

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590801

研究課題名（和文） TRP チャネルによる心筋細胞肥大・細胞死の制御

研究課題名（英文） Involvement of TRP channels in the cardiac hypertrophy and cell death

研究代表者

伊藤 宏 (ITO HIROSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10232464

研究成果の概要（和文）：慢性的心圧負荷の病態では、TRPC1, -C3, C6 の発現上昇が positive feedback 現象としておこり、それが心肥大・心不全発症進展に重要な役割を果たすこと、sildenafil はそれら発現上昇を抑制することで、心肥大を防止することが明らかとなった。また、TRP 依存性 Ca 流入の修飾分子 STIM-1 のノックアウトマウスを用いた検討から、STIM-1 の心肥大における促進的役割も明らかとなり、TRPCs/STIM-1 シグナルが肥大から心不全にいたる一連の過程を、制御・支配しているシグナル分子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In cardiac hypertrophy model, we could detect increases in the expression of TRPC1, -C3, -C6, brain natriuretic peptide (BNP), and NFAT activity, Ca entry, as well as increases in cell surface area. Gene silencing of the TRPC1 and pharmacological treatment with a pyrazole derivative or sildenafil attenuate the Ca entry and prevent cardiac hypertrophy. In analysis of stromal interaction molecule 1 (STIM1; known as a Ca sensor of intracellular Ca store) knockout mice, we provide evidence that STIM1 together with TRPC1 is crucial for the development of cardiac hypertrophy. Moreover, STIM1 contributes to cardiac fibrosis under the condition of pressure over load. Ultimately, TRPC/STIM1 system might become novel pharmacological target in the treatment of cardiac hypertrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：心筋細胞肥大・細胞死・Ca 流入性 TRP チャネル・STIM-1

1. 研究開始当初の背景

高血圧や弁膜症疾患で心臓に圧負荷あるいは液性因子による刺激が加わると、個々の心筋細胞は容積を増大させること（心肥大）によって適応し、しばらくの間心機能は代償さ

れ保持される。しかし、さらに圧負荷が持続すると、代償性心肥大から非代償期（心不全）へ移行し、最終的にはアポトーシスやオートファジー様細胞死などの心筋細胞死が誘導される。ただし、これまでの代償性心肥大や

心筋細胞死の研究は、別々の研究テーマとして取り扱われることがほとんどであり、両者を統合して捉える研究はなされていなかった。しかし、これら慢性心負荷に対する細胞応答は同一の心筋細胞で起こっている現象であり、心筋細胞肥大から心筋細胞死にいたる一連の細胞挙動(心筋細胞の運命)を、時間的に制御・支配しているシグナル分子は不明である。古くより、細胞外からのCa流入は、細胞収縮、興奮だけでなく遺伝子転写活性調節などをかきし細胞の増殖、分化、細胞死を制御していることが知られている。近年、細胞の成長や死に関わるCaの流入経路として Transient Receptor Potential (TRP) channels スーパーファミリーが見出され、さらに最近 TRP 依存性 Ca 流入の修飾分子 STIM-1 が同定され、腫瘍学、免疫学の分野で細胞増殖やアポトーシスに関連したイオンメカニズムとして注目を浴びている。

2. 研究の目的

本研究においては、心筋細胞肥大と細胞死がばらばらに研究されている現状を打開し、慢性的心負荷状態で起こる代償性細胞肥大と細胞死を連結することで心筋細胞の運命制御を統合的に研究する。それらに共通した普遍的なシグナル分子として TRP チャンネルを想定、TRP チャンネル/ STIM-1 系が「慢性的心負荷後の一連の細胞挙動においてどのような役割を担うのか」ということを明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 圧負荷・心不全モデル

① 動物モデル；圧負荷・心不全モデルとして、Dahl 食塩感受性ラット、腹部大動脈結紮ラット、TAC (弓部大動脈結紮) マウスを用いた。

② 細胞モデル；in vitro 実験では、新生仔ラットの初代培養心筋細胞を用いた。

③ K.O. マウス；STIM-1 ヘテロノックアウトマウスに TAC を行ったモデルを用いた。

(2) 分子生物学的実験；

① RT-PCR 解析

② western blotting 解析

③ gene-silencing (TRPCs, STIM-1 に対する siRNA を作製、培養心筋細胞に transfection)

④ NFAT activity 解析 (NFAT-EGFP plasmid を作製し、培養心筋細胞に transfection)

