

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591095

研究課題名(和文)心不全発症・進展における新規治療標的としてのTRPC6/3の意義の解明

研究課題名(英文)Blockade of TRPC6/3 is a Novel Therapeutic Approach Against Pathological Cardiac Remodeling

研究代表者

木下 秀之(Kinoshita, Hideyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：30467477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心不全発症や進展に関係するアンジオテンシンIIやエンドセリン-1などの受容体刺激で活性化される、受容体活性化型CaチャンネルであるTRPC6/3に関し、TRPC6/3阻害による病的な心臓リモデリング抑制効果について検討した。慢性心不全モデルマウスにおいて、TRPC6/3阻害効果を有する薬剤を投与し、左室収縮能低下が抑制された。またTRPC阻害薬は、肺高血圧モデルマウスにおける、肺動脈圧の上昇や右室肥大の進展の抑制を認めた。以上結果は、TRPC6/3を標的とした治療が病的な心臓リモデリング抑制に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of transient receptor potential subfamily C (TRPC) 6/3 in pathological cardiac remodeling.

In model mice of chronic heart failure, blockade of TRPC6/3 significantly attenuated decrease of left ventricular systemic function without affecting blood pressure. Blockade of TRPC6/3 also inhibited PAH and RVH induced in pulmonary hypertension model animals. Blockade of TRPC6/3 could be a novel therapeutic strategy for preventing pathological cardiac remodeling.

研究分野：心不全

キーワード：心不全

### 1. 研究開始当初の背景

薬物、非薬物療法の進歩にもかかわらず、心不全は予後不良の疾患であり、心不全発症にいたる病的筋リモデリングの分子機序の解明を通じた新たな治療標的の発見が必須である。

最近、我々は、アンジオテンシン II やエンドセリン-1 などの受容体刺激で活性化される受容体活性化型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルである TRPC6 が、種々の心肥大モデル動物やヒトの拡張型心筋症の心臓で発現が亢進し、calcineurin-NFAT 経路の活性化を通して病的な筋リモデリングに関与していることを明らかとした。また従来より病的な筋リモデリング抑制効果が報告されている ANP/BNP に関して、共通の受容体 GC-A を介した直接の TRPC6 のリン酸化が ANP/BNP の抗心肥大作用において重要な役割を持つことを明らかとし、TRPC が筋リモデリングの過程における病的シグナルと心保護的シグナルのクロストークの場として機能していること示した (Kuwahara K, et al. JCI. 2006, Kinoshita H, Kuwahara K, et al. Circ Res. 2010)。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、心血管病とそれに引く続く病的な筋リモデリングの最終的な病態である慢性心不全発症における TRPC6、および TRPC6 と相同性が高く TRPC6 と複合体を形成することが知られる TRPC3、両者の役割とそこに関わる分子機序解明を詳細に行い、TRPC6 阻害の治療的効果と臨床的意義を新規に明らかにすることを目的とし、TRPC6/3 抑制が、心不全抑制効果を有するかどうかの検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### **心不全モデル動物を用いた慢性心不全発症・進展に対する TRPC 阻害薬の効果の解析**

本申請研究の分担研究者である桑原は、転写抑制因子である NRSF の優性抑制変異体を心筋特異的に過剰発現させたマウス (dnNRSF-Tg) を作成し、dnNRSF-Tg が進行性の心機能低下と致死性不整脈による突然死を発症することを報告した (Kuwahara K, et al. EMBO. 2003)。この慢性心不全・突然死モデルマウスである dnNRSF-Tg や、心筋特異的に G q を過剰発現させ心不全をきたす G q-Tg マウスなど、複数の心不全モデル動物に対し、TRPC6/3 阻害効果を有する薬剤を投与し、その効果を検討した。

#### **Monocrotaline 誘発性肺高血圧・右室肥大モデル動物における右室肥大・右心不全の発症・進展に対する TRPC 阻害の効果の解析**

肺動脈性肺高血圧症患者の肺組織、肺動脈平滑筋細胞にて TRPC6 の発現が亢進し (Ying, et al. PNAS 2006)、遺伝子発現亢進を伴う TRPC6 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型

