

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591095

研究課題名(和文) 伸展刺激感受性イオンチャネルの機能解析に基づく心筋症・心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Improvement of therapeutic methods for cardiomyopathy/heart failure based on the functional analysis of stretch-activated ion channel

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・研究所・室長

研究者番号：80171908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症・心不全では筋細胞変性により心臓のポンプ機能が著しく低下する。細胞骨格系蛋白質の異常に基づく筋変性では持続的な細胞内へのCa²⁺流入が細胞死の共通の危険因子となること、伸展刺激感受性イオンチャネル(TRPV2)が病態と密接に関与することを報告してきた。しかしながら、特異的阻害剤がないのが現状である。拡張型心筋症患者及びモデル動物ではTRPV2が心筋細胞形質膜に濃縮し、活性化していることを明らかにした。また特異的にTRPV2を抑制する方法を見出した。TRPV2を抑制すると心筋症モデル動物における心筋細胞内Ca²⁺濃度異常が是正され、心機能の悪化が防止され、延命効果が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy (DCM) is a severe disorder defined by ventricular dilation and cardiac dysfunction. A subset of familial DCM is caused by mutations of the genes encoding cytoskeleton. Here, we show that transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) is highly concentrated in the ventricular sarcolemma of patients with idiopathic DCM and animal models of cardiomyopathy. We found some tools to inhibit the surface expression of and Ca²⁺ influx via TRPV2. In the animal models, blockade of TRPV2 ameliorated cardiac dysfunction, and prevented DCM progression; Therefore, we propose that sarcolemmal accumulation or activation of TRPV2 initiated by membrane instability resulting from cytoskeleton abnormalities contributes to cardiac dysfunction in DCM, and TRPV2 may be a promising therapeutic target for advanced heart failure.

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

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症、筋ジストロフィー症などの難病、さらには心筋梗塞、心不全などの循環器疾患では病態の最終局面で細胞死が起こる。これらの筋変性疾患は、遺伝的・後天的を問わずさまざまな病因によって発症するが、数年前に申請者は持続的な細胞内への Ca^{2+} 流入が細胞死の共通の危険因子となること、それをもたらす有力な候補蛋白質、伸展刺激感受性イオンチャネル (TRPV2) を同定した (J. Cell Biol. 161. 957-967 2003, Circ Res 93. 829-838 2003)。1) TRPV2 は正常筋細胞では細胞内小胞に存在するが、筋変性疾患を起こした心筋・骨格筋の細胞形質膜に濃縮して存在すること、2) TRPV2 のアンチセンス遺伝子導入により細胞形質膜に存在する TRPV2 が減少し Ca^{2+} 動態の異常および伸展刺激に対する細胞変性が軽減されること、3) TRPV2 を心臓細胞形質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。これらの実験結果から TRPV2 が筋変性疾患治療薬の有力な標的分子であることが示唆された。実際チャネル活性のないドミナントネガティブ変異体を筋ジストロフィーマウスに導入することにより TRPV2 活性阻害に基づく Ca^{2+} 流入の減少と病態改善効果が確認できた (Hum. Mol. Gen. 2009 18.824-834 2009, FEBS Lett. 583. 3600-3604, 2009)。しかしながら、心筋における TRPV2 の生理的、病態的役割は不明であり、TRPV2 特異的阻害剤も皆無である。

2. 研究の目的

TRPV2の心筋における生理的役割、病態的意義を明確にするとともに、TRPV2が心疾患の有力な治療標的になることを確定することを本研究の到達目標とする。研究は2つの方向性ですすめる。

(1) 医薬品、内因性ペプチドを用いた網羅的ハイスループットスクリーニング、そこから浮かび上がったTRPV2制御候補化合物の特異性検証、さらに優れた制御剤を発見することである。

