

末梢血管形成における壁応力感受性カチオンチャネルの役割解析

西田 基宏, 富田 拓郎, 西村 明幸

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター生理学研究所

概要

1. 研究目的

下肢虚血後の血管形成における血管平滑筋細胞 TRPC6 チャネル役割を明らかにする。

2. 研究方法

TRPC6 欠損マウスおよび血管平滑筋特異的 TRPC6 過剰発現マウスの大腿動脈を結紮し、下肢虚血後の末梢血流量および歩行運動機能の回復に対する影響を調べた。形成血管数および血管径の計測については、腓腹筋組織染色により評価した。平滑筋細胞の増殖・遊走・筋分化における TRPC6 チャネルの役割は、マウス大動脈血管より平滑筋細胞を単離・培養することで評価した。

3. 研究結果

野生型マウスと比べて、TRPC6 欠損マウスでは下肢虚血2週目以降の末梢血流量が有意に増加しており、これに伴って腓腹筋に組織における成熟血管数・血管径も有意に増大していた。しかし、下肢虚血1週間後の末梢血流回復度および毛細血管数の増加に関しては、TRPC6 欠損マウスと野生型マウスのそれとの間に差はなかった。TRPC6 欠損平滑筋細胞は、野生型マウス由来平滑筋細胞と比べて通常の細胞増殖・遊走能に差はなかったものの、筋分化が顕著に増大していることが明らかとなった。

4. 考察

血管平滑筋細胞 TRPC6 は下肢虚血後の毛細血管径を太くする血管形成(arteriogenesis)の過程において、平滑筋細胞の筋分化を負に制御する役割を担うことが明らかとなった。TRPC6 チャネルの阻害によって下肢虚血後の血管成熟が著しく促進したことから、TRPC6 チャネルは末梢循環障害の新しい創薬標的分子となる可能性が示された。

1. 研究目的

成熟した生体において、主要な動脈の閉塞は末梢組織の虚血・壊死につながる重篤な傷害となる。そこで生体は、閉塞した動脈を迂回する血管網(側副血行路)を発達の段階からある程度備えるとともに、虚血後の応答として新たに発達させることでそれを回避する。この新たな側副血行路形成は、初期応答としての血管新生とそれに引き続く血管の成熟・選抜により担われる^(1,2)。これまで血管新生を促進するメカニズムが多く研究され、臨床研究も進められているが、未だに良い成績は得られていない⁽³⁾。血管成熟による機能的な血流回復には、新生血管を覆い安定化する血管平滑筋細胞(VSMCs)の増殖に担われる血管径の拡張が重要であ

る。この VSMCs の増殖を誘導する要因の一つとして挙げられるのが、血行動態応力である。新たな血管内への血流の再循環は血管壁に対して円周方向壁応力を発生させる。この際、VSMCs は血流方向に対し、直角に配向していることから、細胞の長軸方向に対して伸展刺激を受けている。しかし、これら伸展刺激が VSMCs の増殖を導く機構は未だ明らかにされていない。申請者はこれまで心臓が圧負荷により肥大する分子メカニズム解析に従事し、その過程で非選択的カチオンチャネルである transient receptor potential canonical (TRPC)6 が心肥大誘発性 Ca²⁺シグナリング活性化の仲介分子であることを見出した^(4,6)。最近では、アンジオテンシン II 刺激による血管平滑筋細胞の収縮応答にも TRPC6

が関与すること、および世界で唯一末梢循環障害改善薬として使われているシロスタゾール(ホスホジエステラーゼ III 阻害薬)が間接的に TRPC6 チャネル活性を抑制することで平滑筋収縮を抑制することを明らかにした⁽⁶⁾。そこで本研究では、末梢循環障害における血管平滑筋細胞 TRPC6 チャネルの役割を個体レベルで明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

