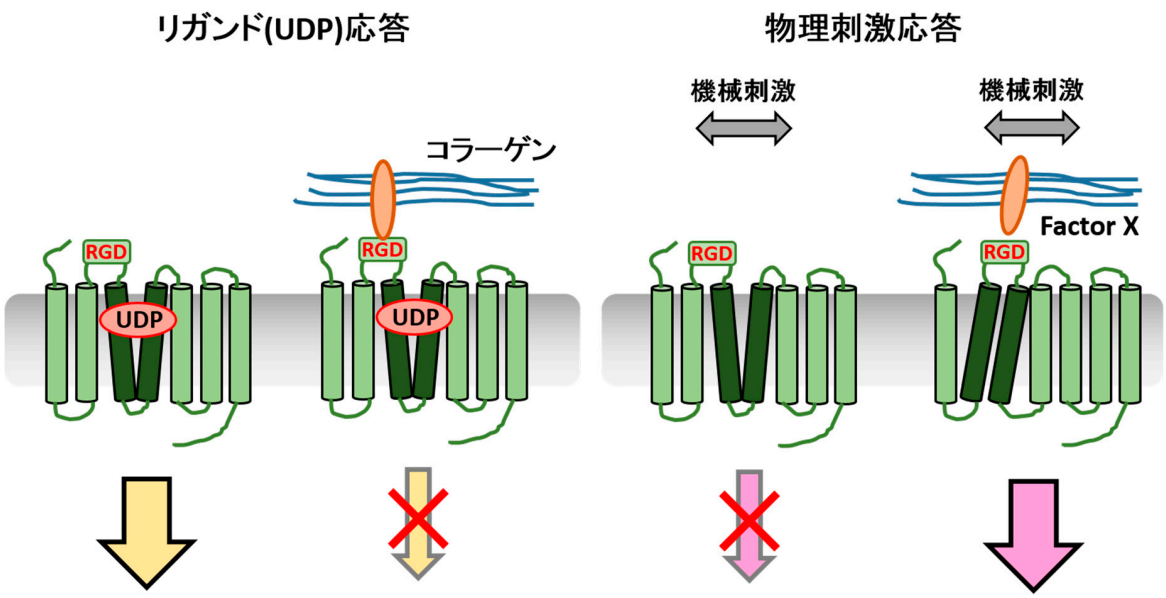
149　心血管組織における力学受容メカニズムの解明	西村　明幸

【目的】加齢や病的状態により血行力学的負荷に適応できなくなると心血管組織の恒常性は破綻し、様々な心血管疾患を引き起こす。我々はこれまでに、細胞外ヌクレオチドをリガンドとするプリン作動性 G 蛋白質共役型受容体(GPCR)の一種である P2Y6R が圧負荷誘発性心不全に関与することを明らかにしてきた。この研究過程において、P2Y6R は従来のリガンドである UDP だけでなく、物理刺激にも応答する可能性が見出された。本研究では、心筋細胞における P2Y6R の物理刺激応答性を検証すると共に、細胞外環境に依存した P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性機構を明らかにする。

【方法】P2Y6R の活性化は細胞内カルシウムイメージングもしくは MAPK のリン酸化を指標にして評価した。P2Y6R を過剰発現させたラット心筋細胞株 H9c2 をストレッチチャンバーにまき、チャンバーを 20%伸展させることで物理刺激を行った。

【結果】H9c2 細胞において、P2Y6R は一過性の伸展刺激により活性化されること、この活性化は細胞外の RGD モチーフに依存していることが明らかとなった。細胞外マトリックスであるコラーゲンは P2Y6R の伸展刺激応答性を促進する一方で、UDP 応答性を低下させることが明らかとなった。