(3) 生理実験；

①ラット、マウスの心機能を心エコー、心電図、血圧測定し評価

②細胞内 Ca 濃度測定；Fura-IIAM を培養心筋細胞に負荷し、蛍光強度の比を用いて測定。

4. 研究成果

(1) TROCs 発現における positive feed back 機構の証明。初めに圧負荷・心不全の病態下において TRPC1, -C3, -C6 の活性化がそれぞれ他の TRPC 発現を上昇させ、協同的に働いていることを証明するため、培養細胞に肥大刺激 ET-1 を投与、さらに特異的 TRPC6 チャンネルブロッカーである sildenafil を投与し TRPC1, -C3, -C6 発現の変動をみた。以下図 1 に示すように、ET-1 によって TRPC1, -C3, -C6 全てその発現が増強し、肥大反応にそれら発現上昇が重要な役割を果たしていることが確認された。さらに、sildenafil は TRPC6 のみならず、TRPC1, -C3, の発現も減少させたことから、TROCs の活性化がそれぞれ他の TRPC 発現をも制御し、TRPC1, -C3, -C6 が協同的に相補的に働いていることを明らかにした。

(2) Dahl 食塩感受性ラット心不全期の TRPC1 チャンネル発現変動の解析。心エコー実験から、Dahl 食塩感受性ラットでは、15 週には心肥大代償期を示すが、19 週になると非代償期に移行し心不全を呈することが確認された。隔週例での TRPC1 と肥大心不全マーカーである BNP 発現を調べたところ、TRPC1 と BNP 発現は強い正の相関関係をしめし、心肥大期のみならず、心不全期でも連関した挙動を示していた。この結果は、TRPC1 が心肥大から心不全に至る一連の細胞挙動に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。(図 2、図 3)

図 1

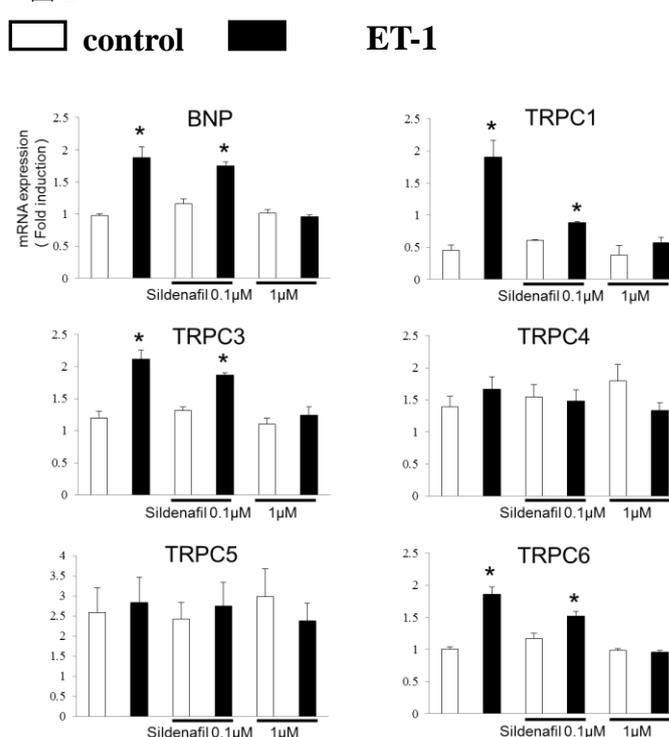


図 2

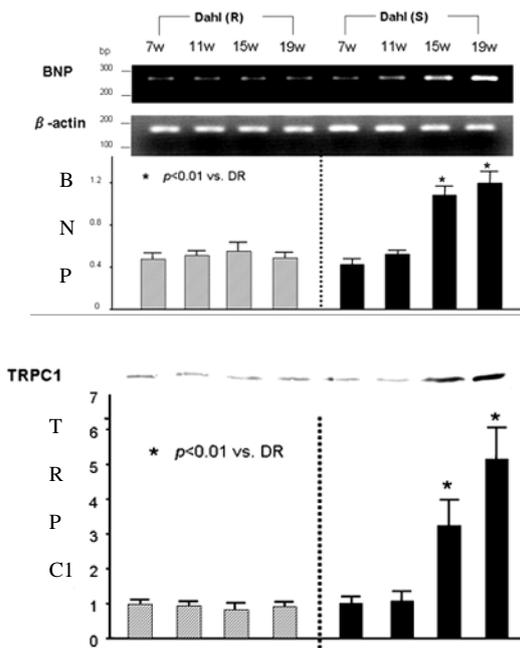
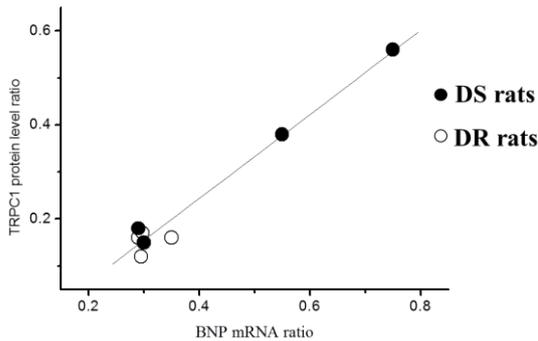


