

小胞体 TRIC チャンネル欠損マウスの高血圧の病態及び、 ヒト TRIC 遺伝子多型と本態性高血圧の関連の解明

京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野
竹島 浩

1. はじめに

小胞体は細胞内Ca²⁺ストア機能を備えており、そのCa²⁺放出による細胞質Ca²⁺濃度上昇は恒常性や機能維持に不可欠である。小胞体Ca²⁺放出を担当するイオンチャンネルとしてリアノジン受容体とイノシトール三リン酸(IP₃)受容体が知られ、それぞれ独自の機構により開口することで小胞体Ca²⁺シグナルを発生させる。このチャンネルの開口に伴い陽イオンであるCa²⁺が小胞体より流出すると、小胞体内腔に負電荷が発生するため、以降のCa²⁺放出が抑制されることが想像される(1)。生理的条件下で観察される数十ミリ秒にも及ぶ小胞体Ca²⁺放出が持続するためには、この負電荷を中和する機構が必要であると古くから想定されている(2)。この機構の一翼を担う分子実体であるカウンターイオンチャンネルとして、一価陽イオン透過性のTRICチャンネルを数年前に我々のグループにて同定した(3,4)。動物においては、TRIC-AとTRIC-Bの2種類のTRICチャンネルサブタイプが独自の組織特異的パターンにより分布している。両サブタイプは3本の膜貫通セグメントを有して、核膜や小胞体膜内でホモ3量体を形成し、細胞内環境下では主にK⁺透過性チャンネルとして機能している。TRIC-AとTRIC-Bの同時欠損マウスは胎生期心不全により致死となり(3)、TRIC-B欠損マウスは出生時に肺胞機能障害による呼吸不全により致死となる(5)。TRIC-A欠損マウスは致死性を示さず、骨格筋にて軽度の形態および生理的異常が観察されていたが(6)、興奮性組織に分布するTRIC-Aの生理機能の詳細は検討されていなかった。

2. 方法

既に樹立したTRIC-A欠損マウスおよびその単離血管・平滑筋試料において、テールカフ法、蛍光顕微鏡法やパッチクランプ法等を駆使して血圧測定、Ca²⁺動態観察やイオン電流測定等を遂行した。また、PCR法や遺伝子チップ法によりヒト一塩基多型(SNP)遺伝子型の解析も企画した。

3. 結果

3-1. TRIC-A欠損マウスにおける高血圧

マウスは夜行性であり、交感神経系が優位な夜間に血圧が上昇する。テレメトリー血圧計測により、TRIC-A欠損マウスは昼間の時間帯のみ高血圧を示すことが明らかになった。テールカフ法により各種の降圧薬(ほぼ最大効果の投薬量)に対する効果を正常マウスとTRIC-A欠損マウスで比較したところ、多くの薬物で同程度の効果が観察されたものの、電位依存性Ca²⁺チャンネル阻害薬でのみ顕著な降圧効果がTRIC-A欠損マウスにて観察された。従って、TRIC-A欠損マウスは脳梗塞や心筋梗塞の発生リスクが特高いとされる夜間高血圧症の有用な動物モデルであり、Ca²⁺チャンネル阻害薬の標的となる血管の収縮亢進が高血圧の原因と推定された。

3-2. TRIC-A欠損抵抗血管の収縮とCa²⁺動態の異常

血圧動態は末梢動脈である抵抗血管の収縮により支配されているため、代表的な抵抗血管である腸間膜動脈を調製し、血管径を測定した。血管の最大弛緩を示すCa²⁺非含有溶液中ではTRIC-A欠損マウスの血管に異常はないが、通常のCa²⁺含有溶液中においてはTRIC-A欠損マウスの血管が正常血管に比べて顕著に細いことが判明した。従って、TRIC-A欠損による血管平滑筋の収縮亢進が高血圧の主原因であることが再確認された。一方、細胞内Ca²⁺濃度を蛍光色素法により測定したところ、TRIC-A欠損マウス血管平滑筋細胞にて定常状態の細胞内Ca²⁺が顕著に上昇していることが観察された。細胞外液からのCa²⁺除去や電位依存性Ca²⁺チャネル阻害薬によって正常血管平滑筋細胞と同程度まで細胞内Ca²⁺濃度が低下することから、TRIC-A欠損細胞におけるCa²⁺濃度上昇は、細胞外からの電位依存性Ca²⁺チャネルが仲介するCa²⁺流入の亢進が原因であると考えられた。さらに、TRIC-A欠損血管平滑筋細胞では、小胞体Ca²⁺貯蔵量の増大やアドレナリン刺激によるIP3酸受容体を介したCa²⁺放出の増強も観察されたが、これらの異常が直接的な高血圧の原因とは考えられなかった。