2. 研究方法

2.1 遺伝子組換えマウスと下肢虚血モデルの作成

α -smooth muscle actin(α -SMA)プロモーターの下流に野生型TRPC6(TRPC6-WT)遺伝子またはドミナントネガティブTRPC6 変異体(TRPC6-DN)をコードさせたコンストラクトを過剰発現させた C57BL6/J マウスは福岡大学医学部・岩本隆宏研究室から供与いただいた。TRPC6 欠損 129Sv マウスは米国 NIEHS 研究所・Lutz Birbaumer 博士から供与いただいた⁽⁷⁾。さらに、 α -SMA プロモーター下に TRPC6(T69A)変異体遺伝子をコードさせたコンストラクトを作成し、TRPC6 欠損マウスに遺伝子導入したレスキューマウス(TRPC6(T69A)/KOマウス)を作出することで、下肢虚血後の血管成熟における TRPC6 の Thr69 残基のリン酸化の関与についても検討した(Fig. 1 参照)。

下肢虚血は、左大腿動脈を結紮することにより誘発させた。末梢血流量は2次元レーザー血流計(オメガウェーブ)を用いて、右足非虚血肢との比で評価した。3~4 週間の経過観察を行った後、ACTIMO-100 滑車付き運動機能測定ケージ(シンテクノ社)を用いて 24 時間の運動機能計測を行い、マウスの腓腹筋組織を摘出した。未成熟な毛細血管および成熟血管は、CD31 抗体および α -SMA 抗体を用いた組織染色

により可視化し、それぞれの陽性血管数を計測した。 α -SMA 陽性血管については、血管ごとの直径も測定し、成熟血管径の変化も定量した。

2.2 初代培養マウス血管平滑筋細胞を用いた解析

マウス胸部大動脈血管を摘出し、コラゲナーゼ法により平滑筋細胞を単離し、初代培養を行った。平滑筋細胞の増殖能は、platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (50 ng/ml) 刺激を行った 1~7 日後の細胞数をセルカウントすることで評価した^(8,9)。細胞遊走能は、Boyden chamber アッセイ法を用いて PDGF-BB (50 ng/ml) 刺激後の移動距離を評価した。細胞の筋分化については、 α -SMA 抗体を用いた細胞染色を行い、蛍光標識された2次抗体の蛍光強度により半定量的に評価した⁽⁹⁾。

2.3 TRPC6 発現量およびリン酸化測定

TRPC mRNA 発現量は real time PCR 法を用いて定量し、TRPC6 タンパク発現量は TRPC6 抗体(Alomone 社)を用いてウェスタンブロットまたは免疫染色により調べた。TRPC6 の Thr69 残基のリン酸化レベルについては、西田らが作成した特異的リン酸化抗体を用いて評価した^(5,6)。

2.4 統計解析

全ての実験は最低 N=3 以上の実験を行ない、平均値±標準誤差で示した。統計については、2 群比較の場合、unpaired student t-test を用いて P<0.05 だった場合に有意と評価した。3 群以上の多重比較の場合、一元配置の分散分析を行った後、Tukey's post-hoc test により評価を行った。特に個体レベルでの時間経過観察の結果の統計解析については、二元配置の分散分析を行った後、Tukey's post-hoc test または Bonferroni's post-hoc test により評価を行った。

