

氏名	ふ やおべん 胡 耀鵬		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	乙第1687号		
学位授与の日付	平成29年10月5日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当（論文博士）		
学位論文題目	Uncovering the arrhythmogenic potential of TRPM4 activation in atrial-derived HL-1 cells using novel recording and numerical approaches （新しい記録法と数理的アプローチによって明らかとなった心房筋由来 HL-1 細胞における TRPM4 チャネル活性化の催不整脈性）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	岩本 隆宏
	（副査） 福岡大学	教授	三浦 伸一郎
	福岡大学	講師	芝口 浩智

## 内容の要旨

### 【目的】

ストレス応答チャネル群 TRP 蛋白質スーパーファミリーの一員、TRPM4 チャネルは、Ca で活性化される陽イオンチャネルであり、細胞内 Ca 動態とリンクした Na 流入経路として働く。このチャネルは全身の臓器や細胞に遍く発現しており、神経伝達物質の放出調節、上皮細胞の内外分泌、免疫細胞のサイトカイン放出、活動電位発生組織の興奮性制御など、多彩な生体機能に関わっていると考えられている。また、近年、房室ブロックを始めとする種々の心不整脈の病態形成に、このチャネル遺伝子の変異が密接に関わっていることが報告されている。一方、心臓に代謝的・機械的負荷を与える病態（心不全、心臓弁膜症、高血圧、糖尿病等）では心臓のリモデリングが生じることが知られているが、この時 TRPM4 チャネルの発現や活性が著明に増加し、後天的な不整脈基質として働くという指摘がある。そこで本研究では、TRPM4 チャネルが心リモデリング時の心臓興奮異常に果たす役割を検討すると共に、その開閉キネティクスを数理的に表現し、更にこのチャネルの活性増加に伴う催不整脈効果を正確に予測する心臓興奮数理モデルの開発を行うことを目指して、以下の実験を行った。

### 【対象と方法】

（1） 強制発現系（HEK293 細胞）において、ヒト TRPM4 チャネル電流の Ca 活性化濃度依存性をパッチクランプ法（膜電位固定モード）で評価した。一部の実験では、電位依存

性 Ca チャネル (VDCC) を共発現して、細胞内 Ca 濃度変化を介した TRPM4 チャネルとの機能協関について定量的に評価した。後者の目的の為、fura-2 による Ca イメージング法による細胞内 Ca 濃度測定を行った。(2) マウス不死化心房筋由来培養細胞株 HL-1 を用いて、TRPM4 チャネル活性と活動電位の定量的な相関について検討した。これには、パッチクランプ法の変法である膜電流固定法を用いた。(3) C57BL/6J マウスの腹腔内に埋入した micro-osmotic pump (Alzet, 1002) を介して 2-3 週間のアンギオテンシンの持続投与 (2mg/kg/min) を行い、心肥大マウスモデルを作成した。このマウスの心臓から酵素処理によって単一心房筋細胞を単離し、パッチクランプ法による電流測定、活動電位測定を行った。(4) 活動電位のシミュレーションを行うため、Luo-Rudy2000、Nygren1998、Aslanidi2009 (以上、Cor1.2 のライブラリー) 及び HL-1 (Takeuchi *et al*, Scientific Reports 2013) の各モデルを利用して、TRPM4 チャネル開閉キネティクスを組み込んだ数理モデルを作成した。(5) 統計学的有意差は、Student *t*-検定、ANOVA (post-hoc 検定: Tukey あるいは Dunnett 検定) を適宜適用して検定を行った。

