

心臓の恒常性維持における TRPC3 チャネル-Nox2 機能連関制御機構の解明

富田 拓郎, 西田 基宏

自然科学研究機構 生命創成探究センター心循環ダイナミズム創発研究部門

概要 心血管組織は、体外・体内の環境変化による様々なストレスに対して、生体恒常性の維持に最も重要な器官である。そのため、環境ストレスに対する迅速な適応機構および頑健性が求められる。しかしながらその詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。これまでの研究から、心臓に慢性的な負荷がかかると心臓内に過剰な活性酸素種(ROS)が蓄積し、それにより心不全が進行すること。また異常なカルシウム(Ca^{2+})応答が心筋細胞内で起こることが数多く報告されてきた。しかしながら、ROSと Ca^{2+} シグナルがどのように相互作用するのかは明らかにされていない。さらに我々は、最近、心臓の血行力学に起因する機械的ストレス適応において、TRPC3チャネルとNox2は物理的・機能的な相互作用を有し、不全心における酸化ストレスの蓄積は、TRPC3、Nox2両者の発現上昇に起因することを突き止め、且つNox2タンパク質の安定性に、TRPC3との物理的な相互作用が決定的であることを明らかにした。

本研究は、抗ガン剤ドキシソルビシン(DOX)の投与による心委縮においても、このTRPC3-Nox2の機能連関が重要であることを明らかにした。TRPC3-Nox2相互作用には、TRPC3のC末端が重要であり、TRPC3のC末端断片(C3-C断片)はTRPC3-Nox2相互作用を阻害した。心筋細胞特異的にC3-C断片を発現させたマウスでは、DOXによる心臓における酸化ストレスの蓄積および心委縮が抑制された。これまでの研究は、病態生理的なTRPC3-Nox2の重要性に着目してきた。そこで生理的な重要性を明らかにするため、自発的運動が心臓機能およびTRPC3-Nox2機能連関に与える影響を解析した。その結果、自発的運動負荷は、心臓におけるTRPC3/Nox2のタンパク質の発現を低下させた。それに伴い、心臓は柔軟性が亢進し、容量性機械的ストレスに対して高い抵抗性を示した。以上から、TRPC3-Nox2複合体の阻害が様々な環境ストレスにより惹起される心不全の新たな治療戦略となることが示唆された。

1. 研究目的

心血管組織は、体外・体内の環境変化による様々なストレスに対して、生体恒常性の維持に最も重要な器官である。そのため、環境ストレスに対する迅速な適応機構および頑健性が求められる。しかしながらその詳細な分子機構は未だ明らかにされていない。これまでの研究から、心臓に慢性的な負荷がかかると心臓内に過剰な活性酸素種(ROS)が蓄積し、それにより心不全が進行すること。また異常なカルシウム(Ca^{2+})応答が心筋細胞内で起こることが数多く報告されてきた。しかしながら、ROSと Ca^{2+} シグナルがどのように相互作用するのかは明らかにされていない。

Transient receptor potential (TRP) チャネルはショウジョ

ウバエの光受容の原因変異遺伝子としてクローニングされた非選択的カチオンチャネルである⁽¹⁾。哺乳類ではこれまでに28種類のホモログが同定され、タンパク質の相同性から6つのサブファミリーに分類される。Canonical TRP (TRPC)チャネルは進化的に最も保存されたTRPチャネルであり、ホスホリパーゼC (PLC)と関連した細胞膜受容体の下流で活性化される非選択的カチオンチャネルである^(2,3)。PLCは細胞膜受容体刺激に応答し、細胞膜のphosphatidylinositol 4,5-bisphosphateをinositol 1,4,5-trisphosphateとdiacylglycerol (DAG)に加水分解する。7つのTRPCチャネルの内TRPC3/6/7はこのDAGに活性化されるチャネルであり、これまでに様々な組織においてその重要性が明らかにされてきた。これまでに我々は、心

臓において TRPC3/C6 チャンネルが、アンジオテンシン受容体やエンドセリン受容体等の神経液性因子の長期曝露ストレスによる心肥大に重要であることを明らかにしてきた⁽²⁾。しかしながらこれら先行研究において、TRPC3/C6 チャンネルは NFAT の活性化による Ca^{2+} シグナルへの寄与のみに注目し、ROS の過剰産生への関与については検討していなかった。

