

## 心不全発症におけるメカノセンサー分子の役割

岡山大学学術研究院医歯薬学域 システム生理  
片野坂 友紀

### 研究概要

心臓は、血行動態の変化に応じて、『動けば肥大し、動かなければ痩せる』というユニークな特性を持つが、心筋細胞の『メカニカルストレス感知機構』は未だ不明な点が多い。心筋細胞では、拍動ごとに、隣接する心筋細胞との機械的・電氣的連絡部位である介在板構造に、細胞内外からの複雑なメカニカルストレスが負荷されている。我々は、世界で初めて、『心筋細胞のメカノセンサー分子 TRPV2 が介在板に存在する』ことを証明した (Katanosaka et al., 2003, *J Cell Biol.*; Muraki et al., 2003, *Cir Res.*)。また、2014 年には、心臓特異的 TRPV2 ノックアウト (KO) マウスを作製して、『TRPV2 を介したメカニカルシグナルが心機能維持には必須であること』を明らかとした (Katanosaka et al., 2014, *Nature Communications*)。本研究では、『動けば肥大し、動かなければ痩せていく』心臓の生理特性を支えるメカノセンサー分子の役割を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、①TRPV2 を介したメカニカル経路は転写因子 MEF2c を制御していること、②TRPV2 は介在板分子の発現と局在を制御していること、③血行動態負荷により誘導される肥大発症において心筋細胞の TRPV2 が key 分子となること、④心不全への重篤化は血管平滑筋細胞の TRPV2 が悪性因子として働くことが明らかになった。臨床における心不全は多面的な原因から引き起こされるものの、血行動態負荷 (メカニカルストレス) が心不全へ至る唯一の共通ルートである。本研究成果は、心筋細胞でメカノセンサー分子として働く TRPV2 を介したシグナル経路・生理的重要性を明らかにすることで、血行動態負荷により生じる心不全発症経路や治療ストラテジーの解明に繋がると考えられる。

### 研究背景

心臓は、血行動態負荷に応じて形や機能を再構築しながら、血液駆出率を維持しようとする。心筋細胞は終末分化細胞であるので、生後の成長や肥大には一つ一つの細胞が大きくなることとなる。心筋細胞が機械的な刺激に対して細胞肥大を示す性質は、in vivo の培養心筋細胞においても保たれている。このため、心筋細胞には、機械的刺激を感知するメカノセンサー分子が存在すると考えられているが、その分子実体の詳細は不明な点が残されている。我々は、TRPV2 の有無により細胞の機械刺激に対する  $Ca^{2+}$  応答が減弱することから、心筋細胞のメカノセンサー候補分子として TRPV2 に着目してきた (Iwata and Katanosaka et al., *J. Cell Biol.*, 2003; Muraki et al., *Cir. Res.*, 2003)。全身性の TRPV2 遺伝子欠損 (KO) マウスは胎生致死を示すため (Park et al., *J. Neurosci.*, 2011)、発現組織における TRPV2 の生理的役割が解析できなかった。我々は、心筋細胞特異的かつ薬物誘導可能な TRPV2KO マウスを作製し、成体マウスの心臓における TRPV2 の生理的役割を解析し、TRPV2 は心臓の構造や機能の維持に必須の分子であることを明らかにした (Katanosaka et al., *Nat. Commun.*, 2014)。本研究では、このように心臓生理に必須の TRPV2 が、常に拍動を続ける心臓内でどのようなシグナル経路を制御するか、また血行動態負荷に対する心臓の変容機構にどのような役割を果たすかを明らかにした。

### 研究成果

① TRPV2 を介したメカニカル経路は転写因子 MEF2c を制御している。

心臓特異的 TRPV2KO マウスは、タモキシフェンを腹腔内投与すると数日以内に TRPV2 発現を約 90% 以上抑制し、重篤な心不全を呈する。そこで、タモキシフェン投与開始から 4 日目の TRPV2KO マウスの心臓を用いてマイクロ