図 3



(3) 心肥大反応における STIM-1 の役割 - in vitro での検討-

培養心筋細胞に ET-1 による肥大刺激をくわえた肥大細胞モデルを作製。同細胞での STIM-1 の発現を調べたところ、予想に反し、その発現に変化はなかった。しかし、次に siRNA against STIM-1 による knock down を行ったところ、ET-1 の一連の肥大反応（細胞表面積の増加、BNP、ANF 上昇、NFAT 活性上昇）は全て抑制された（図 4、図 5）。Store-operated Ca 流入も抑制された。この結果から、心筋細胞肥大反応における STIM-1 の重要性が確認、さらに心筋細胞では内因性 STIM-1 が肥大反応を引き起こすのに十分量存在し、肥大刺激で upregulation する必要がないものと考えられた。

図 4

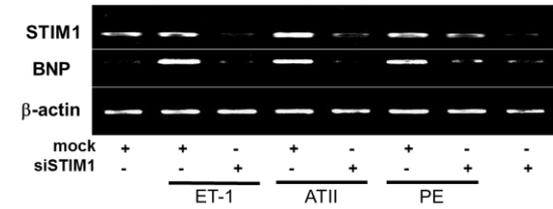
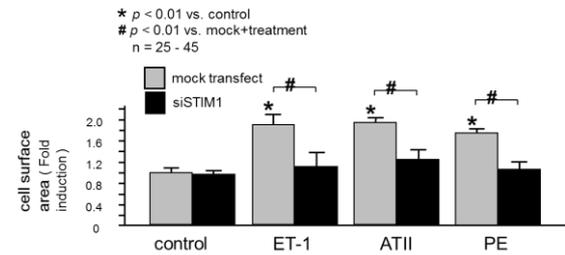


図 5



(4) 心肥大反応における STIM-1 の役割 - ノックアウトマウスでの検討-

① STIM-1 ヘテロノックアウトマウスの子表現型の解析；同マウスの心拍数、心電図所見、心重量、心エコー所見（駆出率、心筋壁厚）を同じ週齢のマウスと比較したが、有意な相違は認めなかった。

② STIM-1 ヘテロノックアウトマウスでの心肥大反応；STIM-1 ヘテロノックアウトマウスに TAC を施行し、その後の肥大反応を観察したところ、以下図 6, 7 に示すように、同マウスでは sham 手術群と比べ心重量、細胞表面積、BNP、ANF、TRPCs 発現など一連の肥大反応が抑制されていた。これらの結果は、STIM-1 が心肥大反応において本質的役割を果たしていることを示唆している。

③ TAC 後の STIM-1 ヘテロノックアウトマウスの生命予後；TAC 手術後 2 日間の死亡率は対照群に比べ優位に高かったが、3 日目以降も生存した群ではむしろ死亡率は低かった（図 8）。この結果は、初期の段階での心肥大は、適応現象として働くが、後期においては非代償性心不全のトリガーとなることを示し、TRPCs/STIM-1 シグナルがそれら一連の過程を時間的に制御・支配しているシグナル分子である可能性を示唆している。この結果は、私達の仮説を支持するものである。