#### 【結果】

- 1) イオノマイシンを用いた細胞膜接着型単一イオンチャネル電流測定法を新たに開発した。これによって、細胞内 Ca による TRPM4 チャネルの 50% 及び最大活性化濃度は、それぞれ 500nM 及び数  $\mu$ M 程度であることが分かった。この値の妥当性は、VDCC の共発現実験 (細胞内 Ca 濃度測定を併用)、及び極細電極を介した Ca 導入実験 (既知の Ca 濃度を細胞内へ直接導入) によって確認することができた。
- 2) HL-1 細胞をアンギオテンシン II (1  $\mu$ M) で数日間刺激すると、平均 4 倍程度の TRPM4 チャネル活性の増加がみられた。この時、HL-1 細胞の活動電位持続時間は後期再分極相で有意に延長し、この効果は TRPM4 特異的な siRNA 処置によってほぼ完全に拮抗された。また、TRPM4 発現増加が高度な場合には、催不整脈性変化である早期後脱分極 (early after-depolarization; EAD) 現象が観察され、この変化は、TRPM4 チャネル特異的阻害薬 9-PA で完全に抑制された。
- 3) 発現系 (HEK293 細胞) において、イオノマイシン法による TRPM4 チャネル開閉キネティクスの定量的解析を行った。その結果に基づいて、TRPM4 チャネルの開閉キネティクスを電位変化・Ca 濃度変化に対して正確に記述する数式表現 (関数) を得た。更にこれらの数式を用いて、TRPM4 チャネルの活性化を反映する心筋活動電位モデル (上述) を作成した。HL-1 数理モデルによるシミュレーションでは、2) で得られた実験結果 (活動電位の延長、EAD の発生) と非常に良く一致する計算結果が得られた。また他の活動電位モデルでも、TRPM4 活性増加が後期再分極相の延長を引き起こすことや EAD を惹起することが示唆された。
- 4) アンギオテンシン II の腹腔内投与で作成した心肥大マウスモデルから急性単離した心房筋細胞においても、TRPM4 チャネル活性の増加を介した活動電位再分極相の延長が生じることが示唆された。

## 【結論】

- 1) 本研究の結果より、持続的リモデリングを受けている心房筋では、TRPM4 チャンネル活性の異常な増加を介した不整脈性変化が生じることが証明された。同時に、心房リモデリングに伴って進行・増悪を示す病態、すなわち心房細動において、TRPM4 チャンネルを分子標的とした新たな薬物治療が有望であることが示唆された。
- 2) 本研究で新たに開発したイオノマイシン法が、これまで定量的解析が困難であった他のイオンチャンネル挙動の定量的評価に有効であることが明らかとなった。
- 3) 本研究で用いた実験と数理モデルを融合させた研究手法は、今後の心臓興奮制御機構とその破綻による病態形成機序を追求する上で、有用であることが示唆された。

## 審査の結果の要旨

本論文は、実験と理論的アプローチを組み合わせ、ストレス応答チャンネル群 TRP 蛋白質スーパーファミリーの一員 TRPM4 チャンネルが、心リモデリング時の不整脈基質として働くことを厳密に実証した研究である。具体的には、異所的遺伝子発現系及び心房筋由来筋細胞株 HL-1、及びマウス心房筋細胞における TRPM4 チャンネルの活性化機序を、電気生理学的計測で詳細に明らかにするとともに、心ストレス下に生じるこのチャンネルの過剰な活性化が不整脈性変化を引き起こす機序について、精緻な数理モデルを構築することによって定量的に解明することに世界に先駆けて成功した。更に本研究の方法論的枠組みが、その他の TRP チャンネルを介した心室やプルキンエ線維の異常興奮の理論的理解にも資する可能性を示した。

### 1. 斬新さ

心臓に代謝的・機械的負荷を与える病態（心不全、心筋梗塞、心臓弁膜症、高血圧、糖尿病等）では心臓の電気的リモデリングが生じ種々の不整脈が生じる。この時、ストレス応答分子 TRPM4 チャンネルの発現や活性も著明に増加することが指摘されていたが、その催不整脈効果については、モデル動物や遺伝子改変動物を用いた研究で一致した結果が得られず、不明であった。本研究は、この疑問に対し TRPM4 チャンネルのキネティクスを厳密に数式化し、更にそれを数理モデルに組み込むことで、実験で観察された不整脈性変化を忠実に再現することに成功した。このような研究は前例がなく、この点において斬新であるといえる。

### 2. 重要性

本研究から得られた重要な成果として次の 3 つを挙げることができる。すなわち、(1)

