

156. TRPC3-Nox2 複合体形成と筋ジストロフィー治療への応用

西山 和宏

九州大学 大学院薬学研究院 創薬育薬研究施設統括室

Key words : TRPC3, Nox2, イブジラスト, 筋ジストロフィー, タンパク質複合体

緒 言

Transient receptor potential (TRPC) タンパク質は、神経液性因子受容体刺激やジアシルグリセロール産生によって開口活性化し、細胞外の物理的・化学的情報を細胞内に伝達する Ca^{2+} 透過型チャネルタンパク質として知られているが、他のシグナルタンパク質と複合体を形成し、酸化・リン酸化へのシグナル変換・増幅を制御する足場の役割も担っている。

当研究グループは、心不全の原因となる心筋萎縮や線維化の形成過程において、TRPC3 と活性酸素 (ROS) 産生酵素 NADPH oxidase (Nox2) との複合体形成を伴う過剰な ROS の産生が関与することを明らかにした [1, 2]。さらに、細胞外の ATP を介した P2Y2 受容体 (P2Y2R) の活性化が複合体形成に寄与することを示した [3, 4]。加えて、TRPC3 - Nox2 複合体を評価する独自のスクリーニング系を構築し、既承認薬を用いたスクリーニングにより、PDE4 阻害剤であるイブジラストが TRPC3 - Nox2 複合体形成を阻害することを見出し、イブジラストが抗がん剤による筋萎縮を抑制することを明らかにした。

一方で、筋ジストロフィーは、筋線維の破壊・変性 (筋壊死) と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性の筋疾患である。疾患の原因となるタンパク質が多数発見されているが、筋萎縮の形成過程における病態特異的タンパク質間相互作用は明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない。筋ジストロフィーでは、細胞からの ATP 放出が亢進しており、細胞外の ATP 濃度が上昇していることや Nox2 活性が異常亢進していることが知られており、TRPC3 - Nox2 複合体形成が病態発症の起点となっている可能性が高い。そこで本研究ではイブジラストの筋ジストロフィーに対する有効性を検証し、TRPC3 - Nox2 複合体の筋ジストロフィーにおける役割を明らかにした。

方 法

1. 動物

C57BL/10Sns1c を遺伝的背景とするデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル (X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx)) マウス (4 週齢) を日本クレアより購入した。コントロール群として同系統の野生型マウス (C57BL/10Sns1c) (4 週齢) を日本 SLC より購入した。この実験は九州大学動物実験規則に則って実施された。また、この実験は九州大学の承認を得て行われた (承認番号: A20-150-0)。

2. 薬物投与

マウスをイソフルランで麻酔をかけて、Dimethyl sulfoxide : Polyethylene Glycol 300=1 : 1 で溶解したイブジラスト (東京化成) (10 mg/kg/day) を含んだ浸透圧ポンプ (Alzet osmotic pump 1004) を腹腔内に埋めこむことで持続投与した。

3. Hanging wire test

投与 2 週目、4 週目に高さ 40 cm で網につかまらせ、逆さにした。落下するまでの時間を測定した (最長 1 分)。落下後、1 分間のインターバルののち再び同様に測定した。以上を繰り返して合計 5 回測定を実施した。5 回の平均値

を測定値として用いた。

4. 血漿パラメーター解析

4週間後のマウスの下大静脈から採取した血液を、3,000 G、10分、4℃で遠心し、上清を採取した。富士ドライケム NX500 を用いて、血漿中のパラメーターを測定した。

5. mRNA 発現解析

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて、筋肉組織サンプルから Total RNA を単離した。定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) は、KAPA SYBR® FAST qPCR kit (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて行った。

6. 免疫組織学的手法による解析

近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay : PLA, Sigma) による TRPC3-NOX2 複合体形成の評価を行った。イブジラストを 4 週間持続投与したマウスから採材したヒラメ筋 (Soleus muscle : SM) を O.C.T. Compound (サクラ精機) 中に凍結包埋した。その後、cryostat (クリオスター NX70, Thermo Scientific) により薄切切片 (14 μ m) を作製した。Sigma の Duolink™ PLA 免疫染色シグナル増幅技術を用いて標本を染色した。

