

局所Ca²⁺シグナルによる心臓線維化の分子制御機構 の解明

北島, 直幸

<https://hdl.handle.net/2324/1500655>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

局所 Ca²⁺シグナルによる心臓線維化の分子制御機構の解明

創薬産学官連携講座 3PS12023E 北島 直幸

【序論】

心不全はすべての心血管疾患の終末像である。心臓に高血圧や大動脈狭窄などの血行力学的負荷が加わると、心臓は代償的に筋肉を増加（肥大）することで収縮力を増大し、心機能を維持しようとする。しかし、負荷が持続すると、心臓の代償機構は破綻し、心肥大から心拡張へと形態構造を変化させる（心臓リモデリング）。心臓リモデリングにおける間質の線維化は、心臓を硬くすることで慢性的な心機能不全を引き起こす。慢性心不全の予後を改善する有効な治療法は未だ確立されておらず、心臓リモデリングの機構解明および新たな創薬標的分子の同定が望まれている。

心臓リモデリングの発症・進展において、細胞膜上の Ca²⁺透過型チャネルを介した局所 Ca²⁺流入シグナリングと活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の産生によるタンパク質の酸化的機能修飾が重要な役割を担うことがわかってきている^{2,3,4}。その中で、我々は、Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 3 が心肥大及び拡張型心筋症の進行を促す Ca²⁺透過型チャネルの分子実体である可能性を示してきた^{1,6}。しかし、TRPC3 が負荷をどのように感知し、どのような分子機構で心臓リモデリングを引き起こすかについては依然としてよくわかっていない。

本研究では、血行力学的負荷によって TRPC3 チャネルが活性化し、局所 Ca²⁺シグナルを介して心臓リモデリングを誘導する分子機構を明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

【実験方法】

圧負荷モデルの作成・心機能測定

C57BL/6J マウスまたは 129Sv TRPC3 欠損 (TRPC3^{-/-}) マウス (6-8 週齢, ♂) または野生型 (TRPC3^{+/+}) マウスの横行大動脈を狭窄 (TAC) することで圧負荷モデルを作成した。TRPC3 選択的阻害剤 (Pyr3; Pyrazole-3) は浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込み、6 週間の持続投与を行なった。心機能は、心エコーおよび左心室カテーテル法により評価した。

線維化の評価

心臓切片標本を collagen type I/III を認識する picrosirius red 染色を用いて染色し、間質におけるコラーゲン蓄積量を定量した。心肥大・線維化誘導に関わる遺伝子の発現変化は、qRT-PCR 法を用いて評価した。

低分子量 G タンパク質 RhoA および Rho GEF の活性測定

TAC 後のマウス心臓および機械的伸展刺激をしたラット新生児心筋細胞を可溶化した。RhoA の活性化は、GTP 結合型の RhoA と特異的に結合する基質タンパク質 (Rhotekin の Rho Binding Domain), GEF-H1 の活性化は RhoA(G17A)変異体を用いた pull down 法により評価した。

メカニカルストレッチ後の ROS 産生の測定

ストレッチチャンバーに播種したラット新生児心筋細胞に ROS 蛍光指示薬 H₂DCFDA を 5 μM, 30 分間導入した。HBSS を用いて 1 回洗浄後、HBSS に置換した。細胞内 H₂DCFDA の蛍光変化は video image analysis system を用いて経時的に記録した。

【結果】

1. TAC 後の心臓における線維化に対する TRPC3 選択的阻害剤の効果

TAC モデル作成 1 週間後より, Pyr3 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)投与を開始し, TAC 6 週間後の心臓の線維化について検討した. TAC による心重量の増加に伴った線維化が Pyr3 投与により有意に抑制された(Fig.1). Pyr3 投与は TAC 後の心肥大関連遺伝子の発現上昇を抑制しなかったものの, 心線維化関連遺伝子の発現上昇を有意に抑制した.

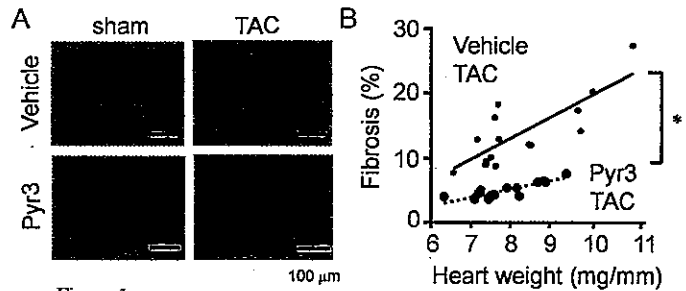


Figure 1 (A) Representative images of picrosirius red staining for fibrosis measurement in mouse hearts 6 weeks after TAC. (B) The correlation between fibrosis and hypertrophy. Fibrosis means picrosirius red positive area (% of total area) and heart weight / tibia length (heart weight) as an index of hypertrophy. n=15, *P<0.05

2. TAC 後の心臓における線維化に対する TRPC3 欠損の効果

TRPC3^(-/-)群では, TRPC3^(+/+)群と比較して TAC による心機能低下が有意に抑制された(Fig.2A). 両群間で TAC 後の心肥大に有意な差は観察されなかったものの, 心重量の増加に伴った線維化が TRPC3^(-/-)マウスにおいて顕著に抑制されていた(Fig.2B, 2C). TRPC3^(-/-)心臓において TAC 後の心肥大関連遺伝子の発現上昇は抑制されず, 線維化関連遺伝子の発現上昇は有意に抑制された.

