

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07116

研究課題名(和文) 成体における新生血管の成熟を決定する分子機構の解明と創薬応用

研究課題名(英文) Analysis of the molecular and cellular mechanism of vessel maturation in adult tissues

研究代表者

富田 拓郎(沼賀拓郎)(Numaga-Tomita, Takuro)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：60705060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体の恒常性維持には機能的な血管網の存在が欠かせない。血管は発達に従って備わるものであるが、成熟個体においても組織障害時に血管網は再形成され、組織の修復・恒常性の回復に貢献する。機能的な血管網の形成には、構造的に脆い微小血管が、より構造的に安定な血管へと成熟していく過程“血管成熟”が重要である。しかしながら、血管成熟は様々な要素が複雑に絡みあった組織応答であり、いまだその制御機構の全容は明らかにされていない。本研究では、血管成熟にクリティカルな役割を果たす分子としてTRPC6チャンネルに着目し、その血管成熟に関わる分子機構を明らかにし、創薬標的としての有用性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血管平滑筋に発現するTRPC6チャンネルが成体における血管成熟の負の制御因子であることを明らかにした。TRPC6を抑制した血管平滑筋細胞およびマウス個体の解析から、TRPC6の抑制が、どのような分子・細胞機構により血管成熟を促進させうるかが明らかになった。本研究における特に重要な発見が、TRPC6の抑制により、血管平滑筋の分化を促進すると内皮障害のレベルも軽減されることである。すなわち、血管平滑筋の表現型の正常化こそが血管の恒常性維持に重要であることが示された。TRPC6は明らかにそこに関与する重要な分子の一つであり、虚血性疾患の予後改善などに有効な創薬標的であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The functional blood vessels play critical roles in body homeostasis. While blood vessels were developmentally formed, once adult tissue have injured, newly formed vascular network contributes to recovery of tissue homeostasis. Formation of functional vascular network requires vessel maturation in which vulnerable nascent capillaries are covered and stabilized by mural cells. Since vessel maturation was complex process involving many factors, the comprehensive molecular and cellular mechanism is still unknown. In this study, we demonstrated that TRPC6 expressed in vascular smooth muscle cells functions as a negative regulator of vessel maturation and the pharmacological suppression of TRPC6 facilitates it even with the endothelial dysfunction. Therefore, TRPC6 could be a druggable target for the ischemic diseases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：血管成熟 血管平滑筋 TRPC6チャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

血管は、個体発生に伴い全身の組織に酸素・栄養素を供給するために発達する。このような発生に伴うものだけでなく、成熟個体においても組織障害時の成体応答として血管は形成される。血管形成は、代謝物の循環や炎症応答を介して組織障害からの回復において、非常に重要である。一方で、血管形成の異常(形成過多あるいは不全)はより重篤な病態を引き起こす。秩序だった血管形成においては、障害刺激により一過的に形成された微小血管はその多くが退縮し、限られた血管のみが成熟し、機能的な血管として残存する。過剰な血管形成は障害応答としてよく見られる血管新生促進因子(血管内皮増殖因子等)の過剰産生による。これら因子は、血管新生を促すと同時に、血管の成熟を抑制する。血管形成不全を伴う多くの疾患において、血管新生の促進が、期待通りの効果を示さない理由は、血管新生により出来る血管の多くが機能的ではないことであると考えられている。即ち、新生血管を機能的な血行路とする血管の成熟を促進する介入法が効果的な治癒効果を示すことが期待される。しかしながら、血管新生に比べて、血管成熟のシステムは、いまだ十分に明らかにされていない。

