

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24年 5月 11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：22689003

研究課題名（和文） 心臓リモデリングにおける受容体作動性カチオンチャンネル TRPC3 の役割解析

研究課題名（英文） Study on the role of receptor-activated cation channel TRPC3 in cardiac remodeling

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）：

慢性高血圧や虚血によって生じる心臓の形態変化（リモデリング）は心機能を低下させる原因として注目されている。我々は、ジアシルグリセロールで活性化される TRPC チャンネル（TRPC3/TRPC6）が圧負荷による心肥大を仲介することを明らかにした。TRPC6 チャンネルは Thr69 残基のリン酸化によりチャンネル活性が抑制されることに着目し、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤や心房性ナトリウム利尿ペプチドが TRPC6 の抑制を介して心肥大や血管収縮を抑制することを新たに見出した。特に血管平滑筋細胞においては、TRPC6 がプロテインキナーゼ A（PKA）や PDE3 と複合体を形成することも明らかにした。さらに、TRPC3 は Ca^{2+} 流入依存的に PKC と相互作用し、NADPH オキシダーゼ依存的な活性酸素生成および心臓リモデリング（心肥大や線維化）の進行に寄与することも明らかにした。以上の結果は、TRPC チャンネルシグナル複合体形成が心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たすことを強く示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Structural remodeling of the heart induced by chronic hypertension or ischemia is a major cause for cardiac dysfunction. We have previously reported that diacylglycerol-activated transient receptor potential canonical channels (TRPC3 and TRPC6) mediate pressure overload-induced cardiac hypertrophy *in vivo*. We here focused on the fact that TRPC6 channel activities are negatively regulated by Thr69 phosphorylation, and found that inhibition of PDEs or atrial natriuretic peptide suppresses cardiac hypertrophy and hypertension through TRPC6 inhibition. Notably, TRPC6 proteins formed a protein signaling complex with PKA and PDE3 in vascular smooth muscle cells. Furthermore, TRPC3 interacts with protein kinase C dependently on TRPC3-mediated Ca^{2+} influx, leading to production of reactive oxygen species via activation of NADPH oxidase, resulting in development of cardiac remodeling, such as hypertrophy and fibrosis. These results strongly suggest that formation of TRPC3/6 protein signaling complex plays a pivotal role in cardiac remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,500,000	6,150,000	26,650,000

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：薬理学

1. 研究開始当初の背景

高血圧や虚血などの負荷によって生じる心臓の形態変化（リモデリング）は、心不全を悪化させる原因として注目されている。心臓の形態変化には、神経体液性因子の関与が強く示唆されている。これまで、受容体と共役する三量体 G_q 蛋白質の下流で活性化される Ca^{2+} シグナリングが心肥大に、 $G_{12/13}$ 蛋白質の下流で活性化される活性酸素シグナリングが線維化に関与することを見出してきた (*EMBO J*, 25, 5305 (2006); *EMBO J*, 27: 3104 (2008))。さらに最近、TRPC3 チャンネルを選択的に阻害する化合物を用いて、TRPC3 チャンネルの抑制が実際に病的心肥大を抑制することを個体レベルで初めて報告した (*PNAS*, 106, 5400 (2009))。この過程で、我々は TRPC3 チャンネル阻害が心肥大よりもむしろ線維化を強く抑制するという現象に注目した。

心臓の線維化は、Angiotensin (Ang) II や transforming growth factor (TGF)- β などの線維化促進因子によって誘発される。最近、TGF- β 刺激による肺の線維化に NADPH oxidase (Nox) が関与することが個体レベルで証明された (*Nat Med*, 15, 1077 (2009))。しかし、Nox を介する ROS 生成に Ca^{2+} が必要なことは知られているものの、TRPC チャンネルと Nox との関係については全くわかっていない。

TRPC タンパクは様々なシグナル分子を集積させるアクセサリ蛋白質として働くこともこれまでに見出しており (*EMBO J*, 22, 4677 (2003))、心臓では TRPC が活性酸素生成系の機能連関に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、心肥大を誘導する Ca^{2+} シグナリングや線維化を誘導する活性酸素シグナリングの発生の場を担う「シグナル分子複合体」を形成する足場としての TRPC チャンネルの役割を明らかにする。具体的には以下の4 つについて検討を行った。