細胞外環境による P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性の変化



149. 心血管組織における力学受容メカニズムの解明

西村　明幸

自然科学研究機構 生理学研究所 心循環シグナル研究部門

Key words：力学受容，プリン作動性受容体，G 蛋白質共役型受容体，心臓リモデリング

緒　言

ヒトの血液循環機能は心血管組織の形態構造によって決定されている。心血管組織の初期発生は先天的に決定されているものの、胎児期後半から発達過程においては体液量、食事内容や運動など、様々な後天的要因も形態構造決定に重要な役割を担っている。心血管組織は絶えず血行力学的負荷に曝されながらも、自身の形態構造を変化させる（リモデリング）ことで負荷に適応する頑健性を備えている。しかしながら、加齢や病的状態により血行力学的負荷に適応できなくなると組織恒常性が破綻し、様々な心血管疾患を引き起こす。細胞が物理量を認識する分子機構として、いくつかのセンサータンパク質が現在までに同定されているが、心血管組織が血行力学的負荷に適応・不適応する（すなわち組織恒常性の維持とその破綻に関する）分子機構については詳しく分かっていない。

心血管組織のリモデリングは、血行力学的負荷以外にもアドレナリン、アンジオテンシンⅡ（Ang Ⅱ）などの神経体液性因子により調節されている。これら神経体液性因子の多くは、G 蛋白質共役型受容体（GPCR）を介して心筋細胞の肥大や線維化といったリモデリング応答を誘導する。ADP や ATP などの細胞外ヌクレオチドによって活性化されるプリン作動性シグナリングは、痛みや神経伝達における重要性がこれまでによく知られているが、近年、心血管系における役割が明らかにされ始めている［1，2］。我々は、心血管系におけるプリン作動性シグナリングについて研究を進めており、GPCR 型プリン作動性受容体の 1 つである P2Y6R が心臓において病的な圧負荷刺激により発現上昇すること、圧負荷誘発性心肥大に関与することを明らかにしている［3］。また最近、げっ歯類の血管平滑筋細胞において、P2Y6R は Ang Ⅱ受容体 AT1R と相互作用することで Ang Ⅱによる血圧上昇を調節することを見出した。P2Y6R は発生に伴い発現上昇し、この加齢に伴う P2Y6R の発現上昇が、Ang Ⅱ誘発性高血圧症の発症リスクを高めることを明らかにした［4］。

これまでに AT1R を始めとするいくつかの GPCR が物理刺激により直接活性化されることが報告されている[5, 6]。P2Y6R を欠失させた心筋細胞では伸展刺激による細胞内カルシウム上昇が低下したことから、P2Y6R は既知のリガンドである UDP だけでなく、物理刺激によっても活性化される可能性が見出された。そこで本研究では、P2Y6R の物理刺激応答性を検証すると共に、P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性の制御機構について検討を行った。

方　法

1. 細胞内カルシウムイメージング

ラット心筋細胞株 H9c2 に Neon transfection system を用いてマウス P2Y6R 発現プラスミドを導入した。その後、細胞をリガンド刺激用としてガラスボトムディッシュ、伸展刺激用としてストレッチチャンバー（メニコン）に播種して 48 時間培養した。一部のディッシュとチャンバーは細胞を播種する前にコラーゲンコーティングを行った。細胞に Fura-2 を取り込ませた後、顕微鏡下にセットし、100 μM UDP 刺激もしくは 20%伸展刺激を行った。

2. ウエスタンブロッティング

P2Y6R を過剰発現させた H9c2 をプラスチックデッシュもしくはストレッチチャンバーに播種して 24 時間培養した後、無血清培地に交換してさらに 24 時間培養した。100 μM UDP で 5 分刺激、もしくはサイクルストレッチ（20%、1 Hz）で 120 分刺激した後、Lysis buffer で細胞を回収した。

結　果

1. P2Y6R は RGD モチーフを介して物理刺激に応答する。

P2Y6R が物理刺激によって活性化されるのかを検証するために、内在性の P2Y6R を持たないラット心筋細胞株 H9c2 にマウス P2Y6R を発現させ、コラーゲンコート済みのストレッチチャンバーに播種した。その後、一過性の伸展刺激（20%、1 秒）を行った際の細胞内カルシウム変動を評価した。H9c2 細胞に伸展刺激を加えると P2Y6R 発現依存的に細胞内カルシウム上昇が確認できた（図 1A，B）。

