

心肥大形成における TRPC1 の発現亢進*

大場 貴喜

秋田大学大学院医学系研究科 細胞生理学講座

(平成 22 年 5 月 31 日掲載決定)

Up-regulation of TRPC1 in the Development of Cardiac Hypertrophy

Takayoshi Ohba

Department of Physiology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

Key words : cardiac hypertrophy, TRP channel, store-operated Ca^{2+} entry

はじめに

心肥大は左室壁への増加した負荷に対する適応反応ではあるが、負荷が持続するとその適応反応は破綻し、あらゆる心疾患の終末像、心不全となる。つまり心肥大は心不全の本態であり、その心肥大の形成機序を細胞レベルおよび分子レベルで解明することは重要になる。ここ数年間、我々がおこなってきた研究テーマである心筋細胞の肥大形成について概説する。

背景

日本国内の慢性心不全患者は約 100 万人と推定されており、高齢化に伴いその数は年々増加傾向にある。現在の心不全-心疾患治療は、利尿薬、 β 遮断薬、アンギオテンシン受容体拮抗薬などの薬物治療やインターベンション技術、新規デバイスなど、めざましい進歩を遂げている。しかし、その現在においても心不全を発症した患者の 5 年生存率は 50% 以下と低く、その治療法には改良の余地が残されている。一方、40 歳以上の健康成人における心肥大の程度と心血管事故

との関連を追跡した Framingham Heart Study では、心肥大の進行に伴い心血管事故の発生率が増加し、心肥大の合併により心血管事故、心血管死、全死亡の頻度が有意に増加することが明らかとなった¹⁾。さらに心肥大の合併により心筋梗塞の予後が悪化すること、心不全の発症、脳血管事故の発症や突然死の頻度が増加することが報告され、心肥大が種々の心血管事故の独立した危険因子であることが明らかとなっている。また他の報告によると、ほとんどの降圧薬は心肥大退縮効果を有することが知られているが、その程度はいずれも低いとされる²⁾。アンギオテンシン受容体拮抗薬は 13%、Ca 拮抗薬は 11%、アンギオテンシン変換酵素阻害薬は 10%、利尿剤は 8%、 β 遮断薬は 6% の心肥大退縮効果を持つ。一方、直接的な血管拡張薬であるヒドララジンでは、十分な降圧を認めたにもかかわらず心肥大の退縮効果は全く認められなかった。

細胞レベルでは、心肥大は心筋細胞自体の肥大（拡大）と間質の変化からなる。この心筋細胞肥大に関して、これまで多くの研究がなされてきた。心筋細胞肥大に関わる細胞内シグナル経路としては Ca^{2+} -calcineurin-NFAT 経路、MAP カスケード経路、JAK-STAT 経路などが知られているが、これらはお互いが相互作用の関係にあると考えられている。その後、1998 年 Molkenin らの報告を契機として、 Ca^{2+} -calcineurin-NFAT 経路が心筋細胞肥大にとって優位に重要な経路であるというコンセンサスが得られるようになった。この Ca^{2+} -calcineurin-NFAT 経路とは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により calcineurin が活性化され、この活性

Correspondence : Takayoshi Ohba
Department of Cell Physiology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 018-884-6070
Fax : 018-836-2604
E-mail : ooba@doc.med.akita-u.ac.jp

*第 20 回秋田医学会学術奨励賞

化された calcineurin は細胞質内にある NFAT を脱リン酸化すると、NFAT は核内へ移行し、心肥大を形成する遺伝子発現を促進する (図 1)³⁾ というものである。もともと細胞内への Ca^{2+} 流入は心筋肥大にとって必須であることは周知の事実であった。よく知られている L 型 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内のリアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出に続くアクチンとミオシンのスライドによる筋収縮いわゆる E-C coupling を引き起こす。しかしながら、心筋細胞肥大を引き起こすような遺伝子発現に関わる Ca^{2+} 流入の起源は知られていなかった。