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) は NAD(P)H を基質として超酸化物を精製する酵素であり、主に自然免疫系における病原菌の破壊等に重要な役割を果たしている。近年、免疫系以外の組織においても、各種疾患時にその発現が上昇することが明らかにされ、ミトコンドリアに次ぐ ROS の発生源として注目されている。7 種類の NOX ホモログの内、Nox2, Nox4 が心臓におけるドミナントなアイソフォームである⁽⁴⁻⁶⁾。NOX2 は酵素本体である gp91^{phox} とサブユニット p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p60^{phox} および Rac1/2 から構成される複合体であり、p47^{phox} のリン酸化を起点とした複合体形成により細胞膜上において活性化する。我々は、心筋細胞において、TRPC3 を介して流入したカルシウムがカルシウム依存的 protein kinase C を活性化し、それにより p47^{phox} がリン酸化され Nox2 複合体の活性化を引き起こすことを明らかにしてきた。

さらに我々は、最近、心臓の血行力学に起因する機械的ストレス適応において、TRPC3 チャンネルと Nox2 は物理的・機能的な相互作用を有することを明らかにした^(7,8)。申請者は、不全心における酸化ストレスの蓄積は、TRPC3, Nox2 両者の発現上昇に起因することを突き止め、且つ Nox2 タンパク質の安定性に、TRPC3 との物理的な相互作用が決定的であることを明らかにした。一方で、ROS は健常時における恒常性維持にも重要である。生理的条件下(運動・妊娠時)においては如何に TRPC3-Nox2 の機能連関が、ROS 生成をファインチューニングし、心臓の恒常性を維持しているかは明らかでない。そこで本研究では、TRPC3-Nox2 の複合体形成機構に着目し、心臓の恒常性維持における活性酸素の生理的重要性を解明する。

2. 研究方法

2.1 DOX 心筋症モデルマウスの作成

7 週齢雄性マウスに DOX (15 mg/kg, Wako) を腹腔内投

与し、DOX 心筋症モデルマウスを作製し、2 週後に sacrifice した。

2.2 心機能測定

DOX 投与後のマウスは 1 週毎に継時的な心機能の心エコー検査により行った。DOX 投与 2 週後エンドポイントにおいて圧測定カテーテル(モデル SPR-671, Millar)を左心室に挿入し左室内圧を測定した。

2.3 アデノ随伴ウイルスを用いた心筋 TRPC3-C-fragment の発現

Nox2 と干渉する TRPC3 の C 末端ペプチド (TRPC3-C-fragment) は PCR で増幅し pEGFP-N1 ベクターに組み込んだ。その後 EGFP と結合した TRPC3-C-fragment (C3-C-GFP) を AAV ベクターにサブクローニングした。AAV vector (1×10^{10} genomic copies) は 6 日齢の C57BL/6J に腹腔内投与し感染させた。心筋における C3-C-GFP の発現は蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) を用いて確認した。

2.4 心筋萎縮および心臓内酸化ストレス測定

ホルマリン固定後の心臓凍結切片を 1% FBS 含有 PBS・室温で 1 時間 blocking 操作を行った。その後 5 μ g/mL の WGA 含有 incubation solution (0.01% Triton X-100, 5% BSA, 3% FBS) 中にて 4°C で一晩反応させた。PBS で 2 回洗浄した後、VECTASHIELD mounting medium で封入した。標本は蛍光顕微鏡で観察し、無作為に 5 つの部位を選択し画像を撮影し ImageJ software (NIH) を用いて心筋面積を測定した。

2.5 心臓の酸化ストレス評価

心臓組織の酸化ストレスレベルを評価する為、マロンジアルデヒド (MDA) 濃度を Bioxytech MDA-586 kit (OxisResearch) で添付文書に従い測定した。凍結したマウス心臓サンプルを potassium phosphate extraction (KPE) buffer (pH 7.5; 100 mM potassium phosphate, 5 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.6% sulfosalicylic acid, and 5 mM buthylated hydroxytoluene) 内でホモジナイズした。サンプルを 20,400 G で 10 分間遠心し、上清を N-methyl-2-phenylindole と 45°C で 1 時間反応させた。20,400 G で 10 分間遠心し、吸光度 586 nm を Spectra Max i3 (Molecular Devices) で測定した。