これまでに我々は、血管平滑筋細胞に発現する非選択的カチオンチャネル TRPC6 のノックアウトマウス (TRPC6-KO)において、下肢における虚血後の血流回復が、野生型に比べて有意に促進されていることを見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管新生の後におこる機能的な血管網の形成に重要となる「血管成熟」を決定する分子機構の解明を目的とする。血管成熟は、複雑なシステム故、in vivo での観察主体の研究が先行しており、多くの分子の関与が報告されているが、いまだ決定的なシグナル伝達系の解明には至っていない。最近、申請者は、壁細胞に発現する非選択的カチオンチャネル TRPC6 がリン酸化依存的に抑制されると血管成熟が亢進することを見出した。しかしながら、どのような状況下で TRPC6 がリン酸化されるのか、病態時の血管成熟抑制にどのように TRPC6 のリン酸化が影響するのかといった分子メカニズムの理解にまで至っていない。そこで本研究では、血管平滑筋における TRPC6 の生理的重要性と、組織レベルにおける血管平滑筋や内皮細胞とのクロストークにおける TRPC6 の重要性を研究した。

## 3. 研究の方法

### マウス大動脈平滑筋細胞の単離と培養

3-5 週齢のマウスから下降大動脈を摘出し、エラスターゼおよびコラゲナーゼ処理により酵素的に血管平滑筋を単離した。血管平滑筋細胞は DMEM+20% FBS の培地にて培養した。血管平滑筋は、FBS を加えない DMEM にて培養することにより収縮型血管平滑筋へと分化させた。

### マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞の培養と血管平滑筋への分化誘導

C3H10T1/2 細胞は、RIKEN BioResource Center から購入した。BME+10% FBS 培地を用いて培養した。血管平滑筋への分化誘導は、24 時間の血清飢餓後、TGF- $\beta$ 1 に

より刺激した。虚血状態を *in vitro* で模倣するため、酸素グルコース欠乏(OGD)ストレスを細胞に与えた。OGD ストレスは、グルコース負含 DMEM 培地を用い、1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター中で 24 時間培養することにより与えた。

#### マウス下肢虚血(Hindlimb ischemia, HLI)モデル

8-10 週齢の雄マウスを使用した。マウスは 3 種混合麻酔下に左足臀部を除毛し、大腿動脈の一か所を結紮(129/Sv)あるいは摘出(C57BL/6J)した。手術後のマウスは、保温し麻酔からの回復を待ち、鎮痛薬としてブプレノルフィンを皮下投与した。術後 1, 3, 7, 14, 21 日後にレーザースペックル血流計(Omega wave)により右足および左足のふくらはぎにおける血流を測定した。血流の回復度は、右足に対する左足の血流量を%で表した。

#### 免疫組織染色

下肢虚血術後 3, 7, 14, 21 日においてイソフルラン過麻酔によりマウスを安楽死させた。マウスの腓腹筋を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液に浸潤し固定。30%スクロース含リン酸緩衝液に置換し、OCT コンパウンドに凍結包埋した。クライオトームにより 10 μm 厚の凍結切片を作製した。1% BSA 含 PBS 溶液によりブロッキングし、各種抗体により免疫染色した。

#### 4. 研究成果

##### 血管平滑筋細胞の表現型スイッチにおける TRPC6 の重要性の解明

血管平滑筋は、細胞増殖・遊走が活発な増殖型と収縮タンパク質を発現しより静的な収縮型という二つの表現型を可塑的に変化させることで、血管組織の恒常性維持にも関与している。多くの血管系疾患は、増殖型血管平滑筋の活性化が病態悪化に関与していることが知られている。そこで、野生型および TRPC6 欠損(TRPC6-KO)マウスから下降大動脈平滑筋を単離し、血管平滑筋の表現型スイッチに TRPC6 が与える影響を解析した。興味深いことに、血清飢餓により収縮型への分化誘導を行った結果、TRPC6-KO 細胞は野生型よりも分化が促進されることが明らかになった。一方で、血小板由来成長因子により誘導される細胞増殖・遊走は TRPC6-KO の影響を受けなかった。

