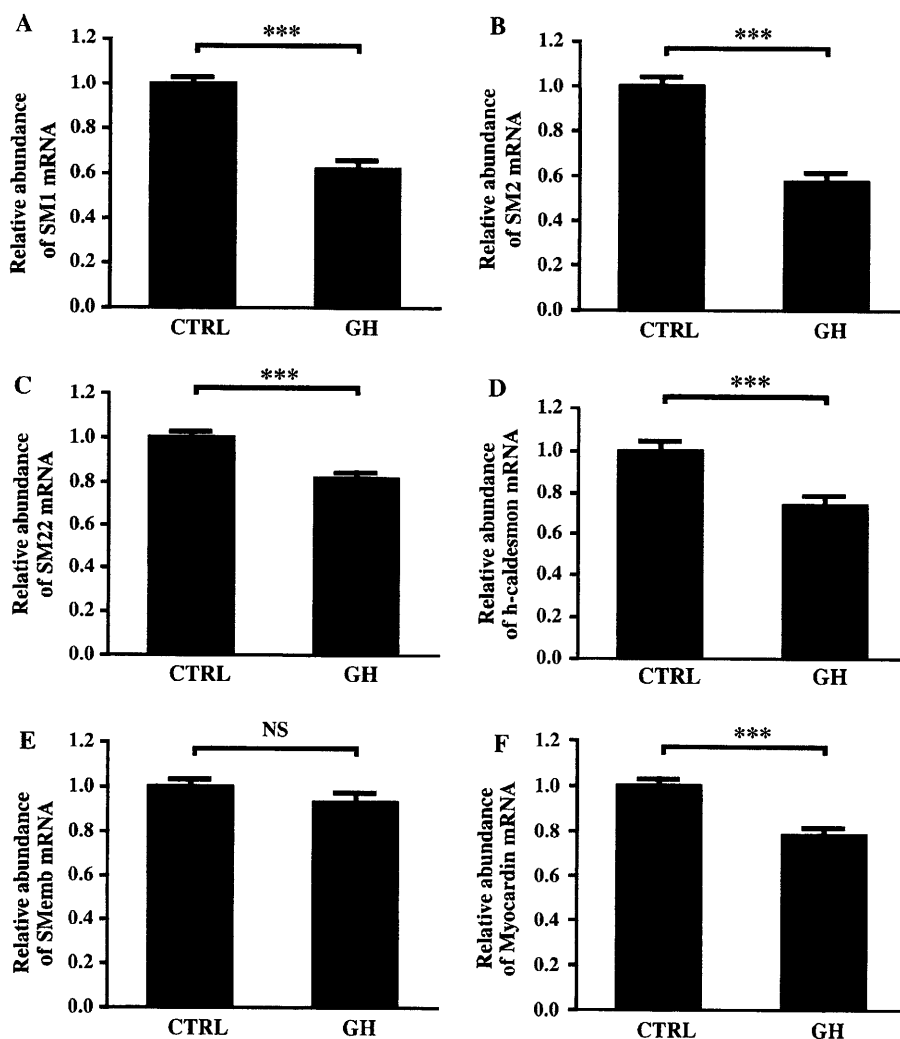


Fig. 6 Effect of GH on the cytoskeletal genes and smooth muscle-specific genes in DA SMCs. **a** SM1, **b** SM2, **c** SM22, **d** h-caldesmon, **e** SMemb, **f** Myocardin. ($n = 15$). $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. Data are expressed as means \pm SEM. *GH* Growth hormone, *CTRL* control, *DA SMC* ductus arteriosus smooth muscle cell, *NS* not significant



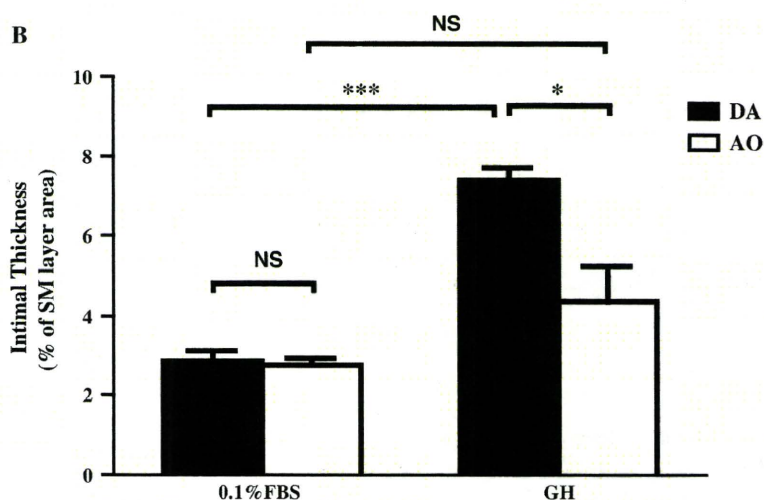
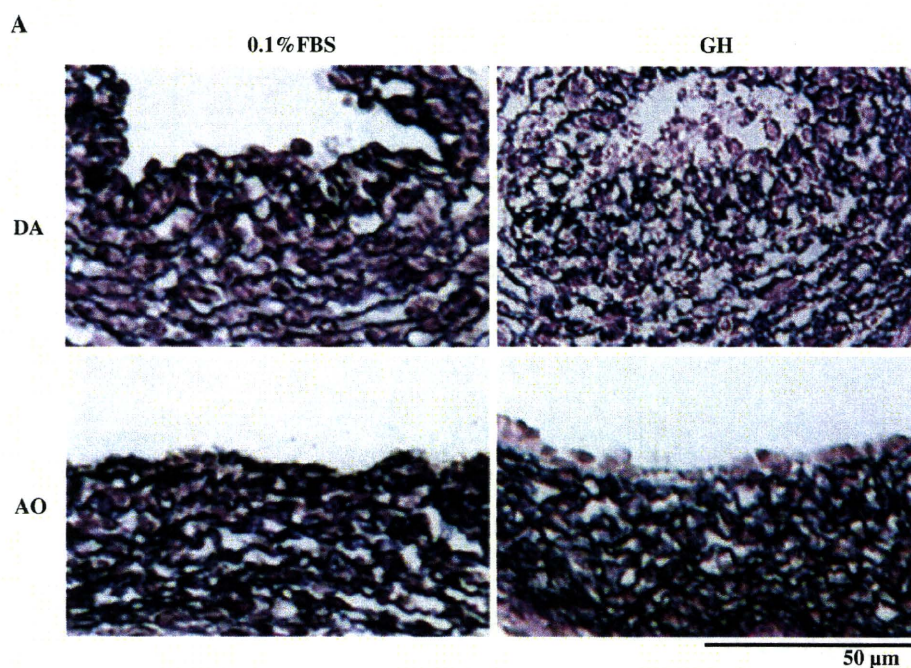
to this observation, Halevy et al. [8] demonstrated that GH inhibited the gene expression of myogenin and the expression of skeletal muscle-specific proteins in a dose-dependent manner in satellite cells. These data suggested that during muscle differentiation, GH inhibited the muscle-specific differentiation at its final stage to retain its synthetic phenotype. We propose that DA SMCs consist of distinct types that depend on their localization. During the progression of intimal cushion formation, DA SMCs in the inner layer are a synthetic phenotype that is highly proliferative and can migrate easily. The GH-GHR signal helps these cells remain a synthetic phenotype. Further studies are required to prove this idea.

Although the present microarray analyses uncovered distinct gene expression profiles of the DA from those of the aorta, several gene profiles are different from a previous report demonstrating the transcriptional profiles between the rat DA and the aorta of premature fetuses

and neonates using the same DNA microarray plates we used [3]. For example, Costa et al. demonstrated that *Myl2* and *Myh7* are predominantly expressed in the rat aorta at e19, but our data showed the opposite result. In addition, the tissue-specific genes that we identified overlap very little with their findings. We do not have a reasonable explanation for this discrepancy. It should be noted that the present study identified several expected genes that are known to be predominantly expressed in the DA, such as prostaglandin E receptor 4, endothelin-1, and *Kcnj8* (potassium inwardly rectifying channel, sub-family J, member 8). In contrast, Costa et al. did not identify this expected DA-dominant gene in the data from their microarray analysis. Furthermore, we also confirmed by quantitative RT-PCR analysis that, using different sets of RNA samples, the expression of several DA-dominant genes was higher in the DA than in the aorta. Therefore, we are confident that we provided

Fig. 7 Effects of GH-mediated intimal thickening of immature rat DA and aorta explants.

a Elastica staining of the DA and the aorta. GH at a concentration of 200 ng/ml. Scale bars 50 μ m. **b** GH significantly promoted intimal thickening of the DA, but not the aorta. ($n = 4-6$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Data are expressed as means \pm SEM. DA Ductus arteriosus, AO aorta, GH growth hormone, NS not significant



reliable data regarding the transcriptional profiles of the developing rat DA.

In conclusion, our study highlighted the distinct transcriptional profiles of the DA. In addition to the expected genes, microarray analysis revealed many genes whose roles were previously unrecognized in the DA. Among them, we found that the GH-GHR signal plays a role in vascular remodeling of the DA by promoting migration of SMCs and the subsequent formation of intimal thickness and regulating the expression of cytoskeletal genes. Although further studies are needed to identify the role of other genes in the DA, our data provide a basis for understanding the molecular mechanisms underlying the

differentiation and remodeling of the DA and for inventing the novel targets that regulate the contraction of the DA in affected children.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Ministry of Health Labor and Welfare (Y.I.), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (Y.I., U.Y., S.M.), the Foundation for Growth Science (S.M.), the Yokohama Foundation for Advanced Medical Science (U.Y., S.M.), the 'High-Tech Research Center' Project for Private Universities: MEXT (S.M.), a Waseda University Grant for Special Research Projects (Q.J.), the Vehicle Racing Commemorative Foundation (S.M.), Miyata Cardiology Research Promotion Funds (U.Y., S.M.), Takeda Science Foundation (Y.I., U.Y., S.M.), the Japan Heart Foundation Research Grant (U.Y.), the Kowa Life Science Foundation (U.Y.),

the Sumitomo Foundation (U.Y.), Japan Cardiovascular Research Foundation (S.M.), Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research (U.Y.) and the Uehara Memorial Foundation (U.Y.).

