

機関番号：84404

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20590874

研究課題名 (和文) 心筋症・心不全発症における TRPV2 チャンネルの病態的役割の解明と治療薬の開発

研究課題名 (英文) Pathophysiological role of TRPV2 as a therapeutic target for cardiomyopathy/heart failure

研究代表者 岩田 裕子 (Iwata Yuko)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生理部・室長

研究者番号：80171908

研究成果の概要 (和文)：細胞骨格系蛋白質異常による筋ジストロフィー・心筋症筋細胞では TRPV2 の細胞膜発現が亢進し活性化されていること、その活性を抑制することにより Ca^{2+} シグナル異常、筋細胞膜 TRPV2 濃縮、筋変性が緩和されることが明らかになった。TRPV2 は筋ジストロフィー・心筋症の優れた治療標的になることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：We identified TRPV2 as a principal candidate for Ca^{2+} -entry pathways which result in abnormal Ca^{2+} handling in muscular degeneration caused by cytoskeleton abnormality. Inhibition of endogenous TRPV2 significantly reduced the increase in basal intracellular Ca^{2+} and stretch-induced damage as well as improved muscle function in animal models. These data suggest that enhanced TRPV2 activity is important to trigger muscle damage and that it is a promising therapeutic target for muscular dystrophy and cardiomyopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:細胞生理、分子薬理

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋症、心不全、イオンチャンネル、カルシウム

1. 研究開始当初の背景

遺伝性、非遺伝性を問わず、多くの原因により心筋症・心不全は起こりいずれの場合も細胞壊死の機序並びに有効な治療方法は未だ不明であるが、その終末病態、病変には類似点が多く、病態発症とその進行には共通な細胞機構が関与する可能性がある。細胞骨格系蛋白質異常により遺伝性心筋症を発症する心筋症ハムスター (BI014.6) をモデル動物と

して用いて筋ジストロフィー・心筋症における、筋細胞内は恒常的に Ca^{2+} が上昇した状態にあること、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内の様々な細胞内情報伝達系を活性化させ、細胞のリモデリングを介して細胞壊死を進行させることが明らかになってきた。持続的細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を起こす有力な候補として TRP チャンネルファミリーに属する TRPV2 を同定した。TRPV2 を心臓細胞膜に高

発現したトランスジェニックマウスの心臓は拡張型心筋症の様相を呈した。TRPV2 は正常組織ではほとんど細胞内膜系に存在するが筋変性が起こると形質膜に移行して活性化され、細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入に寄与する。また伸展刺激により活性化されるという興味深い特徴をもつが、膜移行の機構、活性化機構など全くわかっていない。また特異的阻害剤も皆無である。

2. 研究の目的

心筋症・心不全における TRPV2 の病態的意義を明らかにし、TRPV2 がこれらの病態の治療標的となりうることを確定し、それを標的とした治療薬を開発することを目的とする。そのためまず心筋病態における TRPV2 活性化の分子メカニズムの詳細を明らかにする。その過程で TRPV2 活性阻害法を探索し、探索した阻害薬を用いて心筋症・心不全モデル動物の治療評価をし、さらなる心筋症・心不全治療薬開発へ結びつける。

3. 研究の方法

4 量体として機能すると考えられている TRP ファミリーに属する TRPV2 のイオン透過部位に変異を導入しチャネル活性のない変異体を恒常的に TRPV2 を発現させた HEK293 細胞に導入し、オリゴマー形成と Ca^{2+} 流入に対する変異体のドミナント効果を調べた。 α skeletal actin プロモーターを用いて骨格筋特異的に変異体を発現させたトランスジェニックマウスをジストロフィン欠損で筋ジスになるマウス *mdx* と交配させ *mdx* 内在性の TRPV2 活性をほぼ全て抑制した場合の Ca^{2+} 異常と筋変性に対する効果を調べた。同様にサルコグリカン欠損で筋ジストロフィーと心筋症を発症するハムスター-BIO 骨格筋へアデノウイルスベクターを用いて TRPV2 変異体を導入し筋変性改善を調べた。筋変性の程度は血中クレアチンキナーゼ (CK) 活性、組織 HE 染色で、筋機能はグリップテストで評価した。筋細胞及び筋 fiber の調製は既報に従った。TRPV2 活性はアゴニスト 2-APB 刺激および高濃度 Ca^{2+} 刺激に対する Ca^{2+} 反応性により測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光試薬 Fura2 を用いて測定した。心筋症ハムスター心筋への TRPV2 特異的阻害剤の効果は心エコー、および血中心不全マーカーの測定により行った。

4. 研究成果

恒常的に TRPV2 を発現させた HEK293 ヘイオン透過部位に変異を導入したチャネル活性のない TRPV2 変異体を共発現すると各々 TRPV2 は細胞膜上でオリゴマーを形成し Ca^{2+} および 2-APB による Ca^{2+} 反応性が減弱した。TRPV2 変異体を骨格筋特異的に過剰発現させ