2.6 ウェスタンブロット

マウス心臓サンプルは RIPA buffer (0.1% SDS, 0.5%

sodium deoxycholate, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), protease inhibitor cocktail) 内でホモジナイズした。SDS-PAGE により分離, PVDF 膜に転写した後, タンパク質特異的抗体により検出した。

2.7 低酸素プローブによる低酸素の検出

マウス心臓組織の低酸素レベルを hypoxyprobe kit (Hypoxyprobe HPI inc.) を用いて検出した。Hypoxyprobe solution (60 mg/kg) を腹腔内投与した 60 分後にサクリファイスした。凍結組織を 4- μ m 厚にスライスし 1% BSA 含有 PBS 溶液で blocking し, 抗 Hypoxyprobe 抗体 (1:50) と一晩 4°C で反応させた。洗浄した 2 次抗体と反応させ, 共焦点レーザー顕微鏡で観察し ImageJ を用い蛍光強度を定量化した。

2.8 統計解析

結果は少なくとも 3 例以上の独立した同一条件下で行った実験によるものであり, 全て平均値 \pm 標準誤差で表記した。2 群間の検定には Student's t-test, 3 群以上の比較には One-way ANOVA による分散分析を行った後, Tukey's

post hoc test を用いて post-hoc test を行い, P 値が 5% 未満の場合に有意差があると判断した。

3. 研究結果

3.1 TRPC3 欠損マウスにおける DOX 心筋症の評価

DOX 心筋症では過剰な ROS 産生に伴う心筋細胞の委縮・左室収縮不全が病態の根底にあることが知られている。C57BL/6J マウスの心重量は, DOX 投与 2 週間後に著明に低下した (Fig. 1A)。また心筋断面積 (Cross section area: CSA) を計測したところ, DOX 投与により CSA も低下した (Fig. 1B)。DOX 投与は TRPC3 のタンパク発現を上昇させた (Fig. 1C)。TRPC3 欠損 (TRPC3^{-/-}) マウスへ DOX 投与を行った結果, TRPC3^{-/-} マウスでは DOX による心重量低下と CSA 低下は有意に抑制されていた (Fig. 1D and 1E)。また TRPC3^{+/+} マウスで見られる左室機能低下は TRPC3^{-/-} マウスでは見られなかった (Fig. 1F and 1G)。これらの結果と一致して, TRPC3^{-/-} マウスでは心臓内酸化ストレスが顕著に抑制されていた (Fig. 1H)。以上