References

- Smith GC (1998) The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacol Rev* 50:35–58
- Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Ghatak S, Akaike T, Segi-Nishida E, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Toole BP, Sugimoto Y, Ishikawa Y (2006) Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 116:3026–3034
- Costa M, Barogi S, Socci ND, Angeloni D, Maffei M, Baragatti B, Chiellini C, Grasso E, Coceani F (2006) Gene expression in ductus arteriosus and aorta: comparison of birth and oxygen effects. *Physiol Genomics* 25:250–262
- Yokoyama U, Sato Y, Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S (2007) Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus. *Physiol Genomics* 31:139–157
- Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y, Minamisawa S (2009) T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem* 284:24025–24034
- Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y (2010) Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 106:1882–1892
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17:481–517
- Halevy O, Hodik V, Mett A (1996) The effects of growth hormone on avian skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 101:43–52
- Kishi K, Hirashiba M, Hasegawa Y (1991) Gestational profiles of rat placental lactogen-II (rPL-II) and growth hormone (GH) in maternal and fetal serum, amniotic fluid, and placental tissue. *Endocrinol Jpn* 38:589–595
- Bassett JM, Thorburn GD, Wallace AL (1970) The plasma growth hormone concentration of the foetal lamb. *J Endocrinol* 48:251–263
- Kaplan SL, Grumbach MM, Shepard TH (1972) The ontogenesis of human fetal hormones I. Growth hormone and insulin. *J Clin Invest* 51:3080–3093
- Waters MJ, Kaye PL (2002) The role of growth hormone in fetal development. *Growth Horm IGF Res* 12:137–146
- Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan SL (1981) The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. *Endocr Rev* 2:363–395
- Garcia-Aragon J, Lobie PE, Muscat GE, Gobius KS, Norstedt G, Waters MJ (1992) Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development? *Development* 114:869–876
- Beyea JA, Olson DM, Vandergriend RA, Harvey S (2005) Expression of growth hormone and its receptor in the lungs of embryonic chicks. *Cell Tissue Res* 322:379–392
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008) Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29:535–559
- Egecioglu E, Andersson IJ, Bollano E, Palsdottir V, Gabriellson BG, Kopchick JJ, Skott O, Bie P, Isgaard J, Bohlooly YM, Bergstrom G, Wickman A (2007) Growth hormone receptor deficiency in mice results in reduced systolic blood pressure and plasma renin, increased aortic eNOS expression, and altered cardiovascular structure and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1418–E1425
- Lincoln DT, Singal PK, Al-Banaw A (2007) Growth hormone in vascular pathology: neovascularization and expression of receptors is associated with cellular proliferation. *Anticancer Res* 27:4201–4218
- Klibanski A (2003) Growth hormone and cardiovascular risk markers. *Growth Horm IGF Res* 13(Suppl A):S109–S115
- Colao A (2008) The GH-IGF-I axis and the cardiovascular system: clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:347–358
- Schultz K, Rasmussen LM, Ledet T (2005) Expression levels and functional aspects of the hyaluronan receptor CD44. Effects of insulin, glucose, IGF-I, or growth hormone on human arterial smooth muscle cells. *Metabolism* 54:287–295
- Ikeo S, Yamauchi K, Shigematsu S, Nakajima K, Aizawa T, Hashizume K (2001) Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on human endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1255–C1261
- Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y (2010) The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63:e364–e369
- Colao A, Spiezia S, Cerbone G, Pivonello R, Marzullo P, Ferone D, Di Somma C, Assanti AP, Lombardi G (2001) Increased arterial intima-media thickness by B-M mode echodoppler ultrasonography in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:515–524
- Pfeifer M, Verhovec R, Zizek B, Prezelj J, Poredos P, Clayton RN (1999) Growth hormone (GH) treatment reverses early atherosclerotic changes in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab* 84:453–457
- Kim HS, Aikawa M, Kimura K, Kuro-o M, Nakahara K, Suzuki T, Katoh H, Okamoto E, Yazaki Y, Nagai R (1993) Ductus arteriosus. Advanced differentiation of smooth muscle cells demonstrated by myosin heavy chain isoform expression in rabbits. *Circulation* 88:1804–1810
- Colbert MC, Kirby ML, Robbins J (1996) Endogenous retinoic acid signaling colocalizes with advanced expression of the adult smooth muscle myosin heavy chain isoform during development of the ductus arteriosus. *Circ Res* 78:790–798
- Kumar MS, Owens GK (2003) Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:737–747

EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向

佐藤 陽治*^{1, #}, 鈴木 和博*¹, 早川 堯夫*²

(受付:平成22年10月29日, 受理:平成22年12月27日)

Regulation of Cell/Tissue-Based Medicinal Products in the European Union

Yoji SATO*^{1, #}, Kazuhiro SUZUKI*¹ and Takao HAYAKAWA*²

はじめに

バイオテクノロジーや幹細胞学等の進展に伴い、再生医療・細胞治療などの先端医療で使用することを目的として、培養・活性化等の加工が施された生細胞を含む医薬品・医療機器(細胞・組織加工製品)が国内外で数多く開発されつつあり、今まで治療が困難であった疾患や重度の損傷への高い効果が期待されている。これらの開発の勢いに呼応し、細胞・組織加工製品の品質及び安全性を確保するための行政施策・規制をいち早く整備することは、細胞・組織加工製品の实用化を促進して患者のもとにいち早く届けるという意味の上からも、製品の国際競争力確保の意味の上からも大きな課題である。また、製品の効率的な国際流通を視野に入れた場合、世界各国・各地域における承認審査での有効性・安全性・品質評価に関する考え方についての理解及び国際的協調が不可欠である。

欧州連合(EU)では、細胞・組織加工製品は体細胞治療薬(somatic cellular therapy products)又は組織工学製品(tissue engineered products)の範疇に分類されている。従来、体細胞治療薬は遺伝子治療薬とともに先端医療医薬品(ATMP, advanced therapy medicinal products)という医薬品の一類型に分類されていたが、2008年12月より組織工学製品もATMPとして規制を受けることになった。また、同時にATMPの審査に特化し

た先端医療委員会(CAT)が創設されるなど、積極的な開発支援策が取られている。本稿ではEUにおける、これらの新しい取り組みについて概説する。

1. ATMPの規制の枠組み

EUでは、ATMPは欧州医薬品庁(EMA, European Medicines Agency)が販売承認審査を担当する。2008年12月以前はATMPの範疇に含まれる製品は、遺伝子治療薬(gene therapy products)と体細胞治療薬のみで組織工学製品が含まれておらず^{1, 2)}、また、これらの製品の販売承認審査における評価基準に関して、EU加盟国間で統一がとれていなかった点が問題とされてきた。なおEUでは、医療機器に関しては、いずれかの加盟国より認定された民間の第三者認証機関の認証を受ければEU内の国境を越えた流通が可能となっており、国による審査は行われていないが、組織工学製品については医薬品¹⁾に分類されるか、医療機器^{3, 4)}に分類されるか、その判断は加盟国によりまちまちであった。

欧州委員会(EC)はこれらの問題を、EU内で国境を越えた製品の流通を展開する際の大きな障壁であると考え、その解決策として2007年、ATMPの販売承認規制を定めるRegulation(EC)No1394/2007⁵⁾を定めた。Regulation(EC)No1394/2007は、組織工学製品をATMPの範疇に加えること、及びATMPについては加盟国にお

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 東京都世田谷区上用賀1-18-1(〒158-8501)
Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

*² 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江3-4-1(〒577-8502)
Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

責任著者 Corresponding author

ける承認審査を経ずに初めからEMAで中央審査を行うことなどを主な柱とし、2008年12月より施行されるに至っている。

2. Regulation (EC) No 1394/2007 の概要

2.1 ATMP の定義

ATMPは、遺伝子治療薬、体細胞治療薬、又は組織工学製品と定義される。ここでの「体細胞治療薬」の定義は、「生物学的医薬品 (biological medicinal product) のうち、(a) 意図する臨床上の用途に適用するように生物学的性質、生理学的機能又は構造上の特性を変化させる実質的加工 (substantial manipulation) を施された細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品、ないしはドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品で、(b) 製品に含まれる細胞・組織の薬理的、免疫学的又は代謝的作用を通じて疾患の治療、予防又は診断を行うという観点に適用特性を有するもの、あるいはその観点からヒトに適用ないし投与されるもの」とされている⁹⁾。一方、「組織工学製品」は「工学処理された細胞・組織を含む製品又はこれらから成る製品で、ヒト組織の再生、修復又は置換を行うという観点に適用特性を有するもの、あるいはその観点からヒトに適用ないし投与されるもの」を指す⁹⁾。ここでの、「工学処理された細胞・組織」とは、「意図する再生、修復又は置換に適用するように生物学的性質、生理学的機能又は構造上の特性を変化させる実質的加工を施された細胞・組織、ないしはドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織」を指す (Table 1)。なお、「実質的加工ではない加工」の例としては、切断、研磨、成形、遠心分離、抗生剤・抗菌剤溶液への浸漬、殺菌・消毒・滅菌、放射線照射、細胞の分離・濃縮・精製、濾過、凍結乾燥、凍結、冷凍保存、ガラス化が挙げられている (文献5のAnnex I参照)。

従来、ある特定の組織工学製品が医薬品に該当するのか、医療機器に該当するのかという判断にEU加盟国間で差が生じやすかったことの大原因は、製品分類における「主要作用様式の原則」(primary mode of action rule)にあった。そこでRegulation (EC) No 1394/2007では、たとえ医療機器としての側面が主要作用様式であったとしても、組織工学製品の場合には、生きた細胞・組織を含むか否かという条件を優先し、医薬品の一種であるATMPに分類することとなっている。

2.2 ATMP に対する規制

2.2.1 基本原則：リスクベースアプローチ

EUではATMPの販売承認に関する規制の原則として、リスクベースアプローチ (risk-based approach) が採られている (文献6のAnnex I Part IV参照)。リスクベースアプローチとは、審査対象となる各製品の性質に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスクの分析をベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより規制の方針・内容を定めるという方法である。リスクベースアプローチは、日米欧医薬品規制調和会議 (ICH) で2005年に合意された品質リスクマネジメント・ガイダンス (Q9) でも採用されており、今日では医薬品規制・開発の原則として比較的一般的なものとなっている。ATMPのリスクは、細胞の生物学的特性と由来、製造工程、ベクターの生物学的特性、タンパク質発現の様式、非細胞成分及び臨床におけるATMPの具体的な使用方法に大きく左右される。細胞を利用した製品については、その多様性の高さゆえに、患者、医療従事者又は公衆衛生に対するリスクの度合いも製品ごとに非常に異なってくる。したがって、こうした製品の開発計画及び審査要件は、多様な因子を加味したリスクベースアプローチによってケースバイケースで調節する必要があるとEMAは考えている⁹⁾。同時にEMAは、ATMPの製造工程 (製造工程内での検査や最終製品の検査を含む) は当該ATMPのリスクを十分に制限・制御できる能力を備えているべきだと考えており、また、非臨床試

Table 1 EUにおける「体細胞治療薬」と「組織工学製品」の定義

| | 体細胞治療薬 | 組織工学製品 |
|---|--|----------------|
| 1. 使用目的 | 製品に含まれる細胞・組織の薬理的、免疫学的又は代謝的作用を通じた疾患の治療、予防又は診断 | ヒト組織の再生、修復又は置換 |
| 2. 以下のいずれかに該当する細胞・組織を含む (又はそうした細胞・組織で構成される) | | |
| ・実質的加工* | 使用目的に適用するように生物学的性質、生理学的機能又は構造上の特性を変化させる実質的加工を施された細胞・組織 | |
| ・細胞・組織の機能 | ドナーの体内での本来の機能と同じ機能を患者の体内でも果たすことを意図して利用するのではない細胞・組織 | |

* 実質的加工に含まれない加工の具体例については文献5のAnnex I参照

験及び臨床試験でも、同定されたリスク要因について深く検討すべきだとしている⁹⁾。

(なお著者は、ここでいうリスクとは、所期の目標に対する「不適切性」、「不都合性」、「不合理性」、「非効率性」、「不確実性」などを意味していると解釈している。各ATMPの開発、製造、試験、審査、使用などの各過程や局面において、大小あるいは上位下位のさまざまな目標があり、アプローチがあるが、すべてが患者のためという最終目的につながっているとの本質を常に認識・理解した上で、リスクアセスメント、コミュニケーション、コントロール、レビューなどを実施していくことが肝要である)。

2.2.2 製品の品質・安全性・有効性に関する規制

ATMPは医薬品の一類型であり、従来の医薬品に関する様々な規制が適用される。つまり、市場で流通させるためには販売承認が必要であり、そのためには製品の品質・安全性・有効性を明示することと同時に、市販後の監視・調査が要求される。ATMPの製造に用いる細胞の提供・採取・検査はEUのGood Tissue Practice (GTP)⁹⁻¹¹⁾に従う必要があり、品質管理に関しては、EUのGood Manufacturing Practice (GMP)¹²⁾に従う必要がある。なお、現在EMAはATMP向けの新しいGMPについても検討中である¹³⁾。更に、ATMPと医療機器との複合製品の場合には、医療機器関連規制^{3,4)}に従うとともに、承認申請時には製品の物理的特性、機能様式及び設計方法に関して明らかにする必要がある。また、製品の特性概要・ラベリング・パッケージングの記載に関してはDirective 2001/83/EC¹⁾の要件に従うが、ATMPでは特に、ドナーの匿名性を尊重しつつも、細胞ないし組織の由来について、患者の知る権利に十分に即するようなものとなっている必要がある。

