

助成番号 0831

血管スパズムにおける $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体・ Na^+ 透過性 TRPC チャネル共役系の 役割の解明と新規治療への応用

岩本 隆宏, 喜多 紗斗美, 伊豫田 拓也

福岡大学医学部薬理学

概要 α_1 受容体は様々な臓器血管の交感神経性調節に重要な役割を果たしているが、 α_1 受容体を介する血管トーン制御については未だ十分に解明されていない。最近、私たちは α_1 受容体刺激による血管収縮に 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) 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 高発現マウスでは野生型マウスに比べてフェニレフリン刺激時の血管収縮 (細胞内 Ca^{2+} シグナル) が有意に増大していること、またこれらの血管反応は特異的 NCX 阻害薬により抑制されることを見いだした。この機序を解析する目的で、血管平滑筋細胞を用いた免疫沈降実験、免疫染色実験およびシヨ糖密度勾配分離実験を行ったところ、NCX1 は TRPC3 と相互作用しカベオラ分画に共存していることが示唆された。そこで、血管平滑筋特異的 TRPC3 高発現マウスを作製したところ、フェニレフリン刺激時の血管収縮 (細胞内 Ca^{2+} シグナル) が顕著に増大することを観察した。一方、NCX1 ヘテロ欠損マウスおよび抑制型 TRPC3 高発現マウスでは、同刺激の細胞内 Ca^{2+} シグナルが有意に減弱していた。また、NCX1 および TRPC3 の高発現マウスに高濃度のノルエピネフリンを静脈内投与すると、共に冠スパズムに起因する心電図 ST 上昇が誘発された。この冠スパズムは NCX 阻害薬処置および抑制型 TRPC3 遺伝子導入により抑制された。これらの結果は、TRPC3/NCX1 共役系が α_1 受容体を介する血管トーン制御に重要な役割を果たすことを示唆している。

1. 研究目的

血管緊張は、神経伝達物質やホルモンなどの液性因子と血管壁に加わる圧・伸展刺激などの血行力学的因子により複合的に制御されている。この制御システムが破綻すると、血管スパズム、高血圧、動脈硬化などの種々血管病に陥る。特に、主要臓器の血管スパズムは突然死に関わる重要な病態である。私たちは、血管スパズムの発症機序の解明、さらには、その新たな治療法の開発を目指している。本研究では、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介した血管トーン制御の分子機構について、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) と GPCR 活性化 Na^+ 透過性 TRPC チャネル (TRPC3, TRPC6) の共役系に焦点を当てて研究を行った。

1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) は、生体膜 Ca^{2+} 輸送を担う構成分子の一つであり、他の Ca^{2+} チャネルや Ca^{2+} 輸送体と機能共役することにより、様々な生体応答

の制御及び細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの維持に重要な役割を果たすと考えられている¹⁾。NCX1 は、通常、細胞膜を介した Na^+ 濃度勾配に従って Ca^{2+} を細胞外へ排出しているが、細胞内 Na^+ が増加する特殊な状況下では逆輸送 (「 Ca^{2+} 流入」) を行なう。従来から、NCX1 は高血圧や心不全に関わる重要な輸送体と想定されているが、その機能の複雑性 (両方向性) や活性制御機構の不明確さから、その実体は未だ詳細が不明である。これまでに、私たちは、遺伝子改変マウスと NCX 阻害薬を用いた研究から、血管平滑筋細胞への NCX1 を介する Ca^{2+} 流入が食塩感受性高血圧の発症に決定的な役割を果たすことを明らかにした^{2,4)}。一般的な概念として、活動電位が発生しない血管では、通常の (“平均値”) のイオン環境下、エネルギー論的に NCX1 の Ca^{2+} 流入は起こり得ないとされている。そこで、食塩負荷時に誘導される血管 NCX1 の Ca^{2+} 流入を説明するためには、NCX1 が Na^+ ポンプや Na^+ 透過性