図 6

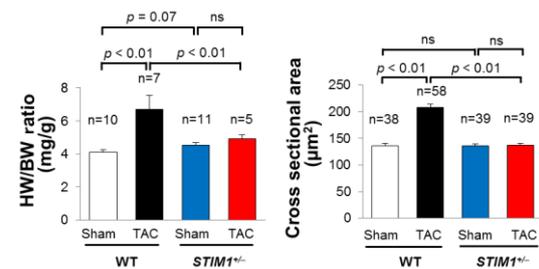


図 7

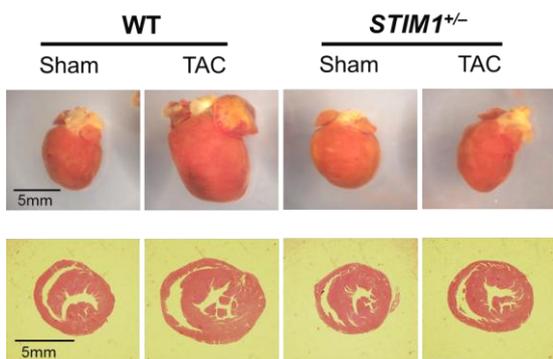
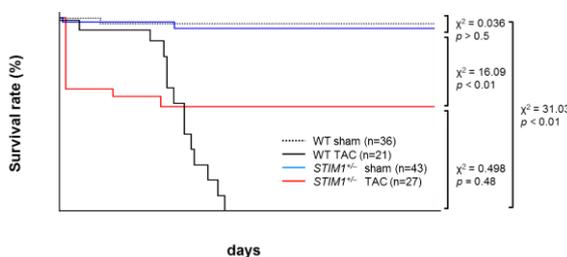


図 8



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 5 件)

- ① Watanabe H, Iino K, Ohba T, Ito H. Possible involvement of TRP channels in cardiac hypertrophy and arrhythmia. Current Topics in Medicinal Chemistry.
- ② Kakizaki M, Nobori K, Watanabe H, Iino K, Ishida M, Ito H. Increased circulating CD3(+)/CD31(+)-T cells in patients with acute coronary syndrome. Heart Vessels. 2012
- ③ Watanabe H, Ohba T, Satoh K, Sano M, Shioya T, Ito H. TRPV1 and TRPA1 in pulmonary vagal afferents and their relations to airway sensitivity (Review). Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. 2011 10:18-30
- ④ Terada S, Koyama T, Watanabe H, Makabe S, Igarashi G, Seki K, Ito H: Abnormal Coagulation and Platelet Profile in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Int. J. Cardiol., 2011 146(3):423-5
- ⑤ Terada M, Nobori K, Munehisa Y, Kakizaki M, Ohba T, Takahashi Y, Koyama T, Terada Y, Ishida M, Iino K, Kosaka

T, Watanabe H, Hasegawa H, Ito H: Double Transgenic Mice Crossed GFP-LC3 Transgenic Mice with ? MyHC mCherry-LC3 mice are New and Useful Tool to Examine the Role of Autophagy in the Heart. Circ J. 2010 74(1):203-206

[学会発表] (計 9 件)

- ① Watanabe H. Transient receptor Potential (TRP) Channel and Hypertensive Heart Disease. The Korean Society of Hypertension 2013. 5. 10-11 Seoul
- ② Watanabe H. TRP Channel and cardiac hypertrophy The Korean Society of Hypertension 2013. 5. 10-11 Seoul
- ③ 大場貴喜 圧負荷による心肥大および心筋繊維化における STIM1 の役割 第 90 回日本生理学会大会 2013. 3. 27-29 東京
- ④ 大場貴喜 Stromal interaction molecule 1 (STIM1) mediates MMP/TIMP Pathway in the Cardiac Fibrosis. 第 77 回日本循環器学会学術集会 2013. 3. 17 福岡
- ⑤ 木曾博典 Slidenafil Inhibits TRPCs Related in the Development of Cardiomyocytes Hypertrophy. 第 77 回日本循環器学会学術集会 2013. 3. 17 福岡
- ⑥ 大場貴喜 Stromal interaction molecule 1 (STIM1) governs cardiac hypertrophy and fibrosis in response to increased afterload. 第 29 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 2012. 10. 26-27 福岡
- ⑦ 大場貴喜 STIM1KO マウスにおける心肥大制御効果 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会 2012. 4. 14 京都
- ⑧ 渡邊博之 Transient Receptor Potential Protein as Cardiac Non-selective Cation Channels Involved in Arrhythmia. 第 75 回日本循環器学会総会学術集会 2011. 8. 3 横浜
- ⑨ Watanabe H Transient Receptor Potential Channels as Novel Therapeutic Targets of Heart Failure. 第 14 回日本心不全学会学術集会 2010. 10. 8 東京

[図書] (計 1 件)

- ① Watanabe H, Ohba T, Ito H. Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) pathways. Springer Verlag 2012 14 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 宏 (ITO HIROSHI)
秋田大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10232464

(2) 研究分担者

渡邊 博之 (WATANABE HIROYUKI)
秋田大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80323145

大場 貴喜 (OHBA TAKAYOSHI)
秋田大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80431625

野堀 潔 (NOBORO KIYOSHI)
秋田大学・医学部・特任講師
研究者番号：40436192
(H22 まで分担者として参画)