

論文の内容要旨

論文題目 **Canonical transient receptor potential channels in human cardiac fibroblasts: Effects of TGF- β**

(ヒト心筋線維芽細胞における TRPC チャンネル : TGF- β の作用)

氏名 池田健一

心筋線維芽細胞は心臓内結合組織を構成するポンプ機能を持たない細胞ではあるが、細胞数は心臓内で約 60~70%を占める最も多い細胞種である。心筋線維芽細胞はそれ自体平滑筋 α -アクチン、メタロプロテアーゼなどを分泌し、細胞外マトリックス(ECM)を産生する筋線維芽細胞に分化し、心臓の細胞成分を支持し、心臓全体の形態を維持するなど重要な役割を持っている。一方、高血圧、心筋梗塞などの病態では、心筋線維芽細胞は細胞数を増加させ、細胞の分化を促し、心筋の線維化(リモデリング)を助長し、心肥大・心不全を引き起こす事が知られている。

一方、TGF- β は増殖因子の一つであり、細胞の分化、増殖、線維化、アポトーシスの促進など様々な働きを持っている。特に TGF- β は心筋梗塞、高血圧など病的圧負荷がかかる心筋でその発現量が増加し、心筋線維芽細胞の活性化の中心的な役割を持ち、ECM 遺伝子発現の亢進、コラーゲンの分泌など心筋の線維化に重要な役割を持っている。近年では、レニンアンジオテンシン系の中でも、特に不全心で増加するアンジオテンシンIIの発現が、TGF- β と協調し、心臓リモデリング(線維化)を促進していることも報告されている。このように様々な作用をもたらす TGF- β が、どのように心筋線維芽細胞の分化、増殖に関与しているかの詳細については不明な点が多い。私は、TGF- β と心筋線維芽細胞の増殖について検討し、TGF- β による心筋線維芽細胞の増殖に細胞内カルシウムイオンの増加が重要であること、さらに、その動員機構につき検討したので報告する。

細胞内カルシウムの動員機構としては、T 型、L 型 Ca^{2+} チャンネルなどの電位依存性 Ca^{2+} チャンネルのほか、TRP チャンネル (transient receptor channel)も重要であることが知られている。TRP チャンネルは TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML の 6つのサブファミリーからなり、特に TRPC には C1~C7, TRPV には V1~V6, TRPM には M1~M8 までのサブタイプが報告されている。近年、ヒト心房細動患者における心房の線維化に TRPM7 が重要な役割を持っているとの報告もされている。同時に、心筋細胞に対しては、TRPC3, 6 が転写因子カルシニューリン及び NFAT を介して心筋肥大に関与すると

の報告もされている。このように心筋細胞及び心筋線維芽細胞の線維化および肥大化などの心臓リモデリングにおいて、TRP 蛋白を介したカルシウム動員が重要な役割を演じていると考えられる。しかし、ヒト心筋線維芽細胞にける TRP 蛋白 (特に TRPC) の薬理的・分子生物学的詳細な検討、さらには、TGF- β の増殖因子と TRPC 蛋白との関連及び心筋線維芽細胞の増殖、線維化についての報告はなく、私は、TGF- β と TRPC 蛋白についての相互作用についても検討した。さらに、細胞内 Ca^{2+} 動員機構の一つに $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構も重要な役割を持っていることが知られている。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構は forward mode 及び reverse mode の2つがあり、通常、心筋細胞においては、forward mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構が働き、細胞内カルシウム濃度を減少するように働いている。しかし、梗塞心筋及び再灌流した傷害心筋などの特に細胞内 Na^+ 上昇などの状態では、reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構が働き、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を促し、不全心など病的心筋の不整脈発生などにも関与していることが知られている。今回、私は、この reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構も細胞内 Ca^{2+} 動員機構および心筋線維芽細胞の増殖に重要であると考え、この点からも検討した。

本研究では、材料としてヒト心筋線維芽細胞を用いて、Fura2-AM を用いた 2 波長励起法、RT-PCR 法、Western blotting 法、small interfering RNA (siRNA) 法、免疫染色法、細胞増殖アッセイ (MTT) 及びフローサイトメトリーによる細胞周期の測定を行い、心筋線維芽細胞における TRPC 蛋白の薬理的及び分子生物学的特徴、ならびに TGF- β の作用、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の関与につき検討するとともに、細胞増殖への影響からも検討した。

Fura2-AM を用いた 2 波長励起法による細胞内カルシウム濃度測定では、ジアシルグリセロール (DAG) のアナログで、TRPC3, 6 のリセプター作用型カルシウムチャネルを活性化させることが知られている 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) の投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度の著明な増加を認めた。一方、細胞外に Ca^{2+} が存在しない場合には、OAG 投与によって、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は認めなかった。また、DAG リパーゼを阻害する RHC 80267 投与によっても細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。このことより、ヒト心筋線維芽細胞には DAG の産生により活性化される TRPC 蛋白が存在することが分かった。また OAG の作用は、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化する PMA を投与すると消失し、逆に PKC 阻害薬である GF109203X を投与すると再び細胞内カルシウム流入が増加することもわかった。このように、OAG による細胞内 Ca^{2+} 上昇は、PKC を介さない直接的活性化によるものと思われた。また、容量依存型カルシウムチャネル (SOC) を活性化させるタプシガルギンの投与では、細胞外に Ca^{2+} が無い場合には、一過性の細胞内 Ca^{2+} 上昇をきたし、細胞外に Ca^{2+} が存在すると、細胞外からの Ca^{2+} 流入による定常的な Ca^{2+} 濃度の上昇をきたした。このように、ヒト心筋線維芽細胞には、OAG により活性化される ROC と SOC の異なるチャネルが存在することが分かった。