チャンネルなどと共に細胞膜上の特殊領域(細胞膜マイクロドメイン)に局在し、食塩感受性因子の刺激により局所的な Na^+ 濃度増加が起こることを想定する必要がある。

本研究では、NCX1、TRPC3 および TRPC6 の遺伝子改変マウスおよび特異的阻害薬を駆使して、GPCR で活性化される NCX1 機能共役系の分子実体および病態機序を解明し、血管病への治療応用を検討する。

2. 研究方法

2.1 各種遺伝子改変動物の作製

血管平滑筋 α アクチンプロモーターを用い、平滑筋特異的 NCX1.3、TRPC3 および TRPC6 トランスジェニックマウスを作製した。また、TRPC3 および TRPC6 については、チャンネル活性を欠失したドミナントネガティブ変異体のトランスジェニックマウスも併せて作製した。

2.2 血圧ならびに血管張力測定

各トランスジェニックマウスの血圧は tail-cuff 法により測

定した。また、マウスより胸部大動脈を摘出し、Krebs 緩衝液(95% O_2 - 5% CO_2 混合ガス通気, 37°C)を満たしたマグナス装置に懸垂し、 α_1 作動薬による血管収縮力反応を測定した。

2.3 摘出マウス腸間膜動脈の張力-細胞内 Ca^{2+} 濃度同時測定

マウスより腸間膜細動脈(100 - 120 μM)を摘出し、両端をガラスピペットに固定した(灌流圧: 70 mmHg)。血管に fluo4-AM (15 μM)を3時間負荷した後 Krebs 緩衝液を表面灌流し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて血管径および細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時測定した。

2.4 免疫沈降実験

細胞溶解液に NCX1 抗体を添加し、4°C で 1 時間 インキュベートした後、protein A-sepharose beads を加えて、さらに 4°C で 1 時間 インキュベートした。次いで、遠心操作により NCX1 抗体の免疫複合体を回収した。この免疫複合体は western blotting 法により解析した。