持続的リモデリングを受けている心房筋では、TRPM4 チャンネル活性の異常な増加を介した不整脈性変化が生じることが証明された。(2) 心房リモデリングに伴って進行・増悪を示す病態、すなわち心房細動において、TRPM4 チャンネルを分子標的とした新たな薬物治療が有望である可能性が示唆された。(3) 本研究で用いた実験と数理モデルを融合させた研究手法は、今後の心臓興奮制御機構とその破綻による病態形成機序を追求する上で、有用であることが示唆された。

### 3. 研究方法の正確性

本研究の結果は、適切な対照群・実験群の設定、十分な実験数の確保、および適切な統計解析による検定によって得られた信頼性の高いものである。また、一つの結果について複数の実験的アプローチ（例えば、選択的阻害薬、RNA 干渉法）で検証しており、極めて正確性の高いものとなっている。更に、数理モデルによって得られた計算結果と実験結果が良く一致することも、本研究方法の正確性を強力に支持している。

### 4. 表現の正確さ

要旨は本研究の重要な点を的確に要約し、目的は同分野における過去の研究の精査から得られた問題意識に基づいて明確に設定されている。方法、結果は正確かつ詳細に記載されている。考察も、結果に対する厳密な自己検証と、その意義や問題点の指摘、及び今後の波及効果にまで踏み込んで述べられている。

### 5. 主な質疑応答

Q1. TRPM4 チャンネルの rundown は ATP、PIP2 で回復するが、これは PI 代謝回転などの生理学的な意味があるのか？

A1. ATP や PIP2 による回復は部分的で、Nilius のグループから報告がある様に、それ以外にもカルモジュリンの喪失（解離）による機序も考えられる。これらの複数の要因を除くため、本研究ではイオノマイシンによる安定的な記録法を用いた。

Q2. TRPM4 の 'intact' な Ca 感受性を調べるのに 3 つの方法を用い、全て同じような Ca による 50%活性化値 (Kd 値) が得られたとしているが、イオノマイシン法では、細胞内 Ca 濃度が別の実験系で測られている。これによるエラーは問題にならないのか？ 局所的な Ca 濃度と TRPM4 チャンネル活性の同時測定を行う方が正確なのではないか？

A2. 確かにそう思うが、技術的に困難なため今回は試みなかった。今後、同時測定を行うことで、今回の結果をより厳密に検証したい。

Q3. HL-1 細胞の実験では、アンジオテンシン II (AGII) 処理で TRPM4 蛋白の発現は約 2 倍、活性は 4 倍に増加しているが、この差は何によるものか？ AGII の長期投与では PKC 活性化による機序が重要な役割を果たしているのでは？

A3. 確かに PKC を介して TRPM4 の発現量だけでなく活性の増強が起こっている可能性もある。また、AGII は活性酸素種の産生を増加させて TRPM4 の活性増加に寄与している可能

性もある。

Q4. 前の質問に関連して、短期間の AGII 処理では異なる結果が得られる可能性はないか？

A4. 1日間の AGII 処理では TRPM4 の発現や活性に有意な変化は見られなかったため、長期間の処理が本研究では必要となった。

Q5. TRPM4 ノックアウトマウスの結果と比べて本研究の結果はどうか？

A5. k/o マウスでは活動電位の持続時間が短縮するという報告がなされているが、我々の動物実験では、正常（無処置）マウスでは TRPM4 チャンネル阻害薬の効果が見られなかった。何らかの理由で食い違いがある。

Q6. シミュレーションの最終ゴールは？

A6. 他のイオンチャンネルや細胞内 Ca 動態との相互作用を考慮した二次元、三次元のリアリティーのある数理モデルを開発し、心臓の興奮生成・伝播とその破綻を統合的に理解することにあると考えている。

Q7. なぜ AGII を心リモデリング刺激として用いたか？

A7. AGII は心筋細胞において病的 Ca 動態を生じ心臓のリモデリングを引き起こすことが知られている。例えば、TRPC6 の発現・発生増加による心肥大との相関を挙げることができる。このように TRP チャンネルの活性や発現は細胞内の Ca 依存性機構と密接に関わっているため、本研究では AGII を使用した。