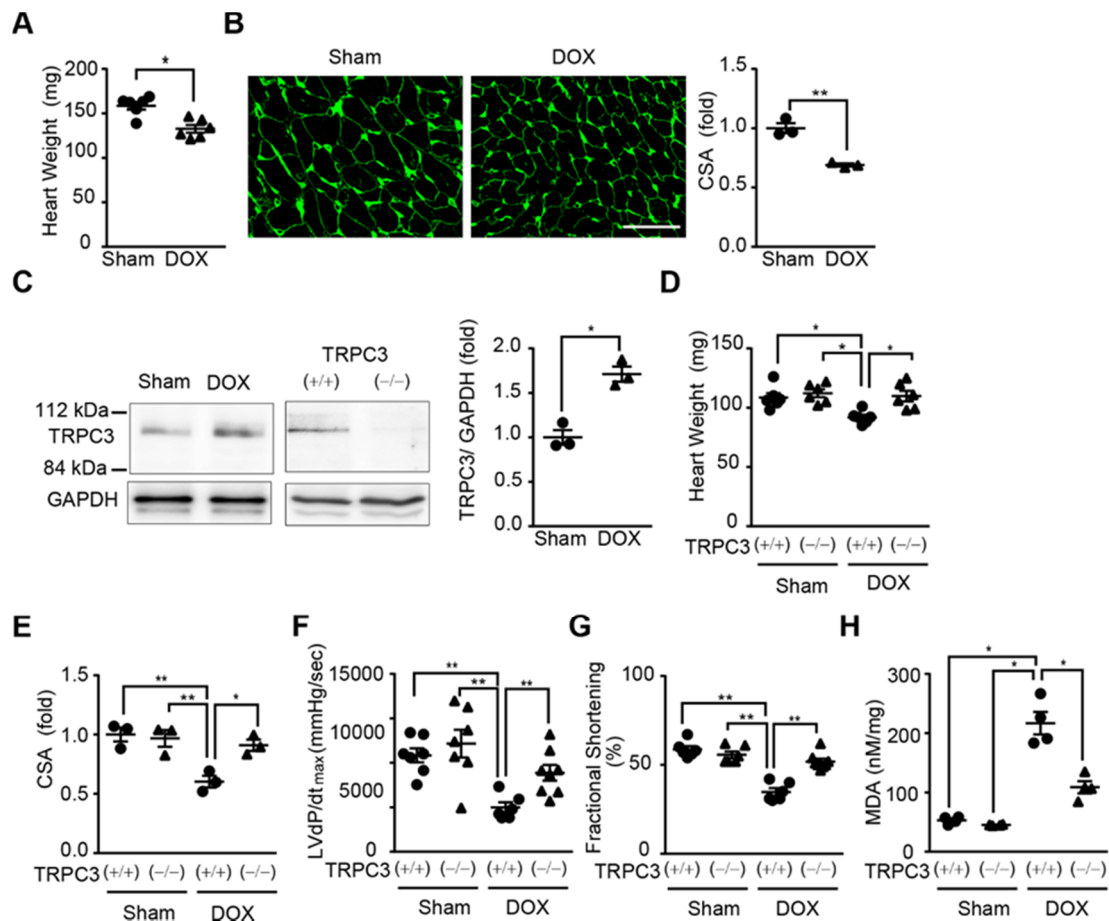


Figure 1. Prevention of DOX-induced myocardial atrophy and oxidative stress in TRPC3-deficient mouse hearts

の結果は TRPC3 チャンネルが DOX による心筋委縮・心機能低下・酸化ストレス産生に寄与していることを示唆する。

3. 2 DOX 投与は心臓に低酸素応答を惹起する。

DOX 投与により低酸素プローブの蛍光強度は増大し (Fig. 2A), また Hypoxia inducible factor 1a (HIF1 α), heme oxygenase-1 (HO-1) といった低酸素シグナルの活性化が見られた (Fig. 2B and C). 低酸素シグナルの活性化は Nox2 発現上昇を伴うことが報告されている⁽⁹⁾。マウス心臓サンプルにおいて、低酸素シグナルの活性化に伴い

Nox2 の発現上昇が見られ、また発現上昇は心重量の低下と相関していた (Fig. 2B-D)。TRPC3^(-/-)マウスの心臓において、DOX 投与後の HIF1 α の発現上昇は TRPC3^(+/+)と同程度であったにも関わらず Nox2 発現上昇は有意に抑制された (Fig. 2E and F)。Nox2 の発現と心重量は TRPC3^(-/-)マウスでも相関関係が見られた (Fig. 2G)。以上の結果は、DOX は心臓における低酸素応答を惹起し、それにより TRPC3 および Nox2 の発現上昇を誘導すると考えられた。