アレイ解析を行い、TRPV2 依存的な遺伝子発現変化を調べた。タモキシフェン投与した TRPV2KO において発現減少を示す遺伝子において、パスウェイエンリッチメント解析を行った結果、心筋収縮関連遺伝子 (cardiac contraction) や、脂質代謝 (Fatty acid metabolism) において、相関が高いことが明らかになった。また、タモキシフェン投与 4 日目の心臓において、50% 以上の mRNA 発現が抑制された遺伝子は 71 個であった。このうち、興奮収縮連関に関与する遺伝子として、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, Ryanodine receptor 2, L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, Phospholamban, Traiadin が 50% 以上の mRNA 発現減少を示した。また、筋形質膜に存在するジストロフィン複合体の構成因子である Delta-sarcoglycan, Gamma-sarcoglycan, Dystrophin も 50% 以上の mRNA 発現減少を示した。さらに、生理条件下で TRPV2 の局在が見られる介在板の構成因子である Catenin alpha 3 および Gap junction protein1 も 50% 以上の mRNA 発現減少を示した。さらに、心筋細胞の成長や肥大時に必須の転写因子である Myocyte enhancer factor 2c (MEF2c)、および転写制御因子 Histon deacetylase 9 (HDAC9) が、50% 以上の mRNA 発現減少を示した。これらの結果から、TRPV2 の発現抑制によって、心筋細胞に備わるストレス条件下において収縮機能を増強させる能力が低下していると推察された。

そこで、心筋細胞のストレス応答能力における TRPV2 の役割を明らかにするために、新生児培養心筋細胞を用いて、10% FCS の有無に依存した細胞分化および肥大応答を解析した。10% FCS 含有培地において、Floxed-TRPV2 マウスから単離した培養心筋細胞では、培養開始 5 時間程度より、TRPV2 由来の浸透圧刺激依存的な  $\text{Ca}^{2+}$  応答が観察できた。また培養 48 時間後より、電気刺激由来の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇応答、および Caffeine 依存的な筋小胞体由来  $\text{Ca}^{2+}$  応答が確認できた。培養 72 時間後では、電気刺激由来の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇応答、および Caffeine 依存的な筋小胞体由来  $\text{Ca}^{2+}$  応答が共に著しく増大した。培養 72 時間経過した細胞は、細胞内にアクチン繊維が収縮軸方向に配列しており、サルコメアが確認できた。また、これらの細胞では同調拍動が確認できた。10% FCS 非含有培地で培養した細胞では、培養開始 48 時間で、HDAC9 が核内に局在している一方で、MEF2c は細胞質に局在していた。10% FCS 含有培地で培養すると、HDAC9 が核内から核外 (細胞質) へ移動し、MEF2c は細胞質から核内へ移動した。このことは、10% FCS 添加による肥大誘導条件下で、肥大応答転写因子・転写調節因子が働いたことを示している。

一方、TRPV2 欠損心筋細胞では、10% FCS 含有培地において、培養 72 時間経過した後も、電気刺激由来の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇応答が観察されなかった。Caffeine 依存的な筋小胞体由来  $\text{Ca}^{2+}$  応答は観察されたものの、正常心筋細胞と比較して応答は著しく小さかった。また、培養 72 時間経過しても、細胞内のアクチン繊維は少なく、細胞面積も著しく小さかった。それぞれの細胞が収縮していることは観察されたものの、同調拍動は見られなかった。さらに、TRPV2 欠損心筋細胞では、HDAC9 および MEF2c 共に発現量が低く、10% FCS 含有培地で培養しても細胞内局在変化が見られなかった。これらのことは、心筋細胞の TRPV2 が、心筋細胞の分化や肥大応答に必須であること、このような心筋細胞変容過程において HDAC9 および MEF2c を制御することを示している。

