

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 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790209

研究課題名（和文） TRIC-A 欠損マウスにおける循環機能の異常

研究課題名（英文） Abnormal circulatory function in TRIC-A-knockout mice

研究代表者

山崎 大樹（YAMAZAKI DAIJU）

京都大学・生理化学研究ユニット・特定講師

研究者番号：40467428

研究成果の概要（和文）：

本研究では TRIC-A 欠損マウスにて観察された高血圧及びイソプロテレノールによる心肥大などの循環機能異常の発症メカニズムの解明を目指した。高血圧は血管平滑筋におけるトーン調節の異常であることが判明した。一方で、イソプロテレノールによる心臓への影響は心肥大に比べて線維化が顕著であることが明らかとなった。残念ながら研究期間内では線維化メカニズムの解明には至らなかったが、他の研究種目にて引き続き実施予定である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this project is to examine the pathogenic mechanism of abnormal circulatory function such as hypertension and isoproterenol (Iso) induced hypertrophy in TRIC-A-knockout mice. It was found that hypertension was caused by abnormality of vascular tonus regulation in TRIC-A-knockout vascular smooth muscle cells. On the other hand, cardiac fibrosis but not hypertrophy was significantly induced by Iso infusion using osmotic pump in TRIC-A-knockout mice. Unfortunately, it was unclear the mechanism of cardiac fibrosis during research period. We will try to examine this project in another one.

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	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：微小循環・末梢循環・循環力学・循環調節・カウンターイオン・カルシウム

1. 研究開始当初の背景

研究代表者のグループは、小胞体及び核膜に分布する新規小胞体分子として TRIC (trimeric intracellular cation) チャンネルを数年前に同定した。TRIC チャンネルは分子量約 33kDa で三量体を形成する。また、電気

生理学的実験から細胞内膜系において主に K⁺ 透過性チャンネルとして機能することが示された。動物組織には TRIC-A 及び-B の 2 種類のサブタイプが独自パターンで分布しており、多くの細胞系で両者の共発現が観察される。両サブタイプの完全同時欠損 (TRIC-DKO)

マウスは胎生心不全で死亡し、その心筋細胞においてはRyRを介する小胞体Ca²⁺放出の減弱により生じた異常が観察された(Yazawa et al., *Nature* 2007)。一方、新生致死を示すTRIC-B 単独欠損マウスは呼吸不全により死亡する。その肺組織を詳細に解析した結果、TRIC-B 欠損によりII型肺胞上皮細胞のIP₃Rを介した小胞体Ca²⁺放出が減弱し、ガス交換機構に必要な不可欠なサーファクタント合成及び分泌が極度に障害されていることが判明した(Yamazaki et al., *Development* 2009)。従って、TRICチャンネルは小胞体Ca²⁺放出と連動して機能するカウンターイオンチャンネルであることが強く示唆される。

2. 研究の目的

致死性を示すTRIC-DKO、TRIC-B 欠損マウスとは異なり、正常に成育・繁殖するTRIC-A 欠損マウスでは、高血圧、βアドレナリン受容体刺激による心肥大といった循環器系異常が観察されており、本研究ではそれら病態の発症メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) TRIC-A 欠損マウスにおける高血圧発症機序の解明

①血圧測定

正常マウス及びTRIC-A 欠損マウスの血圧測定は、圧センサーを麻酔下で頸動脈から挿入し、24時間連続的に血圧を測定する血圧テレメトリーと、マウスを保温カブに入れ安静後、尻尾で血圧を測定するテールカフ法を行った。血圧テレメトリーは5分置きに10秒間データ取得し、2時間の平均値として算出した。またテールカフ法では薬物投与前後の血圧を測定し、その差を算出した。

②血管径モニタリング

腸間膜動脈の最遠位血管を1-2 mm (受動的な血管径が120-150 μm) 摘出し、脂肪を除去した。両端からガラスピペットを挿入し、CCDカメラによる血管モニタリングを行った。