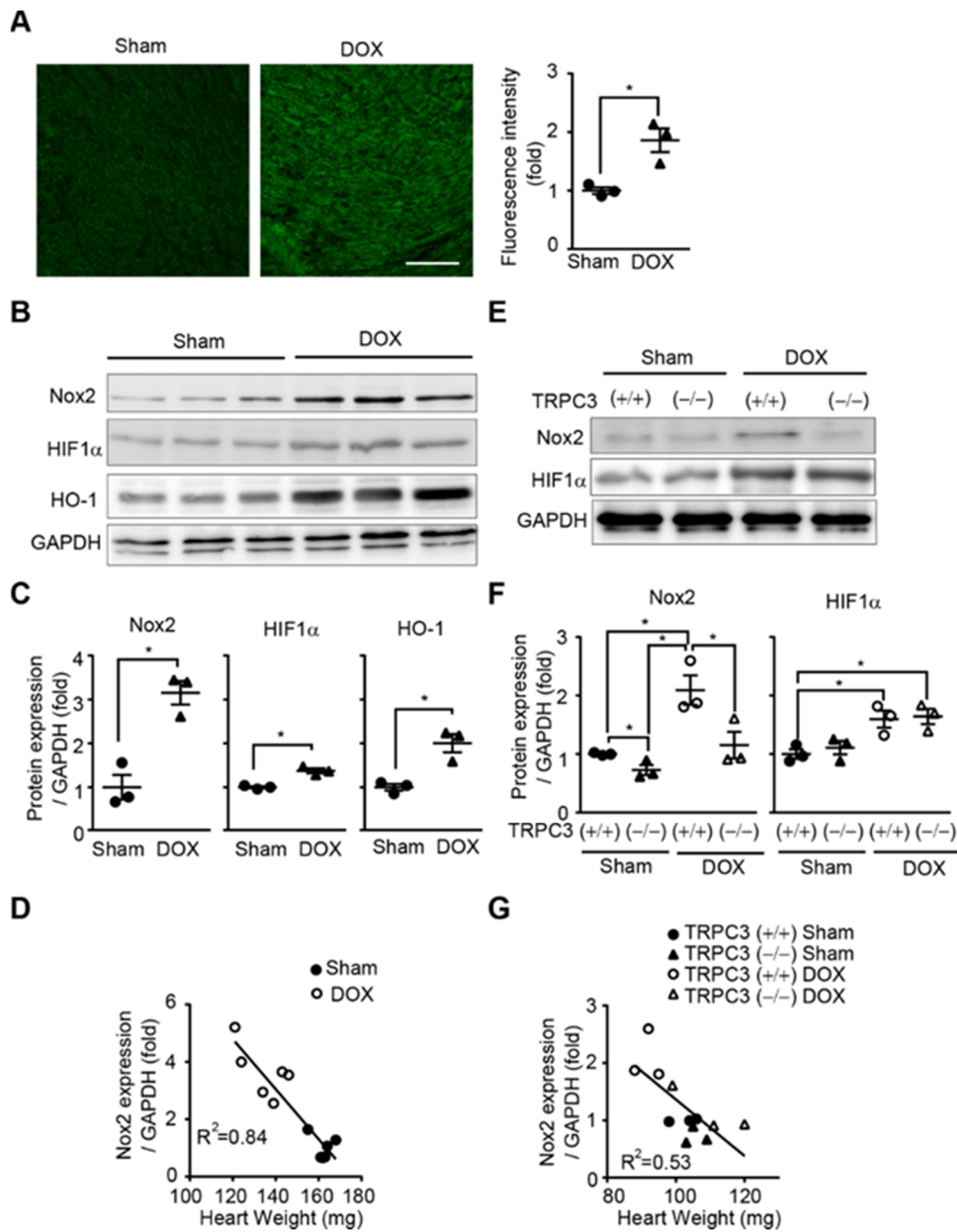


Figure 2. Requirement for TRPC3 in DOX-induced Nox2 upregulation

3. 3 TRPC3-Nox2 複合体の DOX 心筋症への寄与

これまでに我々は、機械的ストレスに惹起される心臓での酸化ストレス上昇には、TRPC3 との相互作用依存的な Nox2タンパク質の安定化が重要であることを見出していた。また、この TRPC3-Nox2 相互作用には TRPC3 の C 末端 (C3-C) が重要であることも同定していた。EGFP を融合した C3-C 断片 (C3-C-GFP) は TRPC3-Nox2 の相互作用を阻害できることを明らかにしていたことから、DOX 心筋症に対する C3-C-GFP の効果を検討した。日齢 6 の雄性 C57BL/6J マウスへアデノ随伴ウイルス (Adeno associated virus: AAV) を腹腔内投与し、トロポニン T をプロモーターとした C3-C-GFP を心筋細胞特異的に発現させた。Control

群は GFP を単独で発現させた。DOX 処置により GFP 群は顕著な心筋萎縮と左室機能低下を認めたが、C3-C-GFP 群では左室機能低下は認められなかった (Fig. 3A-D)。また、C3-C-GFP 群では DOX 処置による MDA 濃度上昇が認められなかった (Fig. 3E)。C3-C-GFP の発現は心臓を蛍光顕微鏡で GFP 波長 (488 nm) を観察することにより確認した (Fig. 3F)。心筋組織サンプルの Nox2, TRPC3 発現は DOX 投与で上昇し、C3-C-GFP 発現により抑制された (Fig. 3G)。以上の結果により、心筋細胞における TRPC3-Nox2 相互作用が DOX 心筋症の進展に関与していることが明らかとなった。