- 1) TRPC3 による活性酸素シグナル制御機構の解析と線維化との関連解析
- 2) TRPC3/6 と相互作用するシグナル蛋白質の同定とその生理的意義の解析
- 3) TRPC3/6 チャンネルのリン酸化による心肥大シグナル制御機構の解析
- 4) 心臓リモデリング（線維化および血管新

生）に対する TRPC チャンネルの役割解析

3. 研究の方法

4 つの目的を達成するため、以下の検討を行った。

- 1) 拡張型心筋症モデル (MLP 欠損) マウスに TRPC3 チャンネル選択的阻害化合物 (pyrazole-3) を 3 週間投与し、心機能と形態変化を観察した。酸化ストレスは、dihydroethidium 蛍光変化および 4-hydroxy-2-nonenal の抗体染色により評価した。TRPC3 と Nox2 との相互作用は TRPC3 と NOX2 を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて免疫沈降により評価した。
- 2) 免疫沈降により内因性 TRPC3, TRPC6 蛋白質と結合するシグナル蛋白質を同定し、この相互作用が TRPC3/6 のノックダウンによって消失するかどうか検討した。
- 3) PDE5 阻害薬や ANP を処置することで心筋細胞の肥大応答が抑制されるかどうか検討する。また、これら薬剤が TRPC6 の Thr69 残基をリン酸化するかどうか確認するため、Thr69 リン酸化を特異的に認識する抗体を作成した。
- 4) 大動脈狭窄モデルマウスまたは下肢虚血モデルマウスに TRPC チャンネル選択的阻害薬を投与し、心臓リモデリングの指標である線維化や血管新生に TRPC チャンネルが関与するかどうか検討した。

4. 研究成果

MLP 欠損マウスの心臓で観察された心機能低下（心不全）は、pyrazole-3 投与により部分的に抑制された。心不全の心臓では心肥大に伴う線維化が観察されたのに対し、pyrazole-3 投与群の心臓では線維化が顕著に抑制されていた。興味深いことに、不全心で観察される活性酸素の生成および活性酸素と脂質との反応で生じる 2 次代謝物 (4-hydroxy-2-nonenal) の蓄積が pyrazole-3 投与によりほぼ完全に抑制されていた。MLP 欠損マウスの心臓から単離した心筋細胞では、TRPC3 タンパク量が著しく増加しており、ジアシルグリセロール (DAG) 処置で誘発される細胞外からの Ca^{2+} 流入が増加していた。さらに、DAG 処置により顕著な活性酸素生成が誘発され、この活性酸素生成は TRPC3 の阻害により完全に抑制された。さらに、HEK293

細胞において、Nox2はTRPC3と相互作用し、TRPC6とは相互作用しないことも明らかになった。一方、TRPC3を欠損させたB細胞株において受容体刺激によるPKC活性化が抑制されていたことから、TRPC3がチャネル活性依存的にPKCと相互作用することも明らかにした。以上の結果から、TRPC3はPKCを介してNox2を活性化し活性酸素の生成を誘導する可能性が示された。

次に、TRPC6チャネルの間接的阻害に寄る心不全治療の可能性を検討した。グアニル酸シクラーゼ欠損マウスで生じる心臓リモデリングは、ANP投与により顕著に改善された。ANPおよびPDE5阻害薬はPKGを介してTRPC6のThr69残基をリン酸化すること、およびリン酸化依存的にTRPC6チャネル活性および心筋細胞の肥大化を低下させることが明らかとなった。一方、TRPC6を多く発現する血管平滑筋細胞ではPKGよりもむしろPKAによるリン酸化のほうが強く関与していた。この機構として、TRPC6がPKA、PDE3と複合体を形成することでPDE3阻害剤の感受性を高めている可能性が示された。

pyrazole-3は圧負荷により誘発される心肥大関連遺伝子の発現増加よりもむしろ線維化関連遺伝子(TGF- β , CTGF, ACEなど)の発現増加を有意に抑制していた。また、AngIIやTGF- β 刺激で誘発される心線維芽細胞の線維化応答もまたpyrazole-3処置により有意に抑制された。一方、下肢虚血後の血流障害において、血管平滑筋細胞のTRPC6を抑制することで末梢血流量が有意に増大していた。以上の結果より、心臓リモデリングの原因となる線維化と虚血(血管新生の抑制)はTRPC3/6チャネルを抑制することで有意に改善されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計16件)