③細胞内Ca²⁺濃度測定

腸間膜動脈第一分枝を摘出し、脂肪を除去した。血管を開き、ガーゼで内皮を除去後、5 μM Fura-PE3 AMを室温にて3時間負荷した。色素負荷後、ガラスボトムディッシュ上のピンに張り付け、一定時間細胞外液を灌流した後に、Ca²⁺イメージング装置にて測定した。

④血管平滑筋細胞の単離

腸間膜動脈を腸管ごと摘出し、腸管から腸間膜動脈を切り離した。切り離した腸間膜動脈から脂肪を除去し、1 mm程度の長さに切った。それをCa²⁺、Mg²⁺-free Hank's 液で37°C、30分間インキュベートし、次いでコラゲナーゼを含んだCa²⁺、Mg²⁺-free Hank's 液中で37°C、40分間インキュベートした。その後、組織片をKraft-Bruhe solution に移し替え、

先端を切ったチップを用いて激しくピペティングした。最後に組織塊をフィルターにて取り除き、実験に用いた。

⑤Ca²⁺スパーク測定

単離血管平滑筋細胞に5 μM Fluo-4 AMを室温にて10分間負荷し、全反射顕微鏡にて細胞表面で生じるCa²⁺スパークを計測した。

⑥STOCs測定

単離血管平滑筋細胞に抵抗値2-5 MΩの電極を刺し、ホールセルパッチクランプ法にてSTOCsを測定した。

⑦膜電位測定

単離血管平滑筋をガラスボトムディッシュに撒き、200 nM OxonolVIを含んだ細胞外液で室温にて20分間灌流した。実験中は常にOxonolVIを細胞外液に添加した。測定は共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus社)にて行った。

⑧Case-control試験

愛媛大学が中核となり、インフォームドコンセントを得られた健常人及び高血圧患者(それぞれおよそ1,100人)の血液サンプルに対してTRIC-A遺伝子のSNPs解析を行った。

⑨GEANE試験

国立循環器病センターが中核となり、汎用される降圧薬であるサイアザイド利尿薬(TZD, indapamide, 2 mg/day)、アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB, valsartan, 80 mg/day)とCa²⁺チャンネル阻害薬(CCB, amlodipine, 5 mg/day)を高血圧患者約130名に処方して、それぞれの降圧効果を検討するとともに、血液試料から遺伝子を抽出する臨床試験(GEANE試験)が既に行われている。このGEANE試験においてTRIC-A遺伝子における高血圧リスクSNPs解析を行った。

(2) TRIC-A 欠損におけるイソプロテレノール誘発性心肥大の発症機序に関する研究

①浸透圧ポンプによる薬物負荷

各種薬物(60 mg/kg/day Iso, 467 ng/kg/day AngII, 75 mg/kg/day PE)を必要量はかり取り生理食塩水に溶解後、浸透圧ポンプへ注入した。その後吸入麻酔下のマウスの皮下(背中)へポンプを挿入しクリップで留めた。2週間後に体重、心重量、肝重量、肺重量を測定するとともに心臓についてはホルマリン固定し、パラフィン包埋・薄切後HE染色あるいはマッソン・トリクローム染色を行い、細胞断面積及び線維化について評価した。

②心エコー・心カテーテル

薬物処置後2週間のマウスに対して適用し、心臓機能評価を行った。

③マイクロアレイ及びリアルタイムPCR

正常マウスとTRIC-A 欠損マウスに対してIsoの溶媒である生理食塩水を負荷したコントロール群及びIso投与群、計4群を作製し

2週間後に心臓を回収しRNA抽出を行った。一部はマイクロアレイに用いた。残りは逆転写を行い、リアルタイムPCRを各種心肥大マーカーや線維化マーカー、イオンチャネル、受容体、シグナル伝達系について mRNA 発現量を比較した。

④ウェスタンブロット

Ca²⁺ハンドリングに関わる分子についてそのタンパク発現量及びリン酸化を検討するためウェスタンブロットを行った。薬物処置したマウスより心臓を回収し、ホモジナイズ・遠心後、一定のタンパク濃度の試料をアクリルアミドゲルにて電気泳動しメンブレンに転写後、各分子の特異的抗体にて免疫反応させ、2次抗体で検出した。