また、ROC と SOC に対する各種拮抗薬 (2-ABP, SKF 96365, La^{3+} など) の抑制作用

につき検討した。タブシガルギンおよび OAG による Ca^{2+} 流入は、これらの拮抗薬に対して全く異なった感受性を示すことが確認された。L 型カルシウムチャネルの阻害薬であるニフェジピンでは、明らかな阻害されないことより、心筋線維芽細胞における細胞内カルシウム動員機構としては TRP 蛋白が重要な役割を演じていることがわかった。さらに、ROC 及び SOC に対する Ca^{2+} 及び Ba^{2+} , Sr^{2+} (ストロンチウム) に対する透過性について検討したところ、タブシガルギンによって活性化される SOC は、OAG により活性化される ROC に比較し、 Ba^{2+} , Sr^{2+} に対する透過性は、カルシウムに比べ低いことが分かった。

次に、siRNA を用いた TRPC 6 のノックダウン、TRPC6 の活性化物質であるハイパーフォリン、OAG 及びアンジオテンシン II による細胞内カルシウム動員に及ぼす効果につき、比較検討したところ、心筋線維芽細胞の Ca^{2+} 動員には TRPC3, 6 とくに、TRPC6 の関与が重要であること、アンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 上昇には、OAG を介した TRPC 蛋白質の活性化が関与していると思われた。

さらに、分子化学的検討を行った。ヒト心筋線維芽細胞の total RNA を用いた conventional RT-PCR で心筋線維芽細胞に発現する TRP 蛋白の遺伝子を解析した。TRPC 1, 3, 4, 6 の発現を認め、TRPV, TRPM については、TRPV 1, 2, 4, TRPM7 の mRNA の発現を認めた。Real-time RT-PCR 法で発現量を定量したところ、TRPC1>4, TRPC6>3 を認めた。さらに、TRPC 蛋白の発現を免疫組織化学染色及びウェスタブロッティングで検討し、TRPC 1, 3, 4, 6 蛋白の発現が確認された。

続いて、心筋線維芽細胞における TGF- β の作用について検討した。TGF- β を、急性に投与したときには、細胞内 Ca^{2+} の流入は認められなかった。しかし、TGF- β 投与後 24 時間経過した細胞では、タブシガルギン、OAG 及びアンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 流入が著明に増強した。次に、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構における細胞内 Ca^{2+} 流入について Fura2-AM を用いて検討した。KB-R7943 を用いて reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を阻害した場合、及び、細胞外 Na^+ を膜非透過性の NMDG $^+$ で置換した場合には、タブシガルギン、アンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 流入は著明に阻害された。以上より、ヒト心筋線維芽細胞の細胞内 Ca^{2+} 動員には、TRPC 蛋白の関与の他に、TRPC を介した細胞内 Na^+ 増加による reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の関与も考えられた。

さらに、MTT アッセイ法を用いて細胞増殖について検討した。TGF- β による細胞増殖は細胞外に Ca^{2+} が存在しない場合には、 Ca^{2+} 存在下に比し、有意に抑制された。また、TGF- β 及びアンジオテンシン II による細胞増殖及び各種阻害剤 (2APB, SKF96365, La^{3+} , ニフェジピン, KB-R7943) の効果について検討した。TGF- β 及びアンジオテンシン II による細胞増殖は、TRPC 蛋白阻害薬 (SKF96365, 2APB, La^{3+})、KB-R7943 にて有意に阻害された。以上より、TGF- β 及びアンジオテンシン II による細胞増殖には、TRPC 蛋白及び reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構が重要な役割を持つことが示唆された。

次に、フローサイトメトリーを用いて、TGF- β 、アンジオテンシン II 及び KB-R7943

のセルサイクルに及ぼす効果につき検討した。TGF、アンジオテンシン処理細胞では、G0/G1 から S/G2, M 期の移行が増大した。TGF- β とアンジオテンシンとの併用では、さらに S/G2, M 期への移行の増大を認めた。一方、KB-R7943 を投与した群では G0/G1 より S/G2, M 期への移行は著明に抑制された。

これらの実験結果より、(1) ヒト心筋線維芽細胞には、OAG により活性化される ROC と容量依存型チャネル (SOC) の異なるチャネルが存在し、分子生物学的検討において、TRPC1, 3, 4, 6 の発現が認められた。(2) OAG 及びアンジオテンシン II による細胞内カルシウム動員として、TRPC3, 6, とくに、TRPC6 の関与が重要であると考えられた。(3) TGF- β 慢性投与では、タプシガルギン、OAG 及びアンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 流入を著明に増強した。(4) タプシガルギン、アンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 流入には、TRPC 以外に、TRPC の活性化による細胞内 Na^+ 増加に伴う reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の活性化も関与していると思われた。(5) TGF- β 及びアンジオテンシン II は、G0/G1 から S/G2, M 期の移行を増大し、細胞増殖をきたしたが、その機序として TRPC 蛋白及び reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が重要な役割を持つことが示唆された。

本研究から、心筋リモデリングにおいて、心筋線維芽細胞の分化・増殖、さらに、TGF- β が大きく関与していることは知られているが、心筋リモデリング抑制治療薬として、TRPC 蛋白及び reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換が、新しい治療の標的となりうる可能性が示唆された。