

氏 名 小田 紗矢香

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2252 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The role of TRPC6 in cardiac positive inotropy through
sympathetic nervous system

論文審査委員 主 査 箕越 靖彦
生理科学専攻 教授
西田 基宏
生理科学専攻 教授
深田 優子
生理科学専攻 准教授
赤羽 悟美
東邦大学 医学部 教授

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Oda, Sayaka

Title The role of TRPC6 in cardiac positive inotropy through sympathetic nervous system

Regulation of cardiac functions, primarily left ventricular (LV) contractility (inotropy) and heart rate (chronotropy), through autonomic nervous system is indispensable for the maintenance of blood circulatory homeostasis. β adrenergic receptors (ARs) are expressed in the heart and activated by norepinephrine (NE) released from sympathetic nerve endings, which leads to induction of positive inotropic and chronotropic effects. Although β_1 AR is believed to predominantly mediate NE-induced increases in cardiac functions, it is not well understood how cardiac functions are sufficiently fine-tuned by β ARs, much lower-affinity binding receptors to NE than α ARs. Previous reports have shown that transient receptor potential canonical (TRPC) 6 plays important roles in α_1 AR-stimulated vasoconstriction and pathogenesis of heart failure in rodents. Although pathological roles of TRPC6 have been extensively studied, its physiological role is still obscure. In this research, I investigated whether TRPC6 participates in physiological cardiac responses induced by activation of autonomic nervous system.

First, cardiac responses induced by stimulation of adrenergic receptor (β AR and α AR) or muscarinic receptor (MR) were compared among wild type (WT), TRPC3- and TRPC6-deficient mice using surgical LV catheterization. I found that isoproterenol (ISO; β AR specific agonist)-induced positive inotropic effect was reduced in TRPC6-deficient mice, whereas β AR-stimulated positive chronotropic effect, α AR-stimulated increase in blood pressure and MR-stimulated negative inotropic and chronotropic

effects were not different significantly among three groups. Proximity ligation assay (PLA) revealed that TRPC6 was in close proximity to β_1 AR in ventricle cardiomyocytes, but not sinoatrial node cells. Additionally, ISO-induced increase in shortening of sarcomere length and Ca^{2+} transient were significantly reduced in isolated TRPC6-deficient adult mouse cardiomyocytes. Knockdown of TRPC6 suppressed ISO-mediated increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production in neonatal rat cardiomyocytes (NRCMs). These results suggest that TRPC6 acts as a positive regulator of β AR-Gs signaling in cardiomyocytes. I next investigated the molecular mechanism underlying enhancement of β AR-Gs signaling by TRPC6 channel. I found that: 1) Intracellular zinc ion (Zn^{2+}) pool in TRPC6-deficient cardiomyocytes was smaller than that in WT cardiomyocytes. 2) NE-induced α AR stimulation caused TRPC6-mediated Zn^{2+} influx in HEK293 cells. 3) α AR inhibition and intracellular Zn^{2+} chelation suppressed NE-induced cAMP production in NRCMs. 4) TRPC6 activation mediated by α AR stimulation enhanced ISO-induced cAMP production, and this enhancement was canceled by TRPC6 knockdown in NRCMs. These results suggest that α AR-mediated Zn^{2+} influx via TRPC6 enhances β AR-Gs signaling. Finally, I examined whether TRPC6 contributes to baroreflex-induced cardiac inotropy in mice. I found that a reflex inotropy induced by hydralazine, a pharmacological vasodilator, was significantly reduced in TRPC6-deficient mice, while a coincident reflex chronotropy was not affected. I have previously reported that hyperglycemia increases TRPC6 expression in the heart. Consistently, positive inotropic effect was promoted in streptozotocin-treated hyperglycemic mice. The interaction between TRPC6 and β_1 AR determined by PLA was also enhanced in the base of hyperglycemic mouse hearts. In the first section, I revealed that TRPC6 positively regulates cardiac inotropy by enhancing β AR-Gs signaling through α AR- Zn^{2+} axis.

In the second section, I investigated whether TRPC6 regulates ISO-induced β AR internalization. Co-expression of TRPC6 with β_1 AR suppressed ISO-induced β_1 AR

internalization and β -arrestin 2 (β Arr2) translocation to the plasma membrane in HEK293 cells. Basal interaction between β_1 AR and β Arr2 was significantly reduced in TRPC6-deficient mouse cardiomyocytes, indicating that TRPC6 is involved in ligand-stimulated β AR internalization.

