

綜 説

末梢循環障害の創薬標的としての TRPC6チャネル阻害の可能性

富田 拓郎

信州大学医学部分子薬理学教室

Therapeutic Potential of TRPC6 Channel Inhibition for Peripheral Arterial Disease

Takuro NUMAGA-TOMITA

Department of Molecular Pharmacology, Shinshu University School of Medicine

Key words: TRPC6, peripheral arterial disease, vessel maturation, vascular smooth muscle cells, endothelial protection

TRPC6チャネル, 末梢循環障害, 血管成熟, 血管平滑筋細胞, 血管内皮保護

I はじめに

末梢循環血流の恒常性維持は、多くの組織の健全な機能において必須である。肥満・高血圧・運動不足といったリスク因子により、動脈硬化が進行し、末梢動脈が閉塞することで末梢循環障害が引き起こされる。末梢循環障害のうち最も多くかつ重要な疾患である下肢閉塞性動脈疾患は、動脈硬化による末梢動脈の閉塞に伴い虚血性症状を示す疾患であり、手足の冷え、間欠性跛行（歩行時の足の痛み）から最終的には壊死に至り下肢切断となる予後不良の疾患である¹⁾。治療法としては、動脈硬化を進展させる危険因子の除去を目指した薬物療法、抗血小板薬の服用や、最終的には外科的な血行再建術が行われる。間欠性跛行を呈する患者に対しては、血流を改善させるために積極的な運動療法が推奨されている。また抗血小板作用や血管拡張作用を有するシロスタゾールが間欠性跛行に対する唯一の承認薬として使用されている²⁾。マウスを用いた病態モデルにおいて、末梢循環障害の改善には、閉塞した主要動脈をバイパスする側副血行路の拡大及び新たな血管形成が重要であることが明らかにされてきた³⁾。すでに様々な因子が、末梢血流の改善に重要であることが報告されている⁴⁾。そのため、これら因子の機能抑制は、基本的に末梢循環の改善に対して負の影響を与える。最近、我々は、非選択的カチオンチャ

ネル transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) が、これまでとは逆に、血流回復を負に制御する因子であることを明らかにした⁵⁾。そして、TRPC6の抑制が、成体における血管形成を促進する効果があることを明らかにした。本稿では、これら最近の研究結果を紹介するとともに末梢循環改善薬の標的分子としてのTRPC6の可能性を紹介する。

II Transient receptor potential (TRP)

チャネルスーパーファミリー

Transient receptor potential は、ショウジョウバエの光受容シグナル変異から同定された遺伝子であり、非選択的カチオンチャネルをコードする。哺乳類においては28種類のホモログがこれまでに同定されており、アミノ酸配列比較から、6種類のサブファミリー (TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML, TRPC) に分類されている⁶⁾。TRP vanilloid (TRPV) ファミリーは、辛み成分であるカプサイシンの受容体であるTRPV1を含むTRPV1-6により構成される⁷⁾。TRPVファミリーは、細胞外の温度、pH、浸透圧などさまざまな外環境変化により活性化し、環境変化のセンサーとしての機能が注目されている。TRP melastatin (TRPM) はマウスの悪性黒色腫（メラノーマ）において発現抑制される遺伝子 Melastatin (TRPM1) との相同性により区分される。TRPMファミリーは、TRPM1-8までのホモログが知られ、TRPVと同様に細胞外の温度（主に冷感）等により活性化される⁸⁾。またカチオンの透過性において、Ca²⁺とMg²⁺の違

Corresponding author: 富田拓郎 〒390-8621
松本市旭3-1-1 信州大学医学部分子薬理学教室
E-mail: ta96tomita@shinshu-u.ac.jp