1. Nishioka K, **Nishida M**, Ariyoshi M, Saiki S, Jian Z, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R and Kurose H. Protein kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channels underlies suppression of angiotensin II-induced vasoconstriction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2278-2286 (2011). 査読有 DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221010
2. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H and **Nishida M**. TRPC3-mediated Ca^{2+} influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 108-113 (2011). 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.124
3. **Nishida M**, Ogushi M, Suda R, Toyotaka M, Saiki S, Kitajima N, Nakaya M, Kim K-M, Ide T, Sato Y, Inoue K and Kurose H. Heterologous down-regulation of angiotensin type1 receptors by purinergic $P2Y_2$ receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 6662-6667 (2011). 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1017640108
4. Tomonari M, To H, **Nishida M**, Mishima T, Sasaki H, and Kurose H. Mechanism of the cardioprotective effects of docetaxel pre-administration against adriamycin-induced cardiotoxicity. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 336-345 (2011). 査読有 DOI: 10.1254/jphs.10279FP
5. 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 β and ERK activation in B cells. *J. Cell Sci.*, 123, 927-938 (2010). 査読有 DOI: 10.1242/jcs.061051
6. **Nishida M**, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima K, Ide T, Inoue R and Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr⁶⁹ is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J. Biol. Chem.*, 285, 13244-13253 (2010). 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M109.074104
7. **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.*, 285, 15268-15277 (2010). 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M109.076232
8. Kinoshita H, Kuwahara K, **Nishida M**, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, Inoue R, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K and Nakao K. Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the anti-hypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. *Circ. Res.* 106, 1849-1860 (2010). 査読有 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208314
9. Sugihara M, Morita H, Matsuda M, Umebayashi H, Kajioka S, Ito S, **Nishida M**, Inoue R, Futatsuki T, Yamazaki J, Mori Y, Inoue R, Ito Y, Abe K and Hirata M. Dual