## ② TRPV2 は介在板分子の発現と局在を制御している。

我々は、生理条件下の心臓組織において、TRPV2 が介在板に局在することを示している (Katanosaka et al., Nat. Commun., 2014)。我々は、タモキシフェンを生後 2 週より投与して、介在板形成過程を電子顕微鏡観察し、介在板形における TRPV2 の役割を解析した。正常心筋組織では、介在板構造は生後 10 週において成熟したアコーディオン構造を示した。しかし、TRPV2 欠損心臓組織では、生後 10 週経過しても、アコーディオン構造が獲得されず、明らかにルーズな細胞間接着が確認された。また、免疫組織化学的に介在板因子の局在を解析した結果、TRPV2 欠損心臓組織では、コネキシン 43 やカテニンなどの介在板因子が異常な局在を示していた。また、培養心筋細胞において、コネキシン 43 やカテニンの発現量や局在は、TRPV2 の発現量に依存していることも明らかとなった。このことから、TRPV2 は介在板分子の発現と局在を制御し、介在板構造の維持に重要な役割をもつことを示している。

## ③ 血行動態負荷により誘導される肥大発症において心筋細胞の TRPV2 が key 分子となる。

生後 2 週より TRPV2 発現を抑制した TRPV2KO マウスを用いて、大動脈結紮による血行動態負荷依存的な病的変容を解析した。正常マウスでは、大動脈結紮手術 2 週間後に、肥大に伴う収縮力の増大が見られるものの、手術

16 週間が経過すると重篤な心不全が発症した。一方、TRPV2KO マウスは、大動脈結紮手術 2 週間後に肥大応答が見られず心機能がわずかに低下したものの、手術から 16 週間経過した後も著しく心機能が低下することはなかった。このことから、圧負荷により引き起こされる心肥大応答には、心筋細胞の TRPV2 が重要な役割を果たすと考えられる。

#### ④ 心不全への重篤化は血管平滑筋細胞の TRPV2 が悪性因子として働く。

血行動態負荷によって引き起こされる心不全は、長い時間を要した反応であり、心筋細胞だけの問題でない。我々は、血行動態負荷によって引き起こされる心不全における血管平滑筋の TRPV2 の役割を明らかにするために、血管平滑筋特異的 TRPV2KO マウスを作製した。正常マウスの血管では、内圧上昇依存的に血管径が増大するものの、ある地点から血管径は減少を始める。しかし、血管平滑筋特異的 TRPV2KO マウスの血管は、内圧上昇依存的に血管径が増大し、収縮応答が見られなかった。このような性質を持つ血管平滑筋特異的 TRPV2KO マウスを用いて、大動脈結紮に対する肥大・不全応答を解析した。驚くことに、血管平滑筋特異的 TRPV2KO マウスは、わずかに肥大応答が見られるものの、手術後 16 週を経過しても、心機能低下を示さず、心室の拡大も見られなかった。このことは、圧負荷による心不全発症において、血管平滑筋細胞に発現する TRPV2 が悪性因子となっていることが示唆された。

#### 考察

本研究では、心仕事が増大する成長期のマウス心臓、および血行動態負荷条件下の成体マウスの心臓における TRPV2 の役割を解明することを通して、『動けば肥大し、動かなければ痩せる』筋細胞の性質維持に TRPV2 が必須であることを明らかにした。本研究の成果は、心不全だけでなく、筋のサルコペニア・フレイル等の予防・治療法・運動模倣薬の開発に繋がることが期待される。また、血管の内圧依存的な収縮応答や、圧負荷に対する心不全応答に血管平滑筋の TRPV2 が重要な役割を果たしていることから、血行動態負荷依存的に平滑筋細胞より産出される心筋細胞悪性因子を見出す手がかりとなるだろう。本研究に対する多大な助成に心より感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Iwata, Y. *et al.* A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca<sup>2+</sup>-permeable growth factor-regulated channel. *J. Cell Biol.* **161**, 957–967 (2003).
- 2) Muraki, K. *et al.* TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Cir. Res.* **93**, 829–838 (2003).
- 3) Park, U. *et al.*, TRPV2-knockout mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J. Neurosci.* **31**, 11425–11436 (2011).
- 4) Katanosaka *et al.*, TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat. Commun.*, doi: 10.1038/ncomms4932. (2014)