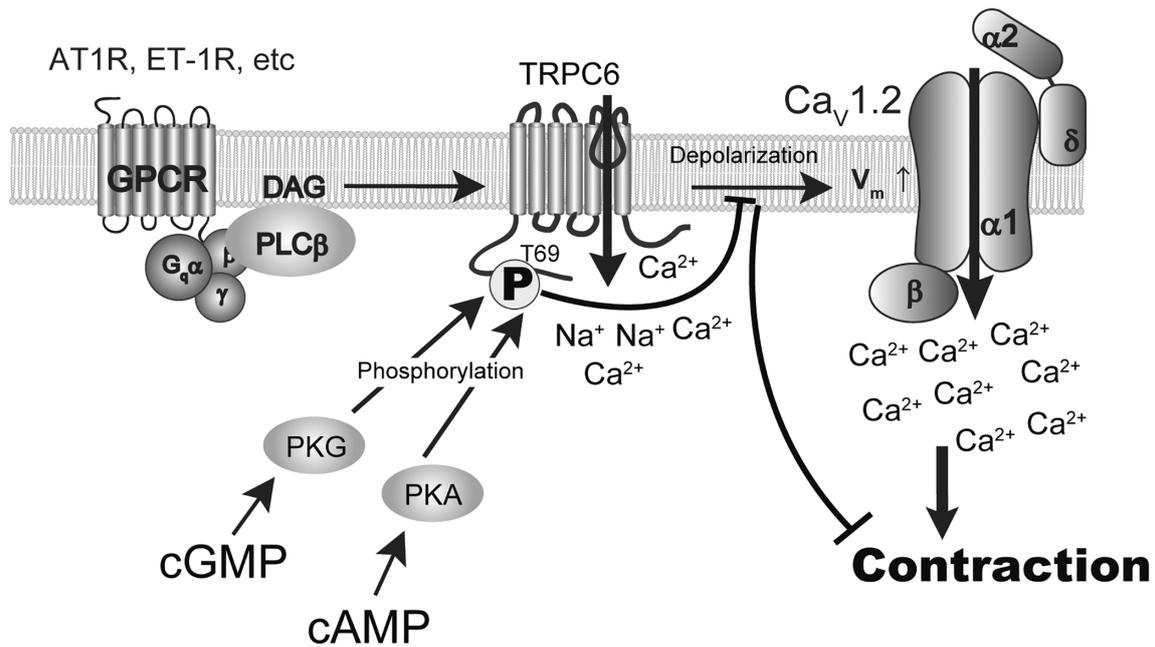


図1 血管平滑筋細胞の収縮における TRPC6チャネルの重要性

TRPC6は血管収縮因子刺激による PLC 経路の下流でジアシルグリセロール (DAG) により活性化し、カチオンを流入させる。それにより細胞膜が脱分極し、電位依存性 Ca²⁺チャネルが活性化し、平滑筋収縮が引き起こされる。TRPC6は PKG あるいは PKA の活性化により69番目のトレオニンがリン酸化され抑制される。それにより脱分極が抑制されるため血管は弛緩する。

いを持つなどの特徴が知られている。TRP ankyrin (TRPA) チャネルは TRPA1のみにより構成される。TRPA1は、ショウジョウバエにおける侵襲刺激感受性変異遺伝子 *painless* のホモログであり、さまざまな侵襲刺激、化学刺激 (特に酸化還元反応) により活性化される⁹⁾。近年では、ガンとの関連性から注目されている¹⁰⁾。TRPML (mucolipin) は、他の TRP チャネルと異なり、細胞膜上に発現せず、エンドリソソームからの Ca²⁺放出に関与することが最近明らかにされた TRP チャネルである¹¹⁾。TRPP (polysistin) は、多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease) の原因遺伝子である TRPP2およびそのホモログである TRPP3, TRPP5により構成される¹²⁾。

本稿にて紹介する TRPC6は TRPC (canonical) ファミリーに属する。TRPC ファミリーは最も進化的に保存された TRP チャネルであり、Gタンパク質共役型受容体や受容体型チロシンキナーゼの下流でホスホリパーゼC (PLC) 依存的に活性化するチャネルである¹³⁾。TRPC1-7の7種の哺乳類ホモログが知られる。ただし、TRPC2はヒトにおいては偽遺伝子である。活性化機構の違いにより、さらに TRPC1/4/5 と TRPC3/6/7に区分される¹⁴⁾。TRPC1/4/5は、細胞

内カルシウムストアと関連して活性化することがこれまでに明らかにされている¹⁵⁾。そして、TRPC3/6/7は、PLC の活性化により phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) の加水分解で生じるジアシルグリセロール (DAG) により活性化される¹⁶⁾。mRNA レベルでの TRPC チャネルの組織発現は多くが中枢神経系で高い。中枢神経系に比べると周辺組織での発現は非常に低い。しかしながら TRPC3/6については、心臓、腎臓、血管平滑筋などの循環系組織において重要な働きをしていることがこれまでに明らかにされている¹⁶⁾。