P2Y6R は細胞外第二領域にアルギニン-グリシン-アスパラギン酸からなる RGD モチーフを有している（図 1C）。RGD モチーフはインテグリンとの相互作用領域として知られている。そこで次に、RGD モチーフが P2Y6R の物理刺激応答性に関与するかを検討した。P2Y6R RGE 変異体を H9c2 に発現させたところ、伸展刺激依存的なカルシウム応答は有意に抑制された（図 1A，B）。また、ヒト P2Y6R では一番目のアルギニンがグルタミンとなっている（図 1C）。そこでマウス P2Y6R に QGD 変異を導入して物理刺激応答性確認したところ、P2Y6R QGD は野生型 P2Y6R 同様に伸展刺激に応答することが分かった（図 1A，B）。P2Y6R RGE 変異体のリガンド刺激応答性を検証したところ、UDP によるカルシウム応答が確認できた（図 1D）。次に細胞内カルシウムとは別の指標として、P2Y6R 活性化の下流で起こる ERK の活性化を評価した。サイクルストレッチ刺激を行ったところ、P2Y6R 発現依存的に ERK 活性化が確認された。一方、RGE 変異体の過剰発現では ERK 活性化は確認されなかった（図 1E）。また、UDP 刺激による ERK 活性化は P2Y6R 野生型と RGE 変異体の過剰発現で違いは見られなかった（図 1F）。以上のことから、P2Y6R RGD モチーフは物理刺激応答性に必要であることが明らかとなった。