この calcineurin-NFAT 経路の活性化に関する研究は免疫学の分野で先行した。リンパ球における calcineurin-NFAT 経路は低振幅かつ持続性の細胞内 Ca^{2+} 流入により活性化される⁴⁾。特に小胞体内の Ca^{2+} 枯渇により活性化される容量依存性 Ca^{2+} (store-operated Ca^{2+} : SOC) チャネルが⁵⁾、この Ca^{2+} 流入 (store-operated Ca^{2+} entry: SOCE) を担っていると考えられている。現在予想されている SOC チャネルの形態を図 2 に示す。この SOC チャネルの一部の分子実体は transient receptor potential (TRP) ファミリーのサブタイプのうち、TRP canonical (TRPC) 1-7 が担うと考えられている。図 3 にあるように TRPC 蛋白は 6 回膜

貫通型の膜蛋白分子で、そのアミノ酸配列の相同性から膜貫通領域の 5 番と 6 番の間のループを内側へ向けチャネルポアを形成する。現在、SOC チャネルは、この TRPC の様々な組み合わせによるヘテロ 4 量体で構成されていると予想されている。一方で、心筋細胞はこの SOCE を持っていることが報告されている^{5,6)}。以上より、当研究室では心筋細胞肥大を引き起こす Ca^{2+} 流入は SOCE であり、その分子実体は TRP であると仮説を立て、基礎実験を組み立てた。