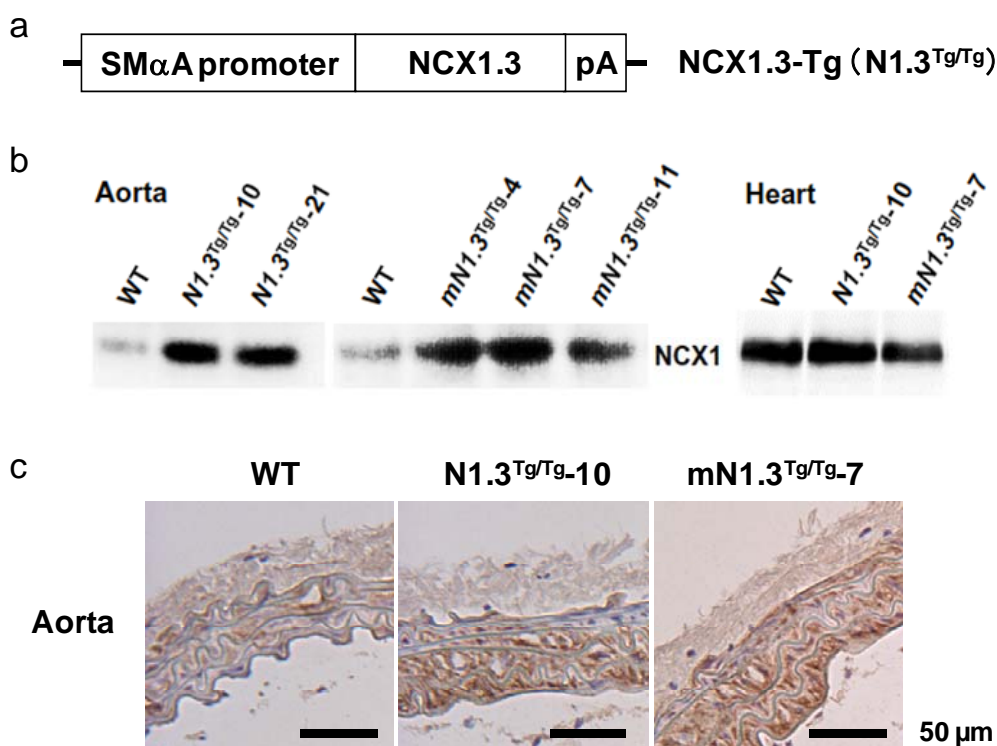


Fig. 1. (a) Schematic representation of the transgene used to generate vascular smooth muscle-specific transgenic mice. The NCX1 was brought under the control of human smooth muscle α -actin (SM α A) promoter. (b) Western blotting analysis with anti-NCX1 antibody in aorta and heart microsomes from NCX1.3 transgenic and wild type mice. (c) Immunohistochemical localization of NCX1 protein in the medial layer of thoracic aorta from wild type and NCX1.3-transgenic mice.

3. 研究結果および考察

GPCR を介する血管トーン制御における NCX1 の役割について調べる目的で、NCX1.3 遺伝子(血管平滑筋の主要なスプライシングアイソフォーム)を血管平滑筋特異的に高発現させたトランスジェニックマウス(NCX1.3-Tg)を作製した(Fig. 1)。得られた NCX1.3-Tg マウスの大動脈では NCX1 蛋白質が野生型(WT)マウスの約7~8倍高発現していた。免疫組織染色により NCX1 は血管平滑筋層に高発現していることを確認した。一方、心臓の NCX1 蛋白質発現量は両マウス間で差がなかった。

この血管平滑筋特異的 NCX1.3-Tg マウスを用い、 α_1 受容体刺激による血管収縮における NCX1 の関与について検討した。NCX1.3-Tg マウスの摘出腸間膜動脈にフェニレフリン(1 μ M)を添加すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)が増加して血管収縮がみられたが、これらの反応は WT

マウスに比べて強いものであった(Fig. 2)。この結果は、NCX1 が α_1 受容体刺激時に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる役割を果たすことを示唆している。そこで、特異的な NCX 阻害薬の作用について検討したところ¹⁾、両マウスでみられた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加および血管収縮作用は有意に抑制された。従って、 α_1 受容体刺激時には NCX1 を介した Ca^{2+} 流入が引き起こされ、血管収縮が誘導されるものと考えられた。そこでさらに、 α_1 受容体刺激により NCX1 を介した細胞内への Ca^{2+} 流入ならびに血管収縮が引き起こされる作用機序を詳細に調べるために、GPCR 活性化カチオンチャンネル(TRPC3 および TRPC6)の関与について検討した。具体的には、TRPC3 および TRPC6 遺伝子の野生型あるいはドミナントネガティブ(DN)体を血管平滑筋特異的に高発現させたトランスジェニックマウスを作製した(Fig. 3)。各 TRPC 蛋白質の発現については、western blotting

