

## 論文の内容の要旨

論文題目 Expression and functional roles of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in human cardiac fibroblasts  
(ヒト心臓線維芽細胞における TRPA1 チャンネルの発現と機能的役割)

氏名 小栗 岳

心臓線維芽細胞は心臓内結合組織を構成するポンプ機能を持たない細胞ではあるが、細胞数は心臓内で約 60~70%を占める最も多い細胞種である。心臓線維芽細胞はそれ自体平滑筋  $\alpha$ -アクチン、メタロプロテアーゼなどを分泌し、細胞外マトリックスを産生する筋線維芽細胞に分化し、心臓の細胞成分を支持し、心臓全体の形態を維持するなど重要な役割を持っている。一方、高血圧、心筋梗塞などの病態では、線維芽細胞は細胞数を増加させ、細胞の分化を促し、心筋の線維化（リモデリング）を助長し、心肥大・心不全を引き起こす事が知られている。

メチルグリオキサール(Methylglyoxal)MG はグルコースなどの還元糖が、蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応して生成される物質である。終末糖化産物 advanced glycation endproducts (AGEs) の中間代謝物でありフルクトース経路からの生成が主ではあるが、脂肪酸代謝やタンパク質の分解経路からの生成もあり多くの合成経路をもつことが知られている。また高血糖状態が長く継続することにより MG の細胞内、細胞外濃度が上昇することが報告されており、これらと AGEs 含め、糖尿病血管合併症や加齢疾患との関係が近年、注目されている。

MG が糖尿病合併症である糖尿病性神経障害による疼痛に直接関与する報告などがあり、そのメカニズムに TRP チャンネルの一つである TRPA1 が関与する報告がいくつかみられる。TRP チャンネルは TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, など、6つのサブファミリーを構成し、またそれぞれのサブグループは更に細分化され哺乳類では 28 種からなることが分かっている。TRP チャンネルの基本分子構造は、いくつかの TRPP を除き、膜 6 回貫通型のイオンチャンネルであり、4 量体として機能する。そのひとつである TRPA1 は、カルシウムイオン選択性が高い非選択性カチオンチャンネルである。生体内において TRPA1 は、後根、三叉神経節や内耳の有毛細胞、消化管などで発現が確認されている。TRPA1 はこれまで、痛み刺激や炎症などの侵害刺激受容、17°C 以下の冷刺激以外に、亜鉛などの金属や酸素、浸透圧による環境変化などで様々な条件で活性化されると考えられているがその活性化機構などは未だ不明な点が多い。

また、TRP チャンネルはすでに心臓での発現も確認されており、さらに心臓線維芽細胞に関しても TRPM7、TRPC3、TRPC6、TRPV4 の発現の報告や、その機能にこれらのチャンネルがカルシウムイオンシグナルを介して関与しているとする報告がある。

糖尿病性心筋症は高血糖状態が長期間継続することにより発症する心臓合併症である。臨床的特徴としては冠動脈疾患や高血圧がない場合においても心臓の拡張障害が認められることが知られており、構造的特徴としては、心臓の線維化、肥大が挙げられる。その発症に関し心臓線維芽細胞が重要な役割を果たしている。一方 MG による心臓線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化の報告や、MG による TRPA1 活性化の報告もあることから、私は、MG による TRPA1 を介した心臓線維芽細胞に対する機能について検証した。

本研究では、Fura2-AM を用いた 2 波長励起法、リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法 (RT-PCR 法)、リアルタイム RT-PCR 法、免疫染色法、ウェスタンブロッティング法、RNA 干渉 (small interfering RNA, siRNA)、フローサイトメトリーによる細胞周期の測定を行った。

細胞はヒト心臓線維芽細胞を培養し 2-5 代継代したものを使用した。Fura2-AM を用いた 2 波長励起法による細胞内カルシウムイオン測定では、MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇を誘発し、これらのカルシウムイオン変化は MG 濃度依存的であった。さらにその効果は細胞外液にカルシウムイオンが存在するときに著明に認められた。このことから MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、主に細胞外のカルシウムイオンが何らかのチャネルを介して細胞内に流入することによって起こることが示唆された。また、MG スカベンジャーであるアミノグアニジンによりこの効果は抑制され、TRPA1 選択的拮抗薬である HC030031 投与によっても抑制され、非特異的な TRP チャネル拮抗薬であるルテニウムレッドによっても抑制された。また、TRPA1 アゴニストである Allyl isothiocyanate (AITC) および 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) 投与により細胞内カルシウムイオン濃度上昇を認めたことから、MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇が TRPA1 チャネルを介することが示唆された。

次に蛋白、遺伝子レベルでの TRPA1 の発現を確認した。RT-PCR 法では TRPA1 の発現が確認され、リアルタイム RT-PCR では TRPA1 の発現量は TRPV2、TRPC1、TRPV1、TRPM2 と比較しても多く、免疫染色法、ウェスタンブロッティング法においても、TRPA1 の発現が確認された。

一方、TRPA1 に対する siRNA を transfection させ、TRPA1 をノックダウンさせた細胞では、TRPA1 の mRNA 発現が抑制されるとともに、MG による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制された。このことからヒト心臓線維芽細胞において MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には TRPA1 が関与していることが裏付けられた。

次に、フローサイトメトリーを用いて、MG の細胞周期に及ぼす効果について検討した。細胞に MG を 48 時間処理した群では、G0/G1 から S/G2, M 期の移行が増大した。一方、この変化は HC030031、及びルテニウムレッドを MG と併用投与した群ではその進行がそれぞれ抑制されることが確認された。

これらの実験結果から明らかとなったことは以下の通りである。(1)MG はヒト心臓線維芽細胞に細胞外液からのカルシウムイオン流入によって細胞内カルシウムイオン濃度を上

昇させる。(2)これらの反応は拮抗薬である HC030031 およびルテニウムレッドにより抑制される。(3)細胞への AITC および 15d-PGJ2(TRPA1 agonist)投与により細胞内カルシウムイオン濃度上昇を認める。(4)siRNA によるノックダウンにより MG の細胞内へのカルシウムイオン流入が抑制される。(5)RT-PCR、リアルタイム RT-PCR、ウェスタンブロッティング、免疫染色にて TRPA1 の発現を認める。(6)フローサイトメトリーにて MG 処理により細胞周期 G0/G1 から S/G2/M への進行を認め、この変化は TRPA1 拮抗薬である HC030031 および非特異的な TRP チャネル拮抗薬であるルテニウムレッドによって抑制された。

MG によるヒト心臓線維芽細胞の活性化機構が TRPA1 を介していることが確認された。このことは今後、糖尿病性心筋症の治療への一助となると考えられた。