

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461139

研究課題名(和文) 心筋症・心不全発症機構の伸展刺激感受性イオンチャネル機能解析からの解明

研究課題名(英文) Functional analysis of stretch activated channel and onset mechanisms of cardiomyopathy

研究代表者

岩田 裕子 (Iwata, Yuko)

国立研究開発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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィー(筋ジス)・心筋症における筋細胞内は恒常的にCa²⁺濃度が上昇した状態にあり、その要因として伸展刺激感受性イオンチャネル(TRPV2)を介するCa²⁺流入が重要であることが明らかになってきた。正常または筋ジス・心筋症動物を用いたTRPV2阻害の安全性と病態治療効果を調べたところ、TRPV2阻害により正常動物では毒性が認められず、TRPV2を標的とした筋ジス・心筋症治療の有効性が確認できた。

一方、癌悪液質筋萎縮の筋変性にはTRPV2、Ca²⁺異常の関与は少ないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that abnormal Ca²⁺ increase via stretch activated ion channel (TRPV2) plays an important pathophysiological role in muscular dystrophy or cardiomyopathy. After checking safety and therapeutic potential of TRPV2 inhibition using normal and muscular dystrophic/cardiomyopathic model animals, it was clearly revealed that TRPV2 inhibition has no toxicity in normal animals and it has good advantage on the muscular dystrophy/cardiomyopathy. On the other hand, muscle damage by cancer cachexia may be induced through TRPV2-independent mechanisms distinct from those in muscular dystrophy or cardiomyopathy.

研究分野：細胞生理 分子薬理

キーワード：心筋症 筋ジストロフィー 癌悪液質 筋変性

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、近年、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、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Ca²⁺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を心筋細胞膜に高発現したトランスジェニックマウスは拡張型心筋症を呈した。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。ま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Ca²⁺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、心筋症筋変性においてもTRPV2が関与するか不明である。また特異的阻害剤が皆無のため治療への応用検討ができないという現状である。最近、N末端ドメインによるTRPV2形質膜濃縮の抑制、あるいは阻害剤(市販薬)が筋ジストロフィー、心筋症に有効であることを報告した。筋変性は悪性腫瘍によっても誘導され(癌悪液質)筋肉の委縮、機能低下を伴うことが知られている。癌悪液質筋委縮においてジストロフィン量の減少が報告され (Cancer Cell 2005)、筋ジストロフィーと同様の筋変性機構が示唆されたがその詳細及び治療法は不明である。

2. 研究の目的

筋ジストロフィーにおける筋変性において関与が認められたTRPV2およびCa²⁺異常が癌悪液質筋委縮にも関与するか検討した。また市販薬のスクリーニングで同定されたTRPV2阻害薬の有効性を悪液質筋委縮モデル、筋ジストロフィー、心筋症モデルを用いて検討し筋変性疾患におけるTRPV2の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

癌悪液質モデルは肺がん細胞LLCまたは大腸がん細胞Colon-26をマウスの皮下移植により作成した。TRPV2阻害剤(トラニラスト)またはドミナントネガティブ(DN)変異体のトランスジェニックマウス

(DN-Tg)を用いてTRPV2を阻害した。筋重量、体重、握力、自発運動量、生化学的指標として血清クレアチンキナーゼ(CK)活性を測定した。摘出筋切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マツソントリクローム(MT)染色により筋組織の評価を行った。TRPV2、ジストロフィン複合体の局在、発現量を免疫組織学的方法で測定した。筋変性により微量のシアリダーゼが変性筋から漏出し、細胞膜シアール酸含量を著しく低下させるが、それをシアール酸非結合糖鎖認識レクチンすなわちピーナツレクチン(PNA)染色で調べた。また細胞内Ca²⁺濃度は、癌悪液質モデル細胞を48時間2種のサイトカインを培養液に加えることで作成した。その細胞を用いて、Ca²⁺蛍光指示薬を負荷して測定した。ジストロフィン欠損またはジストロフィンとユートロフィン欠損で筋ジストロフィーと心筋症を併発するmdxマウス、DKOマウス、ジストロフィン複合体構成因子の1つ、デルターサルコグリカン欠損の心筋症ハムスターを用いてTRPV2阻害作用が確認された市販薬による病態改善効果を検討した。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。

4. 研究成果

(1) 癌悪液質筋委縮に対するTRPV2阻害の効果

野生型マウスに癌細胞を移植後、阻害剤を投与し筋委縮に対する効果を調べたところ、阻害剤の有無で筋重量、筋機能の低下は大差なかった。また内在性のTRPV2活性が阻害されているDN-Tgに癌細胞を移植し、筋委縮の有無を調べたところ、TRPV2を阻害しても癌悪液質による筋委縮、握力及び自発運動低下の改善は観察されなかった。