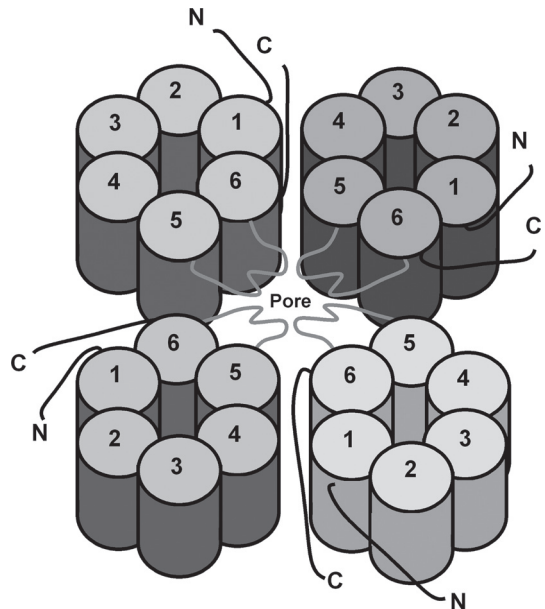


図 2 予想されている SOC チャネルの形態。SOC チャネルは TRP を含む多量体で構成される。TRPC のヘテロ 4 量体が分子実体と考えられている。

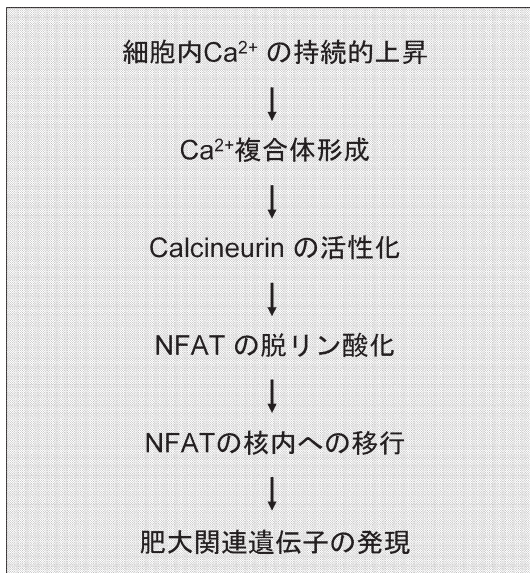


図 1 NFAT 経路は細胞内への Ca^{2+} 流入により活性化される。NFAT 経路が活性化することにより心肥大に必要な遺伝子発現が促進される。

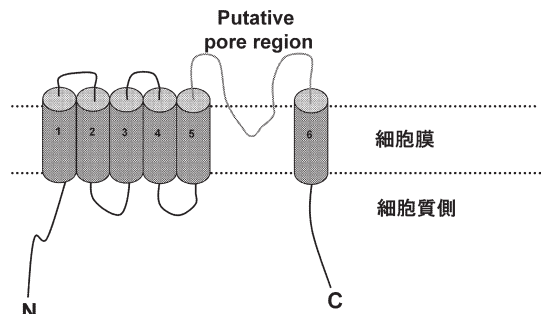


図 3. TRPC 蛋白の形態。6 つの膜貫通領域を持つ。膜貫通領域 5 番目と 6 番目の間でチャネルポアを作ると考えられている。

心肥大モデルを用いた TRP 発現スクリーニング

腹部大動脈縮窄による心肥大モデル (abdominal aortic banding: AAB) を作成した。9 週齢のラット (体重 150-170 g, n=22) に対し、ケタミン (90 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔を行い、左側腹部からのアプローチにて腹部大動脈を露出させ、腎動脈の上方で外径 0.8 mm のワイヤーとともに縛り、ワイヤーを引き抜く。同様の手順で手術を行い、大動脈を縛らずに閉腹したものを Sham 群とした。術後 4 週間で心臓を取り出したところ、心体重比 (mg/g) は AAB: 2.89 ± 0.09 , sham: 2.40 ± 0.05 ($p < 0.01$, $n=11$) と軽度から中等度の心肥大が形成された。まずは、この肥大心とコントロールを用い、半定量的 RT-PCR 解析によって TRP ファミリーの発現量をスクリーニングすることにした。心肥大のマーカーである BNP, ANF, α skeletal-actin (SKA) が AAB 群の心筋で増加していた。この結果と一致して肥大心筋では、TRP ファミリーのうちの一つである TRPC1 が有意に増加していることを見出した⁷⁾。また心肥大の別のモデルとして Dahl 食塩感受性ラットの心臓を用いて TRPC1 の蛋白量を検討したところ、心肥大の形成度と比例して増加していることが示された⁸⁾。次に、*in vitro* で心筋細胞肥大と TRPC1 の関係を検討することにした。エンドセリン 1 (ET-1, 10 nM, 2-48 時間) を心肥大形成刺激として用いたところ、ET-1 処置の時間に比例して TRPC1 蛋白は増加していた。以上から、心肥大の形成度と TRPC1 の発現量は密接にリンクしていることが考えられた。

TRPC1 ノックダウンによる Ca^{2+} 流入への効果

次に TRPC1 を減少させることにより心筋細胞の Ca^{2+} 流入への効果を検討することにした。ET-1 処置の 48 時間前に遺伝子導入をおこない、siRNA 法により TRPC1 の特異的ノックダウンに成功した。次にこの肥大心筋細胞モデルにてストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) を測定した。細胞内ストアの枯渇は、 Ca^{2+} 取り込みポンプ (SERCA) の阻害薬である Thapsigargin (1 μ M) を用い、細胞内 Ca^{2+} を Fura2 の蛍光比にて測定した。Thapsigargin で Ca^{2+} ストアを枯渇した状態を作り、そこで細胞外へ Ca^{2+} を投入し細胞内へ流入した Ca^{2+} を測定するというアッドバックプロトコルを採用した。その結果、ET-1 で肥大した心筋細

胞では SOCE は有意に増加していたが、TRPC1 ノックダウン群の細胞では、ほぼ対象群と同程度まで減少していた。この SOCE は、従来の L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピンやベラパミルの治療域濃度では影響を全く受けなかった。

TRPC1 ノックダウンの心肥大への効果

次に TRPC1 を減少させることにより肥大形成を抑制できるかを検討することにした。肥大刺激 48 時間後に、心筋細胞肥大の評価指標として細胞表面積を測定した。ET-1 (10 nM, 48 時間)、アンギオテンシン 2 (100 nM, 48 時間) およびフェニレフリン (100 μ M, 48 時間) のいずれの肥大刺激によっても増加がみられたが、この細胞表面積の増加は、TRPC1 ノックダウンにより有意に抑制された。また臨床でも使われている心不全、心肥大のマーカーである BNP および ANF の発現量を検討したところ、いずれの肥大刺激による上昇においても、TRPC1 ノックダウンによって有意に抑制された。最後に、この TRPC1 の発現量増加が NFAT 経路とリンクしているかを検討する目的で、TRPC1 の全長 cDNA、およびドミナントネガティブ体として働く欠損変異体を 2 種類作製した。また NFAT 経路の活性度を評価するためのリポータープラスミドを用意した。TRPC1 欠損変異体の作用機序としては、TRPC1 同士は N 端側の coiled-coil 領域で結合することがわかっているため、欠損変異体と結合したチャネル複合体はポアを形成できなくなることが考えられる。GFP 輝度とルシフェラーゼアッセイの 2 通りで評価をおこなったところ、TRPC1 の発現量自体が NFAT 活性と比例関係にあることが示された。