(2) 新規TRPV2結合蛋白質の発見、TRPV2の構造・機能解析、ノックアウトマウスの病態解析などを通してTRPV2の生理機能・病態的役割を明らかにする。筋変性によってTRPV2が形質膜に局在する分子メカニズムを明らかにするこれらの研究は新しい発想に基づく阻害法：生理的に重要な機能は保持した疾患治療法(たとえば形質膜から細胞質への移行を促進する膜透過型ペプチド、伸展刺激感受性阻害膜透過型ペプチドなど)を得るためのプロジェクトであり到達目標である。心筋症モデル動物を用いて新しい発想に基づくTRPV2阻害剤の病態改善効果を検討する。

3. 研究の方法

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。薬剤のTRPV2阻害作用の有無はアッセイ系(特開2007-259745)を用いて調べた。TRPV2阻害作用が確認された薬剤を用いた病態改善効果は心筋症ハムスターを用いて検討した。9週令心筋症ハムスターに2週間あるいは4週間、薬物投与し非投与群と比較した。心機能を心超音波、心電図より測定、生化学的指標として心不全マーカー(ANP, 心筋トロポニンI)の血清中含量を測定した。摘出心筋のヘマトキシリン・エオジン染色、マッソントリクローム染色により形態的評価を行った。

4. 研究成果

(1) TRPV2阻害剤のスクリーニングおよび疾患モデル動物を用いた阻害剤有効性の検討

TRPV2 阻害剤を探索するため、マウス 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) (特開 2007-259745) で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 種類選び) 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。さらに同様なスクリーニングによって、C という低濃度 ($\text{IC}_{50} = \sim 1\mu\text{M}$) で有効な薬剤を見出した。A3, A48, A63, C はマウスだけでなくヒト TRPV2 活性も阻害した。これらの薬剤は、類似 TRP チャネルメンバー TRPV1, TRPC1 などはほとんど阻害しなかった。A による *mdx* を用いた筋ジス改善効果は既に報告したが、本研究においてさらに心筋症ハムスターを用いて上記新規 TRPV2 阻害剤の効果を調べた。TRPV2 阻害薬を投与しない対照群に比べ、左室内径収縮率 (fractional shortening) が上昇し心機能の有意な改善が認められた。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 は心筋症心機能改善を示さなかった。従って、これら TRPV2 を阻害する薬剤は筋ジスだけでなく心筋症筋変性を抑制する効果があることが判明した。

(2) TRPV2 の細胞膜への移行阻害剤の開発

特異性ヒト心筋症患者心筋組織 TRPV2 染色により原因不明の心筋症においても TRPV2 が細胞膜に濃縮していることが明らかになった。心筋症発症と TRPV2 活性化との関係を明確にするため心筋症ハムスターから心筋細胞を単離した。正常心筋では TRPV2 は介在板に局在していたが、心筋症心筋細胞では介在板だけでなく細胞膜に TRPV2 が濃縮し、2-APB に対する細胞内 Ca^{2+} 反応も有意に上昇していた。これらのことは心筋症など筋変性疾患において TRPV2 が細胞膜上で活性化していることを示している。筋変性疾患では TRPV2 が細胞膜に濃縮しており何らかの蛋白質と TRPV2 の細胞質ドメインが相互作用している可能