が、特発性肺動脈性肺高血圧症の発症と関与すること (Yu et al. Circulation 2009) が報告され、肺動脈性肺高血圧症の発症にも TRPC6 が関与している可能性が考えられている。肺動脈性肺高血圧症は右心不全の進行による QOL や生存率の低下を認め、肺高血圧症に伴う右室肥大・右心不全の出現・進行もその病態において重要であると考えられている。これらの肺高血圧モデル動物に対し、種々の TRPC6/3 阻害効果を有する薬剤を投与し、その効果の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### **心不全モデル動物を用いた慢性心不全発症・進展に対する TRPC 阻害薬の効果の解析**

TRPC6 と TRPC3 はヘテロ 4 量体を形成し、選択的 TRPC3 阻害薬である Pyrazole3 は、TRPC3 と TRPC6 の共発現させた際の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 流入を、抑制することが報告されている。今回我々は、拡張型心筋症・突然死モデルマウスである dnNRSF-Tg マウスに対し、Pyrazole3 を 4 週間投与し検討したところ、Pyrazole3 は dnNRSF-Tg の血圧・心拍数には影響を与えずに、心エコーにて評価した左室収縮能の低下を抑制した。また心筋特異的 G q 過剰発現マウス (G q-Tg) は心拡大・心室性不整脈を認めるが、TRPC3, 6, 7 阻害効果を有する Pyrazole4 を 2 週間投与したところ、血圧・心拍数に影響を及ぼさず、G q-Tg の心機能低下が抑制され、心重量・心体重量比の増加が抑制された。

#### **Monocrotaline 誘発性肺高血圧・右室肥大モデル動物における右室肥大・右心不全の発症・進展に対する TRPC 阻害の効果の解析**

我々は、右心不全・肺高血圧動物モデルとして、従来より使用されている monocrotaline 誘発性肺高血圧モデルラット以外に、monocrotaline の活性代謝産物である monocrotaline pyrrole を直接マウスに投与することにより肺高血圧モデルマウスを作成し、さらにこれらの肺高血圧モデル動物において著明な右室肥大を認め、心肥大マーカー ANP, BNP 等の右心室における発現の亢進を認めることを確認した。

MCTp 投与肺高血圧モデルマウスにおいて認められる、肺における TRPC6 の発現亢進、右室収縮期圧の上昇を、TRPC 阻害薬である BTP2 や、TRPC3 を阻害し、生体内で TRPC6/3 阻害効果を有する Pyrazole3 は抑制した。また BTP2 や Pyrazole3 は、MCTp 投与肺高血圧モデルマウスにおける、右室 / (左室+中隔) 重量の増加も抑制した。

同様の検討を、Monocrotaline (MCT) 誘発性肺高血圧モデルラットでも行った。MCT 誘発性肺高血圧モデルラットにおいても、肺組織における TRPC6 の mRNA の発現亢進を認め、Calcineurin-NFAT のターゲットである RCAN1 の発現亢進も認めた。BTP2 や Pyr3 投与は、MCT 誘発性肺高血圧モデルラットの肺におけ

る TRPC6 や RCAN1 の mRNA 発現亢進を抑制した。また、MCT 誘発性肺高血圧モデルラットでは肺動脈の筋性動脈における壁肥厚を認め、右室/(左室+中隔)重量の増加を認めたが、BTP2 や Pyr3 投与はそれらを抑制した。MCT 誘発性肺高血圧モデルラットにおいては、コントロールと比較し生存率の低下を認め、BTP2 や Pyr3 投与により MCT 誘発性肺高血圧モデルラットの生存率の改善を認めた。以上結果より、TRPC6/3 阻害が肺高血圧モデル動物の肺高血圧・右室肥大を抑制する可能性が示唆された。

以上結果は、TRPC6/3 阻害が慢性心不全モデルや肺高血圧症モデル動物において見られる、病的心血管リモデリング進展を抑制する可能性を示す結果であると考えられる。今後さらに TRPC3/6 阻害による病的心血管リモデリング抑制に関わる分子メカニズムの解析を行う予定である。

