

受賞者

岩本 隆宏

福岡大学医学部細胞分子薬理学

## 研究テーマ

### 受容体活性化Ca<sup>2+</sup>流入機構の解明と血管病治療への応用

#### 1. 背景および目的

受容体活性化Ca<sup>2+</sup>チャネルは血管緊張制御や血圧調節に重要な役割を果たすとともに、血管病（血管スパズム、動脈硬化など）とも深くかかわっていると考えられている。しかし、受容体活性化Ca<sup>2+</sup>流入機構の詳細は未だ不明である。最近、私たちは1型Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体(NCX1)の血管特異的トランスジェニックマウスの腸間膜動脈において、G蛋白質共役型受容体アゴニスト刺激時のCa<sup>2+</sup>動員(血管収縮)が著明に亢進していることを見いだした。この血管反応性の亢進はNCX1阻害薬により抑制可能であった。この結果は、受容体刺激時の血管Ca<sup>2+</sup>動員にNCX1を介するCa<sup>2+</sup>流入が関与することを示唆している。我々は、この作業仮説として、G蛋白質共役型受容体(GPCR)で活性化される非選択的カチオンチャネル(TRPC)がNCX1と機能共役系を形成していることを想定した。本研究では、遺伝子改変マウスおよび特異的NCX1阻害薬を用いて、血管平滑筋細胞における受容体活性化Ca<sup>2+</sup>流入機構の分子実体がGPCR/TRPC/NCX1共役系であることを実証する。さらに、この共役系の血管病における病態生理学的役割を解明し、NCX1阻害薬の新規血管病治療薬としての可能性について検討する。

#### 2. 方法

ヒト血管平滑筋アクチン遺伝子プロモーターを用いて、NCX1およびGPCR活性化Na<sup>+</sup>透過性TRPCチャネル(TRPC3、TRPC6)の野生型およびドミナントネガティブ体の血管特異的トランスジェニックマウスを作製した。さらに、これらマウスを交配することにより、両遺伝子のダブル遺伝子改変マウスを作出した。マウス胸部大動脈における各導入遺伝子の発現はリアルタイムRT-PCRにより解析した。また、TRPCおよびNCX1の特異抗体を用いて、大動脈および冠動脈のウェスタンブロッティングおよび免疫染色を行った。機能解析として、遺伝子改変マウスの摘出腸間膜動脈にFura-PE3 (20 μM)を負荷し、フェニレフリン(1、10 μM)を添加した時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。さらに、摘出灌流腸間膜動脈(内径約100 μm)にFluo-4/AMを負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてノルエピネフリンおよびNCX1阻害薬処置時の血管径と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を同時測定した。また、これらのマウスにノルエピネフリン(1mg/kg, iv)を投与し、血圧・心拍数の変化、心電図および心エコーの解析を行った。

#### 3. 結果 研究成果

本研究当初に、フェニレフリン刺激による血管収縮にNCX1を介するCa<sup>2+</sup>流入が関与することを示す実験的証拠を得た。具体的には、血管平滑筋特異的NCX1高発現マウス(NCX1-Tg)および野生型マウスの摘出灌流腸間膜動脈にFluo4-AMを負荷した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度と血管径を同時測定したところ、野生型マウスに比べてNCX1-Tgマウスの動脈ではフェニレフリン刺激時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増加反応および血管収縮が有意に増大していることを見いだした。これらの血

管反応は特異的NCX1阻害薬により抑制可能であった。

そこで、NCX1とGPCR活性化 $\text{Na}^+$ 透過性TRPCチャネル(TRPC3、TRPC6)との機能連関を調べる目的で、TRPC3、TRPC6の野生型およびドミナントネガティブ体の血管特異的トランスジェニックマウスを作製した。これらマウスの胸部大動脈には各導入遺伝子が特異的に高発現していた。TRPC3、TRPC6の遺伝子導入による他のTRPCサブタイプの遺伝子発現量への影響は認められなかった。これらマウスより腸間膜動脈を摘出し、 $\text{Ba}^{2+}$ 取り込みによりTRPCチャネル活性を測定したところ、野生型TRPC3あるいはTRPC6のトランスジェニックマウス(TRPC3-Tg、TRPC6-Tg)の血管では野生型マウスに比べてチャネル活性が増大しており、一方、これらのDN体のトランスジェニックマウス(TRPC3-DN-Tg、TRPC6-DN-Tg)ではチャネル活性が抑制されていた。