性が考えられた。そこで TRPV2 の細胞質ドメインを過剰発現させてドミナントネガティブ効果による細胞膜 TRPV2 濃縮の抑制を試みた。TRPV2 発現 HEK293 細胞において通常では TRPV2 が細胞膜に発現し活性化している。そこに TRPV2 のアミノ N 末端(N 末)ドメイン(a.a.1-387)を導入すると細胞内への移行が促進され、細胞膜 TRPV2 が減少した。それに伴い 2-APB の反応が減弱した。他方、カルボキシ末端(C 末)ドメイン導入ではこのような効果が認められなかった。この結果から、TRPV2 の N 末ドメインを筋変性動物に導入し、内在性の TRPV2 の形質膜発現を抑制することにより病態が改善されることが期待された。In vivo へ利用する前にまず筋変性をおこすモデル細胞系で検討した。TRPV2 の N 末ドメインを容易に細胞に取り込ませるために、HIV ウイルスの細胞内導入膜透過性 TAT ペプチドを利用し、アルギニン 11 個からなるペプチドを N 末ドメインと融合させたものを大腸菌で発現させ精製した(11R-NT)。11R-NT は容易に筋細胞に取り込まれ、11R-NT の細胞内導入により筋ジストロフィー筋細胞における TRPV2 の細胞膜発現は減少した。また 11R-NT 濃度依存的にストレッチ刺激による筋変性も抑制された。次に心筋特異的にこの N 末を導入したトランスジェニックマウス(NT-Tg)を作製した。このマウスを用い心筋症発症への影響を調べ、心不全病態で TRPV2 が細胞膜上で活性化されていることが心不全悪化と密接に関与するかを検討した。また TRPV2 を不活性化することにより心疾患動物が延命するかどうかについて調べた。NT-Tg マウスを拡張型心筋症発症マウス(4C30)と交配させると(4C30/NT-Tg)、拡張型心筋症発症時期の遅延、心機能低下の抑制、延命が観察された。4C30 心筋で観察される Ca 濃度異常、CaMKII の活性化も抑制された。以上の結果は心筋症、心不全など筋変性疾患において細胞膜で活性化している TRPV2 は病態発症及び悪化に重要であること、活性化 TRPV2 を細胞内へ移行させ不活性化させることで病態が改善されることが明らかになった。これらの結果はまとめて論文報告し、Cardiovascular Research 2013 Vol. 99 (4) の Editor's choice になり表紙にも図が掲載された。今後、大型筋ジス動物を用いた TRPV2 特異的阻害剤の有効性の検証、ヒトへの臨床応用へと展開していきたい。

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 3 件)

Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S: Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*,99:760-768, 2013 doi: 10.1093/cvr/cvt163.査読有

Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y: Global metabolic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.*,59:76-85,2013 doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.008.査読有

Iwata Y, Suzuki O, Wakabayashi S: Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator for muscle damage. *Muscle & Nerve*,47:372-378, 2013 doi: 10.1002/mus.23632.査読有

[学会発表](計 18 件)

鎌内慎也、岩田裕子、Cheng-Kun Du, Dong-Yun Zhan、森本幸生、白井幹康、若林繁夫: TRPV2 N 末ドメインの高発現は、トロポニン T 変異を持つ拡張型心筋症モデルマウスの症状を改善する 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 20 日 仙台国際センター
岩田裕子、大武仁美、鎌内慎也、若林繁夫: Ca²⁺透過チャンネル TRPV2 の細胞膜局在の阻害により拡張型心筋症モデル動物の病態進行が抑制された。 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 21 日 仙台国際センター

岩田裕子: Ca²⁺透過チャンネル TRPV2 を標的とした拡張型心筋症・心不全新規治療薬を目指して ジョイントリサーチプロジェクト 第 5 回ミーティング 2013 年 12 月 20 日 国立循環器病研究センター

岩田裕子、鈴木伸之、若林繁夫: 癌悪液質における骨格筋萎縮に Ca²⁺透過チャンネルは関与するか? 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜

Kamauchi S, Iwata Y, Wakabayashi S: Prostaglandin D2 metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜

Maekawa K, Iwata Y, Tajima Y, Ueno N, Nishimaki-Mogami T, Ishikawa M, Murayama M, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Saito Y: Lipidomic analysis of heart tissues from a hamster model for dilated cardiomyopathy. 9th Annual Conference of the Metabolomics Society 2013年7月1-4日 SECC Glasgow/Scotland

Hirayama A, Sugawara S, Abe H, Iwata Y, Maekawa K, Tomita M, Minamino N, Saito Y, Wakabayashi S, Soga T: A metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy using capillary electrophoresis-mass spectrometry. 9th Annual Conference of the Metabolomics Society 2013年7月1-4日 SECC Glasgow/Scotland