⑤新生児心筋細胞の単離及び心肥大実験

P0 あるいは P1 の新生児より心臓を摘出し心耳部分を顕微鏡下で除去した。1 mm 片程度に細かくし、コラゲナーゼ/トリプシンにより心筋細胞を単離した。混在する線維芽細胞をシャーレ上で 37°C、1 時間インキュベートすることで取り除き純度の高い心筋細胞を得た。これを心肥大の実験に用いた。心肥大の実験は培養上清中に各種薬物を添加し、F-actin マーカーである phalloidin と心筋細胞マーカーである α -actinin により免疫染色し、両者が陽性である細胞の面積を解析・比較した。

4. 研究成果

(1) TRIC-A 欠損マウスにおける高血圧発症機序の解明

血圧テレメトリーの結果から TRIC-A 欠損マウスは昼間の時間帯のみ高血圧を示すことが明らかとなった。また、TRIC-A 欠損マウスにて Ca²⁺チャネル阻害薬により高血圧が改善したことから、L 型 Ca²⁺チャネルが発現する血管平滑筋での異常が示唆された。次いで、典型的な抵抗血管である腸間膜動脈を摘出し、血管径及び細胞内 Ca²⁺濃度の測定を行ったところ、Ca²⁺チャネルを介した Ca²⁺流入が増加し定常的な細胞内 Ca²⁺濃度が上昇した結果、血管が恒常的に収縮していることが明らかとなった。これは Ca²⁺スパークの測定の結果から、血管平滑筋において自発的なリアノジン受容体 (RyR) からの Ca²⁺放出、つまり Ca²⁺スパーク頻度が減少したためであることが判明した。さらに STOCs 及び膜電位測定の結果から、Ca²⁺スパーク頻度の減少が細胞表層膜の Ca²⁺活性化 K⁺(BK) チャネル活性 (spontaneous transient outward currents, STOCs) 頻度を低下させ、膜電位を脱分極させることで血管平滑筋の恒常的収縮を引き起こし、高血圧に至ったと結論した (図)。以上の結果は、TRIC チャネルが血管トーン調節に深く寄与することを示唆するものである。さらに共同研究により、ヒト TRIC-A に

おける SNPs が本態性高血圧の発症に関係し、TRIC-A SNPs を有する高血圧患者では降圧薬感受性が有意に低いことを明らかにした。このように、マウスにおける TRIC-A 欠損及びヒトにおける TRIC-A SNPs が高血圧を発症させることから TRIC-A の有無あるいは活性の差が血管トーン調節に寄与していることが明らかとなった。TRIC チャネル自体は比較的新規でありまだまだ研究途上の分子であることから、本研究を発端として本態性高血圧の治療薬開発へと繋がることを期待する。