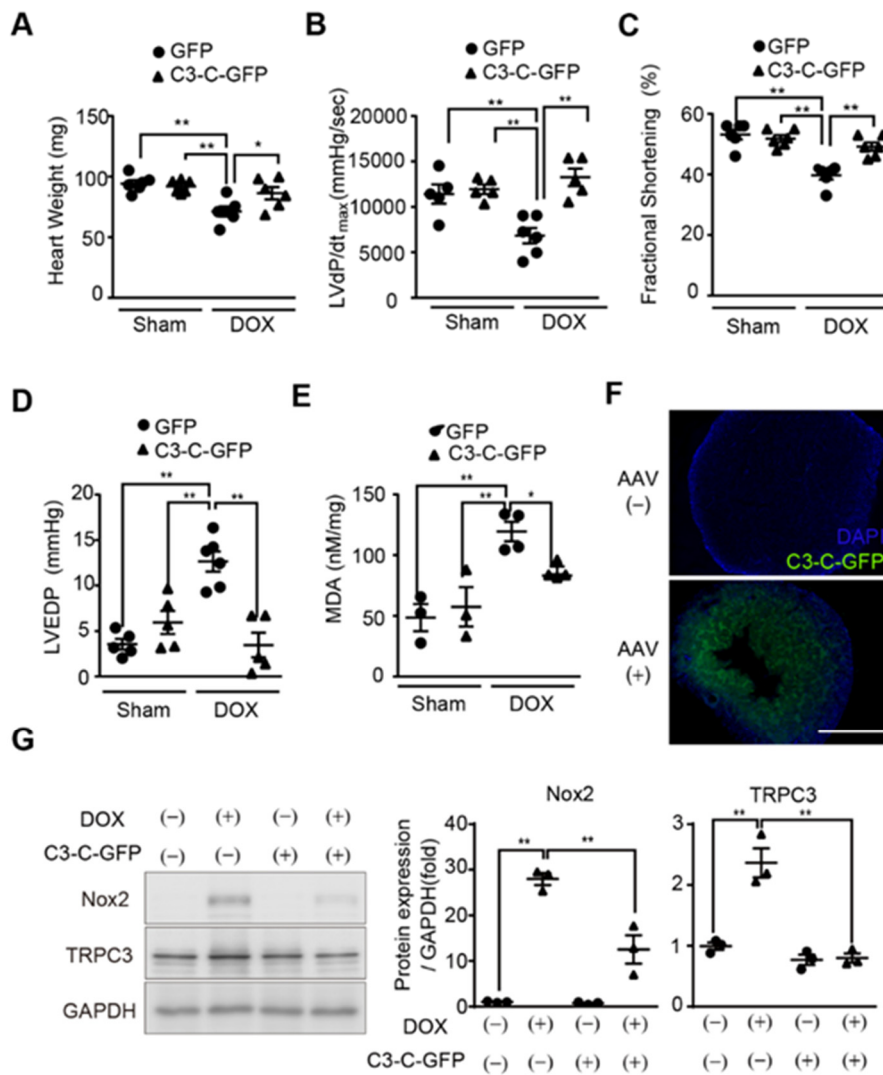


Figure 3. Cardiac expression of C3-C-GFP suppresses DOX-induced cardiomyopathy

3. 4 運動における TRPC3-Nox2 の役割

DOX 心筋症は運動によって改善することがこれまでに報告されている⁽¹⁰⁾。TRPC3-Nox2 機能連関が運動によりどのような影響を受けるのかを次に解析した。自由運動マウス (Voluntary exercise 群) は非運動マウス (Sedentary 群) に比較し 1 日 10 倍程度の距離を走行し (Fig. 4A), 4 週間の自由運動で生理的な心肥大を認めた (Fig. 4B)。急速な容量負荷に対し Voluntary exercise 群はより大きな Stroke Volume を呈し Frank-Starling 曲線の上方移動が見られた (Fig. 4C)。また Voluntary exercise 群では心臓における TRPC3 と Nox2 発現は mRNA レベルでは変化を認めなかったがタンパク量は低下しており (Fig. 4D and E), 生理的心肥大と Nox2 発現量は低下は相関していた (Fig. 4F)。Voluntary exercise は HIF1 α , HO-1 の発現量には影響を認めなかった (Fig. 4E) ことから, Voluntary exercise による Nox2 発現低下はタンパク分解によることが示唆される。以上の結果は TRPC3-Nox2 複合体が左室柔軟性を負に制御しており, 容量負荷時の病的な心筋リモデリングを促進することを示唆する。