TRPC6 チャンネルは、非選択的カチオンチャンネルであり、Ca および Na を細胞に透過させる。TRPC6 チャンネルはホスホリパーゼ C により産生されるジアシルグリセロールにより活性化される。すなわち、成長因子等を含む FBS 存在下では TRPC6 チャンネルは、構成的に活性化されうる状態にあるといえた。そこで、蛍光性膜電位センサーを用いて、血管平滑筋細胞の表現型ごとの膜電位を解析したところ、増殖型血管平滑筋は収縮型血管平滑筋よりも細胞膜が脱分極していることが明らかになった。TRPC6 の欠損は、増殖型細胞の膜電位には大きな影響を与えなかったが、収縮型細胞の膜電位が TRPC6-KO 細胞ではより過分極していることが明らかになった。そして、分化マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) の発現はこの膜電位変化と相関していた。このことから、TRPC6 は細胞膜電位を脱分極させることで、血管平滑筋の分化を抑制する作用を持つことが示唆された。

次に、TRPC6 の血管平滑筋細胞分化を仲介するシグナル伝達経路における重要性を解析した。その結果、分化刺激となる TGF- $\beta$ 1 により誘導される Akt の活性化(リン酸

化)がTRPC6の欠損により上昇することが明らかになった。以前の研究から、Aktの活性化の負の制御因子である脱リン酸化酵素PTENがTRPC6の活性制御に関与することが報告されていた。そこで、TRPC6は自身の活性制御だけでなくPTENの活性化にも影響を与えている可能性を検討した。その結果、TRPC6の欠損は、PTENの膜局在(活性化)を抑制することが明らかになった。TRPC6の膜電位制御がこのPTENの膜局在に影響するかどうかを検証するため、高KCl添加により人工的に細胞膜を脱分極させ、TGF- $\beta$ 1によるPTENの細胞膜からの離脱を解析した結果、細胞膜を脱分極させておくとPTENは細胞膜にとどまり易くなることが明らかになった。

以上の結果から、TRPC6は細胞膜の脱分極を維持することにより増殖型の表現型に血管平滑筋を誘導する機能を有していることが明らかになった。またこの細胞膜の脱分極がPTENの活性化を通して下流のAktの活性化を負に制御していることを明らかにした。これまで、細胞膜電位はチャネル活性制御が主な機能として知られてきたが、近年、シグナル伝達に与える影響が注目されつつある。本研究成果は、Aktの活性制御にも細胞の膜電位変化が重要であることを世界で初めて明らかにした(Numaga-Tomita et al FASEB J, 2019)。

#### 下肢虚血後の血流回復におけるTRPC6の関与

野生型およびTRPC6-KOマウスに対して、HLIを行い、術後21日目までの血流量の変化を解析した。その結果、TRPC6-KOマウスは、野生型に比べて有意に血流回復が亢進していることが明らかになった。このことから、TRPC6は血流回復に対して負の制御因子として機能していることが示唆された。

虚血後の血流回復には、虚血組織における新しい血管の形成が重要であることが知られる。そこで虚血後の腓腹筋における血管新生を免疫染色法により評価した。血管新生はHLI後21日わたって増加したが、野生型とTRPC6-KOマウスの間に有意な差は認められなかった。一方、血管平滑筋に被覆され安定化した血管のマーカーである $\alpha$ -SMA陽性血管数を比較した結果、TRPC6-KOマウスにおいて有意に上昇していた。以上のことから、TRPC6は血管の安定化(血管成熟)を負に制御する因子であることが強く示唆された。

マウス下肢虚血モデルはヒトの末梢循環障害を模したモデルである。ヒトの末梢循環障害においては、ホスホジエステラーゼ3阻害剤であるシロスタゾールが唯一承認された薬であった。これまでに我々の研究室では、シロスタゾールがTRPC6の69番目のスレオニン(T69)のリン酸化を介してTRPC6を抑制することを報告していた。このこととTRPC6-KOでの結果から、TRPC6の抑制が末梢循環障害に対して有効な治療法であることが予想された。そこでTRPC6のT69のリン酸を、下肢虚血後の組織において免疫染色法により解析した結果、虚血後1週間において一過的にTRPC6のT69リン酸化が血管平滑筋において誘導されていることが明らかになった。そこでシロスタゾール投与群におけるTRPC6 T69リン酸化を解析したところ、血流回復がコントロール群よりも優位に改善していることと一致して、T69リン酸化もシロスタゾール処置により持続的に上昇していた。すなわち、シロスタゾールの末梢循環障害に対する有効性の一部がTRPC6のT69リン酸化を介した抑制であることが明らかになった。