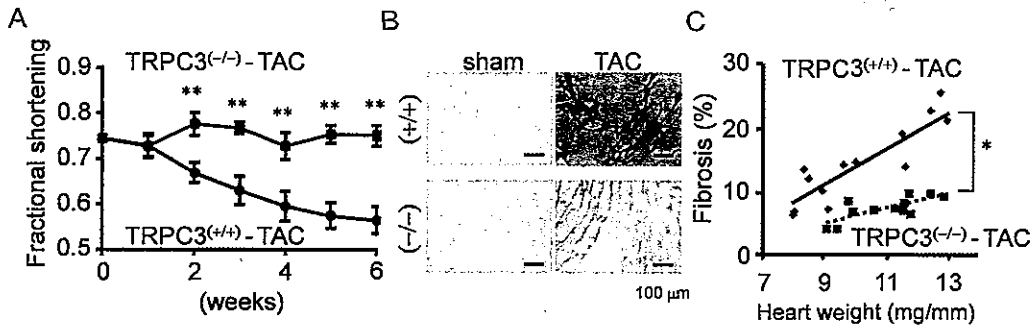
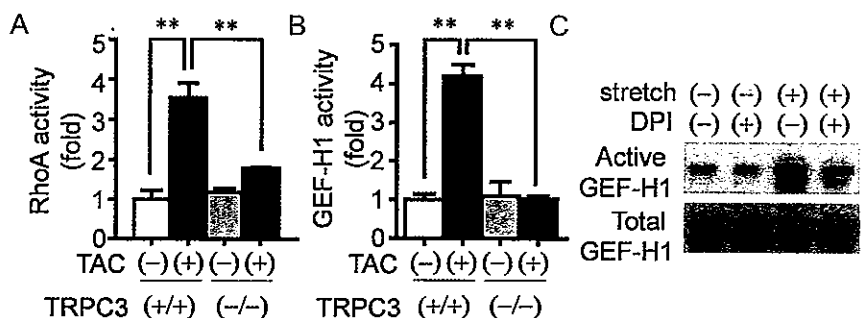


Figure 2 (A) Time dependent changes of fractional shortening. n=12-13, **P<0.01. (B) Representative images of cardiac fibrosis in mouse left ventricles 6 weeks after TAC. (C) The correlation between fibrosis and hypertrophy. n=12-13, *P<0.05.

3. 心筋細胞における TRPC3, GEF-H1, RhoA シグナリングの活性化を介した心臓の線維化

低分子量 G タンパク質 RhoA の活性化は心臓の線維化シグナルの中心的役割を担う. しかし, RhoA の活性化を促す上流シグナルについてはあまり分かっていない. TAC1 週間後の心臓および機械的伸展刺激を与えた心筋細胞において TRPC3 依存的な RhoA の活性化が確認された(Fig.3A). RhoA は Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs)により活性化される. RhoGEFs は 69 種類報告されており, このうち機械的伸展感受性の高い RhoGEFs に標的を絞り検討を行った. TAC1 週間後の心臓および機械的伸展刺激を与えた心筋細胞において, TRPC3 依存的な GEF-H1 の活性化および GEF-H1 依存的な心臓の線維化応答が誘導された(Fig.3B). また, GEF-H1 の活性化は NADPH oxidase (Nox) の阻害剤により抑制された(Fig.3C).

Figure 3 (A) Effect of TRPC3-deletion on RhoA activation 1 week after TAC. n=3, **P<0.01. (B) Effect of TRPC3-deletion on GEF-H1 activation 1 week after TAC. n=3, **P<0.01 (C) Effect of Nox inhibitor (DPI) on GEF-H1 activation induced by mechanical stretch in neonatal rat cardiomyocytes. n=3