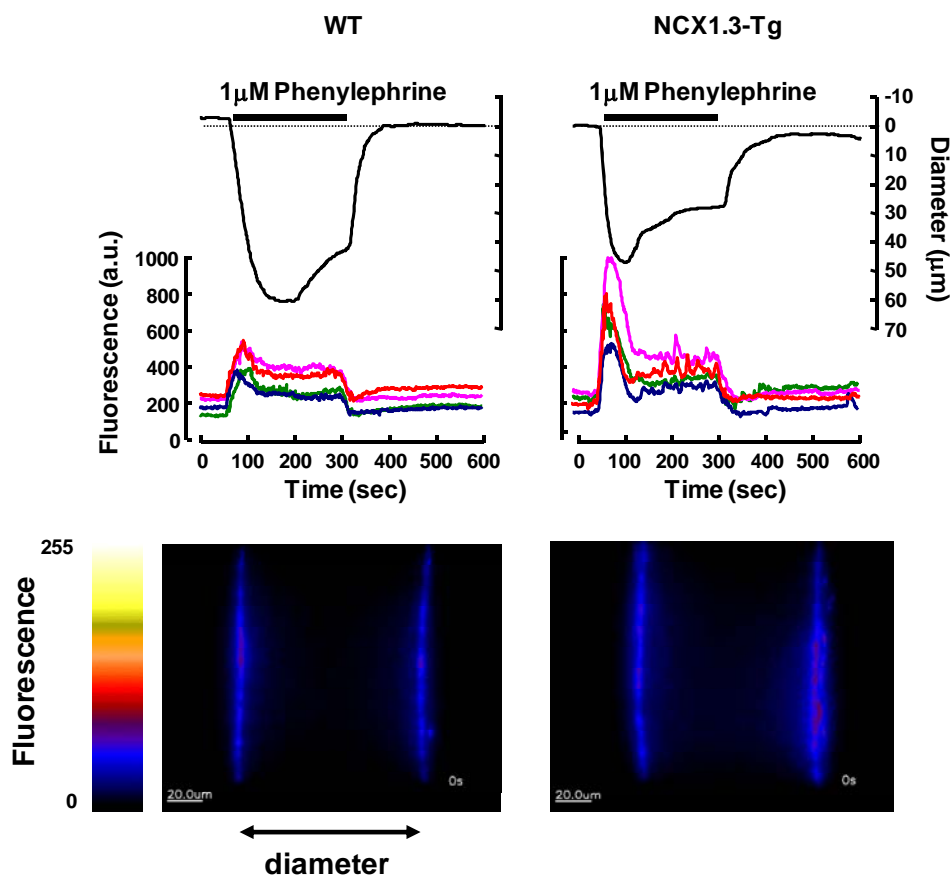


Fig. 2. Effects of phenylephrine on cytosolic Ca^{2+} level and vascular diameter in pressurized small mesenteric arteries of wild type and NCX1.3-transgenic mice. Simultaneous recording of fluorescence and internal diameter changes in fluo4-AM loaded arteries (pressurized to 70 mmHg) by laser confocal microscopy. The fluo4-AM fluorescence, indicated in arbitrary units (a.u.), reflects $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Pseudocolor images indicate the relative $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

(大動脈)および免疫組織染色(大動脈, 冠動脈)により確認した。

まず、これらTgマウスの胸部大動脈リング標本を用い、フェニレフリン(0.1 nM~10 μM)に対する血管収縮反応に

ついて調べたところ、TRPC3-Tgマウスの大動脈ではフェニレフリンに対する血管収縮反応がWTマウスに比べて増強されており、逆にTRPC3-DN-Tgマウスの血管では反応が減弱していた(**Fig. 4**)。また、TRPC6についても同様に