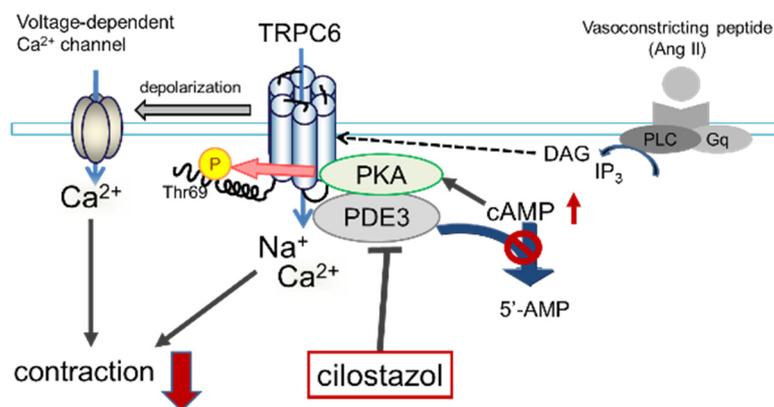


Fig. 1. Mechanism of inhibition of TRPC6 channel activity by cilostazol

3. 結果

3.1 下肢虚血後の末梢循環障害に対する TRPC6 阻害の効果

全ての群において、大腿動脈を結紮した1日後の下肢末梢血流量の著しい低下が起こり、その後1週間後にかけて約30%回復することが確認された。野生型マウスでは、下肢虚血2週間後以降の末梢血流量の回復率が40%程度に留まっていた(**Fig. 2**)。下肢虚血2週間後の腓腹筋組織を用いて TRPC チャンネルの発現量を調べた結果、7種類の TRPC

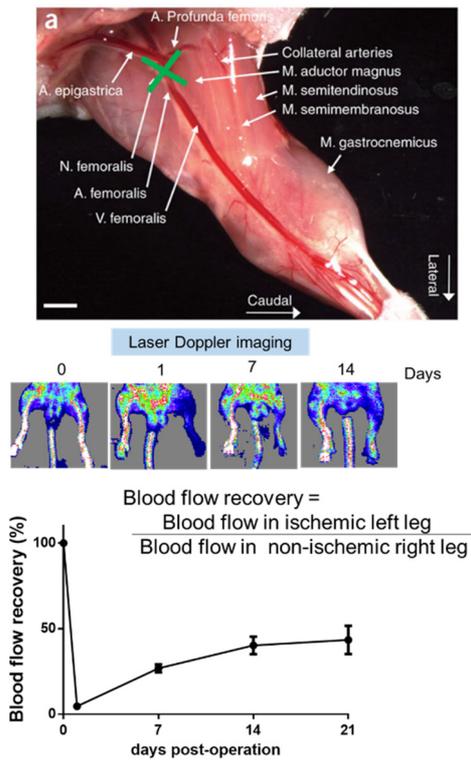


Fig.2. Femoral artery ligation (upper) and calculation of peripheral blood flow recovery (lower). Upper image is cited from Limbourg et al. (ref. 1)

動物ホモログのうち、TRPC6 mRNA だけが下肢虚血の腓腹筋組織で有意に増加していることがわかった。実際、TRPC6 抗体を用いて腓腹筋組織の横断面を染色したところ、 α -SMA 陽性成熟血管壁が強く染まっていた(**Fig. 3**)。そこで、まず血管平滑筋細胞特異的に TRPC6 を過剰発現させた WT/ACTA2-C6(WT) マウスを用いて下肢虚血を行ったところ、手術後の末梢血流回復率が有意に減少していた(**Fig. 4**)。これに対し、TRPC6 欠損(TRPC6(-/-))マウスでは下肢虚血後2週間以降の回復率が野生型(TRPC6(+/+))マウス

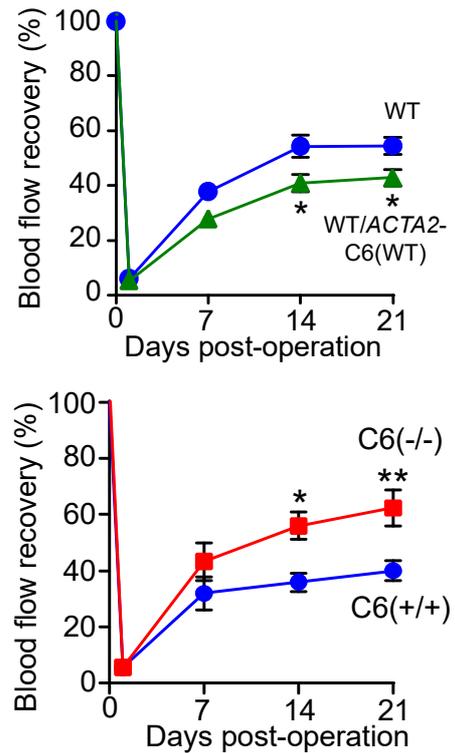


Fig.4. Recovery of peripheral blood flow after femoral artery ligation in smooth muscle cell-specific TRPC6-expressing mice (upper) and TRPC6-deficient mice (lower)