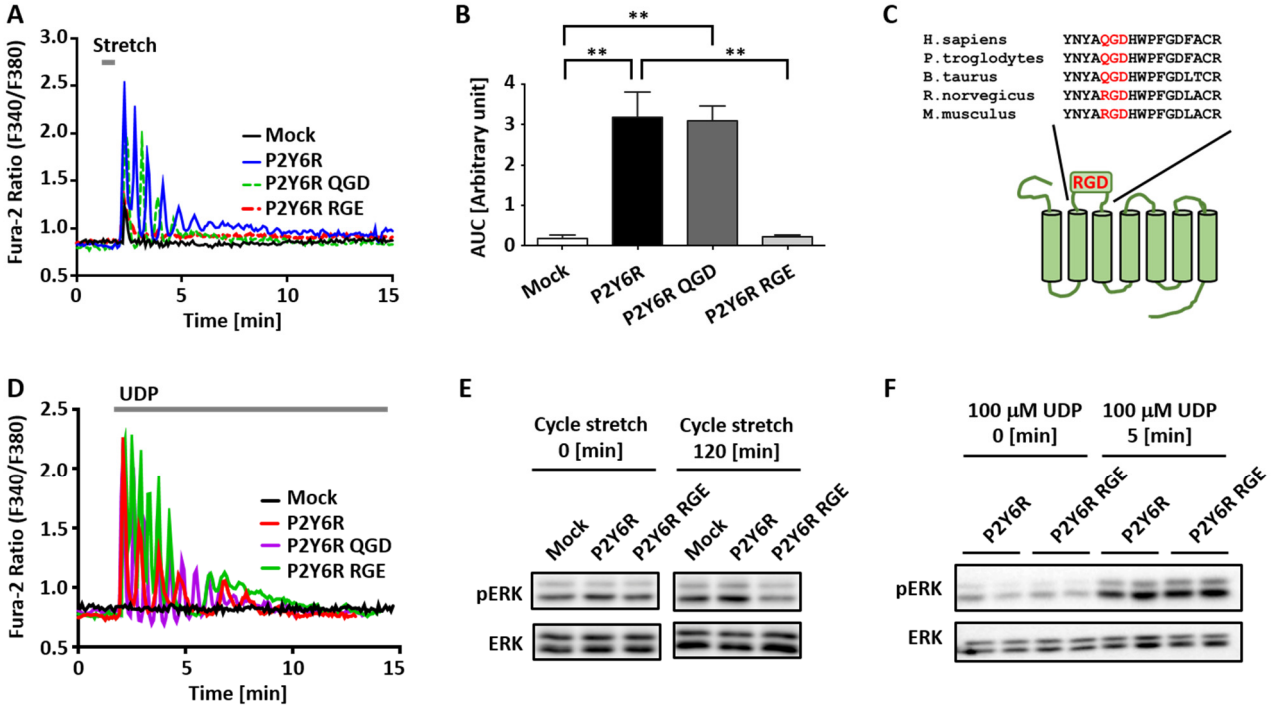


図 1. P2Y6R の伸展刺激応答性

（**A**）P2Y6R 発現 H9c2 細胞における伸展刺激による細胞内カルシウム変動を Fura-2 の蛍光変化により測定した。（**B**）伸展刺激後の細胞内カルシウム上昇の定量結果。One-way ANOVA, $^{**}p < 0.01$.（**C**）P2Y6R の細胞外第二領域のアミノ酸配列相同性。RGD モチーフを赤字で示す。（**D**）P2Y6R 発現 H9c2 細胞における UDP（100 μM）刺激による細胞内カルシウム変動。（**E**）P2Y6R 発現 H9c2 細胞におけるサイクルストレッチ刺激による ERK 活性化。（**F**）P2Y6R 発現 H9c2 細胞における UDP 刺激による ERK 活性化。

2. コラーゲンは P2Y6R のリガンド応答性と物理刺激応答性を変化させる。

RGD モチーフは様々な細胞外マトリックスタンパク質に保存されていることから、細胞外マトリックスが P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性に与える影響について検討を行った。コラーゲンでコーティングしたストレッチチャンバーを用いた場合には伸展刺激による P2Y6R の活性化が確認されたのに対して、コラーゲンコーティングしていないストレッチチャンバーを用いた場合には伸展刺激依存的な P2Y6R の活性化は顕著に抑制されることが明らかになった。一方、UDP による P2Y6R の活性化はコラーゲンコートデッシュ上で減弱することが明らかとなった。非常に興味深いことに、P2Y6R RGE 変異体を用いた場合にはコラーゲンコートによる UDP 応答性の低下は確認されなかった。以上の結果から、コラーゲンは P2Y6R の物理刺激応答性に必要である一方で、リガンド応答性を低下させること、コラーゲンによる P2Y6R の応答性の変化は RGD モチーフを介していることが明らかとなった。