以上から、ラット左室心筋に TRP が発現していること、肥大心ではその発現量が増加していること、TRPC1 の発現抑制は新生仔ラット心筋細胞の SOCE、NFAT 経路を抑制することで心筋細胞肥大を抑制することが示された。

考察と展望

心筋細胞の肥大刺激としてエンドセリン 1 (ET-1, 10 nM) を用いたところ、約 6 時間で TRPC1 が増加し始め、その後 48 時間まで増加し続けた。その後も TRPC1 の増加が続くかどうかは、培養条件などから検討はおこなっていないが、動物モデルの検討からす

ると、おそらくは終末期近くの不全心においても TRP の発現量は増加している可能性が高いと考えられる。これを裏付ける機序として、現在次のように想定している (図 4)。ET-1 などの肥大刺激となる液性因子は、それぞれの受容体に結合する。Phospholipase C (PLC) 代謝が回転し、Diacylglycerol (DAG) は直接 Receptor-operated の機序により、一方 Inositol triphosphate (IP_3) は細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇を引き起こし Store-operated によって、細胞膜上の TRPC 多量体からなる Ca^{2+} チャネルを活性化する。また TRPC1 は機械的伸展によっても活性化することが知られており、stretch-activated Ca^{2+} channel (SAC) を構成する。この Ca^{2+} チャネルから流入した Ca^{2+} が NFAT 経路を活性化する。核内に移行した NFAT は BNP や ET-1 のプロモーターに結合し心肥大に必要な遺伝子発現を促す。また NFAT は TRPC1, TRPC6 のプロモーターにも結合し転写を促進する。そのため、TRPC 多量体からなるこの Ca^{2+} チャネルは自己の Ca^{2+} 流入によって自己の発現量を増加させるというポジティブフィードバックの機序によりさらに増加していく。TRPC1 のノックダウンはこのポジティブ

フィードバックを遮断するため、心筋細胞肥大を抑制すると考えた。さらに昨年、小胞体の Ca^{2+} センサーであり、SOCE の重要な活性化因子である stromal interaction molecule 1 (STIM1) が心筋細胞肥大に関与していることを報告した⁹⁾。STIM1 のノックダウンによってもほぼ同様に肥大抑制効果が得られることから、この TRPC1 の発現増加および SOCE の増加は心筋細胞肥大にとって重要であることが示された。

現在、この研究分野には他の研究室からも報告が相次いでいる。Seth らによると TRPC1 は心筋の機械的伸展により活性化されるチャネルであり、肥大形成にとって極めて重要なイオンチャネルを構成する¹⁰⁾。Wu らによれば病的な心肥大の形成には TRPC1, TRPC3, TRPC6 のどれもが重要であり、これらの複合体が心肥大を促進する¹¹⁾。Voelkers らによれば心筋での STIM1 のノックダウンは生理的には影響がないが、病的な心肥大の抑制につながるという。いずれの報告も当方の主張と矛盾するものではなく、TRPC 複合体チャネルが心肥大にとって重要な役割をしているという点では一致をみている。