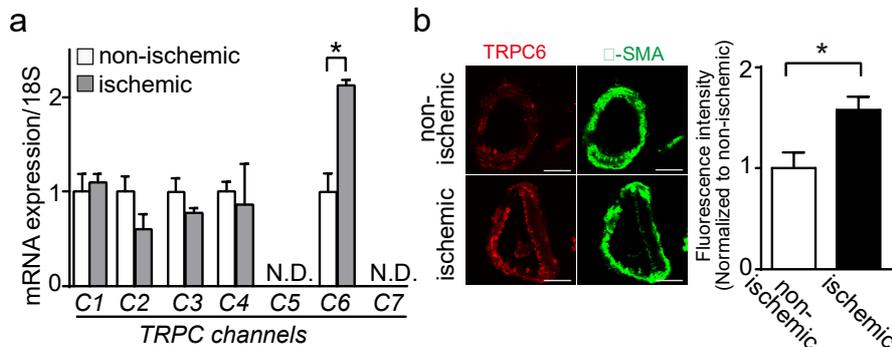


Fig. 3. Changes in expression levels of TRPC1-7 in mouse gastrocnemii after femoral artery ligation

のそれと比べて有意に増加していた。下肢虚血 3 週間後の腓腹筋における CD31 陽性新生血管数を測定したところ、野生型, WT/ACTA2-C6(WT), TRPC6(-/-)マウスにおいて有意な差はなかった。しかしながら, TRPC6(-/-)マウスの腓腹筋組織では α -SMA 陽性成熟血管数および血管ごとの直径が野生型マウスと比べて有意に増加していた (Fig. 5)。WT/ACTA2-C6(WT)マウスの腓腹筋では, 野生型と比べて成熟血管数が有意に減少していることも確認された。以上の結果から, 血管平滑筋細胞に発現する TRPC6 が下肢虚血後の血管成熟を負に制御する可能性が示された。

3. 2 下肢虚血後の TRPC6 抑制と血管成熟における内皮機能の関与

TRPC6 チャンネル活性は Thr69 残基のリン酸化により負に制御される^(5,6)。Thr69 残基は, 内皮由来血管拡張因子(一

酸化窒素やプロスタサイクリン)によってリン酸化される。そこで次に, 下肢虚血後の末梢循環障害における内皮機能の関与を調べた。下肢虚血後の内皮依存的な血管新生が収束する大腿動脈結紮 1 週間後から一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 阻害剤(L-NAME)またはプロスタサイクリン合成酵素 (PTGIS) 阻害剤(CAY-10441)を投与したところ, 野生型マウスにおける下肢虚血2週間以降の末梢血流量が有意に低下した。これに対し, TRPC6 欠損マウスにL-NAME やCAY-10441を投与しても末梢血流量の回復は阻害されなかった。この結果は, TRPC6 阻害による血管成熟が内皮非依存的に起こることを示唆している。次に, eNOS ならびに PTGIS の発現量を免疫組織染色により調べたところ, TRPC6(-/-)マウスの腓腹筋では野生型のそれと比べて有意に eNOS と PTGIS 発現量が高く維持されていることがわかった (Fig. 6)。

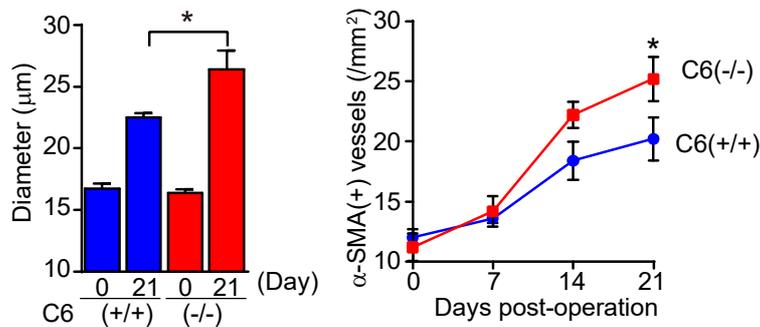


Fig. 5. Increases in diameters of peripheral blood vessels (left) and number of α -SMA-positive vessels in TRPC6 (+/+) and TRPC6 (-/-) mouse gastrocnemii after hindlimb ischemia