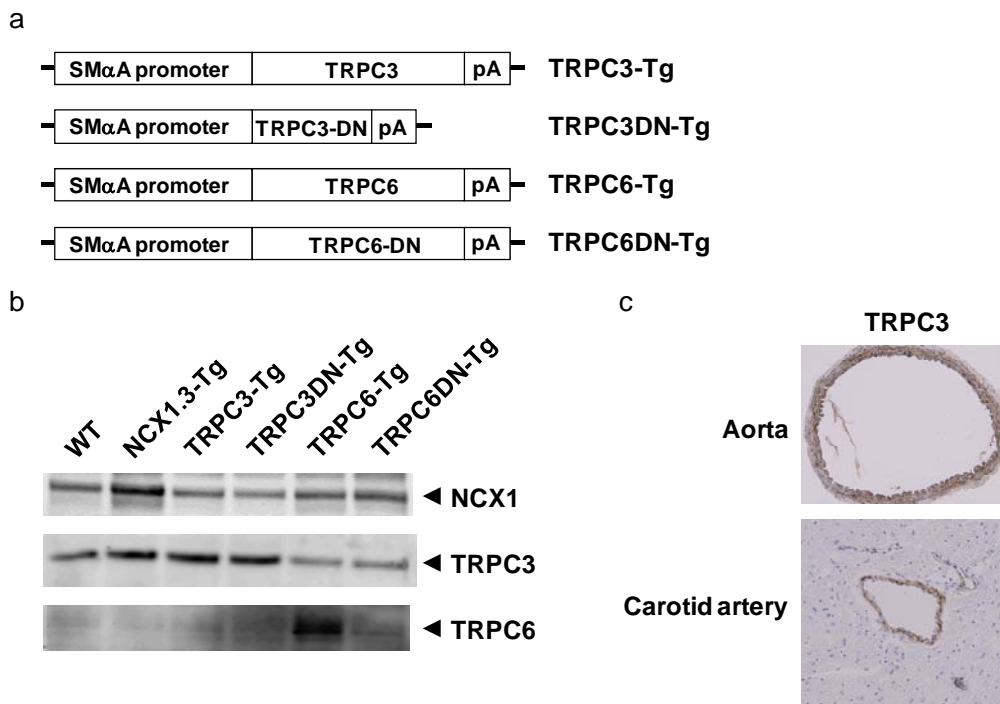


Fig. 3. (a) Schematic representation of the transgene used to generate vascular smooth muscle-specific transgenic mice. The TRPC3, TRPC6 or their dominant negative mutants was brought under the control of human SMαA promoter. (b) Western blotting analysis with anti-NCX1, anti-TRPC3 or anti-TRPC6 antibody in aorta microsomes from NCX1.3-transgenic, TRPCs-transgenic and wild type mice. (c) Immunohistochemical localization of TRPC3 protein in the medial layer of thoracic aorta and carotid artery from TRPC3-transgenic mice.

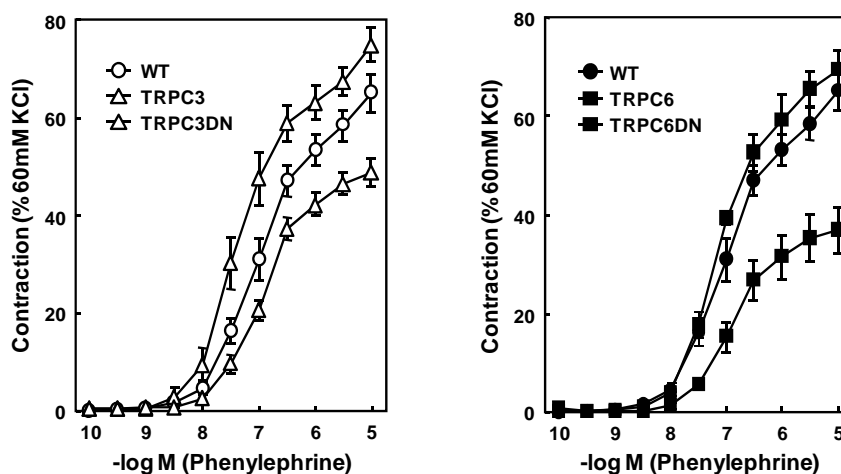


Fig. 4. Contractile responses of thoracic aortas from TRPCs-transgenic and wild type mice to phenylephrine

野生型 Tg ではフェニレフリンに対する収縮反応が亢進しており、DN 体 Tg マウスの血管反応性が減弱していた。

さらに、これら Tg マウス(ペントバルビタール麻酔下)にフェニレフリンを静脈内投与した場合の血圧上昇反応についても調べたところ、TRPC3-Tg および TRPC6-Tg マウスの血圧上昇はWTよりも大きく、一方TRPC3DN-Tg および TRPC6DN-Tg マウスでは血圧上昇反応が小さく、血管収縮反応を反映する結果が得られた(data not shown)。これらの結果より、 α_1 受容体刺激による血管収縮および血圧上昇には、TRPC3 あるいは TRPC6 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