#### 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6件)

1. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure. *Cardiovasc Res.* 2014 Oct 1;104(1):183-93.
2. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. The effects of super-flux (high performance) dialyzer on plasma glycosylated pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and glycosylated N-Terminal proBNP in end-stage renal disease patients on dialysis. *PLoS One.* 2014 Mar 25;9(3):e92314
3. Yasuno S, Kuwahara K, Kinoshita H, Yamada C, Nakagawa Y, Usami S, Kuwabara Y, Ueshima K, Harada M, Nishikimi T, Nakao K. Angiotensin II type 1a receptor signalling directly contributes to the increased arrhythmogenicity in cardiac hypertrophy. *Br J Pharmacol.* 2013 Dec;170(7):1384-95
4. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa

Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K. Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. *J Am Heart Assoc.* 2013 May 24;2(3)

5. Nishikimi T, Okamoto H, Nakamura M, Ogawa N, Horii K, Nagata K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kuwahara K, Masuda I, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. Direct immunochemiluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma proBNP and total BNP levels in normal and heart failure. *PLoS One.* 2013;8(1)
6. Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Takaoka M, Kinoshita H, Nakao K, Kuwabara Y, Yamada Y, Yamada C, Shibata J, Usami S, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Sata M, Nakano H, Seno T, Kawahito Y, Sobue K, Kimura A, Nagai R, Nakao K. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J.* 2012 Nov 28;31(23):4428-40.

[学会発表](計8件)

1. 第109回日本内科学会, 2012年4月13日~15日, 京都, 木下秀之、桑原宏一郎、清中茂樹、森泰生、赤木達、中村一文、桑原佳宏、中川靖章、西君俊雄、中尾一和, 肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療法としての TRPC3/6 阻害の可能性
2. Basic Cardiovascular Science 2012, 2012.7.23-26, New Orleans, Y. Kuwabara, K. Kuwahara, M. Takano, H. Kinoshita, Y. Nakagawa, S. Usami, K. Nakao, T. Minami, Y. Yamada, C. Yamada, J. Shibata, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, K. Nakao, Overexpression of HCN Channels in Failing Heart Contributes to Increased Ventricular Arrhythmicity.
3. 第2回日本肺循環学会学術集会, 2013.6.23, 東京, 木下秀之、桑原宏一郎、清中茂樹、森泰生、赤木達、中村一文、桑原佳宏、中川靖章、錦見俊雄、中尾一和, 肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療法としての TRPC3/6 阻害効果の検討
4. 第78回日本循環器学会学術集会, 2014.3.22, 東京, **木下秀之、桑原宏一郎, TRPC3/6 as Potentially Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension**
5. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), 4.14-18, Kyoto, Japan, Minami T, Kuwahara K,

Kuwabara Y, Cho K, Kinoshita H, Nakagawa Y, Ueda K, Kimura T.: Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodeling in mice

6. **ESC congress 2014 2014.8.30-9.3 Barcelona, Spain**, C. Yamada, K. Kuwahara, Y. Kuwabara, H. Kinoshita, Y. Nakagawa, T. Nihikimi, K. Nakao, T. Kimura: Critical involvement of renin-angiotensin system for developing arrhythmogenic remodeling in mice with chronic heart failure and lethal arrhythmias
7. **第 37 回 日本高血圧学会総会 2014.10.17-19. 横浜、神奈川**, 桑原宏一郎、山田優子、木下秀之、中川靖章、柴田純子、山田千夏、森泰生、中尾一和、木村剛: 拡張型心筋症モデルマウスにおける N 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害は自律神経バランスを改善し突然死を予防する
8. 第 62 回心臓病学会, 日本心臓病学会・日本心臓リハビリテーション学会ジョイントシンポジウム, 2014.9.26-28, 肺動脈性肺高血圧症患者に対する最新の治療を考える, 木下秀之, 柳澤洋, 山田千夏, 中川靖章, 牧山武, 静田聡, 桑原宏一郎, 木村剛 (きむらたけし)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下秀之 (Kinoshita Hideyuki)

京都大学大学院医学研究科 地域医療システム学講座

研究者番号 : 30467477

### (2) 研究分担者

桑原宏一郎 (Kuwahara Koichiro)

京都大学医学部附属病院 循環器内科

研究者番号 : 30402887

### (3) 連携研究者

森泰生 (Mori Yasuo)

京都大学大学院工学研究科

西田基宏 (Nishida Motohiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

心臓シグナル研究部門