3-3. TRIC-A欠損血管平滑筋細胞における過分極シグナル障害

血管平滑筋におけるリアノジン受容体からの自発開口によるCa²⁺放出はCa²⁺スパークとして観察され、細胞膜上のCa²⁺依存性K⁺チャネルを活性化して、細胞膜を過分極させることにより、電位依存性Ca²⁺チャネルを不活性化させてCa²⁺流入を抑制する結果、血管を弛緩させる(血圧低下)ことが知られている(7,8)。蛍光イメージングやパッチクランプ測定により、TRIC-A欠損血管平滑筋細胞では、Ca²⁺スパークの発生頻度の低下、Ca²⁺依存性K⁺チャネルによる一過性外向き電流(STOCs, spontaneous transient outward currents)の発生頻度が減少、静止膜電位の上昇が観察された。従って、この変異平滑筋細胞では、上記の過分極シグナルの発生が障害されていることにより、電気的興奮性が亢進し、電位依存性Ca²⁺チャネルが顕著に活性化されていることが判明した。この異常は静止Ca²⁺濃度上昇と血管収縮性亢進を誘導し、TRIC-A欠損マウスの高血圧の直接原因となると考えられる。

3-4. ヒトTRIC-A遺伝子多型と高血圧

愛媛大グループが中心となり構築した日本人集団の高血圧ケース-コントロール試験において一塩基多型(SNPs)をPCR法により検討した結果、TRIC-A遺伝子を中心とする約100 kbに分布する連鎖SNPsは本態性高血圧リスクを上昇させることが示唆された。代表的なSNP例としては、TRIC-A遺伝子内領域に存在するrs17796739において、日本人ゲノム集団にはC(シトシン)が74%で、T(チミン)が26%の頻度で存在する。この部位での低頻度Tのホモ接合体(14人に1人の確率)では、統計上有意(p=0.018)に高血圧を発症するとともに、約18%発症リスクが上昇するものと算出された。また、rs901792においても低頻度Cのホモ接合体では、統計上有意(p=0.048)に高血圧を発症するとともに、約14%発症リスクが上昇すると算出された。

3-5. ヒトTRIC-A遺伝子多型と降圧薬の薬理効果

国立循環器病センターが中核となり、汎用される降圧薬であるサイアザイド利尿薬(TZD)、アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)とCa²⁺チャネル阻害薬(CCB)を高血圧患者約130名に処方して、それぞれの降圧効果を検討するとともに、血液試料から遺伝子を抽出する臨床試験が既に行われていた。この臨床試験においてTRIC-A遺伝子多型に注目したところ、高血圧リスク多型は降圧薬理作用を規定することが示された。例えば、rs901792では、高血圧リスク多型C(シトシン)のホモ接合体において3つの降圧薬に対

する抵抗性が示された。降圧効果は薬物治療前の血圧値に依存することから、より正確な薬理効果の検討では前値補正とともに、収縮期、平均および拡張期血圧に分割された評価が求められる。前値補正を含めた検討においても、TRIC-Aリスク多型のホモ接合体では降圧薬抵抗性が確認された。

4. 考察

上述の研究成果は文献(9)として発表された。本研究で注目した血管平滑筋細胞にはリアノジン受容体とIP3受容体が共存しており、TRIC-AとTRIC-Bチャンネルも共発現している。TRIC-A欠損によりリアノジン受容体活性の抑制は観察されたものの、IP3受容体の機能障害は認められていない。従って、TRIC-Aチャンネルとリアノジン受容体、TRIC-BチャンネルとIP3受容体という機能共役ペアが想像されるものの、どのような機序で選択的な機能共役が成立するのかについては今後の課題である。また、TRIC-A欠損によりIP3感受性ストアのCa²⁺過剰負荷が観察されたが、その形成機構も不明である。一方、ヒト遺伝子解析により得られた結果からは、TRIC-A遺伝子多型検査が、高血圧予防、降圧薬の選択や用量決定などの個別化医療に貢献することも期待される。

5. 文献

- 1) Yamazaki T. et al. New molecular components supporting ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release: roles of junctophilin and TRIC channel in embryonic cardiomyocytes. *Pharmacol. Ther.* 121, 265-272 (2009)
- 2) Meissner G. Monovalent ion and calcium ion fluxes in sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* 55, 65-82 (1983)
- 3) Yazawa M. et al. TRIC channels are essential for Ca²⁺ handling in intracellular stores. *Nature* 448, 78-82 (2007)
- 4) Pitt S. J. et al. Charade of the SR K⁺-channel: two ion-channels, TRIC-A and TRIC-B, masquerade as a single K⁺-channel. *Biophys. J.* 99, 417-426 (2010)
- 5) Yamazaki D. et al. Essential role of TRIC-B channel in Ca²⁺-handling of alveolar epithelium and perinatal lung maturation. *Development* 136, 2355-2361 (2009)
- 6) Zhao X. et al. Ca²⁺ overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 285, 37370-37376 (2010)
- 7) Berridge M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J. Physiol.* 586, 5047-5061 (2008)
- 8) Amberg G. C. et al. Calcium sparklets regulate local and global calcium in murine arterial smooth muscle. *J. Physiol.* 579, 187-201 (2007)
- 9) Yamazaki D. et al. TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance. *Cell Metab.* 14, 231-241 (2011)