III TRPC6

TRPC6は、他の TRP チャネルと同様に、6回膜貫通型タンパク質であり、N末端、C末端ともに細胞質側に露出する (図1)。4つのタンパク質が相互作用することにより、機能的なチャネル分子を構成する。5回目と6回目の膜貫通ドメインの間にチャネルのポアを形成するポア領域がある。TRPC6は、上記のジアシルグリセロールによる活性化され、カチオンを流入させる。カチオン選択性としては、Ca²⁺に対する透過性が最も高い¹⁴⁾。TRPC6の活性は膜脂質や各種翻訳後

修飾により調整を受けることが明らかにされている。特に protein kinase A, G によるリン酸化は TRPC6 の活性を抑制することが知られている¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。この TRPC6 のリン酸化による抑制は、血管平滑筋においては血管弛緩における重要な機構であることが明らかにされている。内皮細胞由来の一酸化窒素 (NO) が重要な血管弛緩因子であることはよく知られている。内皮細胞から遊離した NO は血管平滑筋の細胞膜を透過し、可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し cGMP 産生を促進する²⁰⁾⁻²²⁾。cGMP により PKG が活性化されると TRPC6 はリン酸化され抑制される¹⁸⁾。血管収縮において TRPC6 は血管収縮因子刺激により活性化し、Ca²⁺ および Na⁺ を細胞内に流入させる。それにより細胞膜が脱分極し、膜電位依存性 L 型カルシウムチャネルが開口し、さらに大きな Ca²⁺ 流入が惹起される。それにより血管平滑筋は収縮する (図 1)。すなわち、NO を介した TRPC6 のリン酸化は、細胞膜の興奮を抑制することにより血管弛緩を誘導しうる¹⁸⁾。同様のスキームが、プロスタサイクリン (PGI₂) による血管平滑筋細胞内 cAMP 上昇と PKA の活性化においても起こり、PGI₂ による血管拡張の一端を TRPC6 の抑制が介していると考えられる (図 1)²³⁾。

IV 抗血小板薬シロスタゾールによる血管拡張と TRPC6 の関係性

末梢循環障害による間欠性跛行において、抗血小板薬シロスタゾールが唯一の承認薬である。シロスタゾールはホスホジエステラーゼ (PDE) 3 の選択的阻害薬であり、cAMP の分解を抑制する²⁾。九州大学の西田らは、シロスタゾールを処置した血管平滑筋細胞において、TRPC6 のチャネル活性が抑制されることを見出し、その分子機構として、TRPC6 のリン酸化の関与を明らかにした¹⁷⁾。シロスタゾールは、PDE3 を阻害することにより細胞内の cAMP 量を上昇させる。それにより PKA が活性化し、TRPC6 の 69 番目のトレオニン (T69) がリン酸化を受ける。T69 がリン酸化された TRPC6 はその活性が抑制される。これにより血管収縮因子による血管平滑筋収縮が阻害される (図 1)。アデノウイルスを用いて、ラット大動脈に TRPC6 の野生型および T69 をアラニンに置換した T69A 変異体を過剰発現させると、それら大動脈ではアンジオテンシン II 刺激による血管収縮がコントロールに比べて増大した。野生型 TRPC6 を導入した大動脈は、シロスタゾール処理により、血管収縮が抑制さ

れたが、T69A 変異 TRPC6 を導入した大動脈の血管収縮はシロスタゾール処置の影響を受けなかった。これらの結果から、TRPC6 の PKA を介した T69 リン酸化が、シロスタゾールによる血管拡張作用に関与することが明らかにされた¹⁷⁾。