Q8. AGII 処理が TRPM4 発現を増加させる機序は？

A8. 細胞内 Ca 動態の変化や PKC を介した情報伝達が関与している可能性がある。

Q9. 本研究は心房性不整脈と TRPM4 の関連について述べているが、心室性不整脈との関連はどうか？

A9. Luo-Rudy の心室 AP モデルでは、TRPM4 の活性増加による早期後脱分極 (EAD) 現象が計算によって予測されるが、もともと心室筋では TRPM4 の発現レベルが低く、AGII 処理では、不整脈を起こすに十分な変化は得られなかった。しかし、自然発症高血圧ラットで見られるような長期的な心リモデリングでは、TRPM4 発現・活性の著しい増加と不整脈性変化が報告されている。

Q10. GEO マイクロアレイデータベースのデータは心室性不整脈と関連しているのでは？

A10. 確かにそうだが、前の質問への回答で述べたように、実験では心室筋で顕著な TRPM4 チャンネルの活性増加を誘導することができず、直接比較することができなかった。

Q11. HEK 細胞で得られた Ca 感受性は HL-1 で得られた結果と一致するか？

A11. 発現系 (HEK) 細胞の利点は TRPM4 を過剰発現することで大きな電流を記録できるため、そのキネティクスの定量的な評価と数式化を容易に行うことができるからである。HL-1 細胞では発現レベルが低く実験的に正確な定量的評価ができないことや、Ca の細胞内導入で収縮するため、比較は困難であった。従って発現細胞系から得られた結果を外挿した。

Q12. 発現細胞系や HL-1 細胞では他の TRP の発現は調べたのか？

A12. HL-1 細胞には TRPC3 が発現していることが知られている。また、HEK 細胞では TRP チャンネルの発現は極めて低い。

Q13. Fig. 3D では BAPTA を用いた場合、EGTA よりも最大活性化電流が小さくなっているのはなぜか？

A13. BAPTA を用いたのは、細胞内 Ca ストアの影響を最小限にするため、Fig. 3E の実験も同じ目的で行った。この実験の目的は Ca による活性化の閾値や 50%活性化濃度を求めることだったので、その点においては EGTA、BAPTA、リアノジン/カフェインも用いた実験で差は見られなかった。最大電流の平均値が異なるのは、発現実験を行った時期が異なるための差である可能性が高い。

Q14. Fig. 4D の Ca 流入量と TRPM4 活性化の相関は、BAPTA を用いればもっと抑制されていたのでは？

A14. 確かにその可能性はあるが、この実験では、Ca バッファリングの影響を最小限にして Ca 流入量と TRPM4 活性化の相関を求めるため、むしろ低濃度の EGTA を意図的に用いている。

Q15. siRNA 処理時間が 4-5 時間と補足説明に書いてあるが、短くないか？

A15. 細胞に対するダメージを少なくするために処理時間を系統的に短くし、数日間の抑制効果が持続して得られる条件として用いた。

Q16. 9-PA 以外の阻害薬は調べたのか？

A16. 補足データに示すように、10microM の濃度では 9-PA が TRPM4 以外の電流に殆ど影響しないことを確認できたので、本研究ではこれを選択的阻害薬として用いた。

Q17. Nygren モデルでは TRPM4 レベルを 3 倍のまでしか増やしてないのはどうしてか？

A17. このモデルは比較的初期のモデルで単純な構造をしているの使用したが、これ以上発現レベルを上げても EAD が発生しなかったなのでそのデータは示さなかった。これに対し、HL-1 モデルは精密な細胞内 Ca 動態も反映した精緻なモデルであり、これに TRPM4 キネテイクスを導入すると、実験データの良い再現が得られた。

Q18. 9-PA が新しい抗不整脈薬になる可能性は？

A18. 最近文献では、抗不整脈作用のみならず心筋保護作用も示唆されており、この化合物をプロトタイプとした薬の開発も夢ではないと思う。

以上のように、申請者は全ての質問に対し適切に答えた。本論文は、心リモデリングに伴う不整脈機序における TRPM4 チャンネルの重要性を数理モデルに基づいた定量的な検証によって明らかにした研究であり、学位論文に値すると評価された。