結 果

1. イブジラストは mdx マウスの筋力と CK 値を改善する

筋力を測定する Hanging Wire test を実施した。投与 2 週間目の測定ではすべての群で有意な差が認められなかったが、4 週間目での測定で、イブジラストを投与した mdx マウスで vehicle を投与した mdx マウス、投与 2 週間目のイブジラストを投与した mdx マウスと比較して有意に Hanging time の延長がみられた (図 1A)。また、mdx マウスでは筋損傷の指標である血中のクレアチンキナーゼ (Creatine Kinase : CK) 値が顕著に増加した一方、イブジラスト投与群では vehicle 群に比べ CK 値が有意に低下した (図 1B)。

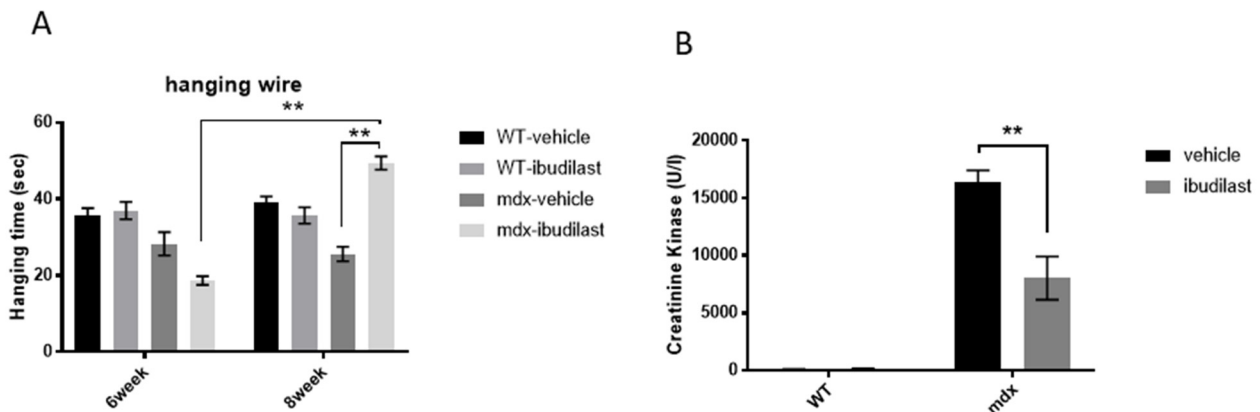


図 1. イブジラスト投与後の mdx マウスにおける筋力と筋損傷の評価

A) 6 週齢 (投与 2 週目)、8 週齢 (投与 4 週目) の時点で Hanging wire test を行った。

B) 筋損傷マーカーであるクレアチンキナーゼ (CK) 値を測定した。誤差範囲は標準誤差で示した。検定は Two-way ANOVA による Tukey 検定を用いた。 $P^{**} < 0.01$, $n=5$ 。

2. イブジラストは mdx マウスの筋萎縮マーカー MuRF1 発現量を低下させるが、C57BL/10 マウスの炎症・筋萎縮マーカーの遺伝子発現に影響を与えない

mdx マウスの vehicle 群とイブジラスト群の遺伝子発現を比較した。炎症マーカーである、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 の発現量は両群間で有意な差は認められなかった。筋萎縮マーカーとして知られる MuRF1 (muscle RING finger protein 1) の発現量はイブジラスト群で有意に減少していた。一方、同じく筋萎縮マーカーとして知られる Atrogin-1

は両群間で有意な差は認められなかった。線維化の指標である α -SMA と COL1A1 も、両群間で有意な差は認められなかった。

C57BL/10 マウスの vehicle 群とイブジラスト群の遺伝子発現を比較した。炎症マーカー、筋萎縮マーカーは両群間で有意な差は認められなかった。 α -SMA は両群間で有意な差は認められなかったが、COL1A1 の発現はイブジラスト群で減少した。

3. イブジラストは mdx マウスのヒラメ筋における TRPC3-Nox2 複合体形成を阻害する

近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay : PLA) により、TRPC3 と Nox2 が複合体を形成しているか検討した。その結果、野生型コントロール群に比べ、mdx の vehicle 群では特に筋細胞の萎縮・浸潤が顕著にみられる領域において PLA ドット (顆粒状の陽性シグナル) の数が増加した。さらに、イブジラストを投与した mdx マウス群では、vehicle 群で増加傾向にあったシグナルの数が減少した (図 2)。