4. TRPC3/Nox2/p22^{phox} 複合体形成による ROS 産生

TRPC3 の活性化が ROS 産生を促すことを過去に報告している¹。ラット新生児心筋細胞に機械伸展刺激を与えると TRPC3 依存的な ROS 産生が確認された(Fig.4A)。NADPH oxidase (Nox)は心不全時に発現量が増加し、酸化ストレスを惹起する。Nox2 は同じ膜タンパク質ある p22^{phox} とヘテロ二量体を形成している。培養細胞に共発現させた免疫沈降法の実験から、TRPC3 は Nox2, p22^{phox} と複合体を形成し、脂質ラフト上に局在することを明らかにした。さらに、ROS 産生には Nox2/p22^{phox} のヘテロ二量体形成だけでなく、細胞質に存在する p47^{phox} 等の補因子の膜移行による活性化が必要である。PKCβによる p47^{phox} のリン酸化が p47^{phox} 活性化に必要であり、TRPC3 は PKCβと機能的に共役することで PKCβシグナルを正に制御する⁵。新生児心筋細胞に機械伸展刺激を与えると TRPC3 依存的な p47^{phox} のリン酸化が確認された(Fig.4B)。

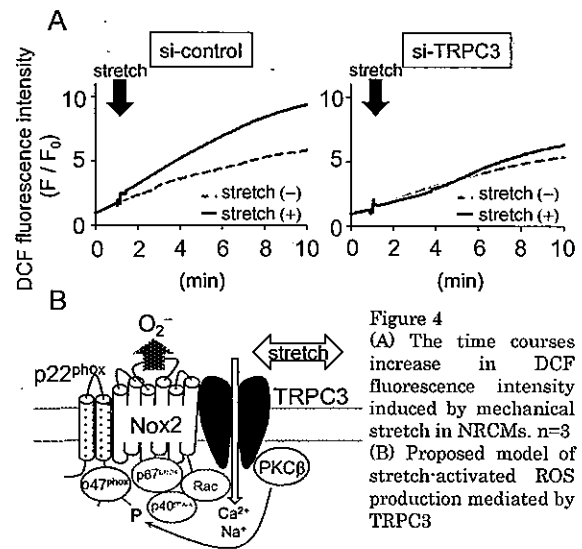


Figure 4 (A) The time courses increase in DCF fluorescence intensity induced by mechanical stretch in NRcMs. n=3 (B) Proposed model of stretch-activated ROS production mediated by TRPC3

5. TRPC3-p22^{phox}-Nox2 複合体形成によるタンパク質の安定化

Nox2 と p22^{phox} の結合は互いのタンパク質の安定化に必要である。TAC1 週間後において Nox2 のタンパク質発現は顕著に増加していた。この Nox2 の発現上昇は TRPC3^{-/-}群で顕著に抑制された(Fig.5A)。mRNA も TAC1 週間後に増加したが、TRPC3^{-/-}群で抑制されなかった(Fig.5B)。また、ラット新生児心筋細胞において TRPC3 の発現低下に依存して Nox2 の発現も低下した。さらに、CHO 細胞や HEK293 細胞に TRPC3 を p22^{phox} や Nox2 と共発現させたところ、p22^{phox} や Nox2 タンパク質の発現量は TRPC3 発現量に依存して増加することがわかった。

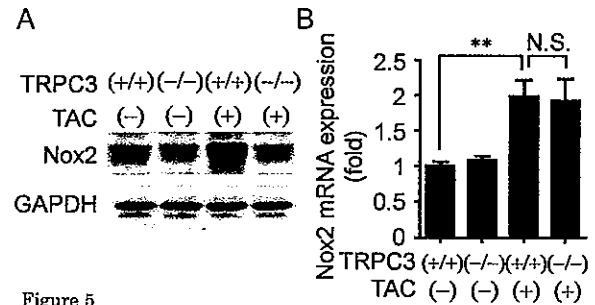


Figure 5 Protein expression levels (A) and mRNA expression levels (B) of Nox2 in TRPC3^{+/+} and TRPC3^{-/-} hearts. Hearts were removed 1 week after TAC. n=3, **P<0.01.

6. 心線維芽細胞における TRPC3 を介した線維化シグナル

心筋細胞で産生された TGF-β等の線維化関連因子が線維芽細胞に作用し TRPC3, GEF-H1, RhoA シグナリングを介した線維化応答が起こるか否か検討した。

ラット心線維芽細胞に TGF-β刺激をすると、α-SMA の発現上昇 (筋線維芽細胞への分化) が生じる。TGF-β刺激による筋分化は TRPC3 や GEF-H1 のノックダウンにより抑制された。TGF-β刺激による GEF-H1 と RhoA の活性化もまた TRPC3 阻害により抑制された(Fig.6)。

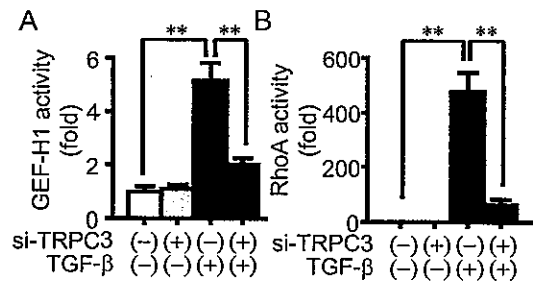


Figure 6 (A and B) Effects of TRPC3 knockdown on GEF-H1 or RhoA activation in NRcFs. n=3, **P<0.05.