たマウス (このマウス骨格筋は正常であった) を筋ジストロフィーマウス (*mdx*) と交配させて *mdx* の TRPV2 活性を抑制したマウス (4, 10, 22 週令) を作製した。このマウスは *mdx* に比し血中クレアチンキナーゼ活性の有意な減少と組織 HE 染色で観察される筋変性の減弱、中心核の減少が認められた。グリップテストによっても機能的改善効果が示された。*mdx* 筋 fiber は 2-APB 刺激、外液 5mM Ca^{2+} 刺激ともに反応して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し筋ジストロフィーにおける TRPV2 の活性化が実証できた。そしてこの TRPV2 活性は変異体導入により顕著に抑制された。変異体の導入により *mdx* の TRPV2 細胞膜発現も抑制された。*mdx* 筋は細胞内 Ca^{2+} 濃度の異常上昇を反映して CaMKII のリン酸化が亢進していたが変異体の導入によりリン酸化の亢進は抑制され、細胞内 Ca^{2+} 濃度の *in vivo* における正常化が示唆された。細胞骨格系蛋白質欠損による筋ジストロフィー筋細胞は TRPV2 の細胞膜発現が亢進し活性化されていること、その活性を抑制することにより Ca^{2+} シグナル異常、筋細胞膜 TRPV2 濃縮、筋変性が緩和されることが明らかになった。同様に TRPV2 変異体をアデノウイルスにより BIO ハムスターの筋ジストロフィー導入し TRPV2 を特異的に阻害することにより改善された。この結果は TRPV2 特異阻害剤は筋ジストロフィー、心筋症治療に有効な可能性が高いことを示唆した。そこで TRPV2 阻害剤を探索するため、TRPV2 発現細胞を用いたハイスループットスクリーニング法 (HTS) により、同定した既知化合物 A, B ($\text{IC}_{50} = \sim 20\mu\text{M}$) の構造をもとにインシリコで類似化合物を探索し、約 200 種類の化合物を選択し、さらにスクリーニングを行った。その結果、A, B より低濃度域 ($\text{IC}_{50} = \sim 1\mu\text{M}$) で阻害活性をもつ A3, A48, A63, B6 を見出した。これらのうち A3, A48, A63 はマウス TRPV2 だけでなくヒト TRPV2 も阻害した。これらの薬剤は、TRP ファミリーチャネルの調べた範囲内で他のメンバー TRPV1, TRPC1 をほとんど阻害しなかった。心筋症モデル動物を用いて上記新規 TRPV2 阻害剤の心筋症病態改善効果を調べた。9 週令の動物に 2 週間あるいは 4 週間経口投与したところ、TRPV2 阻害薬を投与しない対照群に比べて、心エコーにより評価した心機能の有意な改善、心筋変性のマーカーである血中心筋トロポニン I 量および心筋組織切片染色により評価した線維化占有率の有意な減少が確認された。対照的に、TRPV2 阻害作用を有さない A65, A47, B33 は心機能改善を示さなかった。従って、これら TRPV2 を阻害する化合物は心筋症の筋変性抑制効果があることが判明した。本研究により探索された新規薬剤は TRPV2 を特異的に阻害する実験ツールとして有力であるとともに移植しか治療手段がない拡張型心筋

症などに対する有効な治療薬候補となると思われる。さらに特異的阻害抗体の作製とその効果の検討をおこなった。細胞外を認識する抗体は一般に免疫寛容のため作製しにくいいため、マウス TRPV2 発現 HEK 細胞を免疫疾患マウスに免疫し定法に従い脾臓をマイクロマと融合し TRPV2 の外側を認識する抗体を産生するハイブリドーマ上清を flow cytometry により選び種々のアッセイ、スクリーニング後、モノクローン化した。また TRPV2 のペプチドをウサギに免疫して作製した。各々抗体について、イムノプロット、生細胞を用いた免疫染色を行い、TRPV2 外側認識抗体であることを確認した。また阻害活性のスクリーニングを行い、TRPV2 活性を抑制する抗体として、マウスモノクローナル抗体 11-6 および 88-2 とウサギポリクローナル抗体 591、592 を得た。これらの抗体は、TRP ファミリーチャネルの他のメンバー TRPV1、TRPC1 をほとんど阻害しなかった。BIO ハムスターの培養骨格筋細胞を用いて、阻害抗体が細胞内 Ca^{2+} 代謝異常および筋変性を抑制することを確認した。この抗体は阻害剤とともに TRPV2 を特異的に阻害する実験ツールとして有力であるとともに移植しか治療手段がない拡張型心筋症などに対する有効な治療手段となると思われる。