- signaling pathways of arterial constriction by extracellular urine 5²-triphosphate in the rat. *J. Pharmacol. Sci.*, 115, 293-308 (2010). 査読有 DOI: 10.1254/jphs.10281FP
10. **Nishida M**, Kitajima N, Saiki S, Nakaya M & Kurose H. Regulation of angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF- κ B. *Nitric Oxide*, 25, 112-117 (2011). 査読有 DOI: 10.1016/j.niox.2010.10.003
 11. **西田基宏**, 澤智裕. 心不全におけるGタンパク質の酸化修飾と活性酸素・親電子シグナル制御, 細胞工学, 査読無, 31 巻, 2012, 150-154.
 12. **西田基宏**. 活性酸素のシグナル伝達, フアルマシア, 査読無, 48 巻, 2012, 9-14.
 13. **西田基宏**. ミトコンドリア活性酸素の生理的役割, 日本薬理学雑誌, 査読無, 査読無, 138 巻, 2011, 129.
 14. **西田基宏**. TRP チャンネル創薬の現状と今後の展望, 日本薬理学雑誌, 査読無, 138 巻, 2011, 223.
 15. **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, 査読無, 135 巻, 2010, 179-183. <http://dx.doi.org/10.1254/fpj.135.179>
 16. **西田基宏**, 齊木翔太, 北島直幸, 仲矢道雄, 佐藤陽治, 黒瀬等. TRPC チャンネルのリン酸化による心血管機能制御, YAKUGAKU ZASSHI, 査読無, 130 巻, 2010, 1427-1433. <http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.130.1427>
- [学会発表] (計 16 件)
1. **西田基宏**, 北島直幸, 仲矢道雄, 黒瀬等 「心臓の線維化におけるジアシルグリセロール活性化型 TRPC チャンネルの役割」 日本薬理学会年会 (2012/3/14, 京都)
 2. 西田基宏 「心臓リモデリングにおける TRPC チャンネルの役割」 細胞電気薬理研究会 (招待講演) (2012/3/13, 京都)
 3. 北島直幸, 斎木翔太, 有富静, 石川達也, 仲矢道雄, 森泰生, 黒瀬等, 西田基宏 「マウスにおいて L/N 型 Ca²⁺チャンネルの持続的阻害は心不全を抑制する」 日本薬理学会年会 (2012/3/15, 京都)
 4. 斎木翔太, 角田将朗, 佐藤陽治, 仲矢道雄, 岩本隆宏, 黒瀬等, 西田基宏 「末梢循環障害における TRPC6 チャンネルの役割」 日本薬理学会年会 (2012/3/16, 京都)
 5. 斎木翔太, 西田基宏, 西岡絹恵, 有吉麻里奈, 仲矢道雄, 黒瀬等 「シロスタゾールは protein kinase A 依存的に TRPC6 チャンネルをリン酸化することでアンジオテンシン II 刺激による血管収縮を抑制する」 日本薬学会薬理系部会 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011/8/31, 東京)
 6. 北島直幸, 森本幸生, 仲矢道雄, 黒瀬等, 西田基宏 「TRPC3 チャンネルは NADPH オキシダーゼ依存的な活性酸素生成を介して心不全を誘発する」 日本薬学会薬理系部会 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011/8/31, 東京)
 7. 斎木翔太, 渡辺邦宏, 佐藤陽治, 仲矢道雄, 喜多紗斗美, 岩本隆宏, 平野勝也, 黒瀬等, 西田基宏 「下肢動脈血行障害における TRPC6 チャンネルの役割」 第 64 回日本薬理学会西南部会 (2011/11/20, 福岡)
 8. Kitajima N, Mishima T, Kurose H & Nishida M. Diacylglycerol-activated TRPC3 channels mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis in mice. 第 10 回 JBS バイオフロンティア国際シンポジウム (2011/11/14, 福岡)
 9. 北島直幸, 渡辺邦宏, 仲矢道雄, 西田基宏, 黒瀬等 Involvement of TRPC3-mediated production of reactive oxygen species in the progression of dilated cardiomyopathy. 第 11 回日本 NO 学会学術集会 (2011/5/13, 東京)
 10. 北島直幸, 浦野泰照, 長野哲雄, 仲矢道雄, 黒瀬等, 西田基宏 Regulation of hypertrophic signaling by functional coupling between Gq protein-coupled receptor and endothelial NO synthase in rat cardiomyocytes. 第 11 回日本 NO 学会学術集会 (2011/5/13, 東京)
 11. 西田基宏 「脂質活性化型 TRPC チャンネルによる心臓リモデリング制御」 第 41 回日本心脈管作動物質学会 (招待講演) (2012/2/11, 秋田)
 12. **Nishida M**, Kitajima N, Nakaya M, Ide T, Sato Y & Kurose H. Inhibition of phosphodiesterase 5 prevents cardiac hypertrophy through phosphorylation of TRPC6 at Thr⁶⁹. XX World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto. (2010/5/14, Kyoto)
 13. Mishima T, **Nishida M**, Nakaya M, Ide T, Sato Y & Kurose H. G $\alpha_{12/13}$ mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis through production of reactive oxygen species. XX World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto (2010/5/14, Kyoto)
 14. **Nishida M**, Ogushi M, Suda R, Nakaya M & Kurose H. ATP decreases angiotensin type 1 receptor expression through S-nitrosylation of nuclear factor κ B. The 6th international conference on the biology, chemistry, and

therapeutic applications of nitric oxide
(2010/6/14, Kyoto)

15. **西田基宏**、大串真理子、須田玲子、仲矢道雄、黒瀬等 「活性酸素／NOシグナル複合体形成によるNF-κBの機能制御」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 BMB2010 (2010/12/10, 神戸)
16. **西田基宏** 「Study on the role of heterotrimeric G protein signaling pathways for the treatment of heart failure」第84回日本薬理学会年会 (2011/3/23, 横浜)

[図書] (計3件)

1. **Nishida M***, Sunggip C, Kitajima N & Kurose H. *Angiotensin: New Research*, Redox regulation of angiotensin receptor signaling in the heart. NOVA Publishers (New York) 10 頁 (2012)
https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=24714
2. **Nishida M**, Ohba M, Nakaya M & Kurose H. *Heart Failure: Symptoms, Causes and Treatment Options*. NOVA Publishers (New York) 22 頁(2010)
https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=15335
3. Nakaya M, Ohba M, **Nishida M** & Kurose H. Chapter for “*Receptor Signal Transduction Protocols*” the Humana Press “*Methods in Molecular Biology*” series 20 頁(2010)
<http://www.springerlink.com/content/x2588w43p781374l/?MUD=MP>

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

薬効安全性学分野

<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

九州大学薬学部

<http://www.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田基宏 (九州大学大学院薬学研究院)

研究者番号：90342641

(2)(3)該当なし