In vitro系での報告により、TRPC6のT69はprotein kinase A/G依存的にリン酸化されることが明らかになっていた。そこで下肢虚血後の血流回復において、血管平滑

筋での PKA/PKG の活性化を誘導する因子について探索を行った。その結果、一酸化窒素およびプロスタグランジン I<sub>2</sub> を抑制した場合に、虚血後の血流回復が顕著に抑制されることが明らかになった。興味深いことに、TRPC6-KO マウスは、これら因子の抑制に影響を受けなかった。すなわち、NO や PG12 の下流のシグナルインテグレーターとして TRPC6 の T69 リン酸化による抑制が機能していることが明らかになった。

以上の結果から、TRPC6 の抑制が、下肢虚血後の血流回復を促進する効果を有することを明らかにした。そこで、TRPC6 の阻害剤による直接的な抑制が、下肢虚血後の血流回復を促進するかを検討した。我々は、すでに広く使用されている TRPC チャンネルの阻害剤 Pyrazole-2(Pyr-2)に加えて、新規の TRPC6 抑制薬をスクリーニングし、1-benzilpiperidine (1-BP)が TRPC6 の抑制を介して下肢虚血後の血流回復を顕著に促進させる作用があることを見出した。多くの末梢循環障害の患者さんは、糖尿病や高脂血症に伴う内皮障害を併発している。上記の NO や PG12 の効果からわかる通り、内皮障害が併発していると末梢循環障害の予後が著しく毀損される。TRPC6 の直接阻害が、血管の成熟を促進できたことから、内皮障害併発下でも TRPC6 の抑制は、血流回復を改善させる効果が期待された。そこで、高脂血症モデルマウスを用いて、内皮障害存在下における虚血後の血流回復に TRPC6 阻害が与える影響を検討した。その結果、Pyr2 も 1-BP も双方とも内皮障害併発下においても有意に虚血後の血流回復を促進できることが明らかになった (Numaga-Tomita et al. Br J Pharmacol, 2023, Shimauchi et al. Cells, 2022)。