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 8 件)

- ① Iwata Y. and Wakabayashi S. Dominant-negative inhibition of Ca^{2+} influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Neuromuscular Disorders* 20653 (2010)
- ② 岩田 裕子 若林 繁夫
筋変性疾患治療に向けた Ca^{2+} 透過チャネルを標的とした創薬の試み 査読無 化学工業 61 2 88-293 (2010)
- ③ Zanou N., Iwata Y., Schakman O. et al. Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Letters* 査読有 583 3600-3604 (2009)
- ④ Iwata Y. et al. Amelioration of muscular dystrophy by dominant-negative inhibition of Ca^{2+} permeable channel TRPV2 *Journal of pharmacological science* 査読無 109 P96 (2009)

⑤ Iwata Y. et al. Dominant-negative inhibition of Ca^{2+} influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models *Human Molecular Genetics* 査読有 18 824-834 (2009)

⑥ Iwata Y. et al. Activation of Na^+/H^+ Exchanger1 is sufficient to generate Ca^{2+} signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure *Circulation Research* 査読有 103 891-899 (2008)

⑦ Iwata Y. et al. Enhanced Na^+/H^+ Exchange activity participates in pathogenesis of muscular dystrophy and cardiomyopathy 査読無 *Experimental & Clinical Cardiology* 13 98-98 (2008)

⑧ Iwata Y. et al. Activation of Na^+/H^+ exchange is sufficient to induce hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 査読無 45S17 (2008)

[学会発表] (計 12 件)

① 岩田裕子 若林繁夫 Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 の特異的阻害抗体の作成とその筋変性改善効果 2010年12月7日 第83回日本生化学会大会 パシフィコ横浜 (横浜)

② 岩田裕子 若林繁夫 Ca^{2+} -permeable channel TRPV2 as a promising therapeutic for muscular dystrophy and cardiomyopathy 第 15 回世界筋学会国際会議 (WMS2010) 2010年10月15日 崇城大学市民ホール (熊本)

③ 岩田裕子 若林繁夫 Activation of Ca^{2+} -permeable channel TRPV2 serves as a high risk factor in cardiomyopathy 第 20 回国際心臓研究学会 (ISHR2010) 2010年5月16日 京都国際会議場 (京都)

④ 岩田裕子 若林繁夫 心筋症モデル動物における Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 の活性阻害は筋変性を軽減する 第 83 回

日本薬理学会年会 2010年3月18日大阪国際会議場(大阪)

⑤ 岩田裕子 若林繁夫

拡張型心筋症発症における Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2の病態的役割 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日パシフィコ横浜(横浜)

⑥ 岩田裕子 若林繁夫 Amerioration of muscular dystrophy by dominant-negative inhibition of Ca^{2+} influx via TRPV2 国際生理学会 IUPS2009 2009年7月30日京都国際会議場(京都)

⑦ 岩田裕子 若林繁夫

Ca^{2+} -permeable channel TRPV2 as a promising therapeutic target for muscular dystrophy 2009年7月3日第8回日仏ワークショップパリ ミオロジー研究所(フランス)

⑧ 岩田裕子 若林繁夫 Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2阻害による筋変性疾患病態改善効果 2009年6月4日生理研研究会「TRPチャネル群の生理機能と病態生理」岡崎カンファレンスセンター(岡崎)

⑨ 岩田裕子 若林繁夫 Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2のドミナントネガティブ阻害による筋ジストロフィー病態改善効果 第82回日本薬理学会年会 2009年3月17日パシフィコ横浜

⑩ 岩田裕子 若林繁夫

Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2のドミナントネガティブ変異体による筋ジストロフィーの病態改善効果 第81回日本生化学会大会 2008年12月10日神戸ポートアイランド

⑪ 岩田裕子 若林繁夫 Activation of Na^+/H^+ exchange is sufficient to induce hypertrophy and heart failure 第25回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会 2008年12月5日 横浜開港記念会館

⑫ 岩田裕子 若林繁夫

Enhanced Na^+/H^+ Exchange Activity participates in pathogenesis of muscular dystrophy and cardiomyopathy 心筋代謝研究会 2008年7月13日 東京慈恵会医科大学

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

名称: 抗 TRPV2 抗体

発明者: 岩田裕子、若林繁夫

権利者: 国立循環器病センター

種類:

番号: 特願 2010-016760

出願年月日: 2010年1月28日

国内外の別: 国内

名称: TRPV2の部分ペプチド

発明者: 岩田裕子、若林繁夫

権利者: 国立循環器病センター

種類:

番号: 特願 2009-186219

出願年月日: 2009年8月11日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/bunshi/bunshi_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者 岩田裕子

(Iwata Yuko)

独立行政法人国立循環器病研究センター分子生理部・室長

研究者番号: 80171908