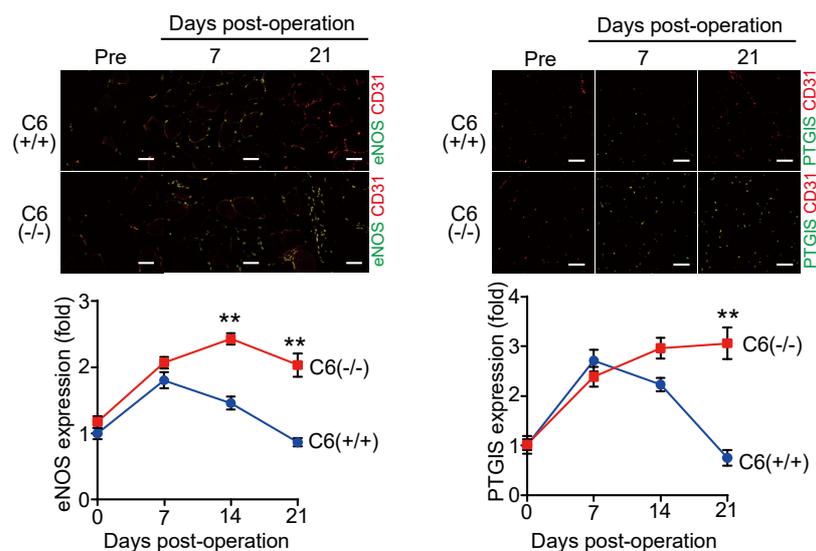


Fig. 6. Changes in expressions of eNOS and PTGIS proteins in TRPC6 (+/+) and TRPC6 (-/-) mouse gastrocnemii after hindlimb ischemia

すなわち、TRPC6 阻害は下肢虚血後の血管成熟を内皮非依存的に促進する一方で、内皮細胞機能も維持する役割を担う可能性を示している。

3.3 下肢虚血後の血管成熟における TRPC6 リン酸化の役割

上記の検討により、TRPC6 リン酸化レベルが末梢循環障害のリスクを規定している可能性が考えられた。そこで次に、TRPC6 リン酸化部位を Ala に置換した変異体を血管平滑筋細胞特異的に発現させた TRPC6 欠損マウス (KO/ACTA2-C6(T69A)) を用いて、下肢虚血後の血管成熟における TRPC6 リン酸化の役割を解析した。世界で唯一有効性が認められている末梢循環障害治療薬シロスタゾールを処置することで、TRPC6(-/-)マウスにおける下肢虚血後の末梢血流量は 80%以上回復した。TRPC6(-/-)マウスの血管平滑筋細胞特異的に野生型 TRPC6 を過剰発現させたマウス (KO/ACTA2-C6(WT)) では TRPC6(-/-)マウスと比べて下肢虚血後の末梢血流量の回復が小さく、シロスタゾール処置によって TRPC6(-/-)マウスと同程度まで回復した (Fig. 7)。これに対し、KO/ACTA2-C6(T69A)マウスではシロスタゾールを処置しても下肢虚血後の末梢循環障害は改善されなかった。実際にシロスタゾール処置による TRPC6リン酸化を免疫染色により確認したところ、KO/ACTA2-C6(WT)腓腹筋組織の成熟血管周囲では顕著な TRPC6 リン酸化シグナルが確認された。一方、KO/ACTA2-C6(T69A)の腓腹筋組織の成熟血管ではシロスタゾール処置しても TRPC6 リン酸化シグナルはほとんど検出されなかった。