4. 考 察

心臓の可塑性は血行力学的負荷に適応するための内

因性の代償メカニズムであるが, 病的な心筋萎縮・病的な心筋肥大何れも慢性心不全のリスクを増加させる。それに対し生長や運動・妊娠による血行力学的負荷で起こる生理的心肥大は同様に心臓の持つ可塑性であるが収縮性は維持される。本研究において我々は TRPC3 抑制が心筋細胞における Nox2 を介した ROS 産生増幅を抑制することで DOX による心筋萎縮を軽減することを示した。圧負荷モデルを用いた先行研究^(7,8)と本研究の結果から, TRPC3-Nox2 複合体は病的な心筋リモデリングを促進し慢性心不全を惹起することが示された。

DOX を含むアントラサイクリン系薬剤は安価であり乳癌・肺癌・リンパ腫・白血病等に効果的な抗ガン剤である。しかし, その用量依存性の心毒性が臨床上的有用性を制限している⁽¹¹⁻¹⁴⁾。本研究で DOX 心筋症へ至る分子メカニズムが明らかとなり, TRPC3-Nox2 複合体が DOX による慢性心不全への治療法と成り得ることが示された。

運動は, 心臓のストレス耐性獲得に有効な介入方法である。しかしながら, 運動の持つ健康増進作用の詳細なメカニズムはまだ明らかになっていない。本研究において, 我々は運動負荷をしたマウスの心臓において, TRPC3 および Nox2 の発現が有意に低下することを明らかにした。TRPC3-Nox2 経路による ROS 産生が抑制されることによ

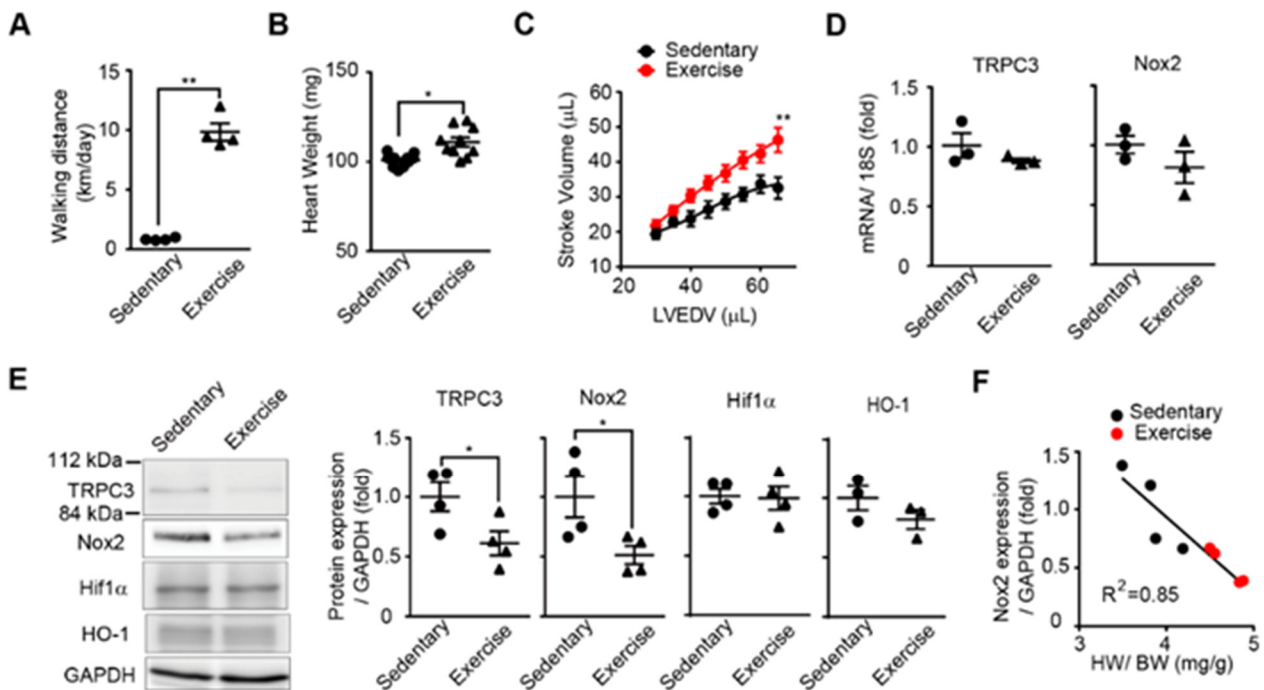


Figure 4. Effects of voluntary exercise on TRPC3-Nox2 coupling and heart function