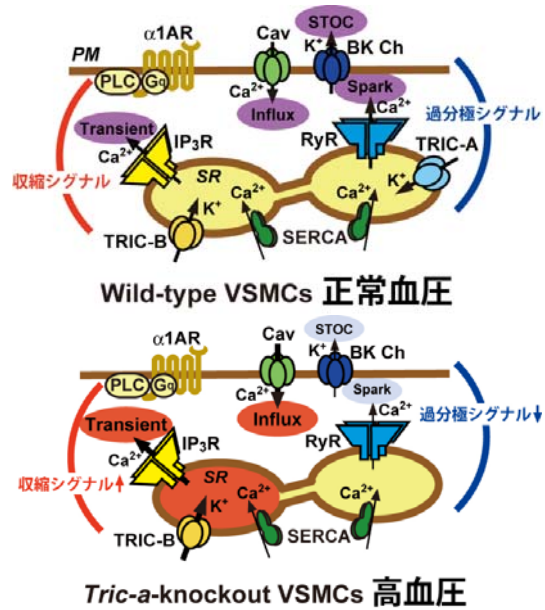


図 TRIC-A 欠損血管平滑筋細胞における Ca²⁺シグナル異常

(2) TRIC-A 欠損におけるイソプロテレノール誘発性心肥大の発症機序に関する研究

TRIC-A 欠損マウスに対して 60 mg/kg/day のイソプロテレノール (Iso) を 2 週間持続投与すると、野生型マウス (WT) に比べて顕著な心重量/体重比の増加に加えて心筋細胞断面積の増大も観察された。さらには心エコーでの左室壁肥厚も確認された。このような現象は AngII や PE では観察されなかった。そこで心肥大発症機序を詳細に検討するため、新生児心筋細胞を単離・培養して Iso による心筋細胞肥大を検討した。しかし新生児心筋細胞では顕著な肥大は観察できなかった。これはウェスタンブロットの結果から成獣と新生児マウス心臓においてリアノジン受容体やホスホランバンなど Ca²⁺シグナリングに関わる分子のリン酸化レベルの差異が原因であると推測された。次に成獣マウスにおいて対照として生理食塩水を投与した正常マウス、TRIC-A 欠損マウスを加えた 4 群の心臓から RNA を抽出し、マイクロアレイによる RNA 発現解析を行った。Iso 刺激により正

常マウスと TRIC-A 欠損マウスの間で大きく発現量が増加したものの中に心肥大に関わる因子はなかった。 β MHC などの心肥大マーカー発現量は TRIC-A 欠損マウス Iso 刺激群で顕著に増加していなかった一方で、コラーゲンやペリオスチンなどの線維化マーカー発現量が TRIC-A 欠損マウス Iso 刺激群で顕著に増加していた。一方で、心重量/脛骨長比では正常マウスと TRIC-A 欠損マウスではほとんど変化なしという結果を得た。従って、Iso による持続刺激は TRIC-A 欠損マウス心臓において、心肥大ではなく顕著な線維化を誘発させることが明らかとなった。

TRIC-A 欠損マウスにおける Iso 刺激は心肥大に比べて顕著な線維化を引き起こすことを明らかにした。線維化発症メカニズムの解明には至らなかったが、顕著な線維化は心肥大に比べて心臓のポンプ機能を低下させる現象であり、この発症機序の解明は心筋梗塞や虚血再灌流後の心臓線維化メカニズムにも通じると期待される。今後、Iso 誘発性線維化メカニズムについて詳細な検討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 8 件)

①Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogihara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T & Takeshima H. TRIC-A Channels in Vascular Smooth Muscle Contribute to Blood Pressure Maintenance. *Cell Metabolism*, 14, 231-241, 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.cmet.2011.05.011
京都大学学術情報リポジトリ:
<http://hdl.handle.net/2433/143634>

②Kito H, Yamazaki D, Ohya S, Yamamura H, Asai K & Imaizumi Y. Up-regulation of Kir2.1 by ER stress facilitates cell death of brain capillary endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 293-298, 2011. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.128

③Zhao X, Yamazaki D, Kakizawa S, Pan Z, Takeshima H & Ma J. Molecular architecture of Ca^{2+} signaling control in muscle and heart cells. *Channels*, 5, 389-394, 2011. 査読有 DOI: 10.4161/chan.5.5.16467

④Yamazaki D, Kito H, Yamamoto S, Ohya S, Yamamura H, Asai K & Imaizumi Y. Contribution of $K_{ir}2$ potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstituted HEK293 cell model. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 300, C75-C86, 2011. 査読有 DOI: 10.1152/ajpcell.00135.2010

⑤Zhao X, Yamazaki D, Park K-H, Komazaki S, Tjondrokoesoemo A, Nishi M, Lin P, Hirata Y, Brotto M, Takeshima H & Ma J. Ca^{2+} overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 37370-37376, 2010. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M110.170084

⑥Pitt SJ, Park KH, Nishi M, Urashima T, Aoki S, Yamazaki D, Ma J, Takeshima H & Sitsapesan R. Charade of the SR K^{+} -channel: two ion-channels, TRIC-A and TRIC-B, masquerade as a single K^{+} -channel. *Biophysical Journal*, 99, 417-426, 2010. 査読有 DOI: 10.1016/j.bpj.2010.04.051