3.4 マウス系統による末梢循環障害改善率と TRPC6 リン酸化との相関性

下肢虚血後の末梢循環障害の程度はマウスの系統によって異なることが知られている⁽¹⁰⁾。そこで、下肢虚血後の血管 TRPC6 のリン酸化レベルと末梢血流量の回復率との関連について調べてみた。興味深いことに、Balb/c マウスでは下肢虚血 1 週間後から 3 週間後にかけての末梢循環回復率が 10%程度と低かったのに対し、129Sv マウスでは 15%程度、C57BL/6J マウスでは 20%程度と高い回復率を示すことがわかった (Fig. 8)。下肢虚血 3 週間後に腓腹筋を摘出し、TRPC6 リン酸化を調べたところ、末梢血流量の回復率が高いマウスの腓腹筋ほど TRPC6リン酸化の程度も大きくなっており、両者は高い正の相関 ($R^2=0.7226$) を示すことが明らかとなった。以上より、下肢虚血後の血管平滑筋細胞の

TRPC6 リン酸化状態が末梢循環障害の予後を規定する因子となることが示された。

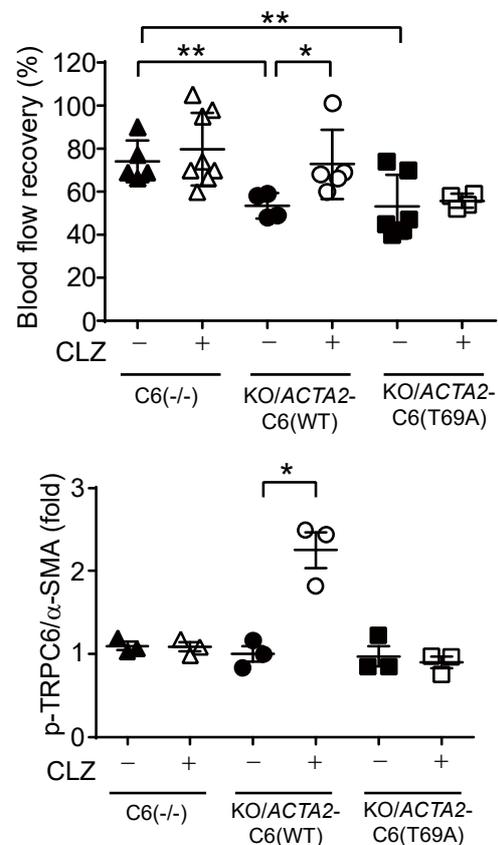


Fig. 7. Effects of cilostazol on the peripheral blood flow recovery (upper) and increases in TRPC6 (Thr69) phosphorylation in TRPC6(-/-), KO/ACTA2-C6(WT), and KO/ACTA2-C6(T69A) mouse gastrocnemii after hindlimb ischemia

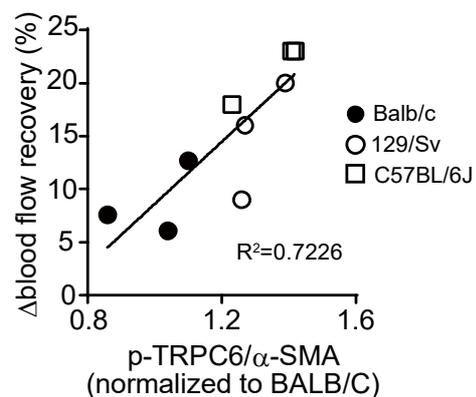


Fig. 8. Relationship between increases in peripheral blood flow recovery after hindlimb ischemia and phosphorylation of TRPC6 at Thr69 in a-SMA-positive vessels in Balb/c, 129 Sv, and C57BL/6J mice

3. 5 血管平滑筋細胞の筋分化における TRPC6 の役割

次に、血管平滑筋細胞における TRPC6 チャンネルの生理的役割について調べた。大腿動脈が閉塞すると、閉塞部位の上流にある毛細血管にずり応力が生じ、これが引き金となって代償的に血管が太くなっていく (Fig. 9)。この際、内皮細胞で形成された新生血管に未成熟な平滑筋細胞が集まり血管周囲を覆うようになる。この過程で平滑筋細胞の増殖と遊走が必須となる。未成熟な平滑筋細胞が血管周囲を覆った後、ずり応力に適応すべく平滑筋細胞は筋収縮タンパク質の発現量を増加させ、筋分化することで、より機能的な血管を形成する。そこで、TRPC6 チャンネルが平滑筋細胞の増殖・遊走・分化のどのステップに寄与するかを検討した。