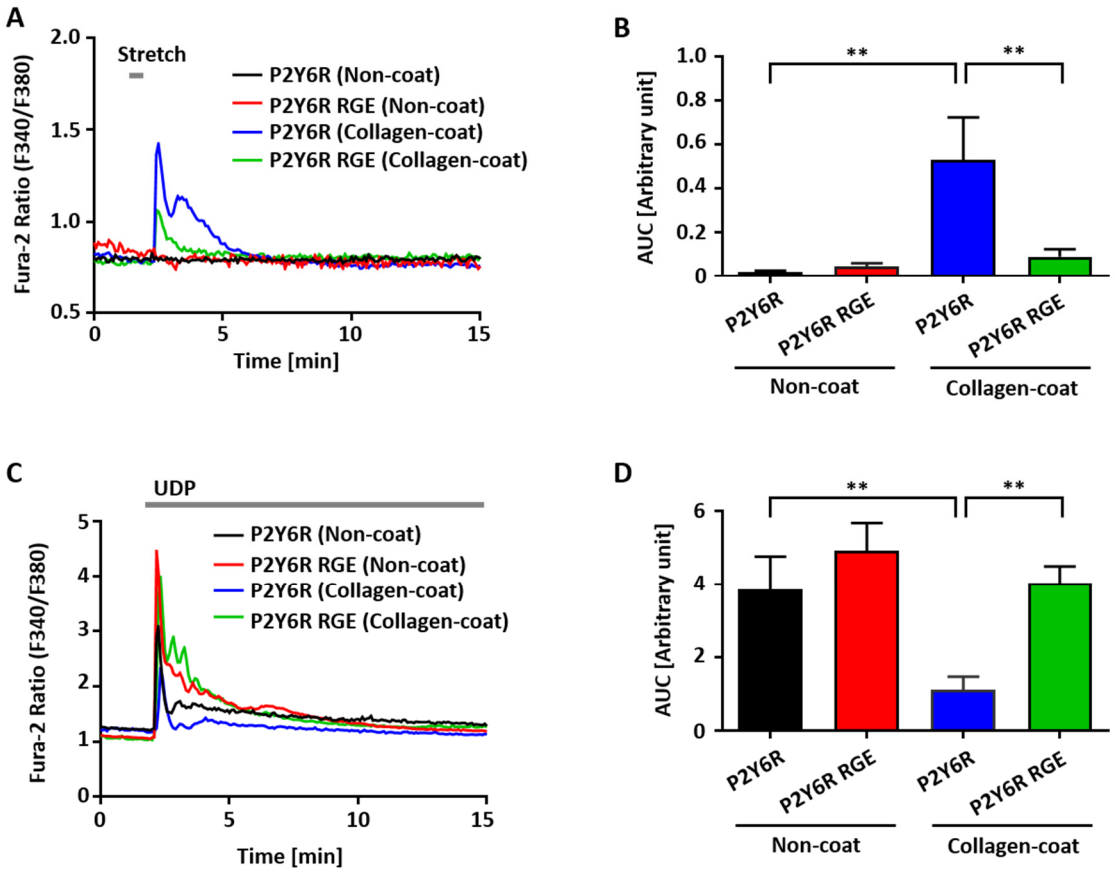


図 2. P2Y6R の伸展刺激応答性

（**A**）コラーゲンコート有り無しのストレッチチャンバーに播種した P2Y6R 発現 H9c2 細胞の伸展刺激依存的な細胞内カルシウム変動。（**B**）伸展刺激後の細胞内カルシウム上昇の定量結果。One-way ANOVA, **p < 0.01.（**C**）コラーゲンコート有り無しのディッシュに播種した P2Y6R 発現 H9c2 細胞の UDP 刺激依存的な細胞内カルシウム変動。（**D**）UDP 刺激後の細胞内カルシウム上昇の定量結果。One-way ANOVA, **p < 0.01.

考　察

今回、UDP を既知のリガンドとするプリン作動性 GPCR である P2Y6R の物理刺激応答性について評価を行い、心筋細胞株の発現系において、20%伸展刺激により P2Y6R が活性化されることを見出した。また、この活性化には細胞外領域に存在する RGD モチーフが関与していることも明らかにした。RGD モチーフは様々な細胞外マトリックスタンパク質に見られるモチーフでインテグリンとの相互作用に関与することが知られている。そこで今後 P2Y6R がどのインテグリンサブタイプと結合することが物理刺激応答性の獲得に関与しているのかを明らかにしていく。また、コラーゲンコートすることで P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性が変化することも見出した。このコラーゲンによる応答性の変化に関しても P2Y6R とインテグリンの相互作用が関与しているのかを明らかにしていく。コラーゲンの蓄積は心不全の進行に伴って増加する。コラーゲンの蓄積に伴う P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性の変化が心臓の病的なリモデリングに関与するのかを今後明らかにしていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Universiti Malaysia Sabah の Caroline Sunggip 博士である。最後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) Sunggip C, Nishimura A, Shimoda K, Numaga-Tomita T, Tsuda M, Nishida M. Purinergic P2Y6 receptors: A new therapeutic target of age-dependent hypertension. Pharmacol Res. 2017 Jun;120:51-59. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28336370 DOI: 10.1016/j.phrs.2017.03.013

2) Nishimura A, Sunggip C, Oda S, Numaga-Tomita T, Tsuda M, Nishida M. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases. Pharmacol Ther. 2017 Dec;180:113-128. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28648830 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.06.010

3) Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H. P2Y6 receptor-Galpha12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. EMBO J. 2008 Dec 3;27(23):3104-15. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19008857 DOI: 10.1038/emboj.2008.237

4) Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems JM, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, Nishida M. Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. Sci Signal. 2016 Jan 19;9(411):ra7. PMID: 26787451 DOI: 10.1126/scisignal.aac9187

5) Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. Nat Cell Biol. 2004 Jun;6(6):499-506. Epub 2004 May 16. PMID: 15146194 DOI: 10.1038/ncb1137

6) Mederosy Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. EMBO J. 2008 Dec 3;27(23):3092-103. Epub 2008 Nov 6. PMID: 18987636 DOI: 10.1038/emboj.2008.233