V 末梢循環障害における TRPC6 の役割

シロスタゾールによる血管拡張に TRPC6 が関与することが明らかにされたことから、我々は、次にシロスタゾールの末梢循環改善作用においても TRPC6 の抑制作用が重要なのではないかと想起した。そこでマウスの末梢循環障害モデル Hindlimb ischemia (HLI) モデルを使用してその可能性を検証した⁵⁾。HLI モデルでは、マウスの左足の大腿動脈を結紮することにより左下肢の主要な血流を遮断し、その後の血流の回復を、右下肢の血流をコントロールとして解析するモデルである。野生型マウスにおいて、HLI は術後 1 日目に顕著に血流を消失させる。この血流の低下はその後時間経過とともに回復する。しかしながら、野生型マウスにおいてはほぼ術前の半分程度までしか血流は回復せず、臨床的な知見と一致することが報告されている²⁴⁾。このモデルを TRPC6 の全身性ノックアウト (KO) マウスに適用した結果、驚くべきことに、その血流回復レベルは野生型に比べて有意に促進された (図 2 A, B)⁵⁾。この結果は、TRPC6 の抑制が末梢循環改善に対して促進効果を有することを強く示唆した。

虚血処置後の血流回復は、結紮により遮断された大腿動脈のバイパス路となる側副血行路の拡張および形成により担われる。そのため、虚血肢の腓腹筋においては、血管新生が増大するため、CD31 抗体にラベルされる微小血管の増大が観察される。しかしながら新生血管数は、TRPC6-KO と野生型マウスの間に違いは認められなかった (図 2 C)⁵⁾。一方で、血管平滑筋のマーカーである α -SMA によりラベルされる成熟血管を比べると、その数および血管径が TRPC6-KO マウスにおいて有意に上昇していることが明らかになった (図 2 C)⁵⁾。すなわち、TRPC6-KO による血流改善作用は、血管新生ではなく、新生血管が血管平滑筋に被覆されることで安定化し、機能的な血管として血管径の拡大が誘導される血管成熟に起因すると考えられた。次に、どの細胞において TRPC6 の抑制が血管成熟を促進するのかを検討することにした。そこで TRPC6-KO マウスにおいて、野生型と T69A 変異体 TRPC6 の発現を組織特異的にレスキューした。血