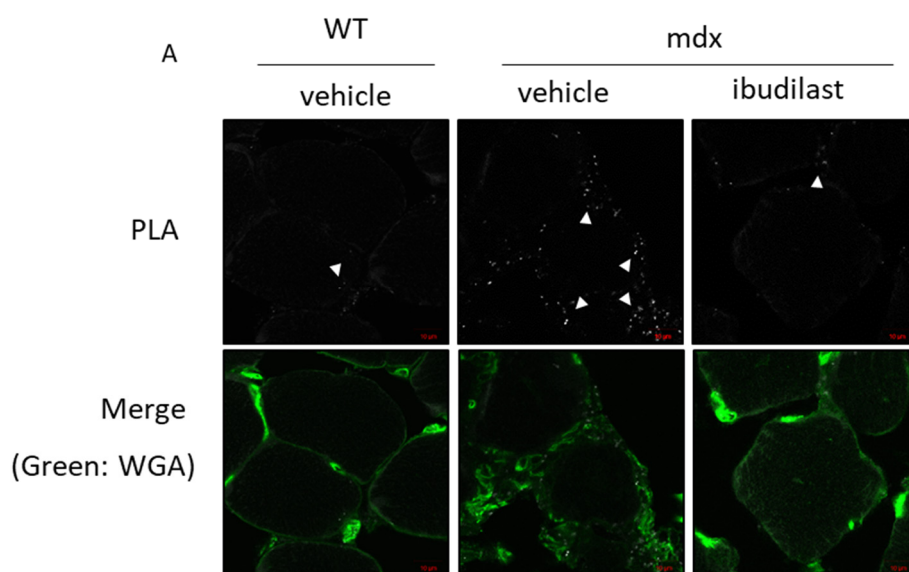


図 2. TRPC3-NOX2 複合体形成阻害の評価

TRPC3 と NOX2 に対して近接ライゲーションアッセイ (PLA) を行った。検出されたドットを矢頭で示す。WTVehicle 群、mdx-vehicle 群、mdx-ibudilast 群で比較した。

考 察

本研究により、mdx マウスにイブジラストを投与することで SM の重量が減少した。また、筋萎縮マーカーである MuRF1 の発現量が減少した。加えて筋損傷の指標である CK 値が低下することが明らかとなった。さらに、筋力の試験である Hanging wire test の成績がイブジラスト投与により改善したことから、イブジラストが筋損傷や筋力の低下を抑制していることが示唆された。一方で、病態進行に伴う炎症や線維化はイブジラスト投与によって抑制されなかった。

現在、TRPC3-Nox2 複合体形成に寄与する TRPC3 チャンネルの C 末端配列を基に、十分な阻害効果を持つ最小のアミノ酸配列を探索している。今後は、このようにして設計されたペプチド阻害剤を用いて、TRPC3 チャンネルの関与が示唆されている疾患モデルに対する治療効果を検討することで、治療法の確立とともに病態メカニズムの解明につながることを期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に協力していただいた九州大学大学院薬学研究院臨床薬学部門生理学分野の皆様ならびに、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci Rep.* 2016 Jun 30;6:28944. doi: 10.1038/srep28944. PMID: 27357941
- 2) Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Ito T, Nishimura A, Matsukane R, Oda S, Hoka S, Ide T, Koitabashi N, Uchida K, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI Insight.* 2017 Aug 3;2(15) :e93358. doi: 10.1172/jci.insight.93358. eCollection 2017 Aug 3. PMID: 28768915
- 3) Sudi SB, Tanaka T, Oda S, Nishiyama K, Nishimura A, Sunggip C, Mangmool S, Numaga-Tomita T, Nishida M. TRPC3-Nox2 axis mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy. *Sci Rep.* 2019 Jul 5;9(1) :9785. doi: 10.1038/s41598-019-46252-2. PMID: 31278358
- 4) Nishiyama K, Numaga-Tomita T, Fujimoto Y, Tanaka T, Toyama C, Nishimura A, Yamashita T, Matsunaga N, Koyanagi S, Azuma YT, Ibuki Y, Uchida K, Ohdo S, Nishida M. Ibudilast attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3 channel and NADPH oxidase 2 protein complexes. *Br J Pharmacol.* 2019 Sep;176(18) :3723-3738. doi: 10.1111/bph.14777. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31241172