(2) 癌悪液質筋委縮における筋変性

癌悪液質筋委縮においては筋ジストロフィーのような血中CKの上昇は観察されなかった。しかし、PNAの筋組織染色がコントロール筋組織に比し上昇しており、シアール酸含量の低下、すなわち筋変性が生じていることがわかった。また癌悪液質筋組織のHE, MT染色より筋融解、筋原線維の減少は観察されたが筋ジストロフィーで認められる線維化像及び再生筋を意味する中心核を持つ筋細胞は殆ど認められなかった。

(3) 癌悪液質筋委縮モデルにおけるTRPV2の関与およびCa²⁺異常の有無

癌悪液質筋委縮モデル筋組織および細胞の免疫染色より、ごく稀に、ジストロフィンの分解、TRPV2の濃縮が観察される場合もあるが、ジストロフィン複合体、TRPV2等の発現量、及び局在はコントロールと差がないことが判明した。また筋ジストロフィーで観察さ

れた細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇及び CaMKII の活性化は癌悪液質筋萎縮モデルでは観察されなかった。癌悪液質筋萎縮は筋ジストロフィーとは違ったメカニズムにより筋萎縮が生じることが示唆された。

(4) 疾患モデル動物を用いた市販 TRPV2 阻害剤の有効性の検討

心筋症ハムスターを用いて TRPV2 阻害作用をもつ市販薬(トラニラスト)の効果を調べたところトラニラスト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。心筋症ハムスターだけでなく *mdx*, *DKQ*, 糖鎖異常の心筋症マウスの心収縮能もトラニラスト濃度依存的に改善した。

今後、トラニラストの作用機序の解析を進めるとともに、網羅的なケミカルライブラリーのスクリーニングを行なって TRPV2 チャネル関連の筋変性疾患治療薬の開発を試みる予定である。

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 5 件)

Zanou N, Mondin L, Fuster C, Seghers F, Dufour I, de Clippele M, Schakman O, Tajeddine N, Iwata Y, Wakabayashi S, Voets T, Allard B, Gailly P: Osmosensation in TRPV2 dominant negative expressing skeletal muscle fibres. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY*, 593:3849-3863, 2015

Iwata Y, Suzuki N, Ohtake H, Kamauchi S, Hashimoto N, Kiyono T, Wakabayashi S: Cancer cachexia causes skeletal muscle damage via transient receptor potential vanilloid 2-independent mechanisms, unlike muscular dystrophy. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*, 7:366-376, 2016

Sun WP, Uchida K, Suzuki Y, Zhou YM, Kim M, Takayama Y, Takahashi N, Goto T, Wakabayashi S, Kawada T, Iwata Y, Tominaga M: Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. *EMBO Reports*, 17:383-399, 2016

Sun WP, Uchida K, Takahashi N, Iwata Y, Wakabayashi S, Goto T, Kawada T, Tominaga M: Activation of TRPV2 negatively regulates the

differentiation of mouse brown adipocytes. *Pfuglers*

Archiv-European Journal of Physiology, 468:1527-1540, 2016

岩田裕子 ストレッチ感受性 Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 を標的とした筋変性治療薬の開発 医学のあゆみ 筋ジストロフィー・筋疾患 - 最近の進歩 259:65-72, 2016

[学会発表](計 20 件)

駒村和雄, 岩田裕子: 拡張型心筋症の新規治療薬の開発: 伸展感受性 Ca 透過型陽イオンチャネル TRPV2 の阻害剤の可能性 第 62 回日本心臓病学会学術集会 2014 年 9 月 26 日 仙台市民会館

岩田裕子, 大武仁美: TRPV2 阻害剤によりマウス重症心筋症の進行が抑制される。第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 国立京都国際会館

Iwata Y, Komamura K.: Tranilast, Transient Receptor Potential Vanilloid 2 Antagonist, Ameliorates End-Stage Heart Failure of Mice With Dilated Cardiomyopathy. AHA Scientific Sessions 2014 Nov. 16, 2014 McCormick Place Chicago /USA

岩田裕子, 大武仁美: ストレッチ感受性チャネルを標的とした筋ジストロフィー治療薬の開発 - TRPV2 を標的にした薬物効果の検討 - 精神・神経疾患研究開発費 25-5 平成 26 年度班会議 2014 年 12 月 3-4 日 JA 共済ビル カンファレンス・ホール(東京)

岩田裕子 トラニラストを用いた拡張型心筋症・心不全治療 ジョイントリサーチプロジェクト第 6 回ミーティング 2014 年 12 月 19 日 国立循環器病研究センター

岩田裕子, 鈴木伸之, 大武仁美, 若林繁夫: Cancer cachexia produces skeletal muscle damage via TRPV2-independent mechanism unlike muscular dystrophy. 癌悪液質筋萎縮は筋ジストとは異なり Ca^{2+} 透過チャネル TRPV2 非依存的な機構で筋変性をおこす 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 19 日 名古屋国際会議場

Sun W, Uchida K, Suzuki Y, Zhou Y, Kim M, Takayama Y, Takahashi N, Goto T, Wakabayashi S, Kawada T, Iwata Y, Tominaga M: Absence of TRPV2 impaired BAT thermogenesis in mice 5th International Ion Channel Conference 2015 年 6 月 26-30 日 中国