岩田 裕子、若林繁夫：筋細胞膜の低下したシアル酸含量は筋変性疾患における傷害の高感度マーカーである 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21-23 日 福岡

鎌内慎也、岩田 裕子、若林繁夫：拡張型心筋症モデル動物におけるプロスタグランジンD2尿中代謝物の増加 第86回日本薬理学会年会 2013年3月21-23日 福岡

岩田 裕子： Inhibition of Ca^{2+} -permeable channel TRPV2 provides the beneficial effects on cardiomyopathy 第 9 回日仏国際シンポジウム 2012 年 9 月 7-8 日 東京

Maekawa K, Tajima Y, Ueno N, Ishikawa M, Murayama M, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Iwata Y, Minamino N, Wakabayashi S, Saito Y: Lipidomic analysis of heart tissues in a hamster model for dilated cardiomyopathy. 53rd International Conference on the Bioscience of Lipids 2012 年 9 月 4-9 日 Banff, Canada

岩田 裕子、若林 繁夫：拡張型心筋症モデル動物における P2X 受容体亢進の病態的意義 第 85 回日本薬理学会年会 2012 年 3 月 16 日 国立京都国際会館（京都）

岩田裕子： Ca^{2+} 透過性チャネル TRPV2 の選択的阻害に基づく筋変性疾患治療法の開発 Bio Japan 2011 アカデミックシーズ発表会 2011 年 10 月 7 日 パシフィコ横浜

田島陽子、前川京子、上野紀子、村山真由子、徳江繭子、中西広樹、田口良、岩田裕子、南野直人、若林繁夫、斎藤嘉朗：拡張型心筋症モデルハムスターの血漿における脂質メタボローム解析 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日 京都国際会議場

前川京子、田島陽子、上野紀子、村山真由子、徳江繭子、香取典子、中西広樹、田口良、岩田裕子、南野直人、若林繁夫、斎藤嘉朗：拡張型心筋症モデルハムスターの心筋における脂質メタボローム解析 リン脂質バイオマーカーの探索 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日 京都国際会議場

斎藤嘉朗、前川京子、田島陽子、上野紀子、徳江繭子、村山真由子、香取典子、中西広樹、岩田裕子、南野直人、若林繁夫、田口良：拡張型心筋症モデルハムスターの心筋におけるトリアシルグリセロールのメタボローム解析 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日 京都国際会議場

岩田裕子、若林 繁夫：心筋症ハムスターにおける P2X 受容体亢進の病態的役割 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21-24 日 京都 国立京都国際会館

岩田裕子： Ca^{2+} 透過性チャネル TRPV2 の選択的阻害に基づく筋変性疾患治療法の開発

Chp I J a p a n バイオビジネスアワード JAPAN 受賞者セミナー 2011 年 7 月 13 日 大阪 インテック大阪

〔図書〕(計 2 件)

Iwata Y, Wakabayashi S: Abnormal Ion Homeostasis and Cell Damage in Muscular Dystrophy Hegde, M., Ankala, A. Muscular Dystrophy InTech Croatia 2012 143-158

Iwata Y, Wakabayashi S: Animal Models of Muscular Dystrophy Aroad Szallasi, Tamas Biro TRP channel in Drug Discovery Vol. II Humana Press Netherlands 2012 457-478

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：筋傷害の簡便検査方法及び筋傷害検査用キット

発明者：鈴木 治、岩田 裕子

権利者：基盤研、国循

種類：特許証

番号：第 4997441 号

取得年月日：2012 年 5 月 25 日取得

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ncvc.go.jp/res/bunshi/bunshij.html>

新聞記事 2012 年 1 月 9 日 日経朝刊「筋ジスの発症物質発見」

論文が Cardiovascular Research 2013 Vol. 99 (4) の Editor's choice になり表紙にも図が掲載された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 裕子 (IWATA, Yuko)

国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：80171908