従来の医薬品・医療機器とは異なり多くのATMPは患者の体の一部となる。したがって、ATMPの有効性・副作用に関するフォローアップ及びリスクマネジメントをECは非常に重要視しており、申請者にはフォローアップ、市販後調査の詳細についての説明、またリスクマネジメント計画が求められる。ATMPの市販後フォローアップ及びリスクマネジメントに関してはEMAから詳細な指針が出されている¹⁴⁾。また、ATMPの承認を受けた者は、その製品を使用する医療施設とともに、血液細胞以外の細胞・組織に関する規制⁹⁾ないし血液細胞に関する規制¹⁵⁾、及び個人情報保護に関する規制¹⁶⁾に従い、患者・製品及び原材料のトレーサビリティを確保するシステムを構築・運用しなければならない。ATMPのトレーサビリティに関する詳細な指針については、現在検討中である。

3. ATMPの臨床試験

EUにおけるATMPの臨床試験は、日本における「治験 vs. 臨床研究」に相当する区分は存在せず、大学等における非商業目的の臨床研究に相当する試験であっても、すべて日本の治験に相当する規制が適用される。臨床試験(治験)後にEU域内で流通させる場合にはEMAによる中央審査が必要となる。ただし、EMAはあくまでも薬事承認審査を行う機関であり、治験の開始・実施に関する手続きはすべて加盟国の管轄となっている。すなわち、EMAは臨床試験には一切関与できない。

臨床試験に関しては、ICHの基準に従ったEUのGood Clinical Practice (GCP)¹⁷⁾を順守することが必要であるが、Regulation (EC) No 1394/2007施行後のATMPの臨床試験に関しては、これに加え、現在策定中のATMP向けGCPに従う必要があるとされる。その詳細についてはトレーサビリティの確保等に関する留意点等がドラフト版¹⁸⁾から垣間見ることができる。

治験に関する裁量がEU加盟各国に属することから、同一の治験届を各国に提出しても結論が国によって異なる恐れがある。逆に、加盟各国の規制や倫理基準に対応できるよう、治験届の内容に国別の修正を余儀なくされる可能性がある。こうした状況は、治験の科学的な価値を下げることになると危惧される。また、すべてのEU加盟国において治験参加者は等しく保護されるべきであるのが前提であることから、各国の理解も得られにくくなってしまふ。治験に関するハーモナイゼーションについてはEMAではなく、Heads of Medicines Agency (HMA)の臨床試験推進グループで議論されており、ガイダンス¹⁹⁾を示す等の活動がなされている。

4. 相談制度・販売承認審査

4.1 相談制度

EMAは科学助言ワーキングパーティー (SAWP, Scientific Advice Working Party)を通じて医薬品の製品開発に関する科学的助言やプロトコール支援を開発者に提供している。ATMPの開発者は中小のベンチャー企業等 (SME, Small and Medium-sized Enterprise)が多いことから、現在EMAでは、SMEがATMPについての科学的助言を必要とする場合、通常の手数料の90%割引で相談に応じている。相談者がSMEで、対象となるATMPが公衆衛生上の特別な利益となることが証明できる場合には、更なる割引が考慮される。なお、それ以外の開発者でも対象品目がATMPならば通常の65%割引で相談に応じている。また、オーファン医薬品の場

合のプロトコール支援は無料である。

ATMPに関する場合には、SAWPを通じた相談以外に、より非公式な制度として技術革新タスクフォース(ITF, Innovation Task Force)との相談も利用可能である。ITFはEMA内の多部署から成るグループで、法律・ガイドライン等が未整備な先端的治療・技術に関して規制面での問題点を議論することを目的としている。したがって、既存のガイドラインではカバーしきれないケースの多いATMPのような新規の製品については、開発者から規制面での疑問点をITFに投げかけることができる。この制度はITFから助言を受けるというよりもむしろ意見交換の意味合いが強い。ITFとの相談は無料であるが論議内容の法的拘束力はない。

更にこれらの制度とは別に、EMAの先端医療委員会(CAT, Committee for Advanced Therapies)は、開発者の品目がATMPに該当するか否かの助言を無料で行うとともに、SMEの非臨床試験・品質試験のデータの科学性に関する暫定認証を無料で行っている(後述)。

4.2 ATMPの中央審査

EU内の国境を越えたATMPの流通に関しては、EMAがECからの委任を受けて一括して承認審査を行っており、そこで品質・安全性・有効性に関する科学的評価が行われている。EMA内でヒト向けの医薬品の販売承認審査を行うのは、ヒト用医薬品委員会(CHMP; Committee for Human Medicinal Products)であるが、ATMPについては従来の医薬品・医療機器よりも専門的かつ多分野にわたる評価を要することから、CHMPの下部諮問組織として先端医療委員会(CAT)が2008年12月末に設置され、CATでの品質・有効性・安全性の評価意見書案をもとにしてCHMPが承認審査を行い、CHMPが作成した評価意見書をもとにしてECが承認の判断をする、という体制が取られている。ATMPの品質・安全性・有効性確保に関する要件・評価をEU内で調和させ、直接的で迅速な流通を図る目的から、ATMPはEU加盟国内での審査を経ることなく、直接CATでの評価を受けることになった。

4.3 経過措置

2008年12月30日以前にEU内で流通が承認されたATMPに関しては、経過措置が取られる。組織工学製品ではないATMPの場合には3年の移行期間(2008年12月31日～2011年12月30日)、組織工学製品である場合には、4年の移行期間(2008年12月31日～2012年12月30日)が与えられており、それまでにATMPとしての再承認を受ける必要がある。期間内に再承認を受けな

い場合には、EU市場での承認は取り消される。

4.4 先端医療委員会(CAT)の構成と任務

4.4.1 構成

先端医療委員会(CAT)は、EU加盟国から各1名(副委員各1名)、患者団体から2名(副委員2名)、臨床医が2名(副委員2名)の、正副合計66名で構成され、会議は毎月1回開催される。患者団体及び臨床医の代表者としての委員はECが選定する。現在は、患者団体としてEGAN(欧州遺伝病連帯ネットワーク European Genetic Alliances' Network)及びEurordi(欧州希少疾病機構 European Organisation for Rare Diseases)、臨床医の代表者としてESGCT(欧州遺伝子細胞治療学会 European Society of Gene and Cell Therapy)及びEBMT(欧州血液骨髄移植グループ European Group for Blood and Marrow Transplantation)のメンバーがCATに参加している。なお、CHMPとの連携の必要性から、加盟国代表の委員うち5名はCHMPの委員である必要がある。

ATMPの評価において必要な学問領域としては、医療機器・組織工学・遺伝子治療・細胞治療・バイオテクノロジー・外科学・ファーマコビジランス・リスクマネジメント及び倫理学が挙げられており、委員会全体に必要な領域がカバーできるようにアレンジされている。その内訳は、遺伝子治療専門家が19%、細胞治療専門家が21%、組織工学の専門家が17%、バイオテクノロジー専門家が24%、倫理学専門家が8%、ファーマコビジランス専門家が5%、医療機器専門家5%、外科学専門家1%となっている。

4.4.2 CATの任務

CATの任務には、①ATMPの科学的評価、②ATMP該当性に関する助言、③SMEのATMP品質・非臨床データの暫定認証、④SAWPへの協力、そのほか、ATMP以外の製品についてのCHMPとの相談、及びECへの助言などがある。

4.4.2.1 ATMPの科学的評価

CATの任務の中でも主要なのは、ATMPの科学的評価である。個別のATMPについて、CATは品質・安全性・有効性に関する科学的評価結果を意見書案としてCHMPに提出する。評価意見書案の提出は、正式な承認申請日から数えて約200作業日以内に行う。なお、CHMPは正式な承認申請日から数えて210作業日以内に承認に関する評価意見書を確定する。なお、これら作業日には土日祝日を含む。また、CATの質問事項リストが出された時から申請者がこれに回答するまでの間は作業日に勘定しない。ATMPが医療機器との複合製品

の場合には、CATは医療機器認証機関との情報交換も行う。

4.4.2.2 ATMP 該当性に関する助言

CATは特定の品目がATMPに該当するか否かについて、科学的な基準に基づいた検討・判断を行う。製品の分類に関する助言要請は、治験届や承認申請の有無に係らず随時受け付けられており、手数料もかからない。正式な助言要請から60日以内で回答されることになっている。CATの回答は、製品の内容・治療対象・CATによる検討結果について、秘匿事項を除いた後に公開される。また、ATMPのファーマコビジランス及びリスクマネジメントシステムの計画及び実施に関しても、承認申請者・承認取得者からの要請に応じて助言を行う。

4.4.2.3 SMEのATMP品質・非臨床データの暫定認証

中小ベンチャー企業等(SME)はATMPの品質・非臨床データに関し、CATによる科学的評価に基づく暫定認証を受けることができる。暫定認証の審査は治験開始・承認申請の有無に係らず、SMEから申請があった場合に随時行われる。あくまで品質・非臨床データの科学的評価の結果のみを認証するものであって、治験届や承認申請とは独立したものとみなされている。すなわち、認証書は法的には治験届や承認申請の際に提出すべきデータの代用として使うことはできない。ただしECとしては、同じデータを用いて将来、治験あるいは承認の申請が行われる際には、申請の評価が行いやすくなることも期待している。

4.4.2.4 SAWPへの協力

CATはSAWPに協力することにより、ATMPの科学的助言にも関与している。ただし、CATのSAWPへの関わり方の詳細については試行錯誤が続いている。

4.5 ATMP承認審査におけるEMA各組織の役割

4.5.1 CATとCHMPの共同作業

従来の医薬品の場合はCATに諮問されることなく、CHMPラポーターとCHMP副ラポーターがそれぞれ専門家チームを構成して評価し、その評価結果をCHMPで議論する。結論がCHMPで了承されると、それを受けたECが承認をすることになる。一方、ATMPの評価はCATラポーターとCHMPコーディネーター及び品質・安全性・有効性の各専門家からなるチームと、CAT副ラポーターとCHMP副コーディネーター及び品質・安全性・有効性の各専門家からなるチームの2チームで行う。2チームが作成した評価レポートをCHMPのメンバー1名とCATのメンバー1名以上が査読し、その結果をCATの全体会議で議論する。CATは議論した内容を評価意見書案としてCHMPに提出する。CHMPは評価

意見書案をもとに承認審査を行って評価意見書を作成し、更にこれをもとにECが承認の可否を判断する。

4.5.2 CATの役割

先述のようにCATはATMPの科学的評価を行うことになっているが、具体的作業としては、ATMPの評価に関して質問事項のリスト、解決すべき問題点のリスト、及び評価意見書案の内容を議論する。また、必要となれば会議中にEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家にもスライドと電話でのプレゼンテーションをさせ、議論を行う。CAT正副ラポーターは、CATの全体会議における評価の過程・議論をコーディネートするとともに、評価レポート、質問事項リスト、問題点リスト等の作成を担当し、またEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家との相談の必要性があるかどうかの判断を行う。

4.5.3 CHMPの役割

CHMPはATMPの評価を行う2チームの任命を行うとともに、CATの評価意見書案をもとにした評価意見書を作成する。また、CATでの評価過程でコメントを加えることもできる。全体会議で主なATMPについての科学的意見や議論について情報を共有し、必要であれば審査期間(正式な承認申請日から数えて210日作業日)の最後に問題点リストの作成及び口頭での説明の機会設定を行うことができる。

CHMP正副コーディネーターは、CATの上部組織であるCHMPとCATとの間の情報のパイプ役となるとともに、CHMPにおいてCATの意見についての討議・採択を担当する。また、審査期間中にEMAのワーキングパーティーメンバー等の外部専門家との相談の必要性があるかどうかの判断を行う。

4.5.4 EMA事務局の役割

EMAはCATの評価意見書案及びCHMPの評価意見書がそれぞれ決められた期間内に作成されることをチェックすると同時に、CAT及びCHMPの評価の透明性を確保する。CAT事務局は、CAT正副ラポーターの評価レポートの科学的面及び規制の面での整合性を確保すると同時に、CHMPでの最終承認を受けるための評価意見書案の準備を行う。更に、CAT事務局はATMPの評価や回収に関する情報収集・提供を行う。

5. 市販後安全対策

Regulation (EC) No 1394/2007には、ATMP市販後における安全対策として、トレーサビリティの確保と市販後における安全性監視(ファーマコビジランス)が挙げられている。ATMPのドナー・原材料・製品・製造工程

及び患者のトレーサビリティの確保は従来の関連 Directive に従うことになるが、先述のように、現在 ATMP に特化した指針についても検討中である。

ファーマコビジランスについては、ATMP に特化した指針¹⁹⁾ が出され、2008年12月末より発効している。EUでは従来、ファーマコビジランスはファーマコビジランスシステムとリスクマネジメントシステムとで構成されているが、このATMP向け指針では有効性フォローアップシステムの構築が要求されている点が特徴的である。また、リスクマネジメントの実施に当たってのATMPに特有のリスクの例、ファーマコビジランスの実施における注意点、リスクを最小化するための方策なども示されている。

ATMPは生きている細胞・組織を含む。したがって、患者への投与後、長期間の間には細胞・組織の性質に変化が生じる可能性があり、これと同時にATMPとしての有効性にも変化が生じ得る。一方、そうした変化が患者にどのような影響をもたらすか、という点については販売承認前には十分には理解し得ない。ATMPに対する患者の免疫応答性及び反復投与による免疫獲得等も、有効性・安全性に影響する可能性がある。また、ATMPの投与の様式（手術時の患者の状態・前処理、手術及び手術後の処置などまで含む）によっても有効性・安全性は変わり得る。更に、ATMPは作用期間が限定的なものから終生理植され続けるものまで様々である。これらの理由から、ATMPに関しては有効性のフォローアップが重視されることになる。

ATMPの市販後安全対策の課題としては、構築したファーマコビジランスシステム、リスクマネジメントシステム及び有効性フォローアップシステムに関する不透明性が挙げられている。すなわち、データが非公開で、要旨のみが公開されることになっており、新たなATMPの開発促進・安全性確保の上で問題視されている。また、データの保管及びトレーサビリティシステムの担い手が承認申請者である点も、そのままではよいのかという議論がある。

6. 例外規定—ホスピタルエグゼンプション—

ATMPの中央審査の原則の例外として、Regulation (EC) No 1394/2007のArticle 28には、①特定の一患者向けの特注品の処方箋に従って、②固有の品質基準に基づき、③非反復的に製造され、④医療従事者の職務責任の下、⑤同一加盟国内で、⑥単一病院において使用されるという条件すべてを満たす場合には中央審査とはならない、という規定がある。これをホスピタルエグゼンプシ

ョン（病院特例、Hospital Exemption）と言う。ただし、ホスピタルエグゼンプションに該当する品目の場合も、生産国において製造工程と品質に関する承認を受ける必要があり、またファーマコビジランス実施とトレーサビリティの確保が必要となる。特に自己由来細胞を用いたATMPの場合、患者ごとのオーダーメイドであることから「非反復的生産」と考えがちだが、通常EUでは、一定の標準化された製造工程で工業的（産業的）に製造される場合には、自己細胞を原材料としても患者ごとに互いに別個の製品とはならず、反復的製造と見なされる²⁰⁾。これは製造工程中にあるリスクが多くの製品・患者に拡散するのを防ぐためである。

おわりに

ATMPは目覚ましい進展を見せ、EUでも次々と新たな開発品が出現しているが、細胞・組織・遺伝子といった、これまでにない複雑な構成成分を含むと同時に、その臨床応用に関しては非常に限られた経験と知識しか存在せず、明確な科学的根拠に基づいた品質や安全性等の確保が課題であった。これを克服するための取り組みとしてRegulation (EC) No 1394/2007が発出されたが、その取り組みの中にもまだ問題点は多い。例えば、中小ベンチャー企業向けのATMP品質・非臨床データの暫定認証は、臨床試験審査や販売承認審査とは正式な法的繋がりが無いため、その意義付け、位置付けはまだ明確ではない。開発の早い段階で暫定認証が行われてもデータ自体が最終的な製品の規格と乖離したものとなりかねず、逆に遅ければ大企業への技術移転等が進まない。適切なタイミングについての判断もまだ難しい。また、ATMPに関するホスピタルエグゼンプションの要件中の単語の解釈の違いから、EU地域内でも特定の先端治療が受けられる国と受けられない国が生じ、実施国に患者が集中する、いわゆる「医療難民」が発生することが危惧され、CATでも「非反復的」「単一の病院」などの単語の定義についてハーモナイゼーションの必要性が説かれている。ATMP向けのGCPやGMP及びトレーサビリティに関する詳細な指針等もまだ確定されていない。

こうした問題はあるものの、EUの規制当局は、ATMPに対して品質や安全性等の確保及びリスク・ベネフィットのバランスを図りつつ、実用化を促進するために試行錯誤をいくつも繰り返しながら、着実に規制の枠組み作りを進めている。既に2009年6月には培養軟骨製品が、新たな審査体制の下での初のATMP品目として販売承認を受けているが、即座にCATはその審査経験をもとに、培養軟骨製品の承認審査における留意点をまとめた

文書²¹⁾を公表している。また、研究開発が進むiPS細胞等の多能性幹細胞に由来するATMPに関する特別な留意点をまとめた文書²²⁾を公表するなど、EUの医薬品産業の強化に必要な新技術の開発支援に積極的な姿勢を示している。

細胞・組織加工製品を医薬品か医療機器かに分類するのではなく、ATMPという医薬品カテゴリーに括って特別な規制をかける、というEUの非常に大胆な取り組みは、従来の医薬品・医療機器の二分法に拘泥されずに先端医療製品そのものと率直に向き合いつつ品質・安全性・有効性の評価を行うことができる可能性を持っている。あらゆる医療製品や医療技術が究極的には患者あるいは将来、患者になりうる人々のために制度上も最も効果的、合理的なアプローチをとるという視点で考えれば、むしろ必然的な帰結であるかも知れない。我が国における先端医療の実用化促進施策、及び規制の国際協調のためにも参考とすべきものと考えられる。

文 献

- 1) Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
- 2) Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use.
- 3) Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 concerning medical devices.
- 4) Council Directive 90/385/EEC of 20 June 1990 on the approximation of the laws of the Member States relating to active implantable medical devices.
- 5) Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004.
- 6) Commission Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products.
- 7) EMA: Guideline on human cell-based medicinal products EMEA/CHMP/410869/2006.
- 8) EMA: Concept paper on the development of a guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of directive 2001/83/EC applied to advanced therapy medicinal products EMA/CHMP/CPWP/708420/2009.
- 9) Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells.
- 10) Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells.
- 11) Commission Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells.
- 12) Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use.
- 13) EMA: GMP for advanced therapy medicinal products: status EMEA/INS/GMP/372447/2008.
- 14) EMA: Guideline on safety and efficacy follow-up-risk management of advanced therapy medicinal products EMEA/149995/2008.
- 15) Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC.
- 16) Directive 95/46/EC of the European Parliament and of the Council of 24 October 1995 on the protection of individuals with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data.
- 17) Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use.
- 18) European Commission: Detailed guidelines on good clinical practice specific to advanced therapy medicinal products ENTR/F/2/SF/dn D(2009)35810 (3 December 2009).
- 19) Heads of Medicines Agencies: Guidance document for a Voluntary Harmonisation Procedure (VHP) for the assessment of multinational Clinical Trial Applications CTFG/VHP/2010/Rev1.
- 20) European Commission: Consultation paper: Human tissue engineering and beyond: proposal for a community regulatory framework on advanced therapies (4 May 2005).
- 21) EMA: Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee CAT/CPWP/568181/2009.
- 22) EMA: Reflection paper on stem cell-based medicinal products (draft) CAT/571134/09.

TRPC チャネルのリン酸化による心血管機能制御

西田基宏,^{*a} 斎木翔太,^a 北島直幸,^a 仲矢道雄,^a 佐藤陽治,^b 黒瀬 等^a

Regulation of Cardiovascular Functions by the Phosphorylation of TRPC Channels

Motohiro NISHIDA,^{*a} Shota SAIKI,^a Naoyuki KITAJIMA,^aMichio NAKAYA,^a Yoji SATO,^b and Hitoshi KUROSE^a^aDepartment of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan, and^bDivision of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received June 15, 2010)

Calcium ions (Ca^{2+}) play an essential role in homeostasis and the activity of cardiovascular cells. Ca^{2+} influx across the plasma membrane induced by neurohumoral factors or mechanical stress elicits physiologically relevant timing and spatial patterns of Ca^{2+} signaling, which leads to the activation of various cardiovascular functions, such as muscle contraction, gene expression, and hypertrophic growth of myocytes. A canonical transient receptor potential protein subfamily member, TRPC6, which is activated by diacylglycerol and mechanical stretch, works as an upstream regulator of the Ca^{2+} signaling pathway required for pathological hypertrophy. We have recently found that the inhibition of cGMP-selective phosphodiesterase 5 (PDE5) suppresses agonist- and mechanical stretch-induced hypertrophy through inhibition of Ca^{2+} influx in rat cardiomyocytes. The inhibition of PDE5 suppressed the increase in frequency of Ca^{2+} spikes induced by receptor stimulation or mechanical stretch. Activation of protein kinase G by PDE5 inhibition phosphorylated TRPC6 proteins at Thr⁶⁹ and prevented TRPC6-mediated Ca^{2+} influx. Substitution of Ala for Thr⁶⁹ in TRPC6 abolished the antihypertrophic effects of PDE5 inhibition. These results suggest that phosphorylation and functional suppression of TRPC6 underlies the prevention of cardiac hypertrophy by PDE5 inhibition. As TRPC6 proteins are also expressed in vascular smooth muscle cells and reportedly participate in vascular remodeling, TRPC6 blockade may be an effective therapeutic strategy for preventing pathologic cardiovascular remodeling.

Key words—transient receptor potential; calcium signaling; hypertrophy; remodeling; phosphodiesterase

1. はじめに

心血管系における長期的な構造的改変（リモデリング）は、心不全や動脈硬化を引き起こす原因として注目されている。心血管リモデリングは、心筋細胞や血管平滑筋細胞の肥大、線維芽細胞の過形成や筋分化などによって引き起こされる。この過程には、細胞外からの持続した Ca^{2+} 流入によって誘発される Ca^{2+} シグナリングの活性化が深く関わっている。心血管系における Ca^{2+} 流入の主な役割は興奮収縮連関（excitation-contraction coupling, E-C

カップリング）への寄与であり、周期的な心筋細胞の興奮（活動電位）に伴う電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入が筋小胞体に貯蔵された Ca^{2+} の放出を惹起し、トロポニンCの抑制解除を介してアクチン-ミオシンの相互作用による律動的な収縮を発生する（Fig. 1）。一方、心血管リモデリングに係わる Ca^{2+} シグナリングは活動電位に依存せず、細胞外の生理活性物質や機械的圧負荷によって誘発される Ca^{2+} 流入を介して活性化される。この電位以外の物理化学的な刺激で活性化される Ca^{2+} 透過型カチオンチャネルの分子実体として注目されているのが Transient Receptor Potential (TRP) である。われわれは最近、アンジオテンシンII (Ang II) やエンドセリン-1 (ET-1) などのアゴニスト刺激により誘発される活動電位の発火頻度の増加に、ジアシルグリセロール (diacylglycerol;

^a九州大学大学院薬学研究科薬効安全性学分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）、^b国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部（〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）

*e-mail: nishida@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S52 で発表したものを中心に記述したものである。

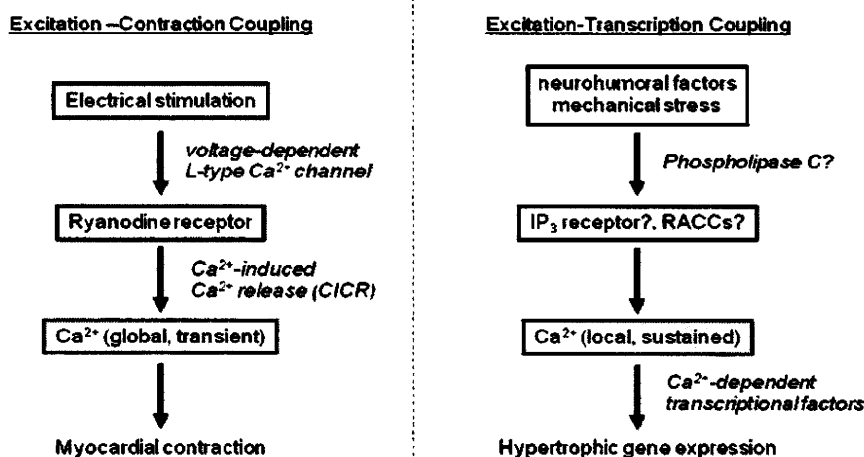


Fig. 1. Diagram of Excitation-contraction Coupling and Excitation-transcription Coupling in the Heart

DAG)で直接活性化されるTRPチャネル(TRPC3とTRPC6)が関わっていることを見出した。¹⁾また、TRPC3/TRPC6チャネルを選択的に阻害する化合物が個体レベルの心肥大を抑制することが明らかとなり、心不全治療薬の新たな標的分子としての可能性がみえてきた。²⁾さらにごく最近、ホスホジエステラーゼ5(PDE5)阻害剤がプロテインキナーゼG(PKG)依存的にTRPC6タンパクをリン酸化しTRPC6チャネル活性を減弱させることで、アゴニスト刺激やメカニカルストレスで誘発される心肥大応答を抑制することを明らかにした。³⁾PDE5阻害剤は性機能改善薬としてだけでなく、肺動脈性高血圧や慢性心不全に対しても有効であることから、PDE5阻害剤の標的分子として見いだされたDAG活性化TRPCチャネルは様々な心血管疾患の新たな治療標的となることが期待される。

2. 興奮転写連関と心肥大

細胞外の神経伝達物質や液性因子などの化学的刺激あるいはメカニカルストレスやずり応力などの物理的刺激は、持続的なCa²⁺流入を誘発し、カルモデュリン(CaM)を介してnuclear factor of activated T cells(NFAT)やCaM-binding transcription factor(CAMTA), cAMP-responsive element binding protein(CREB)などの転写因子を活性化し、心肥大関連遺伝子の発現を誘導する。⁴⁾これを興奮転写連関(excitation-transcription coupling, E-Tカップリング)という。興奮転写連関を担うCa²⁺流入は、細胞質のCaMキナーゼやCaM依存性ホスフ

ターゼ(カルシニューリン)によって感知されることで初めて転写が誘導される。しかし、E-Cカップリングに必要なリズムカルな細胞内Ca²⁺濃度変化が起こっている中で、CaMキナーゼやカルシニューリンが一体どうやってE-Tカップリングに必要なCa²⁺流入を感知するのかについてはよくわかっていない。最近、活動電位に伴って生じるCa²⁺スパイクの頻度の増加そのものが心肥大関連遺伝子の発現誘導に必要であることが明らかにされ、電位依存性Ca²⁺チャネルを介するCa²⁺流入の量的・時間的変化が興奮転写連関の誘導に関与する可能性が示された。⁵⁾われわれはカルシニューリンの下流にある転写因子NFATの活性を指標に心肥大誘導を担うCa²⁺シグナリングの活性化機構の解析を行い、受容体刺激によるCa²⁺流入を仲介する新たな因子としてTRPCチャネルを同定した(Fig. 2)。

3. TRPCチャネルと心肥大

哺乳類TRPCチャネルには7つのアイソフォーム(TRPC1-TRPC7)が存在する。このうち、TRPC2, TRPC3, TRPC6, TRPC7の4つがDAGにより直接活性化されると報告されており、心筋細胞にはTRPC3, TRPC6, TRPC7の3つが発現している。⁶⁾われわれは、Ang II刺激で誘発されるCa²⁺シグナリングの活性化及び心筋細胞の肥大応答に、TRPC3チャネルとTRPC6チャネルが関与することを見出した。TRPC3とTRPC6は、肥大心及び不全心において発現が増加しており、TRPC3あるいはTRPC6を心筋細胞に過剰発現させたマウス

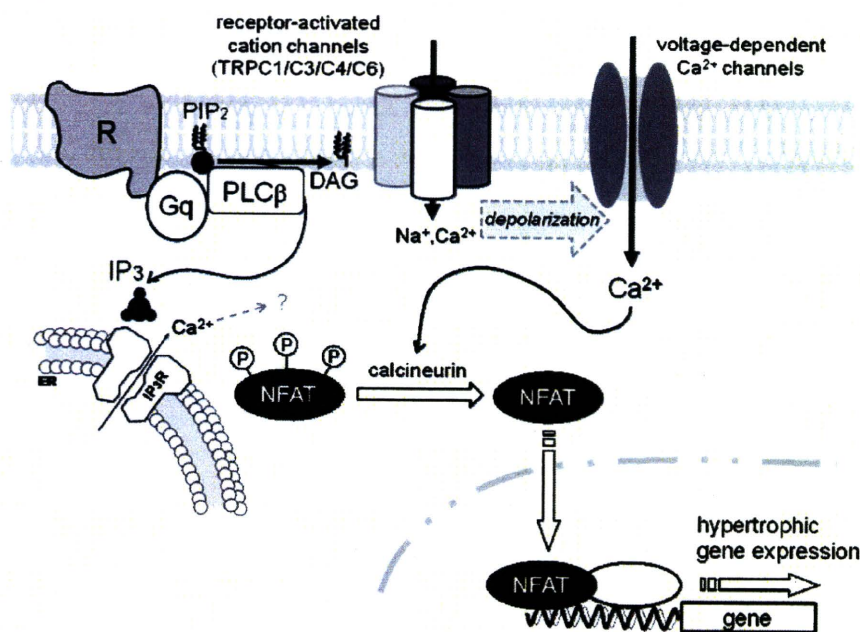


Fig. 2. Role of DAG-activated TRPC Channels in the Development of Cardiac Hypertrophy

では圧負荷に対する肥大感受性が増大する。^{7,8)} 一方、TRPC3 又は TRPC6 の恒常的不活性型変異体を心筋細胞に発現させたトランスジェニックマウスでは、圧負荷による心肥大が顕著に抑制されることも報告されている。⁹⁾ これに加えて、DAG 非感受性の TRPC1 チャンネルを欠損させたマウスや TRPC1 の恒常的不活性型変異体を心筋特異的に発現させたマウスでも圧負荷による心肥大が抑制されることが明らかにされている。^{9,10)} さらに、心筋の TRPC3 と TRPC4 が複合体を形成すること、及び TRPC4 の恒常的不活性型変異体を心筋特異的に発現させたマウスで圧負荷による心肥大が抑制されることがつい最近報告された。⁹⁾ イオンチャンネルは基本的に四量体を形成すると信じられており、これらの知見を考慮すると、心筋の DAG 活性化チャンネルは TRPC1/C3/C4/C6 のヘテロ四量体で構成されている可能性が考えられる。

4. リン酸化による TRPC チャンネル活性の制御

TRPC チャンネル活性は、リン酸化されることで増大又は抑制される。例えば Src チロシンキナーゼの Fyn が SH2 ドメインを介して TRPC6 タンパクの N 端領域と物理的に相互作用すること、及び Fyn による TRPC6 の Tyr リン酸化が TRPC6 のチャンネル活性を増大させることが報告されている。¹¹⁾ また、Src による TRPC3 チャンネルの Tyr リン酸化

が DAG 刺激による TRPC3 チャンネル活性化に必須であることも報告されている。¹²⁾ これに対し、PKC や PKG による TRPC チャンネルの Ser/Thr 残基のリン酸化は TRPC チャンネル活性を低下させる。¹³⁾ PKC は TRPC6 の細胞質 C 端領域にある 768 番目の Ser (Ser⁷⁶⁸) 残基をリン酸化し、PKG は TRPC3 の Thr¹¹ 残基及び Ser²⁶³ 残基又は TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基をリン酸化することでチャンネル活性を抑制する (Fig. 3)。特に TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基 (ヒト TRPC6 では Thr⁷⁰ 残基) や TRPC3 の Thr¹¹ 残基はリン脂質との親和性が高い pleckstrin homology (PH) 様ドメインに位置しており、C 端側の PH 様ドメインとリン脂質の結合はチャンネル活性の増強に係わることが報告されている。¹⁴⁾ TRPC のリン酸化が TRPC タンパクの膜局在を変化させないことから、Ser/Thr 残基のリン酸化は TRPC チャンネルの四量体構造を不安定化させている可能性が考えられる。

5. PDE5 阻害による TRPC6 チャンネルのリン酸化

シルデナフィル (商品名: バイアグラ) は、PDE5 阻害により PKG 依存的に末梢血管拡張を引き起こすことで性機能改善作用を発揮する。シルデナフィルは、米国では肺動脈性高血圧症にも適応されており、最近では心肥大や心不全にも効くという知見が出てきている。^{15,16)} PDE5 阻害剤は PKG 依

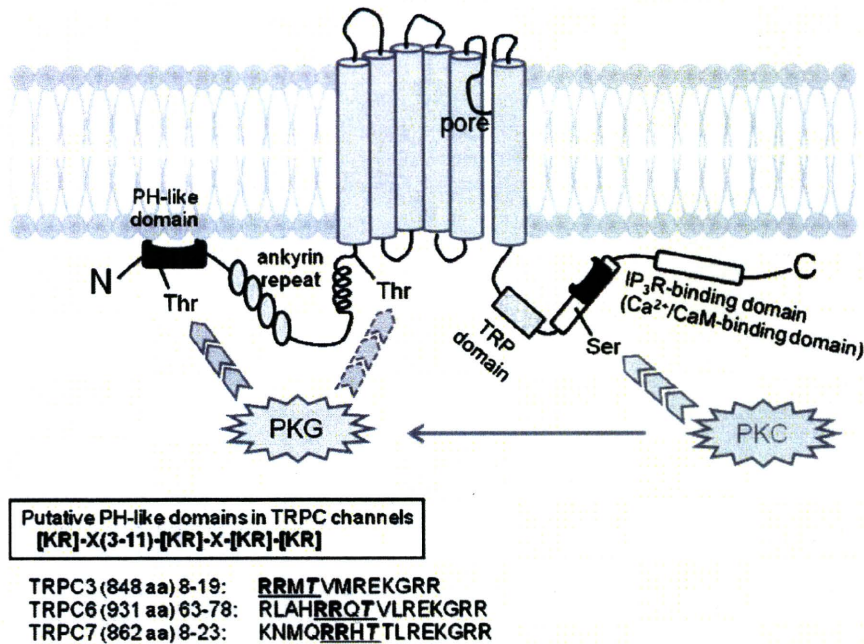


Fig. 3. Conserved Pleckstrin Homology (PH)-like Domains Including PKG Phosphorylation Sites in Human DAG-activated TRPC Channels

存的に様々なシグナル分子をリン酸化することで心血管保護作用を示すと考えられており、PDE5 阻害による心肥大抑制は Regulator of G protein Signaling (RGS) のリン酸化を介した三量体 G_q タンパク質シグナリングの抑制によるものだと考えられていた。¹⁷⁾しかし、われわれは G_q タンパク質の下流で生成される DAG の誘導で刺激した際に生じる Ca^{2+} シグナル応答もまた PDE5 阻害剤によって抑制されることに気がついた。この結果は、PDE5 阻害剤が DAG の下流のシグナル分子を抑制している可能性を示している。そこでわれわれは TRPC6 チャンネルに注目し、Thr⁶⁹ 残基がリン酸化されている TRPC6 タンパク (pTRPC6) を特異的に認識する抗体を作製した。HEK293 細胞に TRPC3, TRPC6, TRPC7 をそれぞれ過剰発現させ、膜透過型 cGMP アナログ (8-Br-cGMP) 刺激を行い、ウェスタンブロットを行った。TRPC チャンネルは糖鎖修飾を受けることが知られている。TRPC6 には細胞外ループに糖鎖修飾部位が 2 ヲ所存在するため、糖鎖修飾の有無により 100-120 kDa に 3 種類のバンドが検出される。TRPC6 を過剰発現させ、8-Br-cGMP で刺激したもののみのみ、スミアーバンドが検出された (Fig. 4)。一方、TRPC3 及び TRPC7 を過剰発現させた細胞では、pTRPC6 抗体で 8-Br-

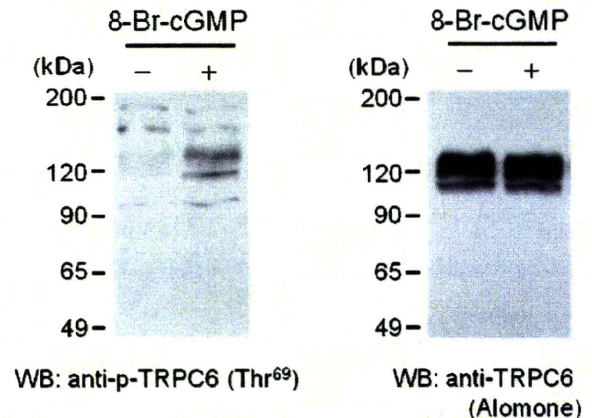


Fig. 4. Specific Recognition of TRPC6 Phosphorylation at Thr⁶⁹ by a Phospho-specific Antibody

Phosphorylation of TRPC6 at Thr⁶⁹ induced by PKG activation in vector-, TRPC3-, TRPC6- and TRPC7-expressing HEK293 cells. HEK293 cells were treated with 8-Br-cGMP (100 μ M) for 2 h. WB; western blotting.

cGMP 刺激によるリン酸化のバンドは検出されなかった。このリン酸化特異的なバンドは pTRPC6 抗原ペプチドをリン酸化抗体と一緒に反応させることで完全に消失し、非リン酸化 TRPC6 ペプチドと一緒に反応させてもバンドは消失しなかったことから、作製した pTRPC6 抗体が、TRPC6 の Thr⁶⁹ のリン酸化を特異的に認識していることが確認された。

次に、PDE5 阻害が心筋細胞に発現している

TRPC6 をリン酸化するかどうかを検討した。ラット新生児心筋細胞に心肥大応答を完全に抑制する濃度の PDE5 阻害剤を 1 時間処置すると、微弱ではあるが 8-Br-cGMP 刺激と同様に TRPC6 (Thr⁶⁹) のリン酸化バンドが観察された。PDE5 阻害剤処置による TRPC6 のリン酸化もまた KT5823 の処置によって完全に抑制された。Kass らのグループは以前、シルデナフィル (100 mg/kg/d) をマウスに 1 週間経口投与することで、圧負荷による心肥大が抑制されることを報告している。¹⁸⁾ 彼らと全く同じ条件で、マウスにシルデナフィル (100 mg/kg/d) を 1 週間投与したところ、心臓での TRPC6 (Thr⁶⁹) のリン酸化レベルが有意に増加していることがわかった。この結果より、*in vitro* で心肥大抑制効果を示す濃度の PDE5 阻害剤が TRPC6 チャンネルをリン酸化し得るように、*in vivo* においても心肥大抑制効果を示す用量の PDE5 阻害剤が、確かに TRPC6 (Thr⁶⁹) をリン酸化していることが明らかとなった。

6. PDE5 阻害による心肥大抑制作用における TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基の関与

ラット新生児心筋細胞に野生型 TRPC6 (TRPC6) 又は TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基をアラニンに置換した変異体 (TRPC6-T69A) を発現させ、エンドセリン (ET-1) 刺激を行い、心肥大応答 (細胞面積の増加とアクチン再構築) を測定した。TRPC6-WT 又は TRPC6-T69A を発現させておくと、発現させない場合と比較してより強い肥大応答が観察された。TRPC6-WT 発現による肥大増強効果は PDE5 阻害剤処置により完全に抑制されたものの、TRPC6-T69A 発現による肥大増強効果は PDE5 阻害剤により抑制されなかった (Fig. 5)。これらの結果より、PDE5-I 処置による肥大応答抑制には、TRPC6 の Thr⁶⁹ のリン酸化が必要であることが示された。

7. メカニカルストレス刺激による Ca²⁺ 応答に対する PDE5 阻害剤の効果

心臓は圧負荷によって肥大する。機械的伸展刺激は、*in vitro* の圧負荷のモデルとして一般的に用いられている。TRPC6 は受容体刺激以外にも、メカニカルストレスによって活性化することが報告されている。そこで、PDE5 阻害剤が機械的伸展刺激によって誘発される肥大応答を抑制するかどうかを検討するため、Fig. 6(A) に示すような伸展装置を顕微鏡上に設置した。ラット新生児心筋細胞に一過的

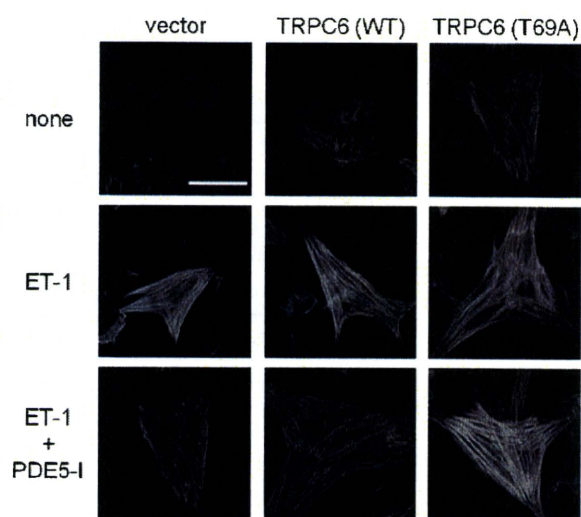


Fig. 5. Phosphorylation of Thr⁶⁹ Is Essential for the Anti-hypertrophic Effects of PDE5 Inhibition

Effects of PDE5-I on the ET-1-induced actin reorganization in vector, TRPC6 (WT), TRPC6 (T69A)-overexpressing cardiomyocytes. Cardiomyocytes were treated with PDE5-I (10 μ M) for 20 min before the addition of ET-1 (100 nM). Scale bar=50 μ m.

な機械的伸展刺激を加え、刺激後の細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を測定したところ、Ca²⁺ オシレーションが観察された (Fig. 6)。この Ca²⁺ オシレーションは PDE5 阻害剤を処置することで完全に抑制された。PDE5 阻害剤による Ca²⁺ オシレーションの抑制は、KT5823 (1 μ M) を処置することで解除された。機械的伸展刺激で生じる Ca²⁺ オシレーションは、TRPC チャンネル選択的阻害剤 (BTP2) や TRPC6 の恒常的不活性型変異体を発現させることによっても抑制されたことから、機械的伸展刺激により TRPC6 チャンネルを介したカチオン流入が誘発されることで、膜電位変化 (脱分極) が生じている可能性が示された。さらに、心筋細胞に持続的な機械的伸展刺激を行ったところ、NFAT の転写活性、心肥大マーカー [脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)] の発現、タンパク合成は顕著に増大した。これらの増大は、PDE5 阻害剤により有意に抑制された。以上の結果から、PDE5 阻害剤は、機械的伸展刺激によって生じる心筋細胞内への Ca²⁺ 流入を抑制することで、肥大応答を抑制することが示唆された。

8. おわりに

初代培養ラット心筋細胞を用いた解析で、われわれは、PDE5 阻害剤による心肥大抑制効果のメカニ

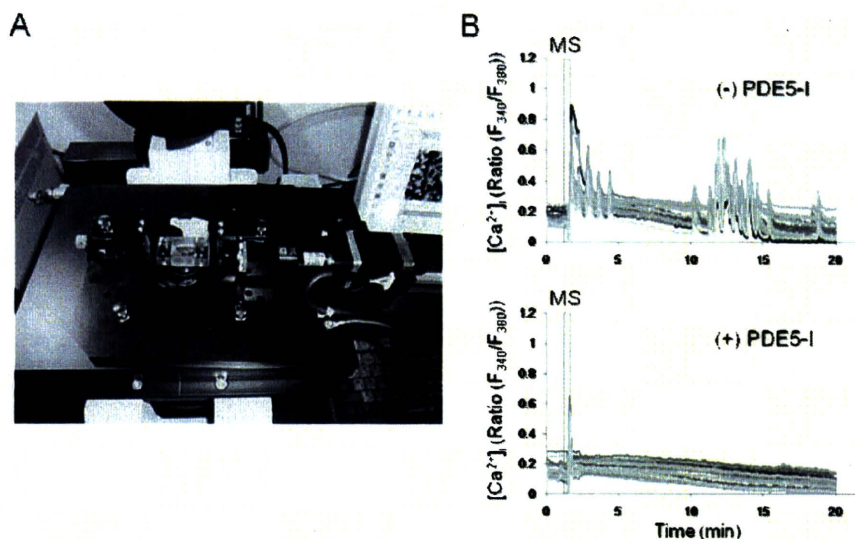


Fig. 6. Inhibition of PDE5 Suppresses Ca^{2+} Responses Induced by Mechanical Stretch

(A) Images of mechanical stretch machine (Strex Co. Ltd.). Twenty % of mechanical stretch at the speed of 90 mm/sec was performed for 3 sec. (B) Traces of Ca^{2+} responses induced by mechanical stretch (MS) in the absence or presence of PDE5-I ($10 \mu\text{M}$). More than 20 cardiomyocytes were monitored in each experiment.

ズムに TRPC6 の Thr⁶⁹ 残基のリン酸化が必要であることを見出した。われわれのグループはつい最近、PDE5 阻害剤のみならず心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) もまた TRPC6 チャンネルの Thr⁶⁹ 残基のリン酸化を介して心肥大を抑制し得ることを報告した。¹⁹⁾ この知見より、NO 供与剤や ANP 製剤、PDE5 阻害剤など細胞内 cGMP 濃度を上昇させるすべての薬剤が、Thr⁶⁹ 残基のリン酸化による TRPC チャンネル活性の抑制という共通のメカニズムを介して心肥大を抑制する可能性が示された。また、PKG でリン酸化される部位はプロテインキナーゼ A によってもリン酸化されることから、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬もまた心肥大抑制作用を示す可能性が期待できる。さらに、TRPC6 は血管平滑筋細胞にも多く発現しており、心筋での役割と同様に細胞肥大に関与する可能性が考えられる。今後、DAG 活性化 TRPC チャンネルを直接あるいは間接的に抑制する化合物を同定することで、新しいタイプの心血管疾患治療薬のシードが見つかるかもしれない。

現在、イオンチャンネルの一塩基多型 (SNP) 解析が精力的に進められている。ポジショナルクローニング解析から、腎糸球体硬化症の家系で TRPC6 チャンネルの活性化型変異体が同定されている。例えば、P112Q 変異体では TRPC6 チャンネルを介する

Ca^{2+} 流入が増大し、R895C, E897K 変異体では TRPC6 電流量が増大することが明らかにされている。^{20,21)} 遺伝病の SNP 中に TRPC6 の Thr⁷⁰ 残基の変異体はみつかっていない。しかし、Thr⁷⁰ 残基の変異は硝酸薬や PDE5 阻害薬の薬剤耐性にも関与する可能性があるため、今後は SNP 解析を含めて DAG 活性化 TRPC チャンネルの生理機能をより詳細に解析していく必要があるだろう。

本研究は九州大学の動物実験委員会及び遺伝子組換え委員会で承認されており、九州大学及び文部科学省の定める動物実験ガイドラインに従って実施されたものである。

REFERENCES

- 1) Onohara N., Nishida M., Inoue R., Kobayashi H., Sumimoto H., Sato Y., Mori Y., Nagao T., Kurose H., *EMBO J.*, **25**, 5305–5316 (2006).
- 2) 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).
- 3) Nishida M., Watanabe K., Sato Y., Nakaya

- M., Kitajima K., Ide T., Inoue R., Kurose H., *J. Biol. Chem.*, **285**, 13244–13253 (2010).
- 4) Santana L. F., *Circ. Res.*, **103**, 681–683 (2008).
 - 5) Colella M., Grisan F., Robert V., Turner J. D., Thomas A. P., Pozzan T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2859–2864 (2008).
 - 6) Lucas P., Ukhanov K., Leinders-Zufall T., Zufall F., *Neuron*, **40**, 551–561 (2003).
 - 7) Nakayama H., Wilkin B. J., Bodi I., Molken-
tint J. D., *FASEB J.*, **20**, 1660–1670 (2006).
 - 8) 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).
 - 9) Wu X., Eder P., Chang B., Molken-
tint J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7000–7005
(2010).
 - 10) Seth M., Zhang Z.-S., Mao L., Graham V.,
Burch J., Stiber J., Tsiokas L., Winn M.,
Abramowitz J., Rockman H. A., Birnbaumer
L., Rosenberg P., *Circ. Res.*, **105**, 1023–1030
(2009).
 - 11) Hisatsune C., Kuroda Y., Nakamura K., Ino-
ue T., Nakamura T., Michikawa T., Mizutani
A., Mikoshiba K., *J. Biol. Chem.*, **279**, 18887–
18894 (2004).
 - 12) Vazquez G., Wedel B. J., Kawasaki B. T.,
Bird G. S., Putney J. W. Jr., *J. Biol. Chem.*,
279, 40521–40528 (2004).
 - 13) Yao X., *Handb. Exp. Pharmacol.*, **179**, 527–
540 (2007).
 - 14) Nilius B., Owsianik G., Voets T., *EMBO J.*,
27, 2809–2816 (2008).
 - 15) Galiè N., Rubin L. J., Simonneau G., *N.
Engl. J. Med.*, **362**, 559–60 (2010).
 - 16) Lewis G. D., Lachmann J., Camuso J., Le-
pore J. J., Shin J., Martinovic M. E., Systrom
D. M., Bloch K. D., Semigran M. J., *Circula-
tion*, **115**, 59–66 (2007).
 - 17) Takimoto E., Koitabashi N., Hsu S., Ketner
E. A., Zhang M., Nagayama T., Bedja D.,
Gabrielson K. L., Blanton R., Siderovski D.
P., Mendelsohn M. E., Kass D. A., *J. Clin.
Invest.*, **119**, 408–420 (2009).
 - 18) Takimoto E., Champion H. C., Li M., Belardi
D., Ren S., Rodriguez E. R., Bejia D.,
Gabrielson K. L., Wang Y., Kass D. A., *Nat.
Med.*, **11**, 214–222 (2005).
 - 19) Kinoshita H., Kuwahara K., Nishida M.,
Jiang Z., Rong X., Kiyonaka S., Kuwabara
Y., Kurose H., Inoue R., Mori Y., Li Y.,
Nakagawa Y., Usami S., Fujiwara M., Yama-
da Y., Minami T., Ueshima K., Nakao K.,
Circ. Res., **106**, 1849–1860 (2010).
 - 20) Winn M. P., Conlon P. J., Lynn K. L., Far-
rington 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).
 - 21) Reiser J., Polu K. R., Möller C. C., Kenlan
P., Altintas M. M., Wei C., Faul C., Herbert
S., Villegas I., Avila-Casado C., McGee M.,
Sugimoto H., Brown D., Kalluri R., Mundel
P., Smith P. L., Clapham D. E., Pollak M.
R., *Nat. Genet.*, **37**, 739–744 (2005).

Pertussis Toxin Up-regulates Angiotensin Type 1 Receptors through Toll-like Receptor 4-mediated Rac Activation^{*[5]}

Received for publication, October 15, 2009, and in revised form, March 8, 2010. Published, JBC Papers in Press, March 15, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.076232

Motohiro Nishida[‡], Reiko Suda[‡], Yuichi Nagamatsu[‡], Shihori Tanabe[§], Naoya Onohara[‡], Michio Nakaya[‡], Yasunori Kanaho[¶], Takahiro Shibata^{||}, Koji Uchida^{||}, Hideki Sumimoto^{**}, Yoji Sato[§], and Hitoshi Kurose^{†1}

From the [‡]Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and the ^{**}Department of Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, the [§]Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo 158-8501, the [¶]Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Comprehensive Sciences and Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, and the ^{||}Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

Pertussis toxin (PTX) is recognized as a specific tool that uncouples receptors from G_i and G_o through ADP-ribosylation. During the study analyzing the effects of PTX on Ang II type 1 receptor (AT1R) function in cardiac fibroblasts, we found that PTX increases the number of AT1Rs and enhances AT1R-mediated response. Microarray analysis revealed that PTX increases the induction of interleukin (IL)-1 β among cytokines. Inhibition of IL-1 β suppressed the enhancement of AT1R-mediated response by PTX. PTX increased the expression of IL-1 β and AT1R through NF- κ B, and a small GTP-binding protein, Rac, mediated PTX-induced NF- κ B activation through NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species. PTX induced biphasic increases in Rac activity, and the Rac activation in a late but not an early phase was suppressed by IL-1 β siRNA, suggesting that IL-1 β -induced Rac activation contributes to the amplification of Rac-dependent signaling induced by PTX. Furthermore, inhibition of TLR4 (Toll-like receptor 4) abolished PTX-induced Rac activation and enhancement of AT1R function. However, ADP-ribosylation of G_i/G_o by PTX was not affected by inhibition of TLR4. Thus, PTX binds to two receptors; one is TLR4, which activates Rac, and another is the binding site that is required for ADP-ribosylation of G_i/G_o.

established as a pharmacological tool for a specific inhibitor of G_i signaling. PTX is composed of A-protomer and B-oligomer, and A-protomer exerts ADP-ribosyltransferase activity on the α subunit of heterotrimeric G_i proteins (G α_i), leading to inhibition of receptor-G protein coupling (1, 2), whereas B-oligomer of PTX recognizes and binds carbohydrate-containing receptors that deliver A-protomer into the cytosol (3). However, several reports have demonstrated that PTX has additional effects, such as enhancement of immune responses (4–6), increase in adenosine A₁ receptor density (7), and activation of tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and NF- κ B (8–10). These effects of PTX are reported to be independent of G_i modification.

Angiotensin (Ang) II plays an important role in the regulation of hypertrophy and/or hyperplasia of cardiovascular cells (11–13). In cardiac fibroblasts, Ang II has been demonstrated to stimulate the processes related to extracellular matrix remodeling (14). The biological function of Ang II is mediated by Ang II receptors located on the plasma membrane. Two isoforms (type 1 (AT1) and type 2 (AT2)) of Ang II receptor have been identified, but most of the cardiovascular effects of Ang II are attributed to AT1R (15). AT1R belongs to the G_q-coupled receptor family. Stimulation of AT1R activates phospholipase C and increases [Ca²⁺]_i through the production of inositol 1,4,5-trisphosphate, leading to the modulation of fibroblast activities, such as cell proliferation and extracellular matrix protein synthesis (16).

An increase in AT1R density is one of the features to enhance fibrogenic responses of the heart. For example, an increase in AT1R density has been reported in the heart after myocardial infarction (17, 18) and in hearts from biopsies from patients with spontaneous intracerebral hemorrhage (19). Several cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β , have been reported to up-regulate AT1R (17, 20). However, the molecular mechanism responsible for the increase in AT1R density is still unknown.

Many studies suggest that low concentration of ROS acts as a second messenger in the cardiovascular system (21, 22). Stimulation of IL-1 β and TNF- α induces ROS production through

PTX,² a major virulence factor of Gram-negative bacillus *Bordetella pertussis*, which causes whooping cough, is well

^{*} This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (to M. Nishida, M. Nakaya, and H. K.); a grant-in-aid for scientific research on Innovative Areas (to M. Nishida); a grant-in-aid for scientific research on Priority Areas (to H. K.); and grants from the Nakatomi Foundation, Sapporo Bioscience Foundation, and Naito Foundation (to M. Nishida).

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables 1 and 2 and Figs. 1–4.

The data discussed in this study have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and are accessible through GEO Series accession number GSE5017.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel./Fax: 81-92-642-6884; E-mail: kurose@phar.kyushu-u.ac.jp.

² The abbreviations used are: PTX, pertussis toxin; Ang II, angiotensin II; AT1R, Ang II type 1 receptor; DN-Rac and DN-p47^{phox}, dominant negative Rac and p47^{phox}, respectively; DPI, diphenyleneiodonium; GFP, green fluorescent protein; ct, carboxyl terminal region; I κ B α m, non-phosphorylated form of I κ B α , which works as a dominant negative mutant; IL, interleukin; MOI, multiplicity of infection; NF- κ B, nuclear factor κ B; I κ B, inhibitor of κ B; PH, pleckstrin homology; PI, phosphatidylinositol; PI-3-P, PI 3-phosphate; PLC, phospholipase C; PX, *phox* homology; Ro-106-9920, 6-(phenylsulfonyl)tet-

razolo[1,5-b]pyridazine; ROS, reactive oxygen species; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; WT, wild type; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; siRNA, small interfering RNA.

NADPH oxidase activation (23). A small GTP-binding protein, Rac, regulates the activity of NADPH oxidase (24) and mediates IL-1 β - or TNF- α -induced ROS production and NF- κ B activation (25). We have previously reported that Rac mediates Ang II-stimulated ROS production through NADPH oxidase activation in cardiac myocytes and cardiac fibroblasts (26, 27). Overexpression of constitutively active Rac1 induces hypertrophic responses in isolated cardiomyocyte and dilated cardiomyopathy *in vivo* (28, 29). Although a high concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) is reported to decrease AT1R density (30), it is unknown whether production of low concentration of ROS via Rac-mediated NADPH oxidase activation participates in the receptor-stimulated increase in AT1R density of cardiac cells.

Toll-like receptors (TLRs) play a critical role in both innate and adaptive immunity (31). There are at least 10 TLRs identified so far in humans, which specifically recognize and bind to a variety of pathogenic factors, including lipopolysaccharide. The mouse heart expresses at least six receptors (TLR2, -3, -4, -5, -7, and -9), and the stimulation of these receptors induces activation of NF- κ B. TLR2 and TLR4 have been extensively studied in the heart, and both receptors are in part responsible for cardiac dysfunction in certain pathological conditions (32). Recent studies have elucidated that PTX functions as a superior ligand for TLR4 (6, 10). Although stimulation of TLR4 results in production of proinflammatory cytokines, it has not been reported that PTX exerts some pharmacological action(s) through TLR4 in cardiovascular cells, and it is unknown whether PTX-induced ADP-ribosylation of G_i/G_o requires TLR4-mediated entry into cells.

During the study of the role of G_i proteins in AT1R-mediated fibrotic responses using rat neonatal cardiac fibroblasts, we found that PTX enhances Ang II-induced increase in [Ca²⁺]_i. Because we previously reported that the treatment with PTX increases Rac activity in rat neonatal cardiac myocytes (26), we hypothesized that Rac is implicated in PTX-induced enhancement of Ang II signaling in cardiac fibroblasts. In this study, we demonstrate that PTX B-oligomer induces Rac activation through a pathway independent of ADP-ribosylation of G_i/G_o. PTX increases IL-1 β induction through sequential activation of TLR4, Rac, NADPH oxidase, and NF- κ B, which leads to AT1R up-regulation through amplification of Rac-dependent signaling in rat cardiac fibroblasts.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials, Recombinant Adenoviruses, and Culture of Cardiac Fibroblasts—PTX, simvastatin, and anti-G $\alpha_{q/11}$ antibody were purchased from Calbiochem. Ang II was from Peptide Institute. Mastparan-7, ATP, wortmannin, and diphenyleneiodonium (DPI) were purchased from Sigma. Ro-106-9920 was from Tocris. Rat IL-1 β and PTX B-oligomer were from Wako. Rabbit anti-rat IL-1 β antibody and the rat IL-1 β ELISA kit were from Endogen. Anti-G α_{11} , anti-PLC β_3 , anti-I κ B α , anti-p65, anti-RhoA, anti-rabbit IgG, and anti-mouse IgG antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). [¹²⁵I]Ang II, [³²P]NAD, and glutathione-Sepharose beads were from Amersham Biosciences. Anti-Rac1 and anti-Rap1 antibodies were from Transduction Laboratories. Anti-Ras antibody was from Upstate Biotechnology. Anti-phospho-

Akt and anti-Akt antibodies were from Cell Signaling. Fura2/AM was from Dojindo. 2,7-dichlorofluorescein diacetate and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody were from Molecular Probes. Collagenase and Fugene 6 were from Roche Applied Science. Dual luciferase reagents were from Promega. pNF- κ B-Luc and pRL-SV40 were from Stratagene. The sequences coding the Rap1-binding domain of Ral-GDS, Rac-binding domain of p21-activated kinase, Rho-binding domain of rhotekin, or Ras-binding domain of Raf were cloned, sequenced, and ligated into pGEX-4T-1 to make glutathione S-transferase fusion protein constructs. Glutathione S-transferase fusion proteins were expressed at room temperature and purified using glutathione-Sepharose as described (33). The cDNA encoding GRP1-PH was provided by Dr. Alexander Gray (University of Dundee, Scotland). Recombinant adenoviruses of GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2)-ct, RGS4 (regulator of G protein signaling 4), WT G α_i , G α_i -ct, I κ B α m, GFP-fused WT Rac, GFP-fused constitutively active Rac (G12V), DN-Rac (T17N), DN-p47^{phox}, and p115-RGS were produced as described previously (26, 34). Stealth siRNAs oligonucleotides for rat IL-1 β , TLR4, and Rac1 were from Invitrogen. Sequences of stealth siRNA used were described in supplemental Table 1. Cardiac fibroblasts were prepared from ventricles of 1–2-day-old Sprague-Dawley rats, as described previously (27).

Quantification of Intracellular Ca²⁺ and ROS Concentration—[Ca²⁺]_i was measured by the method described previously (35). Briefly, cells (5 × 10⁴) were plated on a 3 × 10-mm microcoverglass (MATSUNAMI) and loaded with 1 μ M fura-2/AM in the cultured medium at 37 °C for 30 min. Cells were washed with HEPES-buffered salt solution containing 107 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES (pH 7.4), and 11.5 mM glucose. Measurement of intracellular ROS concentration was performed in 2 mM Ca²⁺-containing HEPES-buffered salt solution with a fluorescent dye, 2,7-dichlorofluorescein diacetate, as described previously (27). Fluorescence images were recorded and analyzed with a video image analysis system (Aquacosmos, Hamamatsu Photonics). The peak changes ($\Delta F/F_0$) of dichlorofluorescein fluorescence intensity were identified as values obtained by subtracting the basal fluorescence intensity (F₀) from the maximal intensity during a 15-min PTX treatment.

Measurement of IL-1 β mRNA and Protein Expression—Expression of IL-1 β mRNA and protein was measured by real time reverse transcription-PCR and ELISA, as described previously (36). For the preparation of real time reverse transcription-PCR analysis, cells (3 × 10⁵) plated on 6-well dishes were treated with PTX for 24 h and lysed with 400 μ l of RLT buffer (Qiagen). For ELISA, cells (1 × 10⁵) on 12-well dishes were treated with PTX (100 ng/ml) in 500 μ l of medium, and cells were then collected together with medium. After cells were homogenized with a 26-gauge syringe, 100 μ l of supernatants were used. Assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Microarray Analysis—Cells (1 × 10⁶) plated on 35-mm dishes were treated with PTX for 24 h and lysed with 400 μ l of RLT buffer. Total RNA was extracted with the RNeasy minikit (Qiagen) and RNase-free DNase set (Qiagen). Total RNA was converted to biotin-labeled cRNA, which was hybridized to the

Up-regulation of AT1 Receptors by Pertussis Toxin

rat genome U34A GeneChip (Affymetrix) for 16–24 h at 45 °C. The hybridization signals on the microarray were scanned and computed at a target intensity of 500 by a GeneChip Scanner 3000 and GeneChip Operating Software (Affymetrix), respectively. The data analysis was performed as follows. At the first step, probe sets without expression in the fibroblasts, which were indicated as absent by absolute analysis in more than half of the replicates in both the control and PTX-treated groups, were eliminated from the data set. Then, if the difference in the mean signal intensity of a given probe set was equal to the cut-off (1.25-fold) or more between the control and PTX-treated groups and if its *p* value calculated by Student's *t* test was less than 0.05, that probe set was employed. At the last step, probe sets with an annotation "signal transduction" (GO:0007165) in the AmiGO data base (available on the World Wide Web) were extracted, using the NetAffx Gene Ontology Mining Tool (available on the World Wide Web).

Ang II Binding Assay—Measurement of Ang receptor binding was performed according to the previous report (15) with a slight modification. After various treatments for 24 h, cardiac fibroblasts were rinsed with 10 ml of ice-cold phosphate-buffered saline and mechanically detached in 1 ml of ice-cold lysis buffer containing 10 mM Tris, pH 7.4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 μg/ml benzamidine, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor (type II-S), and 5 μg/ml leupeptin. The cell lysate was centrifuged at 45,000 × *g* for 10 min at 4 °C. The pellet containing crude membrane fraction was resuspended in 1 ml of ice-cold lysis buffer with a Potter type homogenizer, frozen, and stored at –80 °C until use. After the concentration of membrane protein was determined, membrane protein (20 μg) was used for the binding studies. The membrane was incubated with 0.1 nM ¹²⁵I-Ang II in 75 mM Tris, pH 7.4, 12.5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and increasing concentrations of unlabeled Ang II (0–14 nM) for 1 h at 25 °C. Nonspecific binding was determined in the presence of 1 μM unlabeled Ang II. The reaction mixture was filtered over Whatman GF/C filters. The filters were washed with ice-cold buffer containing 25 mM Tris, pH 7.4, and 1 mM MgCl₂. The bound ¹²⁵I-Ang II on the filters was measured with a γ-counter. The values of *K_d* and *B_{max}* were calculated by Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Measurement of NF-κB Activity—After adenovirus was infected at 100 MOI for 2 h in serum-free medium, fibroblasts (3 × 10⁵ cells) in a 24-well plate were transiently co-transfected with 0.45 μg of pNF-κB-Luc and 0.05 μg of pRL-SV40 control plasmid, using Fugene 6 (27). Luciferase activity was measured 48 h after transfection with dual luciferase reagents.

Measurement of Small GTPase Activities—Activation of small G proteins was determined as described previously (26). Activated Rac, Rho, Ras, and Rap1 were pulled down with 5 μg of glutathione *S*-transferase-fused Rac-interacting domain of p21-activated kinase (PAK-CRIB), Rho-binding domain of rho-tekkin (34), Ras-binding domain of Raf-1 (37), and Rap1-binding domain of Ral-GDS (38), respectively. Pulled-down small G proteins were detected with anti-Rac1, anti-RhoA, anti-Ras and anti-Rap1 antibodies. For knockdown of Rac1, cells were transfected with a mixture of Rac1 siRNAs (50 nM each) for 72 h.

Confocal Visualization of GFP-fused Proteins and NF-κB p65 Subunit—Cells (1 × 10⁵) plated on glass bottom 35-mm dishes were infected for 24 h with GFP, GFP-Rac, GFP-constitutively active Rac, GFP fusion protein with PX domain of p40^{phox} (p40^{phox}-PX), and p40^{phox}-PX (R105K). After the treatment with PTX (100 ng/ml) for 24 h, cells were fixed by 10% formaldehyde neutral buffer solution. For localization of NF-κB, cells were stained with anti-p65 antibody. Fluorescence images were measured at an excitation wavelength of 488 nm with a laser-scanning confocal imaging system (Carl Zeiss LSM510).

In Vitro PTX-catalyzed ADP-ribosylation Assay—*In vitro* ADP-ribosylation of Gα_i proteins by PTX was performed as described previously (39) with a slight modification. Briefly, cardiac fibroblasts pretreated with or without 100 ng/ml PTX for 24 h were harvested with ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 μg/ml benzamidine, 5 μg/ml aprotinin, and 5 μg/ml leupeptin. After centrifugation at 15,000 rpm for 10 min at 4 °C, the pellet was resuspended in lysis buffer. PTX was preactivated by incubation in the solution containing 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM ATP, 20 mM dithiothreitol, and 1 mg/ml bovine serum albumin for 30 min at 30 °C. Then activated PTX was added to the assay mixture, including 100 μg of the membrane, and incubated for 60 min at 30 °C. The final concentrations of all reagents in the assay mixture were as follows: 50 mM Tris (pH 7.5), 50 μM GDP, 10 mM thymidine, 5 μM NAD, 0.5 μM [³²P]NAD, 20 μg/ml PTX, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM ATP, and 4 mM dithiothreitol. The reaction was stopped by the addition of an excessive amount of ice-cold 50 mM Tris (pH 7.5), and the samples were centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet was solubilized in SDS sample buffer, boiled, and subjected to 12% SDS-PAGE. Radioactive bands were detected by filmless autoradiographic analysis (BAS2000 system, Fujifilm).

Statistical Analysis—The results are presented as mean ± S.E. from at least three independent experiments. The representative data of time course experiments were plotted from one of three similar experiments that were performed with more than 20 cells. The mean values were compared with control by one-way analysis followed by Dunnet's *t* test (for three or more groups) or Student's *t* test (for two groups).

RESULTS

PTX Enhances Ang II-induced Ca²⁺ Release through AT1R Up-regulation—During the study of AT1R function in cardiac fibroblasts, we found that treatment with PTX enhances transient increase in [Ca²⁺]_i induced by Ang II at low concentration in the absence of extracellular Ca²⁺ (Fig. 1A). The EC₅₀ value of Ang II for the changes in [Ca²⁺]_i increases was 464 ± 44 pM in control cells, whereas the EC₅₀ value was decreased to 91 ± 33 pM in PTX-pretreated cells (Fig. 1B). However, the ATP-induced Ca²⁺ release was not affected by PTX (Fig. 1C). These results suggest that PTX selectively enhances Ca²⁺ response induced by AT1R stimulation. We also found that treatment with PTX for 24 h resulted in a 2-fold increase in maximal ¹²⁵I-Ang II binding activity (*B_{max}*) in comparison with PTX-untreated membrane (Fig. 1D). PTX increased AT1R density in a time-dependent manner, and more than 18 h was required for a 2-fold increase in AT1R density (supplemental Fig. 1). The