP の方が、感度および特異性の点から心肥大応答のマーカーとして優れているため、BNP の発現を測定した。

これらの結果より、TAC 処置によって引き起こされる心肥大形成に TRPC3 が関与していることが明らかになった。TRPC6 選択的な阻害剤が利用可能でないため、TRPC6 の関与はこのアプローチでは調べることができない。

(2) PDE5 阻害剤が TRPC6 の機能抑制を引き起こすことを利用し、TAC 処置によって引き起こされる心肥大における TRPC6 の関与を検討する。

①HEK293 細胞に発現させた TRPC6 チャネルを介した Ca²⁺流入は、PDE5 阻害剤の前処置により阻害された。

②アミノ末端部分に存在する 69 番目の Thr を Ala に置換した変異型 TRPC6 は、PDE5 阻害剤による TRPC6 の Ca²⁺流入活性を阻害しなかった。

③Thr69 がリン酸化された TRPC6 を認識する抗体を作成した。得られた抗体はリン酸化型のみを認識することを確認した。次に、PDE5 阻害剤によって TRPC6 の Thr69 がリン酸化されるか、作成した抗リン酸化型 TRPC6 抗体を用いて検討したところ、PDE5 阻害剤の前処置により Thr69 がリン酸化された。一方、Ala 置換型 TRPC6 のリン酸化は観察されなかった。

④TAC 処置によって引き起こされる心肥大は PDE5 阻害剤 (シルデナフィル) によって抑制されることが報告されていた。そこで、TAC 処置およびシルデナフィル処置した心臓の TRPC6 のリン酸化状態を検討したところ、シルデナフィル処置依存性にリン酸化が増加していた。

これらの結果は、TRPC6 の活性を抑制すると TAC 処置による心肥大形成が抑制されることを示している。

Py3 および PDE5 阻害剤を用いた結果より、TRPC3/TRPC6 が圧負荷による心肥大形成に関わっていることを示している。

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 6 件)

1. 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** (13), 5400-5405 (2009)
2. Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H.: Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem.* **286** (17), 13244-13253 (2010)
3. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H., Inoue R, Mori Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K, Nakao K.: inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. *Circ Res.* **106** (12), 1849-1860 (2010)

[学会発表] (計 6 件)

1. 黒瀬等、西田基宏 (2008): 「心臓の線維化における $G_{12/13}$ 蛋白質の役割」薬理学会共催・第 2 回トランスポーター研究会 (ワークショップ in 福岡 2008 年 11 月) シンポジウム
2. 有吉麻里奈、西岡絹恵、仲矢道雄、西田基宏、黒瀬等 (2008): 「抗血小板薬シロスタゾールの TRPC チャネルの抑制を介した血管拡張作用」薬理学会共催・第 2 回トランスポーター研究会 (ワークショップ in 福岡 2008 年 11 月) ポスター発表
3. 黒瀬等 (2009): 「線維化とプリン受容体」日本薬学会第 129 年会 (平成 21 年 3 月) シンポジウム
4. 黒瀬等 (2010): 「心臓の線維化」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010 年 12 月) シンポジウム
5. 仲矢道雄、西田基宏、黒瀬等 (2011): 「 β アドレナリン受容体遮断薬による GRK5/ β アレスチン 2 を介した心臓の線維化」第 84 回日本薬理学会年会 (平成 22 年 3 月) シンポジウム

6. 仲矢道雄、西田基宏、黒瀬等 (2011): 「 β アドレナリン受容体遮断薬の GRK5/ β アレスチン 2 を介した心臓の線維化」日本薬学会第 130 年会 (平成 22 年 3 月) シンポジウム

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://210.233.60.66/~chudoku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒瀬 等 (KUROSE HITOSHI)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 10183039