【考察】

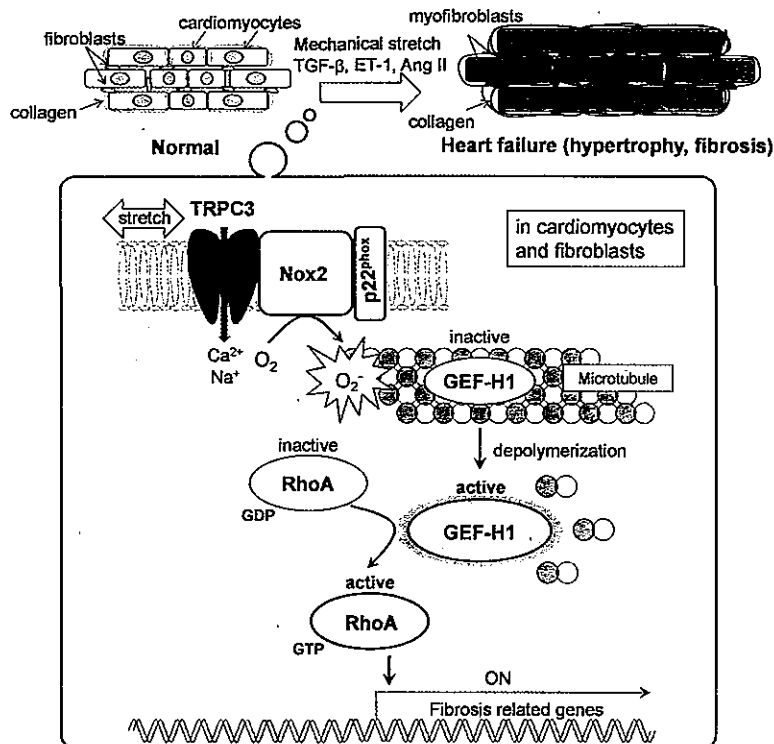
本研究により、TRPC3^(+/+)マウスはTAC後の適応応答である心肥大を抑制せず、線維化を強く抑制することで、TAC後の慢性期における心機能低下を抑制していることが明らかとなった。この機序として、TRPC3チャネルの活性化がNox2依存的なROSシグナルを介して線維化を誘導することを初めて明らかにした。

TRPC3タンパク質は、

- 1) PKCβ-p47^{phox}経路を活性化するための局所Ca²⁺流入制御を担うチャネル
- 2) Nox2/p22^{phox}複合体と物理的に結合してタンパク質の発現の安定化を補助する足場タンパク質

という2つの役割を持つ。すなわち、TRPC3チャネル活性化は、局所Ca²⁺流入を介してNox2を活性化すると同時に、チャネル活性非依存的にNox2タンパク発現を安定化することでROS産生を増幅するpositive regulator of ROS (PRROS)であると考えられる。TRPC3の下流で産生されたROSは、GEF-H1/RhoA経路を活性化することで線維化を誘導する。微小管上に安定して局在するGEF-H1は、微小管が脱重合することで活性化する。ROSは微小管の脱重合を促進することによりGEF-H1を活性化するという報告がある⁷。TRPC3は、ROSを介して微小管を脱重合し、線維化を誘導しているのかもしれない。

これまでROSシグナルの制御因子の分子実体については全く不明であった。本研究により、TRPC3がPRROSの分子実体であることを初めて明らかにした。興味深いことに、メカノ作動性RhoGEFsが普段の心筋収縮弛緩運動では活性化されず、病態時においてのみ活性化する根底には、TRPC3を介したROSシグナル活性化が必要であることが示された。ヒトiPS心筋細胞や心線維芽細胞を用いた系においても、TRPC3を介した線維化応答が確認されている。本研究成果は、慢性心不全の機序解明および新規創薬標的分子の同定に大きく貢献するものと期待される。



【発表論文・参考論文】

1. Kitajima N., et al., *Biochem Biophys Res Commun.* (2011) 409:108-113
2. Nishida M., Sawa T., Kitajima N., et al., *Nat Chem Biol.* (2012) 8:714-724
3. Kitajima N., Nishida M., *Nihon Yakurigaku Zasshi.* (2013) 141:350-351.
4. 北島直幸, 西田基宏: 心臓におけるTRPチャネルの多様な役割 *実験医学* (2014) Vol.32 No.4
5. Numaga T., Nishida M., et al., *J Cell Sci.* (2010) 123:927-938
6. Kiyonaka S., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2009) 106:5400-5405
7. Kratzer E., et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2012) 47:688-697