野生型 (TRPC6(+/+)) および TRPC6(-/-) マウスの大動脈血管から単離し、初代培養した。TRPC6(-/-) 平滑筋細胞に PDGF-BB 刺激を行なったところ、TRPC6(+/) 平滑筋細胞に PDGF-BB 刺激を行った場合と同程度の細胞増殖と遊走が観察された。一方、筋分化マーカーである α -SMA 発現量を調べたところ、TRPC6(-/-) 平滑筋細胞では TRPC6(+/) 平滑筋細胞と比べて α -SMA 発現量が有意に高いことがわかった (Fig. 10)。

興味深いことに、cilostazol を長時間処置し、TRPC6 をリン酸化させた TRPC6(+/) 平滑筋細胞においても TRPC6(-/-) 平滑筋細胞と同程度に α -SMA 発現量が増加することがわかった。以上の結果は、TRPC6 チャンネル活性阻害が血管平滑筋細胞の増殖・遊走能に影響を与えずに筋分化だけ促進させることを強く示唆している。

4. まとめ

本研究により、血管平滑筋細胞の TRPC6 チャンネルが末梢循環障害の負の制御因子となることを初めて明らかにした。その根底となるメカニズムとして、下肢虚血後の TRPC6 チャンネル発現増加に伴う TRPC6 チャンネル活性増加が血管成熟に必須となる平滑筋細胞の筋分化を負に制御することが明らかとなった。また、末梢循環障害改善薬として世界で唯一有効性が認められているシロスタゾールが、TRPC6 チャンネルをリン酸化依存的に活性阻害することで血管成熟を促進させている可能性が示された。

TRPC6 チャンネルの阻害は、内皮機能非依存的に下肢虚血後の血管成熟を著しく促進することから、TRPC6 チャンネルの直接阻害が内皮機能不全を伴う末梢循環障害患者への新たな創薬戦略になることが大いに期待される。

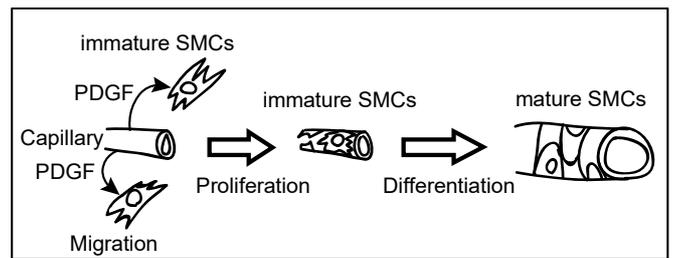


Fig. 9. Scheme of blood vessel maturation via proliferation, migration, and muscular differentiation of vascular smooth muscle cells