上記の実験において、TRPC3-Tg マウスに高濃度の α_1 受容体刺激薬を投与した時に突然死することを見いだした。そこで、この突然死の原因を明らかにする目的で、TRPC3-Tg マウスの心電図を麻酔下および無麻酔下で測定した。その結果、TRPC-Tg マウスに高濃度ノルエピネフリン(1 mg/kg, iv)を投与すると、麻酔下では AV ブロックが誘発されて死に至り、無麻酔下では ST 上昇が観察された。さらに興味深いことに、NCX1.3-Tg マウスにおいても同処置で類似の心電図異常が起こることを見いだした。つまり、TRPC3-Tg ならびに NCX1.3-Tg マウスでは高濃度ノルエピネフリン投与により冠動脈スパズムが誘発されている可能性が考えられた。そこでさらに、マイクロフィルによる冠動脈造影を行ったところ、両 Tg マウスにおいて高濃度ノルエピネフリン投与時に冠動脈狭窄が起こることを確認し

た(Fig. 5)。一方、WT マウスの冠動脈においては同様の冠動脈狭窄は観察されなかった。TRPC3-Tg マウスおよび NCX1.3-Tg マウスにおいては TRPC3 あるいは NCX1 の高発現により α_1 受容体刺激時の血管反応性が亢進した結果として冠動脈スパズムが誘発されたと考えられた。

次に、ノルエピネフリンの冠動脈スパズム誘発時における NCX1 と TRPC3 の機能協関について調べるため、NCX1とTRPC3の遺伝子改変マウス間で様々なダブル遺伝子改変マウスを作製し、ノルエピネフリンによる心電図異常の有無について検討した(Table 1)。

その結果、NCX1.3-Tg と TRPC3-DN-Tg のダブル遺伝子改変マウスにノルエピネフリンを処置したところ、

Table 1

Genotype			
NCX gene X TRPC gene		AV block (anesthetized)	ST elevation (conscious)
NCX1.3-Tg		有	有
NCX1.3-Tg	TRPC3DN-TG	無	無
NCX1.3-Tg	TRPC6DN-TG	抑制傾向	n.d.
	TRPC3-TG	有	有
NCX1-KO	TRPC3-TG	無	無
	TRPC3-TG	無	n.d.
NCX1-KO		無	n.d.
Wild type		無	無

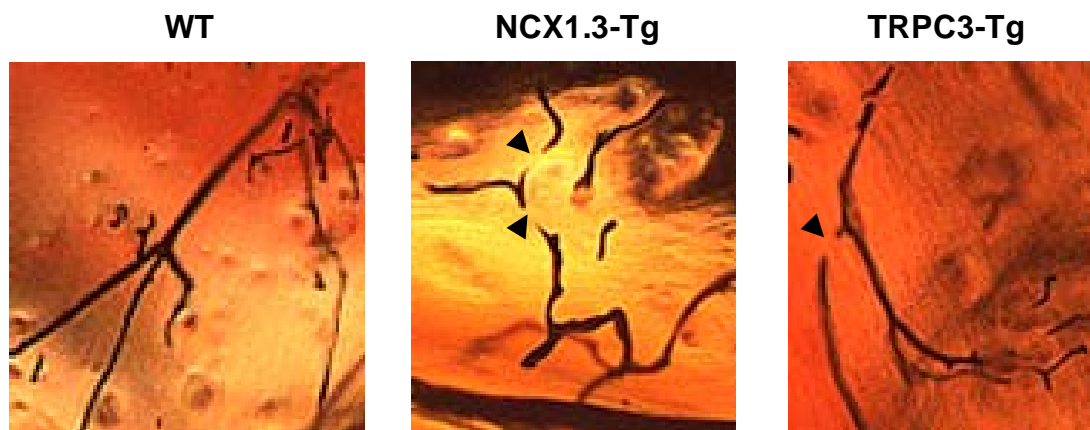


Fig. 5. Microvascular filling of coronary arteries from NCX1.3-transgenic, TRPC3- transgenic and wild type mice after norepinephrine injection. Norepinephrine-induced vascular spasm is present in NCX1.3-transgenic and TRPC3-transgenic mice, but not in wild type mice.