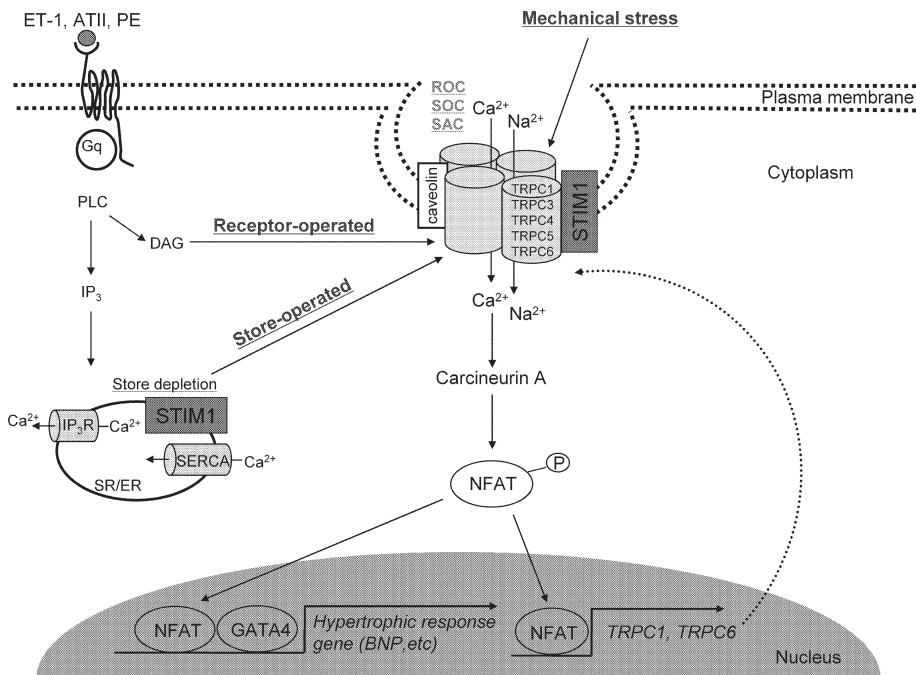


図 4. 心筋細胞の肥大形成における細胞内経路の予想図。TRPC1 は自己が流入させた Ca^{2+} により自己の発現量を増加させる可能性がある。

おわりに

動物モデルを用い、細胞レベルの心肥大形成機序における TRPC1 について概説した。潜在的な治療対象が膨大である心肥大、心不全にとって、分子機序およびその活性化機序のさらなる解明は極めて重要である。実際、生体内での活性化機序や関連分子の解明など課題は多く、治療への応用までにはまだまだ遠い道のりがある。将来、この新規 Ca^{2+} 流入経路の解明と修飾方法の開発を進め、心不全治療に寄与できたらと思う。

謝 辞

研究活動を支え、指導して頂いている尾野恭一教授と伊藤宏教授をはじめ、細胞生理学講座のメンバーと循環器内科呼吸器内科講座の先生方、皆様に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B. and Castelli, W.P. (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.*, **322**, 1561-1566.
- 2) Devereux, R.B., Palmieri, V., Sharpe, N., De Quattro, V., Bella, J.N., de Simone, G., Walker, J.F., Hahn, R.T. and Dahlöf, B. (2001) Effects of once-daily angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium channel blockade-based antihypertensive treatment regimens on left ventricular hypertrophy and diastolic filling in hypertension: **the prospective randomized enalapril study evaluating regression of ventricular enlargement (preserve) trial.** *Circulation*, **104**, 1248-1254.
- 3) Molkenin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R. and Olson, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.*, **93**, 215-228.
- 4) Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P. and Crabtree, G.R. (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. *Nature*, **383**, 837-840.
- 5) Hunton, D.L., Lucchesi, P.A., Pang, Y., Cheng, X., Dell'Italia, L.J. and Marchase, R.B. (2002) **Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated T-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes.** *J. Biol. Chem.*, **277**, 14266-14273.
- 6) Hunton, D.L., Zou, L., Pang, Y. and Marchase, R.B. (2004) **Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, 1124-1132.
- 7) Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima T. and Ito, H. (2007) Up-regulation of TRPC1 in the Development of Cardiac Hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **42**, 498-507.
- 8) Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y. and Ito, H. (2006) **Increased expression of transient receptor potential c1 in rats with hypertensive hypertrophy.** *Akita J. Med.*, **32**, 45-51.
- 9) Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Satoh, T., Ono, K. and Ito, H. (2009) Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 172-176
- 10) Seth, M., Zhang, Z.S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., Tsiokas, L., Winn, M., Abramowitz, J., Rockman, H.A., Birnbaumer, L. and Rosenberg, P. (2009) **TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart.** *Circ. Res.*, **105**, 1023-1030.
- 11) Wu, X., Eder, P., Chang, B. and Molkenin, J. D. (2010) TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 7000-7005.
- 12) Voelkers, M., Salz, M., Herzog, N., et al. (2010) Orail and Stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **48**, 1329-1334.