⑦山崎大樹、山本伸一郎、竹島浩 小胞体 Ca^{2+} 放出における TRIC チャンネルの生理的役割 日薬理誌 135, 99-103, 2010. 査読無

⑧山崎大樹 小胞体における TRIC チャンネル機構 医学のあゆみ vol. 235, p341, 2010. 査読無

[学会発表] (計 12 件)

①Yamazaki D and Takeshima H. Arrhythmic Ca^{2+} signaling in the heart of Tric-a-knockout mice. 第 89 回日本生理学会大会. 2012/3/30. 長野県松本文化会館 (長野県)

②山崎大樹 喜多紗斗美、西美幸、今泉祐治、岩本隆宏、竹島浩. 血管平滑筋における TRIC-A の血圧維持機構. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012/3/14. 国立京都国際会館 (京都府)

③Park KH, Yamazaki D, Naitou D, Zhao C, Pan Z, Takeshima H, Ma J. Arrhythmic intracellular Ca^{2+} signaling and electrocardiogram in the heart of Tric-a $^{-/-}$ mice. Biophysical Society 56th annual meeting. 2012/2/26. San Diego (USA)

④Zhao C, Yamazaki D, Tabara Y, Hanada H, Nishi M, Miyata T, Miki T, Takeshima H.

TRIC-A Gene polymorphism associated with hypertension patients. 8th AFMC International Medicine Chemistry Symposium. 2011/12/1. 京王プラザホテル (東京都)

⑤ Yamazaki, Kita S, Naitou D, Nishi M, Imaizumi Y, Iwamoto T, Takeshima H. TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance. 8th AFMC International Medicine Chemistry Symposium. 2011/12/1. 京王プラザホテル (東京都)

⑥ 山崎大樹、喜多紗斗美、内藤大督、西美幸、今泉祐治、岩本隆宏、竹島浩. TRIC-A チャンネルは血管平滑筋において血管調節に寄与する. 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2011/10/22. 神戸学院大学 (兵庫県)

⑦ 内藤大督、山崎大樹、竹島浩. 血管平滑筋における TRIC-A チャンネルは血圧調節に寄与している. 第 84 回日本生化学会大会. 2011/9/24. 国立京都国際会館 (京都府)

⑧ Tao S, Yamazaki D, Takeshima H. TRIC-A channel and cardiac hypertrophy. The 6th SKO Joint Symposium. 2011/6/2. Seoul National University (Korea)

⑨ Yamazaki D, Kita S, Komazaki S, Naitou D, Nishi M, Yamamura H, Imaizumi Y, Iwamoto T, Takeshima H. TRIC-A channel and blood pressure regulation. Biophysical Society 55th annual meeting. 2011/3/7. Baltimore (USA)

⑩ 山崎大樹、竹島浩. TRIC-A チャンネルと血圧調節. 平成 22 年度 生理研研究会「イオンチャンネル・トランスポーターと心血管機能：細胞機能の分子機序とその統合的理解」. 2010/11/5. 岡崎カンファレンスセンター (愛知県)

⑪ Yamazaki D, Yamamoto S, Nishi M, Takeshima H. TRIC channel function in sarco/endoplasmic reticulum. 第 87 回日本生理学会大会. 2010/5/21. 盛岡市民文化ホール (岩手県)

⑫ Yamazaki D and Takeshima H. Ca²⁺ signaling dysfunction in embryonic cardiomyocytes of lacking RyR, JP or TRIC channels. XX World Congress ISHR 2010 Kyoto. 2010/5/13. 国立京都国際会館 (京都府)

[その他]

ホームページ等

・ 京都大学 研究成果発表

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2011/110802_1.htm

・ 京都大学薬学研究科生体分子認識学分野

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/news26.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 大樹 (YAMAZAKI DAIJU)

京都大学・生理化学研究ユニット・特定講師

研究者番号：40467428

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし