

TRPC チャネルを標的とした新規 Ca^{2+} 拮抗薬の創製清中茂樹,^a 加藤賢太,^a 西田基宏,^b 森 泰生^{*,a}

Pharmacological Properties of Novel TRPC Channel Inhibitors

Shigeki KIYONAKA,^a Kenta KATO,^a Motohiro NISHIDA,^b and Yasuo MORI^{*,a}

^aDepartment of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto-Daigaku Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan, and ^bDepartment of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received August 31, 2009)

Ca^{2+} signals control diverse cellular processes, ranging from ubiquitous activities like gene expression to tissue specific responses such as lymphocyte activation and cardiac diseases. TRPC channels control Ca^{2+} influxes that induce diverse cellular processes upon stimulation of plasma membrane receptors coupled to phospholipase C (PLC). Invention of subtype-specific inhibitors for TRPCs is crucial for distinction of respective TRPC channels that play particular physiological roles in native systems. Here, we identify a novel pyrazole compound (Pyr3) which selectively inhibits TRPC3 channels. Structure-function relationship studies of pyrazole compounds showed that the trichloroacrylic amide group is important for the TRPC3 selectivity of Pyr3. Electrophysiological and photoaffinity labeling experiments reveal a direct action of Pyr3 on the TRPC3 protein. In B lymphocytes, Pyr3 eliminated the B cell receptor-induced Ca^{2+} oscillation regulated by TRPC3-mediated Ca^{2+} influx. In the cardiac system, Pyr3 attenuates activation of nuclear factor of activated T cells and hypertrophic growth in myocytes and pressure overload-induced hypertrophy *in vivo*. Thus, the TRPC3-selective inhibitor Pyr3 is useful for treatments of TRPC3-mediated diseases and for clarification of crucial and widespread functions of TRPC3 as well.

Key words—transient receptor potential canonical 3 (TRPC3); Ca^{2+} channels; inhibitor; pyrazole compounds

1. はじめに

細胞内の Ca^{2+} 濃度調節は、生理応答・生命維持において不可欠である。定常状態の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は数十 nM と低濃度に保たれているが、細胞外からの刺激により数百 nM–数 μM まで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇すると、様々な細胞応答が引き起こされる。このような $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、細胞外からの Ca^{2+} 流入と小胞体からの Ca^{2+} 放出により生じる。細胞外からの Ca^{2+} 流入を主に調節するのが、形質膜の Ca^{2+} チャネルである。 Ca^{2+} 流入の異常は様々な疾病を引き起こすことから、 Ca^{2+} チャネルは重要な創薬ターゲットとして考えられ、 Ca^{2+}

チャネル阻害剤すなわち Ca^{2+} 拮抗剤の開発が進められてきた。その代表的な成果が、ニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムを代表とする Ca^{2+} 拮抗剤である。これらは、血管平滑筋の L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルを阻害し、血管拡張作用をもたらすため、主に高血圧薬、狭心症薬として臨床応用されてきた。近年、電位依存性 Ca^{2+} チャネル、神経伝達物質などのリガンド作動性 Ca^{2+} チャネルに属さない、新しい Ca^{2+} チャネル群が明らかになってきた。その中で最も大きなファミリーを形成するのが TRP チャネル群である。TRP チャネルは、生体の“感応”から“適応”まで幅広い生理機能を担っていると考えられており、新しい創薬ターゲットとして着目されつつある。また、選択的な阻害剤は、このような医療への応用だけでなく TRP チャネルの生理機能解明のツールとしても有効であるため、その開発は急務とされている。本総説においては、われわれの最近の研究成果を中心に、主に生体の

^a京都大学大学院工学研究科合成生物化学専攻分子生物科学分野 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂) ^b九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

*e-mail: mori@sbchem.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S18 で発表したものを中心に記述したものである。

“適応”を担っている TRPC チャンネル阻害剤の開発について概観する。

2. TRP チャンネル

trp (transient receptor potential) 遺伝子は、1989年にショウジョウバエの光受容変異株の原因遺伝子として発見された。¹⁾ *trp* 変異株においては、光刺激による光受容応答変化が一過的 (transient) であることから、このように名付けられた。遺伝子解析の結果、脊椎動物において約 30 種類のコホモログが発見され、遺伝子の相同性から 6 つのファミリーに分類されている (Fig. 1)。TRP “canonical” (C) ファミリーは TRP の由来であるショウジョウバエ TRP と最も相同性が高いグループであり、チャンネル活性化は受容体刺激後によるホスホリパーゼ C の活性化と関連する。TRPC3, TRPC6, TRPC7 は、ホスホリパーゼ C の活性化で産生するジアシルグリセロールにより活性化される。TRPC5 など一部のメンバーは一酸化窒素 (NO) を感知し、システイン残基の酸化修飾を介して活性化されることをわれわれは明らかにしている。²⁾ TRP “vanilloid” (V) ファミリーは唐辛子の辛み成分であるカプサイシンに反応して活性化する vanilloid receptor (TRPV1) 及びそのコホモログである。TRPV ファミリーは温度上昇、pH、浸透圧の変化など物理的・

化学的な刺激で活性化されるという特徴も有する。

TRP “melastatin” (M) ファミリーはメラノーマ (悪性黒色腫) の悪性度に逆相関して発現量が変化する TRPM1 及びそのコホモログある。われわれは TRPM2 が酸化ストレスで活性化され、細胞死、³⁾ 炎症⁴⁾ を誘導することを明らかにした。TRP “polycystic kidney disease” (P) ファミリーは多発性嚢胞腎の原因遺伝子の 1 つである PKD2 (TRPP2) 及びそのコホモログである。TRP “mucolipin” (ML) ファミリーは先天代謝異常症 (4 型ムコリポドーシス) の原因遺伝子である TRPML1 及びそのコホモログである。TRP “ankyrin” (A) ファミリーは、アミノ末端に多くのアンキリンリピート構造を有する。動物種においては 1 種類の TRPA ファミリー (TRPA1) しか同定されておらず、TRPA1 は求電子性の刺激性化学物質で活性化される。⁵⁾

TRP チャンネルの基本構造は電位依存性カリウムチャンネルと同様の六回膜貫通構造で、ホモあるいはヘテロ四量体形成によりイオンチャンネルを形成すると考えられている (Fig. 2)。最近、TRP チャンネルの単粒子構造解析が報告された。TRPC ファミリーでは、TRPC3 チャンネルのクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析像が報告された。⁶⁾ TRPC3 チャンネルの内部は膨らんだ重ね箱様の構造をとっており、膜貫通領域はカリウムチャンネルと同様にチャンネルポアとしての特徴を有していた。膨らんだチャンネルの骨格は、ホスホリパーゼ C などのチャンネル制御タンパク質と相互作用していると考えられる。TRPM ファミリーにおいては、TRPM2 のネガティブ染色画像が報告された。⁷⁾ TRPM2 はベル状の構造をとっており、全体構造として TRPC3 と同様の構造であったが、細胞質側に Nudix モチーフと思われる突起した構造が存在した。TRPV1 のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析も報告された。⁸⁾ TRPV1 は TRPC3 と同様にバスケット状の大きな細胞質領域と、コンパクトな膜貫通領域から形成されている。3 つの TRP チャンネル構造の共通点としては、4 回対称構造であること、細胞質側に大きな構造を有することが挙げられる。特に細胞質側の大きな構造が TRP チャンネルに特有であり、「センサー」イオンチャンネル機能と関連があると推測される。

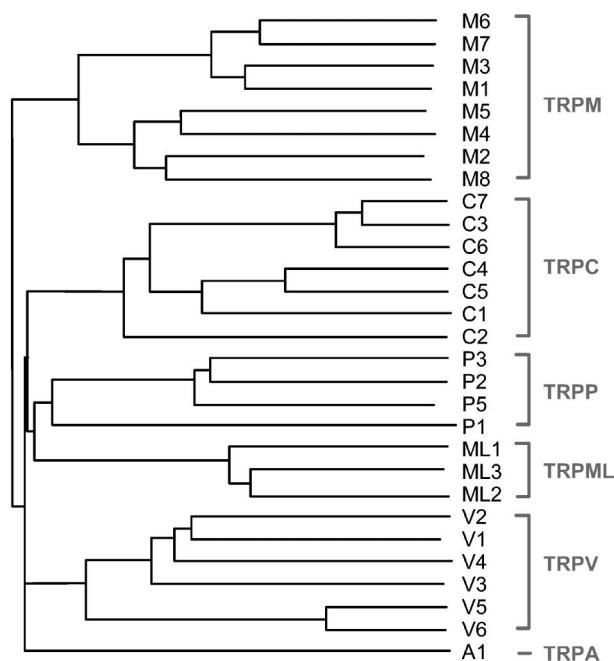


Fig. 1. Phylogenetic Tree of TRP Channels

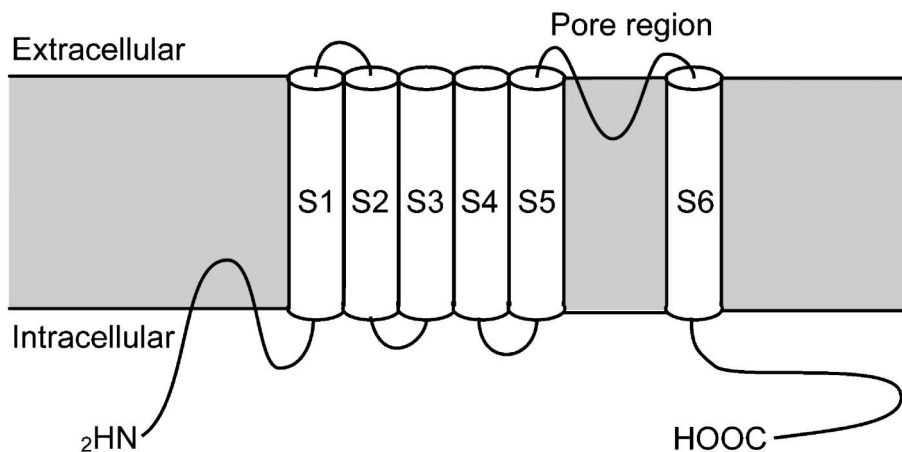


Fig. 2. Putative Topological Structure of TRP Channels

3. 受容体活性化型 TRPC チャンネル

ホスホリパーゼ C と共役する形質膜受容体の活性化により、細胞外からの Ca^{2+} 流入が起こり、遺伝子発現を伴う細胞増殖などの生理応答が引き起こされる。TRPC チャンネルは、その Ca^{2+} 流入の主な分子実体であり、生体の“適応”を担うチャンネルといえる。以下に、その代表例を紹介する。

T 細胞、B 細胞、マスト細胞を含む多くの免疫細胞において、遺伝子発現を介した増殖や分化に Ca^{2+} 流入が必須な役割を果たしている。ここでは、calcium release-activated calcium (CRAC) チャンネルが主な Ca^{2+} 流入経路であり、T 細胞や B 細胞におけるサイトカイン遺伝子転写活性化に必須であることがわかっている。従来、TRPC チャンネルが CRAC チャンネルの分子実体と考えられていたが、小胞体の Ca^{2+} センサーとして同定された STIM1 及び重症複合型免疫不全の原因遺伝子である Orai1 の複合体がその主な分子実体として近年認識されつつある。⁹⁾ しかしながら、TRPC1 あるいは TRPC3 を欠損した B 細胞株やノックアウトマウスにおいて、これらの機能も低下することから、TRPC チャンネルも CRAC に関与すると考えられる。¹⁰⁻¹²⁾ また、免疫 T 細胞や B 細胞においては、持続的な Ca^{2+} 流入 (Ca^{2+} オシレーション) が免疫活性化や増殖に必須である。われわれは、形質膜における TRPC3 とホスホリパーゼ C γ の複合体形成が Ca^{2+} 流入の持続を担っていることを明らかにしている。¹³⁾

神経の生存や分化においても、TRPC チャンネルの重要性が明らかにされつつある。脳由来神経栄養

因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は神経の生存や分化を促進し、軸索の伸長を方向づけることが知られている。成長円錐においては TRPC3, TRPC6 を介した Ca^{2+} 流入が BDNF 誘発性の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に係わっており、成長円錐の化学誘引性方向転換に必要であることが示された。¹⁴⁾ TRPC5 による Ca^{2+} 流入も、成長円錐の長さや形態を決めるのに重要である。¹⁵⁾

疾病と TRPC チャンネルの係わりについても報告されている。腎疾患の一種である家族性巣状分節状糸球体硬化症 (Focal and segmental glomerulosclerosis: FSGS) の原因遺伝子として、TRPC6 が同定された。¹⁶⁾ 家族性 FSGS の患者においては、TRPC6 の 112 番目のプロリンがグルタミンに置換されており、アンジオテンシン II などのアゴニストに対する TRPC6 を介した Ca^{2+} シグナルが増強していた。一方、心肥大と TRPC チャンネルの関連も着目されている。心肥大は心不全につながる重大な心疾患原因の 1 つで、神経体液性因子や機械的圧負荷によって引き起こされる。心肥大の形成には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が極めて重要な役割を果たしている。TRPC 遺伝子のノックダウン及びノックインマウスの解析の結果、ホスホリパーゼ C の下流において TRPC3 あるいは TRPC6 チャンネルを介する Ca^{2+} 流入が、カルシニューリンの活性化及び Ca^{2+} 依存的な転写因子である nuclear factor of activated T cells (NFAT) の核移行を惹起し、心肥大応答を引き起こすことが、複数のグループにより独立に報告された。¹⁷⁻²⁰⁾

4. 従来の TRPC チャンネル阻害剤

TRPC チャンネルを選択的に活性化するリガンドは知られていない。また、TRPC チャンネルは活性化機構に関して未解明な点が多いことから、選択的な阻害剤の開発が遅れていた。従来は、選択性は低い TRPC チャンネルを阻害可能な数種類の有機化合物がその機能解明に用いられてきた (Fig. 3)。

SK&F 96365 は受容体活性化型カルシウム流入阻害剤として 1990 年に報告された。²¹⁾ 当時はまだ分子実体が明らかにならなかった受容体活性化 Ca^{2+} 流入 (receptor-activated Ca^{2+} entry: RACE) の阻害剤として同定されたので着目を浴び、その後の RACE 及び TRP チャンネル研究の発展に大きく貢献している。この阻害剤の特徴として以下のことが挙げられる。細胞種に依存せずに RACE を阻害でき、 IC_{50} 値は約 $10 \mu\text{M}$ である。この濃度領域であれば細胞内 (小胞体) からの Ca^{2+} リリースには影響を与えないが、RACE だけでなく電位依存性 Ca^{2+} チャンネルも同じ濃度領域で阻害してしまう。以上、SK&F 96365 は初期の RACE 及び TRP の研究には欠かせない拮抗剤であったが、選択性が低く作用濃度が高いことがこの阻害剤の大きな問題点であった。

LOE 908 は、受容体活性化型カチオン流入阻害剤として、1993 年に報告された。²²⁾ HL-60 細胞の

受容体活性化型カチオン流入阻害に関しては、SK&F 96365 の IC_{50} 値が 620 nM であるのに対して、LOE 908 の IC_{50} 値は 40 nM と阻害能が高い。しかし、LOE 908 は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルや遅延整流性 K^{+} チャンネルを阻害することが知られており、やはり選択性の点で問題を有する。

もう 1 つ代表的な阻害剤として容量性 Ca^{2+} 流入 (capacitative Ca^{2+} entry: CCE) を抑制する 2-APB が挙げられる。元々、この阻害剤は細胞透過性の IP_3 受容体の阻害剤として同定された。²³⁾ CCE における IP_3 受容体の重要性の確認などに使われており、CCE のメカニズム解明において大きく貢献している。しかし、その後の研究から、2-APB は IP_3 レセプターに関与しない経路でも、TRP チャンネルを $1\text{--}10 \mu\text{M}$ の濃度領域において阻害していることが明らかになった。²⁴⁾ TRP チャンネルの阻害剤としても用いられているが、選択性のなさが大きな問題点である。

5. ピラゾール型 TRP チャンネル阻害剤

最近、上記の化合物とは異なるタイプの TRP チャンネル阻害剤として、ピラゾール化合物が着目されている (Fig. 4)。ピラゾール誘導体は、インターロイキン 2 (IL-2) 産生を阻害する、あるいは免疫 T 細胞の活性化を抑制する薬として、2000 年頃に複数の製薬企業でスクリーニングされた。²⁵⁻²⁷⁾ ピラゾール誘導体はカルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化を直接阻害しないため、従来の免疫抑制剤 (FK506, CsA) とは作用部位が異なる。その後、BTP2 (YM-58483) が T 細胞において CCE を阻害し、また HEK293 細胞において TRPC チャンネルを阻害することが報告された。²⁸⁻³⁰⁾ 前述した他の TRP チャンネル阻害剤 (SK&F 96365, LOE 908, 2-APB) とは異なり、BTP2 はミトコンドリアや小胞体からの Ca^{2+} 放出、 K^{+} チャンネル、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルには作用しない。

われわれは BTP2 とは異なるピラゾール化合物 (Pyr3) を見い出した。³¹⁾ Pyr3 は、BTP の名前の元となる bis (trifluoromethyl) pyrazole 基を持っていないため、共通構造である pyrazole 基に基づき命名した (Fig. 4)。HEK293 細胞に各 TRPC チャンネルを強制発現させ、TRPC チャンネルを介した Ca^{2+} 流入に対する Pyr3 の効果を評価したところ、Pyr3 は TRPC3 チャンネル活性を阻害し、その IC_{50} 値は

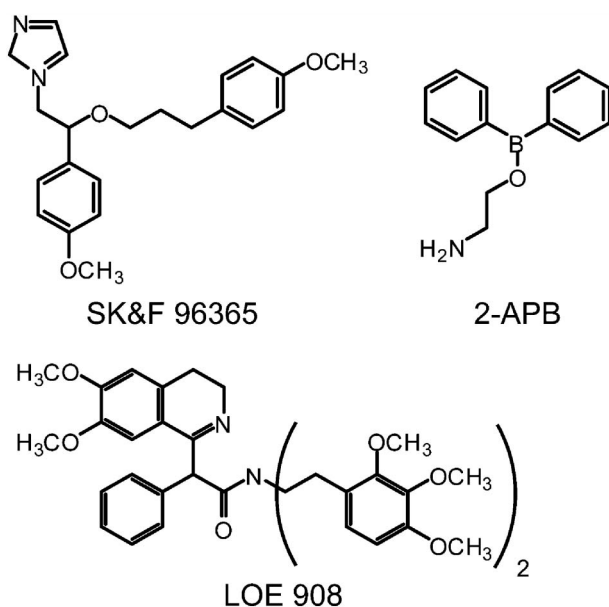


Fig. 3. Chemical Structures of Classical TRP Channel Inhibitors (SK&F 96365, LOE 908, 2-APB)

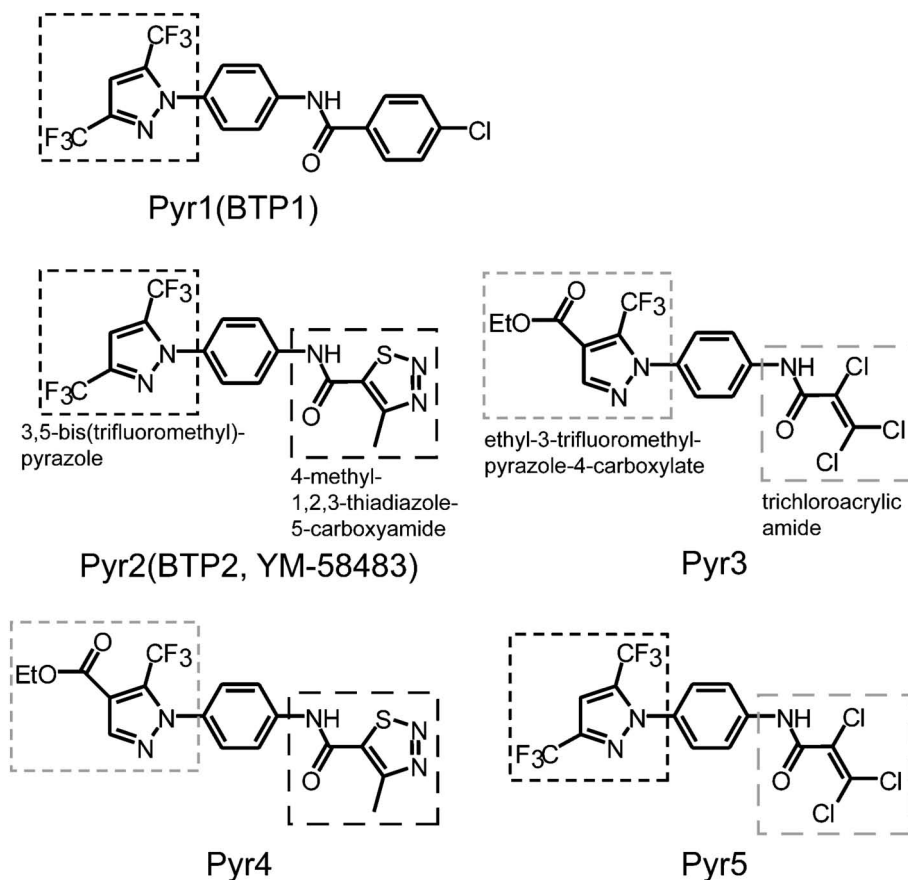


Fig. 4. Chemical Structure of Pyrazole Compounds (Pyr1, Pyr2, Pyr3, Pyr4, Pyr5)

0.7 μM であった (Fig. 5). 他の TRPC チャンネルに対して Pyr3 は 10 μM で処置してもそれらの活性を阻害せず, TRPM2, TRPM4, TRPM7 チャンネルに対しても影響を及ぼさなかった. また, Pyr3 処置は小胞体からの Ca^{2+} 放出, 定常状態の Ca^{2+} 濃度変化には影響しない. すなわち, Pyr3 は TRPC チャンネルファミリーの中でも, TRPC3 を選択的に阻害する. さらに, TRPC3 と TRPC6 を共発現させてヘテロ四量体を形成させた際にも, Pyr3 は同様の濃度領域で Ca^{2+} 流入を抑えたことから, Pyr3 は TRPC3 を含むヘテロマーチャンネルの活性も阻害することが示された.

Pyr2 (BTP2) の TRPC チャンネルに対する阻害能について, われわれの実験系で評価したところ, 他のグループの報告と同様に TRPC3, TRPC5 の活性を阻害した. また, TRPC6, TRPC7 に対しても同様の阻害能を示した. すなわち, Pyr2 は TRPC チャンネル全般を阻害すると考えられる.

次に Pyr3 のどの官能基が TRPC3 選択性をもたらすのかを評価するために, Pyr3 の一部の官能基

を Pyr2 のものと置き換えた Pyr4, Pyr5 を用いて阻害能を評価した (Fig. 4). Pyr3 の trichloroacrylic amide 基を 4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide 基で置き換えた Pyr4 は, TRPC3, TRPC6, TRPC7 のチャンネル活性を阻害したが, TRPC5 の活性は阻害しなかった. すなわち, Pyr4 はジアシルグリセロールで活性化される TRPC チャンネル群の活性を阻害すると言える. Pyr3 の ethyl-3-trifluoromethylpyrazole-4-carboxylate 基を 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole 基で置き換えた Pyr5 は, TRPC3 選択性を有していた. すなわち, Pyr3 と Pyr5 に共通する trichloroacrylic amide 基が TRPC3 の選択性に重要であることがわかった.

6. Pyr3 は細胞外から TRPC3 チャンネルに作用する

電気生理学的手法(ホールセルパッチクランプ法)を用いて, Pyr3 の TRPC3 チャンネルに対する作用機序を調べた. TRPC3 チャンネルを過剰発現させた HEK293 細胞において, 内在性のムスカリン性アセチルコリン受容体刺激により TRPC3 を介した陽イ

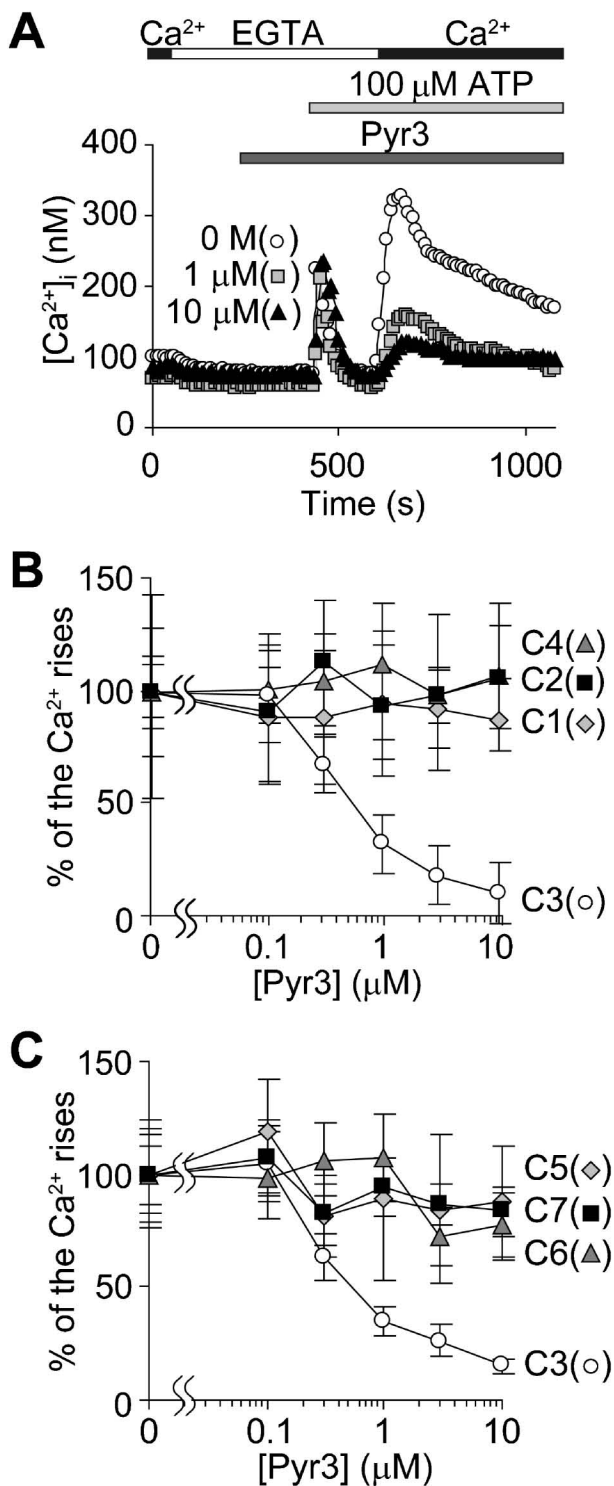


Fig. 5. Inhibitory Action of Pyr3 on TRPC Channels
 (A) Average time course of Pyr3 on ATP-receptor induced Ca^{2+} influx via TRPC3 channel. (B, C) Concentration-dependent inhibitory action of Pyr3 on Ca^{2+} influx induced by $100 \mu\text{M}$ ATP (B) or $100 \mu\text{M}$ carbachol (C) via TRPC channels.

オン電流が確認できるが、細胞外液への Pyr3 の添加によりその陽イオン電流が Pyr3 の濃度依存的に阻害された。一方、パッチピペットを介して細胞内

液に Pyr3 を加えてもこのような阻害は確認できなかったが、さらに細胞外液に Pyr3 を加えることで陽イオン電流は阻害された。このように、Pyr3 の作用部位は TRPC3 の細胞外側である。

Pyr3 が TRPC3 タンパク質に対して直接作用しているかどうかを評価するために、光アフィニティーラベル化を応用した手法 (post-photoaffinity labeling modification: P-PALM) を用いた。³²⁾ この手法では、光ラベル化後に、ラベル化剤が有するケトン基が標的タンパク質に修飾される。ケトン基に対して特異的に反応するビオチン誘導体を加えることで、ラベル化タンパク質選択的にビオチンを修飾することが可能となる。ピラゾール型光ラベル化剤 (Pyr-PP) を設計し、TRPC3-EGFP を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、光ラベル化、ビオチン修飾を行った (Fig. 6)。アビジンビーズを用いたプルダウン後のウェスタンブロットングによりラベル化剤 (Pyr-PP) の導入を確認でき、Pyr3 の共存によって濃度依存的にそのラベル化は競合阻害された。また、光ラベル化、ビオチン修飾後の TRPC3 を TRPC3 抗体で免疫沈降し、SDS 及び還元剤で変性させてから SDS-PAGE、ビオチン抗体によるウェスタンブロットングを行っても、同様にラベル化を確認できた。すなわち、Pyr3 は TRPC3 に直接作用していることが確認できた。

7. 免疫 B 細胞における内在性 (native) TRPC3 チャンネルの阻害

前述したように、われわれは、免疫 B 細胞株 (DT40 細胞) において、ホスホリパーゼ $\text{C}\gamma 2$ を介するシグナル複合体形成が持続的な Ca^{2+} 上昇に必須であることを見出した。¹³⁾ その機序は、初期に流入した Ca^{2+} によってホスホリパーゼ $\text{C}\gamma 2$ が形質膜に移行しシグナル複合体を形成することで、さらに Ca^{2+} 流入が引き起こされるという正の協調的シグナル増幅である。その際の Ca^{2+} 流入を担うのが TRPC3 であり、TRPC3 は形質膜でホスホリパーゼ $\text{C}\gamma 2$ と相互作用することも確認している。そこで、免疫 B 細胞における TRPC3 に対する Pyr3 の阻害効果を評価した。DT40 細胞に Pyr3 を処置したところ、B 細胞受容体刺激直後の Ca^{2+} 応答にはほとんど影響を与えることなく、持続的な Ca^{2+} 応答 (Ca^{2+} オシレーション) を阻害した。また、B 細胞受容体刺激後のホスホリパーゼ $\text{C}\gamma 2$ の形質膜

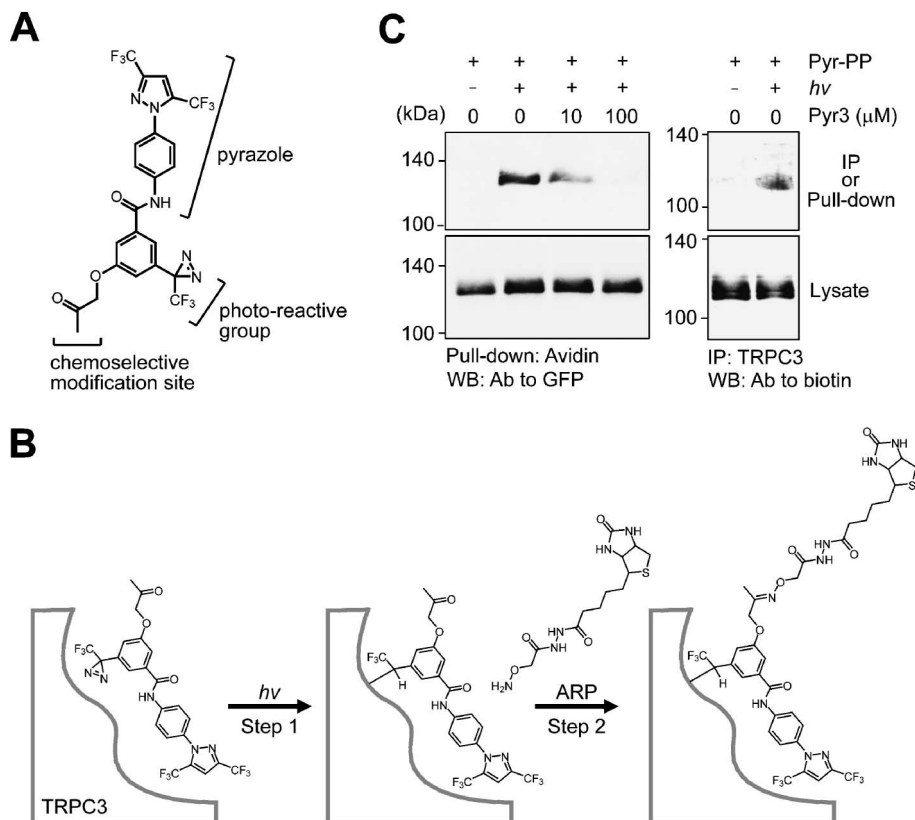


Fig. 6. Photochemical Cross-linking of TRPC3 with Pyr-PP

(A) Chemical structure of Pyr-PP. (B) Schematic representation of P-PALM method using Pyr-PP. The photoreaction forms a covalent bond between the ligand and target protein (step 1), and the consecutive oxime bond formation between the ketone group and ARP allows collections of labeled proteins using biotin-avidin binding (step 2). (C) Pyr-PP directly binds TRPC3 protein. Left, after P-PALM, TRPC3-GFP proteins are detected with anti-GFP antibody by western blotting (WB) in avidin pull-down samples. Right, after P-PALM, the incorporation of the Pyr-PP-ARP adduct is detected with anti-biotin antibody by WB in immunoprecipitated (IP) samples with anti-TRPC3 antibody.

移行を阻害した。

ホスホリパーゼ *Cy2* の持続的な活性化は、ジアシルグリセロールの産生増大及びプロテインキナーゼ *C* 及び MAP キナーゼの一種である ERK の活性化を引き起こすことが知られる。そこで B 細胞受容体刺激後の ERK のリン酸化に対する Pyr3 の効果を評価したところ、初期のリン酸化は抑制されなかったが、持続的なリン酸化が抑制された。これらの結果は TRPC3 を欠損させた DT40 株から得られたものと同様 (未発表データ) であり、Pyr3 が native の TRPC3 チャネル活性も阻害することを確認できた。

8. Pyr3 は TRPC3 による心肥大を抑制する

前述したとおり、TRPC3 がアンジオテンシン II による NFAT の活性化及び心肥大に重要であることが報告された。¹⁷⁻²⁰⁾ そこで、心肥大に対する Pyr3 の効果についてラット新生児培養心筋細胞を用いて評価した。その結果、Pyr3 は NFAT の核移

行及び NFAT ルシフェラーゼの活性を濃度依存的に阻害した。興味深いことに、TRPC チャネル全般の阻害剤である Pyr2 の IC_{50} 値が $2 \mu M$ であるのに対して、TRPC3 選択的な Pyr3 の IC_{50} 値が $0.05 \mu M$ と、Pyr3の方が阻害能が高かった。また、Pyr3 は、心肥大マーカーである脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP) 産生、アクチン再構成、タンパク合成など、その他のアンジオテンシン II による心肥大応答も阻害したことから、心肥大応答に対して著効を示した。

次に、マウスにおいて、圧負荷により惹起させた心肥大に対する Pyr3 の *in vivo* 効果を評価した。大動脈狭窄 (transverse aortic constriction: TAC) を 1 週間行い心肥大を惹起し、Pyr3 の阻害効果を検討した (Fig. 7)。1 週間の TAC 処置は心重量の増加など求心性心肥大を引き起こしたが、Pyr3 はそれを抑制した。心肥大マーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic polypeptide:

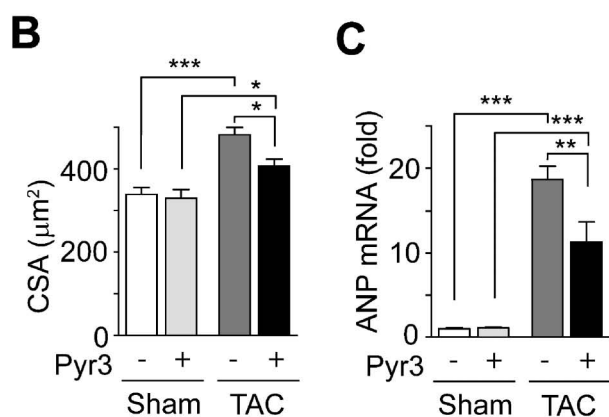
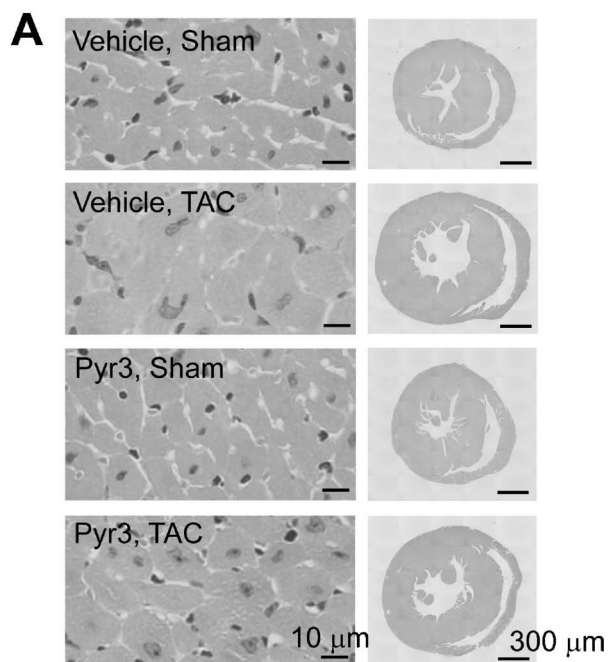


Fig. 7. Potent Suppressive Effects of Pyr3 on Cardiac hypertrophy Induced by Pressure Overload in Mice

Effects of Pyr3 on 1-week transverse aortic constriction (TAC)-induced concentric hypertrophy. (A) H&E-stained mid transverse sections of hearts isolated from sham- and TAC-operated mice. (B, C) Effects of Pyr3 on the increase in cross-sectional areas (CSA) in B and ANP mRNA expressions in C.

ANP) の産生を評価したところ、心肥大により増加した ANP の発現量が Pyr3 投与により抑制された。また、6 週間 TAC を行い遠心性心肥大を惹起させたが、それに対しても Pyr3 を投与することでその心肥大応答が抑制された。シャム処置群においては、Pyr3 投与は心拍数や血圧などの心機能、体重及び組織重量、生存率に影響を与えなかった。すなわち、Pyr3 は求心性及び遠心性心肥大を抑制する新しい心不全治療薬としての可能性が期待される。

9. おわりに

本総説では、TRPC チャンネル拮抗剤について概

観した。TRPC チャンネル選択的な阻害剤に関しては開発が遅れていたが、われわれが報告した TRPC3 選択的な阻害剤 Pyr3 を始めとして、ピラゾール化合物群は各 TRPC チャンネル選択的な阻害剤としての高いポテンシャルを有していると思われる。また、他の TRP ファミリーに関して、TRPV1 における capsazepine など一部のものを除くと、選択的な阻害剤はほとんど知られていない。Pyr2 (BTP2) は TRPM4 を活性化するという報告³³⁾も考慮すると、ピラゾール化合物は TRP チャンネル創薬全体において、基本骨格になる大いなる可能性を秘めている。

REFERENCES

- 1) Montel C., Rubin G. M., *Neuron*, **2**, 1313–1323 (1989).
- 2) Yoshida T., Inoue R., Morii T., Takahashi N., Yamamoto S., Hara Y., Tominaga M., Shimizu S., Sato Y., Mori Y., *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 596–607 (2006).
- 3) Hara Y., Wakamori M., Ishii M., Maeno E., Nishida M., Yoshida T., Yamada H., Shimizu S., Mori E., Kudoh J., Shimizu N., Kurose H., Okada Y., Imoto K., Mori Y., *Mol. Cell*, **9**, 163–173 (2002).
- 4) Yamamoto S., Shimizu S., Kiyonaka S., Takahashi N., Wajima T., Hara Y., Negoro T., Hiroi T., Kiuchi Y., Okada T., Kaneko S., Lange I., Fleig A., Penner R., Nishi M., Takeshima H., Mori Y., *Nat. Med.*, **14**, 738–747 (2008).
- 5) Takahashi N., Mizuno Y., Kozai D., Yamamoto S., Kiyonaka S., Shibata T., Uchida K., Mori Y., *Channels*, **2**, 287–298 (2008).
- 6) Mio K., Ogura T., Kiyonaka S., Hiroaki Y., Tanimura Y., Fujiyoshi Y., Mori Y., Sato C., *J. Mol. Biol.*, **367**, 373–383 (2007).
- 7) Maruyama Y., Ogura T., Mio K., Kiyonaka S., Kato K., Mori Y., Sato C., *J. Biol. Chem.*, **282**, 36961–36970 (2007).
- 8) Moiseenkova-Bell V. Y., Stanciu L. A., Serysheva I. I., Tobe B. J., Wensel T. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7451–7455 (2008).
- 9) Hogan P. G., Rao A., *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 235–245 (2007).
- 10) Mori Y., Wakamori M., Miyakawa T., Her-

- mosura M., Hara Y., Nishida M., Hirose K., Mizushima A., Kurosaki M., Mori E., Gotoh K., Okada T., Fleig A., Penner R., Iino M., Kurosaki T., *J. Exp. Med.*, **195**, 673–681 (2002).
- 11) Liu X., Cheng K. T., Bandyopadhyay B. C., Pani B., Dietrich A., Paria B. C., Swaim W. D., Beech D., Yildirim E., Singh B. B., Birnbaumer L., Ambudkar I. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17542–17547 (2007).
- 12) Kim M. S., Hong J. H., Li Q., Shin D. M., Abramowitz J., Birnbaumer L., Muallem S., *Gastroenterology*, **137**, 1509–1517 (2009).
- 13) Nishida M., Sugimoto K., Hara Y., Mori E., Morii T., Kurosaki T., Mori Y., *EMBO J.*, **22**, 4677–4688 (2003).
- 14) Li Y., Jia Y. C., Cui K., Li N., Zheng Z. Y., Wang Y. Z., Yuan X. B., *Nature*, **434**, 894–898 (2005).
- 15) Greka A., Navarro B., Oancea E., Duggan A., Clapham D. E., *Nat. Neurosci.*, **6**, 837–845 (2003).
- 16) Winn M. P., Conlon P. J., Lynn K. L., Farrington M. K., Creazzo T., Hawkins A. F., Daskalakis N., Kwan S. Y., Ebersviller S., Burchette J. L., Pericak-Vance M. A., Howell D. N., Vance J. M., Rosenberg P. B., *Science*, **308**, 1801–1804 (2005).
- 17) Onohara N., Nishida M., Inoue R., Kobayashi H., Sumimoto H., Sato Y., Mori Y., Nagao T., Kurose H., *EMBO J.*, **25**, 5305–5316 (2006).
- 18) Brenner J. S., Dolmetsch R. E., *PLoS ONE*, **2**, e802 (2007).
- 19) Nakayama H., Wilkin B. J., Bodi I., Molkenstin J. D., *FASEB J.*, **20**, 1660–1670 (2006).
- 20) Kuwahara K., Wang Y., McAnally J., Richardson J. A., Bassel-Duby R., Hill J. A., Olson E. N., *J. Clin. Invest.*, **116**, 3114–3126 (2006).
- 21) Merritt J. E., Armstrong W. P., Benham C. D., Hallam T. J., Jacob R., Jaxa-Chamiec A., Leigh B. K., McCarthy S. A., Moores K. E., Rink T. J., *Biochem. J.*, **271**, 515–522 (1990).
- 22) Krautwurst D., Hescheler J., Arndts D., Lösel W., Hammer R., Schultz G., *Mol. Pharmacol.*, **43**, 655–659 (1993).
- 23) Ma H. T., Patterson R. L., van Rossum D. B., Birnbaumer L., Mikoshiba K., Gill D. L., *Science*, **287**, 1647–1651 (2000).
- 24) Iwasaki H., Mori Y., Hara Y., Uchida K., Zhou H., Mikoshiba K., *Recept. Channels*, **7**, 429–439 (2001).
- 25) Djuric S. W., BaMaung N. Y., Basha A., Liu H., Luly J. R., Madar D. J., Sciotti R. J., Tu N. P., Wagenaar F. L., Wiedeman P. E., Zhou X., Ballaron S., Bauch J., Chen Y.-W., Chiou X. G., Fey T., Gauvin D., Gubbins E., Hsieh G. C., Marsh K. C., Mollison K. W., Pong M., Shaughnessy T. K., Sheets M. P., Smith M., Trevillyan J. M., Warrior U., Wegner C. D., Carter G. W., *J. Med. Chem.*, **43**, 2975–2981 (2000).
- 26) Kubota H., Yonetoku Y., Sugawara K., Funatsu M., Kawazoe S., Toyoshima A., Okamoto Y., Ishikawa J., Takeuchi M., U.S. Patent 6348480 (2002).
- 27) Betageri R., Cywin C. L., Hargrave K., Hoermann M. A., Kirrane T. M., Parks T. M., Patel U. R., Proudfoot J. R., Sharma R., Sun S., Wang X.-J., U.S. Patent 6506747 (2003).
- 28) Ishikawa J., Ohga K., Yoshino T., Takezawa R., Ichikawa A., Kubota H., Yamada T., *J. Immunol.*, **170**, 4441–4449 (2003).
- 29) Zitt C., Strauss B., Schwarz E. C., Spaeth N., Rast G., Hatzelmann A., Hoth M., *J. Biol. Chem.*, **279**, 12427–12437 (2004).
- 30) He L. P., Hewavitharana T., Soboloff J., Spassova M. A., Gill D. L., *J. Biol. Chem.*, **280**, 10997–11006 (2005).
- 31) Kiyonaka S., Kato K., Nishida M., Mio K., Numaga T., Sawaguchi Y., Yoshida T., Wakamori M., Mori E., Numata T., Ishii M., Takemoto H., Ojida A., Watanabe K., Uemura A., Kurose H., Morii T., Kobayashi T., Sato Y., Sato C., Hamachi I., Mori Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5400–5405 (2009).
- 32) Nagase T., Shinkai S., Hamachi I., *Chem. Commun.*, 229–230 (2001).
- 33) Takezawa R., Cheng H., Beck A., Ishikawa J., Launay P., Kubota H., Kinet J. P., Fleig A., Yamada T., Penner R., *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1413–1420 (2006).