#### まとめ

本研究では、血管平滑筋に発現する TRPC6 チャンネルが成体における血管成熟の負の制御因子であることを明らかにした。そして、TRPC6 を抑制した血管平滑筋細胞およびマウス個体の解析から、TRPC6 の抑制が、どのような分子・細胞機構により血管成熟を促進させうるかが明らかになった。本研究における特に重要な発見が、TRPC6 の抑制により、血管平滑筋の分化を促進すると内皮障害のレベルも軽減されることである。すなわち、血管平滑筋の表現型の正常化こそが血管の恒常性維持に重要であることが示された。TRPC6 は明らかにそこに関与する重要な分子の一つであり、虚血性疾患の予後改善などに有効な創薬標的であることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Oda S, Nishiyama K, Furumoto Y, Yamaguchi Y, Nishimura A, Tang X, Kato Y, Numaga-Tomita T, Kaneko T, Mangmool S, Kuroda T, Okubo R, Sanbo M, Hirabayashi M, Sato Y, Nakagawa Y, Kuwahara K, Nagata R, Iribe G, Mori Y, Nishida M	4. 巻 13
2. 論文標題 Myocardial TRPC6-mediated Zn <sup>2+</sup> influx induces beneficial positive inotropy through $\alpha$ -adrenoceptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34194-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Numaga Tomita T, Shimauchi T, Kato Y, Nishiyama K, Nishimura A, Sakata K, Inada H, Kita S, Iwamoto T, Nabekura J, Birnbaumer L, Mori Y, Nishida M	4. 巻 180
2. 論文標題 Inhibition of transient receptor potential cation channel $\alpha$ 6 promotes capillary arterIALIZATION during post ischaemic blood flow recovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 94 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Kato Y, Morimoto H, Sakata K, Matsukane R, Nishimura A, Nishiyama K, Shibuta A, Horiuchi Y, Kurose H, Kim SG, Urano Y, Ohshima T, Nishida M	4. 巻 11
2. 論文標題 A TRPC3/6 Channel Inhibitor Promotes Arteriogenesis after Hind-Limb Ischemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11132041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inazumi H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Numaga-Tomita T, Kashihara T, Nakada T, Kurebayashi N, Oya M, Nonaka M, Sugihara M, Kinoshita H, Moriuchi K, Yanagisawa H, Nishikimi T, Motoki H, Yamada M, Morimoto S, Otsu K, Mortensen RM, Nakao K, Kimura T	4. 巻 130
2. 論文標題 NRSF-GNAO1 Pathway Contributes to the Regulation of Cardiac Ca <sup>2+</sup> Homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 234 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/circresaha.121.318898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashihara T, Kawagishi H, Nakada T, Numaga-Tomita T, Kadota S, Wolf EE, Du CK, Shiba Y, Morimoto S, Yamada M.	4. 巻 5
2. 論文標題 beta-Arrestin-Biased AT1 Agonist, TRV027 Causes a Neonatal-Specific Sustained Positive Inotropic Effect without Increasing Heart Rate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American College of Cardiology	6. 最初と最後の頁 1057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2020.08.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi K, Takahashi H, Furuichi T, Toyota M, Furutani-Seiki M, Kobayashi T, Watanabe-Takano H, Shinohara M, Numaga-Tomita T, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Naruse K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Gravity sensing in plant and animal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Microgravity	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-020-00130-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Numaga-Tomita Takuro, Nishida Motohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 TRPC Channels in Cardiac Plasticity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 454 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9020454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sudi Suhaini Binti, Tanaka Tomohiro, Oda Sayaka, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki, Sunggip Caroline, Mangmool Supachoke, Numaga-Tomita Takuro, Nishida Motohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 TRPC3-Nox2 axis mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46252-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Numaga Tomita Takuro, Shimauchi Tsukasa, Oda Sayaka, Tanaka Tomohiro, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki, Birnbaumer Lutz, Mori Yasuo, Nishida Motohiro	4. 巻 33
2. 論文標題 TRPC6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential dependent coupling with PTEN	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 9785 ~ 9796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802811R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 富田 拓郎、小林 誠、川岸 裕幸、中田 勉、山田 充彦
2. 発表標題 血管平滑筋細胞におけるL型電位依存性カルシウムチャンネルとストア作動性カルシウムチャンネルの関係性解明
3. 学会等名 日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田 拓郎、川岸 裕幸、中田 勉、山田 充彦
2. 発表標題 The effect of chemical sympathetic innervation on the postnatal heart development.
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田拓郎、高橋弘毅、山田充彦
2. 発表標題 小胞体Caセンサー-STIM1によるCav1.2チャンネル制御機構の解明
3. 学会等名 第66回中部日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田拓郎、西田基宏
2. 発表標題 血管平滑筋の表現型スイッチにおけるTRPC6チャンネルの重要性の解明
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuro Numaga-Tomita, Hiroki Takahashi, Mitsuhiko Yamada
2. 発表標題 Analysis of the molecular mechanism underlying ER Ca <sup>2+</sup> sensor STIM1-dependent suppression of CaV1.2
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Numaga-Tomita T, Shimauchi T, Kitajima N, Nishimura A, Nishida M
2. 発表標題 Importance of TRPC3-Nox2 coupling in cardiac stiffness
3. 学会等名 8th International Workshop Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------