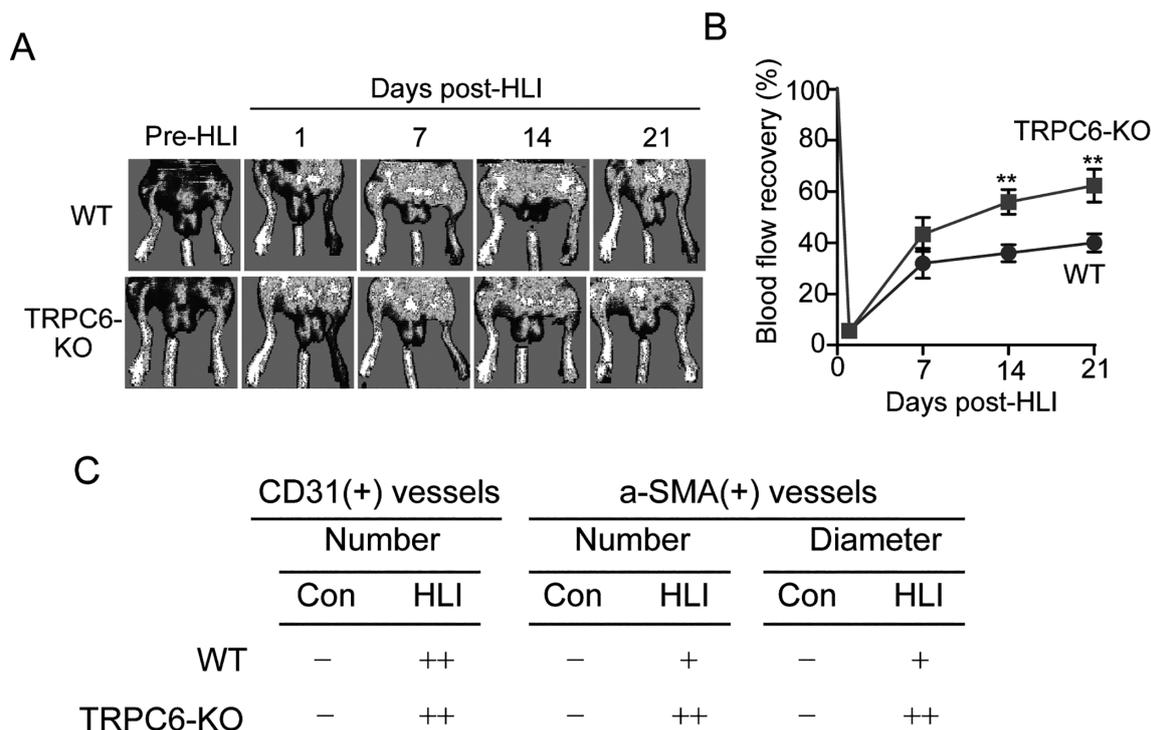


図2 TRPC6-KO マウスでは下肢虚血後の血流回復が亢進する
 A, B : Hindlimb ischemia (HLI) モデルにおける血流回復の経時変化。
 C : HLI 後の新生血管数および成熟血管径・数の WT と TRPC6-KO マウス間比較。
 Con: Contralateral right leg, HLI: HLI left leg (文献5 より改変して引用)

管平滑筋特異的に TRPC6 を発現させた結果、TRPC6-KO マウスに比べて、どちらの TRPC6 をレスキューしたマウスにおいても有意に血流回復が抑制された。以上のことから、血管平滑筋において TRPC6 が抑制されることが、虚血後の血管新生に続く血管成熟を促進し、血流がさらに改善することにつながる事が明らかにされた。また上記の TRPC6 レスキューマウスに対してシロスタゾールを処置し、シロスタゾールによる血流改善効果を検討した結果、T69A 変異体を発現するマウスにおいては、シロスタゾールによる血流改善効果が現れなかった。このことから、シロスタゾールの作用点として、血管平滑筋の TRPC6 のリン酸化による抑制が重要であることが強く示唆された。

VI TRPC6抑制の血管平滑筋細胞に与える影響

それではなぜ TRPC6 が抑制されることが血管成熟の促進につながるのか？そこで単離培養細胞を用いて血管平滑筋の細胞生理機能へ TRPC6 抑制が与える影響を解析した²⁵⁾。血管平滑筋細胞は、組織損傷等により血管が障害されると、増殖し、障害部位に遊走することで血管の修復に寄与する²⁶⁾。この増殖・分化能が

亢進した脱分化型血管平滑筋の表現型を増殖型と呼ぶ。一方で、新生血管を血管平滑筋が被覆し血管が安定化すると、血管平滑筋は分化型と呼ばれる筋収縮能を獲得した表現型となる。この血管平滑筋の表現型スイッチの異常により増殖型血管平滑筋が増え続けると、動脈硬化や肺高血圧症の病態形成につながる²⁷⁾²⁸⁾。そこで、まず TRPC6 抑制が増殖型表現型に与える影響を解析した。しかしながら、血管平滑筋の代表的な脱分化誘導因子である血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor, PDGF) の刺激により誘導される血管平滑筋細胞の増殖・遊走能は TRPC6-KO の影響を受けなかった。次に、血管平滑筋細胞の増殖型から分化型への表現型スイッチに対する TRPC6 抑制の影響を解析した。野生型および TRPC6-KO マウスから単離した大動脈血管平滑筋細胞を、無血清培地にて培養することにより分化型へ表現型を誘導した結果、TRPC6-KO 細胞において血管平滑筋の分化マーカーである α -SMA の発現が上昇することが明らかになった。すなわち、TRPC6 抑制は血管平滑筋細胞の分化を促進する効果があると示唆された。血管の修復過程においては、既存の血管から血管平滑筋細胞が遊走するのと