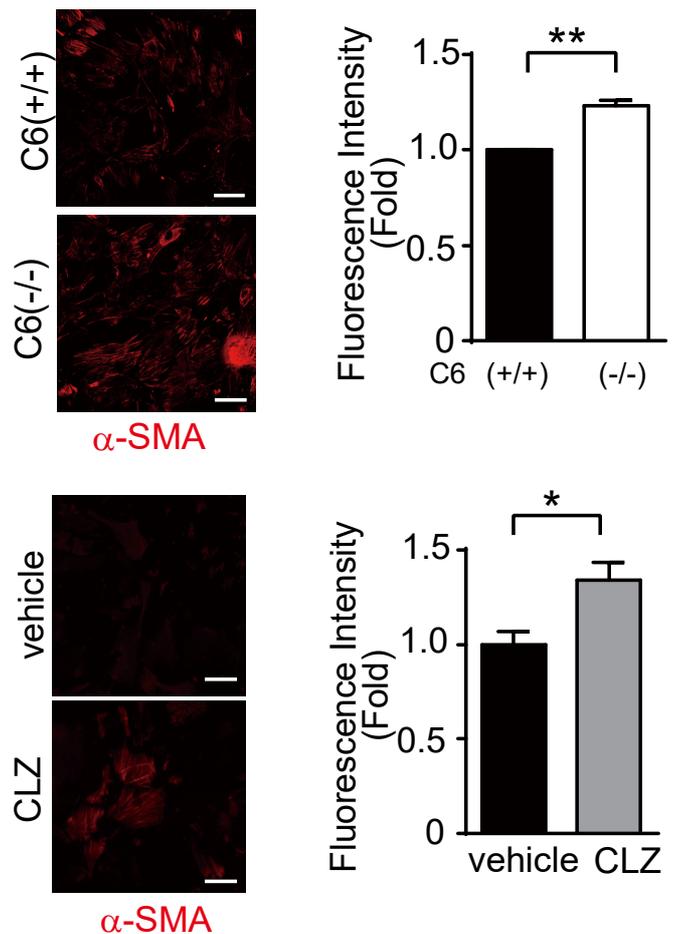


Fig. 10. Increases in α -SMA protein expressions by inhibition of TRPC6 channel activity in mouse vascular smooth muscle cells (VSMCs). Mouse VSMCs were treated with 10 μ M cilostazol (CLZ)

5. 文献等

- 1) Limbourg, A., Korff, T., Napp, L.C., Schaper, W., Drexler, H., and Limbourg, F.P. 2009. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-

- limb ischemia. *Nat Protoc* 4:1737-1746.
- 2) Schaper, W. 2009. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol* 104:5-21.
 - 3) Heil, M., and Schaper, W. 2004. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 95:449-458.
 - 4) Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. 2006. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 25:5305-5316.
 - 5) Nishida, M., Onohara, N., Sato, Y., Suda, R., Ogushi, M., Tanabe, S., Inoue, R., Mori, Y., and Kurose, H. 2007. Galphai2/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J Biol Chem* 282:23117-23128.
 - 6) Nishioka, K., Nishida, M., Ariyoshi, M., Jian, Z., Saiki, S., Hirano, M., Nakaya, M., Sato, Y., Kita, S., Iwamoto, T., et al. 2011. Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2278-2286.
 - 7) Dietrich, A., Mederos, Y.S.M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaya, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., et al. 2005. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25:6980-6989.
 - 8) Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A., and Yuan, J.X. 2003. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C316-330.
 - 9) Arnold, C., Feldner, A., Pfisterer, L., Hodebeck, M., Troidl, K., Genove, G., Wieland, T., Hecker, M., and Korff, T. 2014. RGS5 promotes arterial growth during arteriogenesis. *EMBO Mol Med* 6:1075-1089.
 - 10) Haas, T.L., Lloyd, P.G., Yang, H.T., and Terjung, R.L. 2012. Exercise training and peripheral arterial disease. *Compr Physiol* 2:2933-3017.

Role of Wall Stress-Responsive Cation Channels in the Maturation of Peripheral Blood Vessels

Motohiro Nishida, Takuro Numaga-Tomita, Akiyuki Nishimura

Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences

Summary

Collateral arterial growth (arteriogenesis) through efficient phenotype switching of vascular smooth muscle cells (SMCs) is an endogenous compensatory mechanism for the progressive occlusion of large conductance arteries. However, why arteriogenesis is retarded during severe ischemia remains obscure. Here we found that an increased abundance of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) proteins in SMCs during ischemia negatively regulates arteriogenesis in mice. TRPC6 deficient mice showed improvement of peripheral blood circulation as well as walking activities after hind-limb ischemia, without affecting capillary formation and macrophage infiltration. Suppression of TRPC6 channel activity through endothelium-dependent and -independent phosphorylation of TRPC6 at Thr69 promoted arteriogenesis through increasing muscular differentiation of SMCs while maintaining proliferative and migrating activities. Marked TRPC6 phosphorylation was observed in neonatal gastrocnemii, but it declined with age. The magnitude of TRPC6 phosphorylation level was well co-related with the strengths of resilience to ischemic stress among three mouse strains. These results strongly suggest that TRPC6 phosphorylation at Thr69 is a key indicator of arterial growth during ischemic arteriogenesis, and will provide a new strategy to prevent retardation of arteriogenesis after hind-limb ischemia.