り、心臓はより柔軟になりそれにより、容量性の機械的ストレスに対して抵抗性が上昇することが強く示唆された。

5. 今後の課題

本研究により、DOX 心筋症のような化学的なストレスによる心臓リモデリングが TRPC3-Nox2 の機能連関による過剰な ROS 産生に惹起されることが明らかとなった。しかしながら、どのように Nox2 が TRPC3 との相互作用によりプロテアソーム系による分解から保護されるのかは明らかにできていない。また運動処置による TRPC3-Nox2 の発現低下メカニズムも明らかにできていない。これら分子機構の解明を通して、心臓の病的あるいは生理的可塑性の獲得機構を明らかにし、新たな心不全治療法の開発基盤となる研究を進めていく必要がある。

6. 文献

1. Montell C, Rubin GM. Molecular Characterization of the *Drosophila* trp Locus: A Putative Integral Membrane Protein. *Neuron*. 1998;2(4):1313-1323.
2. Onohara N, et al. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2006;25(22):5305-5316.
3. Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T. In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium*. 2007;42(2):233-244.
4. Kitajima N, et al. TRPC3-mediated Ca^{2+} influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409(1):108-113.
5. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2010;106(7):1253-1264.
6. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to heart failure. *Hypertension*. 2002;40(4):477-484.
7. Kitajima N, et al. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci Rep*. 2016;6:37001.
8. Numaga-Tomita T, et al. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Sci Rep*. 2016;6:39383.
9. Diebold I, Petry A, Sabrane K, Djordjevic T, Hess J, Gorchach A. The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *J Cell Sci*. 2012;125:956-964.
10. Scott JM, Khakoo A, Mackey JR, Haykowsky MJ, Douglas PS, Jones LW. Modulation of anthracycline-induced cardiotoxicity by aerobic exercise in breast cancer: current evidence and underlying mechanisms. *Circulation*. 2011;124(5):642-50.
11. Yeh ET, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation*. 2004;109(25):3122-3131.
12. Witteles RM, Bosch W. Myocardial Protection During Cardiotoxic Chemotherapy. *Circulation*. 2015;132(19):1835-1845.
13. Zhang S, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-1642.
14. BurrIDGE PW, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2016;22(5):547-556

Physiological Importance of Functional Coupling between TRPC3 and Nox2 in Cardiac Homeostasis

Takuro Numaga-Tomita, Motohiro Nishida

Cardiocirculatory Dynamism Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLs),
National Institutes of Natural Sciences

Summary

Chronic stresses induces pathological cardiac remodeling in which production of reactive oxygen species (ROS) plays a critical role. We have revealed that those ROS were produced by NADPH oxidase 2 (Nox2), despite low Nox2 expression levels in the normal heart. We demonstrate that transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) Ca²⁺-permeable channel acts as a positive regulator of Nox2 in both enzymatic activation and protein expression in cardiomyocytes during pathological remodeling. TRPC3 physically interacts with Nox2 through TRPC3 carboxyl-terminal regions, escaping Nox2 from proteasomal degradation, resulting in amplification of Ca²⁺-dependent Nox2 activation. This TRPC3-Nox2 coupling mediates mechanical stress-induced cardiac fibrosis and a chemotherapy agent Doxorubicin-induced cardiac atrophy in mice. Inhibition of TRPC3-Nox2 coupling in cardiomyocytes could significantly suppressed Dox-induced cardiac atrophy. Furthermore, voluntary exercise which has a beneficial effect on cardiac function significantly reduced the level of TRPC3 and Nox2 protein expression. Exercised mouse heart increased their elasticity which resulted in improvement of cardiac function. These results suggest that functional and physical coupling of TRPC3 and Nox2 mediates various stress-induced cardiac remodeling and inhibition of TRPC3-Nox2 coupling will be a promising therapeutic target for the treatment of pathological muscle remodeling.