NCX1.3-Tg マウスで見られた AV ブロックや ST 上昇などの心電図異常は観察されなかった。また、TRPC3-Tg と NCX1 遺伝子欠失(ヘテロ)のダブル遺伝子改変マウスにおいてもノルエピネフリンによる心電図異常は認められなかった。従って、高濃度ノルエピネフリンによる冠動脈スパスムはNCX1とTRPC3の両方が存在する場合にのみ引き起こされると考えられ、 α_1 受容体刺激による血管収縮に NCX1 と TRPC3 の機能的な相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。

そこでさらに、NCX1 と TRPC3 との物理的な相互作用について調べるため、ラット胸部大動脈、A7r5 細胞およびヒト肺動脈培養細胞を用いて免疫沈降法により解析を行った (Fig. 6)。その結果、これら全ての標本において NCX1 と TRPC3 はそれぞれの抗体で共沈することを見いだした。また、ラット胸部大動脈および A7r5 細胞においては、NCX1 と TRPC6 の共沈も確認した。従って、血管平滑筋において NCX1 および TRPC3 は直接あるいは間接的に

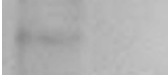

に相互作用していることが示唆された。

以上の結果より、 α_1 受容体を介する血管トーン制御に NCX1 と TRPC3 との機能共役が重要な役割を果たしていることが示された。血管特異的 NCX1 高発現マウスの摘出動脈において、GPCR 刺激時の Ca^{2+} 動員(血管収縮)が著明に亢進していること、またこの血管反応が NCX 阻害薬により抑制可能であることから、GPCR 刺激時の血管 Ca^{2+} 動員には NCX1 を介する Ca^{2+} 流入が関与するものと考えられた。NCX1、TRPC3 および α_1 受容体はおそらく脂質ラフトやカベオラなどの膜マイクロドメインに局在しており、 α_1 受容体刺激により TRPC3 を介して細胞内に Ca^{2+} とともに Na^+ が流入し、この局所の Na^+ 濃度増加を駆動力として NCX1 が Ca^{2+} を細胞内に取り込んでいることが推察される (Fig. 7)。この NCX1 と TRPC3 の機能共役は動脈スパスムや高血圧に関与している可能性があることから、NCX1 阻害薬や TRPC3 阻害薬は新たな循環器系治療薬として創薬開発が期待される。

Rat thoracic aortas

								
	TRPC3					NCX1		
	IP: anti NCX1	+	-			IP: anti NCX1	+	-
	Blot: anti TRPC3	+	+			Blot: anti NCX1	+	+

A7r5 cells

										
	TRPC3				TRPC6			NCX1		
	IP: anti NCX1	+	-		IP: anti NCX1	+	-	IP: anti NCX1	+	-
	Blot: anti TRPC3	+	+		Blot: anti TRPC6	+	+	Blot: anti NCX1	+	+

ヒト肺動脈培養細胞


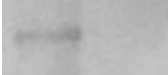

										
	TRPC3				TRPC6			NCX1		
	IP: anti NCX1	+	-		IP: anti NCX1	+	-	IP: anti NCX1	+	-
	Blot: anti TRPC3	+	+		Blot: anti TRPC6	+	+	Blot: anti NCX1	+	+

Fig. 6. Interaction of NCX1 and TRPCs in rat thoracic aortas, A7r5 cells and cells. The lysates were immunoprecipitated with anti-NCX1 antibody followed by Western blotting analysis with anti-TRPC3 or anti-TRPC6 antibody.