In the third section, I investigated whether TRPC6 contributes to the progression of cardiac remodeling caused by chronic β AR activation. Subcutaneous administration with ISO continuously for 4 weeks induced LV remodeling and dysfunction in WT mice, while ISO-induced heart failure was suppressed in TRPC6-deficient mice. In contrast, ISO-induced increase in heart weight was enhanced in TRPC6-deficient mice. In fact, chronic β AR activation enhanced TRPC6 mRNA expression in mouse hearts. Thus, TRPC6 contributes to β AR-induced heart failure and negatively regulates cardiac hypertrophy in mice.

Collectively, I revealed that TRPC6 links between α AR and β AR through Zn^{2+} mobilization, leading to enhancement of cardiac positive inotropy in response to sympathetic nerve activation. Since TRPC6 is expressed universally and various biological responses are regulated by sympathetic nervous system, Zn^{2+} -dependent enhancement of β AR signaling via TRPC6 might be involved in other physiological responses.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 小田紗矢香

Title
論文題目 The role of TRPC6 in cardiac positive inotropy through sympathetic nervous system

交感神経系を介する心筋の収縮力増加（陽性変力作用）は、全身の血液循環恒常性維持に重要であり、その破綻は心不全の主たる臨床転帰となる。交感神経終末から放出されるノルアドレナリン（NA）は、心臓に多く発現する β アドレナリン受容体（ β AR）を介して心機能を亢進する。しかし、なぜNA応答性の高い α ARではなく、NA応答性の低い β ARによって心機能が調節されるかは不明であった。本論文は、受容体作動性チャネルtransient receptor potential canonical (TRPC) 6が α ARによって活性されて Zn^{2+} 流入が起こり、このことが β ARのNA応答性を増強させ、マウス心臓の陽性変力作用を正に制御することを見出した。

出願者は最初に、TRPC6とその類縁サブタイプTRPC3の遺伝子欠損マウス、野生型マウスを用いて、降圧剤投与が引き起こす血圧低下に伴う圧受容反射を比較した。その結果、 β ARを介する陽性変力作用だけがTRPC6欠損マウスでのみ強く抑制され、陽性変時作用や血圧低下については3群間に差はなかった。成熟マウス心臓の単離心室筋細胞においても、TRPC6欠損により、 β AR刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と筋収縮増強効果が抑制された。マウス心臓でのTRPC6タンパク質と β ARタンパク質の局在をProximity ligation assayを用いて調べたところ、TRPC6と β ARは心室筋で多く共局在しており、陽性変時作用に関わる洞房結節では共局在がほとんど観察されなかった。

β ARに及ぼすTRPC6の調節作用を明らかにするため、ラット新生児初代培養心筋細胞を用いて β AR刺激によるcAMP産生を測定した。NAの24時間前処置により、 β AR刺激によるcAMP産生が有意に増大し、その増強作用は α AR阻害薬、TRPC6のノックダウン、 Zn^{2+} キレート剤処置によって抑制された。HEK293細胞株に α ARとTRPC6チャンネルを過剰発現させたところ、TRPC6のみがNA刺激により細胞内 Zn^{2+} 濃度を増加させた。逆に、TRPC6を欠損した成熟マウスの心室筋細胞では Zn^{2+} 貯蔵量が有意に低下した。さらに、HEK293細胞にTRPC6と β ARを共発現させたところ、 β AR刺激による β AR内在化が抑制され、チャンネル機能を無くしたTRPC6では効果がなかった。

最後に、TRPC6と β ARとの機能連関に関する病態生理的意義を調べた。出願者は修士学位論文において、高血糖状態を作り出したマウス心臓においてTRPC6発現量が増加することを報告している。この高血糖マウスにおいて、圧受容反射による陽性変力作用が増強すること、その増強作用がTRPC6欠損マウスでは消失することを見出した。また慢性的に β AR刺激を行うと、野生型マウスでは心機能が低下するが、TRPC6欠損マウスでは心機能の低下が抑制されることを見出した。

以上の結果は、 β ARによる心臓の陽性変力応答にTRPC6チャンネルを介した Zn^{2+} 流入が関与すること、その作用に α ARとの機能連関が存在することを明らかにした画期的な知見である。以上のことから、全員一致で本論文が博士学位論文に相応しいと結論した。