次に、これらTRPCトランスジェニックマウスの腸間膜動脈を用いて、ノルエピネフリン刺激時の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を比較したところ、TRPC3-TgおよびTRPC6-Tgマウスの血管ではノルエピネフリン添加による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加反応が野生型マウスに比べて増大していたのに対して、TRPC3-DN-TgおよびTRPC6-DN-Tgマウスでは細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加反応が抑制されていた。また、TRPCトランスジェニックマウスの胸部大動脈リング標本を用いて、フェニレフリン( $10^{-10}\text{M}\sim 10^{-5}\text{M}$ )に対する用量依存的な血管収縮反応を測定したところ、TRPC3-TgおよびTRPC6-Tgマウスではその血管反応性は野生型マウスに比べて増大しており、TRPC3-DN-TgおよびTRPC6-DN-Tgマウスではその血管反応性は減弱していた。さらにフェニレフリンを静脈内投与した時の血圧上昇反応を調べたところ、同様にTRPC3-TgおよびTRPC6-Tgマウスで反応性が増大し、TRPC3-DN-TgおよびTRPC6-DN-Tgマウスでは反応性が減弱していた。

さらに、TRPC3-Tgマウスにノルエピネフリン(1mg/kg)を静脈内投与した時の心電図を解析したところ、冠動脈スパズムに起因するST上昇および房室ブロックが引き起こされることを見いだした。興味深いことに、NCX1-Tgマウスにおいても同様のノルエピネフリン誘発心電図異常が観察された。そこで、TRPC3とNCX1の両者の機能的関係を明らかにする目的で、TRPC3-TgマウスとNCX1ヘテロノックアウトマウスとを交配して得られたダブル遺伝子改変マウスを用いて、同様の実験を行ったところ、ノルエピネフリン処置による房室ブロックは観察されなかった。また、NCX1-TgマウスとTRPC3-DN-Tgマウスとのダブル遺伝子改変マウスの場合にもノルエピネフリン誘発房室ブロックは認められなかった。また、これらダブル遺伝子改変マウスの腸間膜動脈でのノルエピネフリン刺激時の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加反応を測定したところ、それらの増加反応は野生型マウスと同程度であった。さらに、NCX1-TgマウスおよびTRPC3-Tgマウスで観察されたノルエピネフリン誘発心電図異常はNCX1阻害薬により抑制することが可能であった。さらに、NCX1阻害薬はNCX1-TgマウスおよびTRPC3-Tgマウスの腸間膜動脈でのノルエピネフリン刺激時の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度増加反応を野生型マウスの反応レベルまで抑制可能であった。

#### 4. 考察

これらの結果は、 $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮(冠動脈スパズム)にNCX1とTRPC3の機能共役が重要な役割を果すことを示唆している。我々は、NCX1とTRPC3が血管平滑筋細胞膜上の特殊領域(マイクロドメイン)において機能的複合体を形成し、 $\alpha 1$ 受容体刺激により活性化されたTRPC3を介する $\text{Na}^+$ 流入がNCX1の $\text{Ca}^{2+}$ 流入( $\text{Na}^+$ 汲み出しと同時に)を引き起こす機序を推定している。この

GPCR/TRPC3/NCX1共役系は、受容体活性化Ca<sup>2+</sup>流入経路の分子実体である可能性が高いと推定している。創薬科学の面から、NCX1阻害薬およびTRPC阻害薬は各種GPCR活性化Ca<sup>2+</sup>流入を画一的にブロックできる可能性があり、多因子誘発血管攣縮の治療薬として将来の治療応用が期待される。

#### 5. 発表論文、参考文献

- 1) Mima, M., Kawai, C., Paku, K., Tomoo, K., Ishida, T., Sugiyama, S., Matsumura, H., Kitatani, T., Yoshikawa, H.Y., Maki, S., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Kita, S., Iwamoto, T. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ca<sup>2+</sup>-free primary Ca<sup>2+</sup>-sensor of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. **Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.** 64(Pt 12): 1125-1127, 2008.
- 2) Kita, S., Iyoda, T., Iwamoto, T. Cardiovascular Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: Pathophysiologic roles and therapeutic potentials. **Med. Bull. Fukuoka Univ.** 35(4): 211-218, 2008.
- 3) 岩本隆宏、喜多紗斗美、伊豫田拓也 心血管系Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体の構造・機能・病態生理 **日本臨床生理学雑誌** 38(4): 195-201, 2008.
- 4) Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Nakajima, Y., Komuro, I., Matsuda, T., Baba, A., Araie, M., Kita, S., Iwamoto, T., Hara, H. A Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoform, NCX1, involves in renal cell death after N-Methyl-D-aspartate and ischemia-reperfusion. **J. Neurosci. Res.** 87(4): 906-917, 2009.
- 5) Blaustein, M.P., Zhang, J., Chen, L., Song, H., Raina, H., Kinsey, S.P., Izuka, M., Iwamoto, T., Kotlikoff, M.I., Lingrel, J.B., Philipson, K.D., Wier, W.G., Hamlyn, J.M. The Pump, the Exchanger and Endogenous Ouabain: Signaling Mechanisms that Link Salt Retention to Hypertension. **Hypertension** 53(2): 291-298, 2009.
- 6) 岩本隆宏、喜多紗斗美、伊豫田拓也 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体を分子標的とした新規Ca<sup>2+</sup>調節薬の開発 **遺伝子医学MOOK** 12号「創薬研究者必見！最新とランスポーター研究2009」 248-254, 2009.