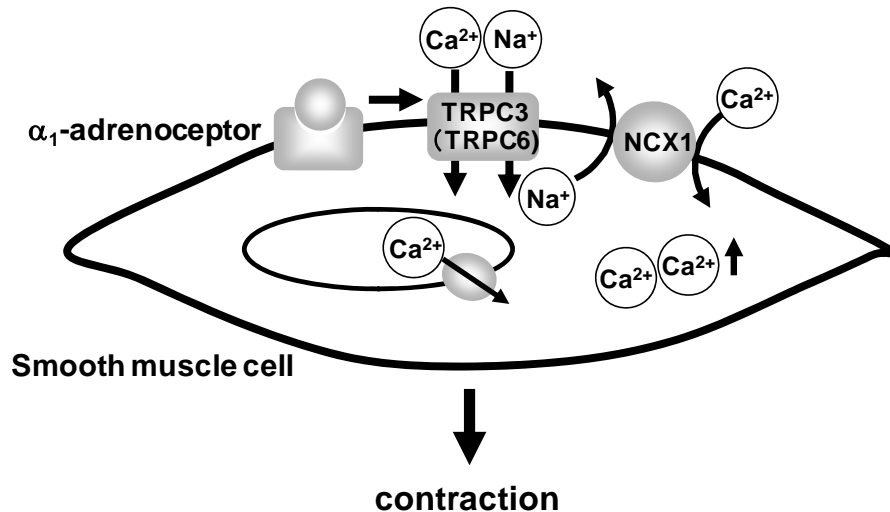


Fig. 7. Proposed pathway responsible for α_1 -receptor agonist-induced vascular contraction. α_1 -agonist activates the nonselective cation channel, TRPC3 or TRPC6. The entry of Na^+ via these channels results in the increase in subplasma membrane $[\text{Na}^+]$ and then the acceleration of NCX1-mediated Ca^{2+} entry.

文献

- 1) Iwamoto T, Watanabe Y, Kita S, Blaustein MP: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 7(3), 188-198, 2007.
- 2) Iwamoto T, Kita S, Zhang J, Blaustein MP, Arai Y, Yoshida S, Wakimoto K, Komuro I, Katsuragi T: Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med* 10, 1193-1199, 2004.
- 3) Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, Wier WG, Blaustein MP. Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J Physiol* 569, 243-256, 2005.
- 4) Blaustein MP, Zhang J, Chen L, Song H, Raina H, Kinsey SP, Izuka M, Iwamoto T, Kotlikoff MI, Lingrel JB, Philipson KD, Wier WG, Hamlyn JM: The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. *Hypertension.* 53(2), 291-298, 2009.

No. 0831

Elucidation of Roles of NCX/TRPC Coupling in Vascular Spasm and Its Applications

Takahiro Iwamoto, Satomi Kita, Takuya Iyoda

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Summary

α_1 -adrenoceptor contributes to the sympathetic regulation of various arteries. However, the molecular mechanisms underlying α_1 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction remain obscure. We found that phenylephrine-induced cytosolic Ca^{2+} elevation and contraction were significantly greater in mesenteric arteries from NCX1-transgenic mice (vascular smooth muscle-specific promoter), as well as from TRPC3-transgenic mice, compared to wild-type mice. In these two kinds of transgenic mice, a bolus injection of norepinephrine elicited ST-segment elevation and Atrio-Ventricular block (coronary spasm), both of which were suppressed by a selective inhibitor for NCX1 or TRPC3. When we crossed NCX1-transgenic mice with dominant negative TRPC3-transgenic mice and TRPC3-transgenic mice with NCX1-knockout mice, their offspring mice did not exhibit α_1 -adrenoceptor-mediated hypervasoreactivity. Coimmunoprecipitation, sucrose gradient fractionation, and immunolocalization experiments revealed that NCX1 and TRPC3 are interactively enriched in caveolar raft domains of vascular myocytes. These findings indicate that TRPC3/NCX1 coupling plays a pivotal role in regulating arterial tonus via α_1 -adrenoceptor.