Iwata Y: Inhibition of Transient receptor potential vanilloid 2 ameliorates Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy in animals: Possibility of Re-profiling an Off-Patent Drug. 第 10 回日仏筋ジスト

ロフィーワークショップ(シンポジウム) 2015年7月2-4日 パリ フランス

岩田裕子、鈴木伸之、若林繁夫: 癌悪液質における筋傷害に Ca^{2+} 透過チャネルは関与するか? 第1回日本筋学会学術集会 2015年8月8日 国立精神・神経医療研究センター

岩田裕子: 新しい心筋症治療薬の開発 第2回筋ジストロフィー医療研究会(特別企画) 2015年10月24日 大阪大学中之島センター

岩田裕子、平山円: ストレッチ感受性チャネルを標的とした筋ジストロフィー治療法の開発 TRPV2 を治療標的とした心筋症治療薬の開発 精神・神経疾患研究開発費 25-5 平成 27 年度班会議 2015年12月9日 国立精神・神経医療研究センター

岩田裕子 ストレッチ感受性チャネル(TRPV2)を標的とした筋ジストロフィー心筋症治療法の開発 筋ジストロフィー合同班会議 2016年1月8日 東京

岩田裕子、平山円、若林繁夫、中川修: TRPV2 に対する新しい阻害薬が拡張型心筋症ハムスターの病態悪化を抑制した第89回日本薬理学会年会 2016年3月11日 横浜

Matsumura T., Matsui M., Iwata Y., Asakura M., Saito T., Fujimura H., Sakoda S. TRPV2 inhibition therapy might be effective for cardiomyopathy of muscular dystrophy: 2th European Academy of Neurology 2016年5月28-31日コペンハーゲン(デンマーク)

Matsumura T., Matsui M., Iwata Y., Asakura M., Saito T., Fujimura H., Sakoda S. TRPV2 inhibition therapy can be effective for cardiomyopathy of muscular dystrophy: 14th International Congress on Neuromuscular Disease (ICNMD) 2016年6月5-9日 トロント(カナダ)

松村 剛、松井未紗、岩田裕子、朝倉正紀、齊藤利雄: 進行期心不全筋ジストロフィー患者における TRPV2 阻害療法パイロット試験: 第2回日本筋学会学術集会 2016年8月6日 国立精神・神経医療研究センター

Matsumura T., Matsui M., Iwata Y., Asakura M., Saito T., Fujimura H., Sakoda S. TRPV2 inhibition therapy can be effective for cardiomyopathy of muscular dystrophy: 21th International congress of the world muscle society (WMS) 2016年10月4-8日 グラナダ(スペイン)

片山由美、岩田裕子、富松彩佳、渡邊

裕介、斎藤能彦、中川修 胎生期血管内皮遺伝子 Tmem100 の心血管形態形成における発現制御機構と分子機能の解析 第39回日本分子生物学会年会 2016年12月1日 横浜

深山俊治、藤田匡秀、岩田裕子、渡邊裕介、片山由美、中川修 Hrt1/Hey1 転写調節因子の心血管形態形成における意義 第39回日本分子生物学会年会 2016年12月2日横浜

岩田裕子、平山円: ストレッチ感受性チャネルを標的とした筋変性新規治療薬の開発 精神・神経疾患研究開発費 25-5 平成 28 年度班会議 2016年12月8日 国立精神・神経医療研究センター

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 筋変性疾患バイオマーカー及び検査方法

発明者: 岩田裕子

権利者: 国立循環器病研究センター

種類: 特願

番号: 2015-180427

出願年月日: 2015年9月14日

国内外の別: 国内

名称: ヒト TRPV2 活性化方法

発明者: 岩田裕子

権利者: 国立循環器病研究センター

種類: 特願

番号: 2015-180428

出願年月日: 2015年9月14日

国内外の別: 国内

名称: TRPV2 阻害剤

発明者: 岩田裕子

権利者: 国立循環器病研究センター

種類: 特願

番号: 2015-180429

出願年月日: 2015年9月14日

国内外の別: 国内

取得状況(計3件)

名称: TRPV2 の部分ペプチド

発明者: 岩田裕子、若林繁夫

権利者: 国立循環器病研究センター

種類: 特許証

番号: 特許第 5644026 号

取得年月日: 2014年11月14日

国内外の別: 国内

名称: TRPV2 阻害剤、疾患の予防又は治療剤、薬剤探索用リード化合物、及び薬剤探索方法
発明者: 岩田裕子、若林繁夫

権利者：国立循環器病研究センター
種類：特許証
番号：特許第 5667223 号
取得年月日：2014 年 12 月 19 日
国内外の別：国内

名称：抗 TRPV2 抗体
発明者：岩田裕子、若林繁夫
権利者：国立循環器病研究センター
種類：特許証
番号：特許第 5754039 号
取得年月日：2015 年 6 月 5 日
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩田裕子 (Iwata, Yuko)
国立研究開発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