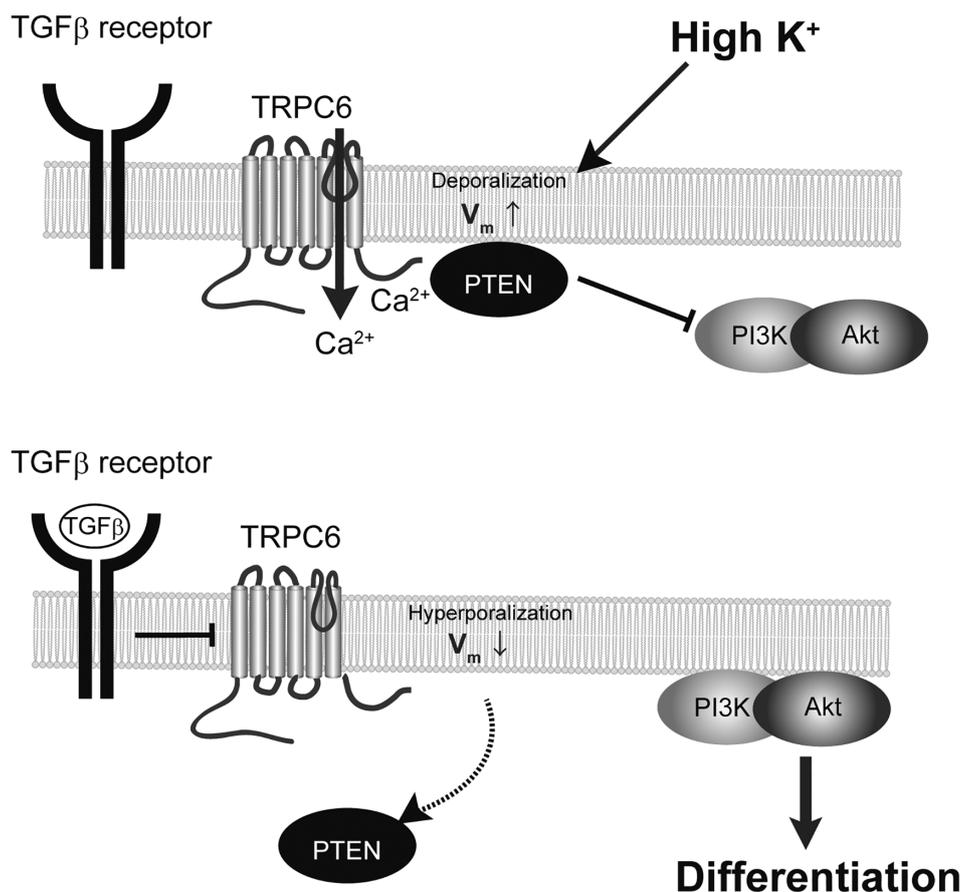


図3 TRPC6による血管平滑筋分化シグナルの制御機構

- A: 未分化細胞においては、TRPC6の活性化による静止膜電位の脱分極側シフトおよびCa²⁺流入によりPTENは形質膜に移行し、活性化される。それによりPI3K-Akt経路は抑制されている。
- B: TGFβ刺激は、TRPC6を抑制し、静止膜電位を過分極側にシフトさせる。それによりPTENは形質膜から離脱し不活性化する。それによりAktが活性化し、血管平滑筋細胞系への分化が誘導される。

並行して、組織中の間葉系幹細胞が血管平滑筋細胞系へと分化して修復に関与することが知られている²⁹⁾⁻³¹⁾。そこで、この分化系を模倣する *in vitro* 細胞系としてマウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2細胞を使用することとした。C3H10T1/2細胞は、Transforming growth factor β 1 (TGFβ1) 刺激により、血管平滑筋細胞へと分化することが知られている³²⁾³³⁾。C3H10T1/2細胞における TRPC6の発現を siRNA を用いて抑制し、TGFβ1刺激に誘導される血管平滑筋マーカー遺伝子の発現を検証した。その結果、C3H10T1/2細胞においても、TRPC6の発現抑制は、血管平滑筋細胞系への分化を促進することが明らかになった。

C3H10T1/2細胞の TGFβ1による血管平滑筋細胞系への分化には Aktの活性化が重要であることが明らかにされていた(図3B)³²⁾。しかしながらこれまでに、TGFβ1刺激が細胞内 Ca²⁺を上昇させる効果はほ

とんど報告がなく、蛍光イメージングにおいても細胞内 Ca²⁺上昇は確認できなかった。Aktの活性化には、PI3 kinaseによる PI(3,4,5)P₃の産生が必要となる。実は、これまでに TRPC6は、この PI(3,4,5)P₃の負の制御因子である Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) 脱リン酸化酵素との機能的相互作用が報告されていた³⁴⁾³⁵⁾。そこで TRPC6の抑制は PTENによる PI3K/Aktの抑制シグナルを解除する方向に作用するのではないかと考えた。TRPC6の活性がどのように PTENの膜結合を制御しているのかについて、我々は TRPC6による細胞膜の脱分極に注目した。Ⅲの項目でも触れたように血管平滑筋において TRPC6は細胞膜電位を脱分極させ L型 Ca²⁺チャネルの活性化を仲介している。そこで細胞膜の脱分極が PTENの細胞膜結合に与える影響を解析した。コントロールの細胞では細胞膜に局在す

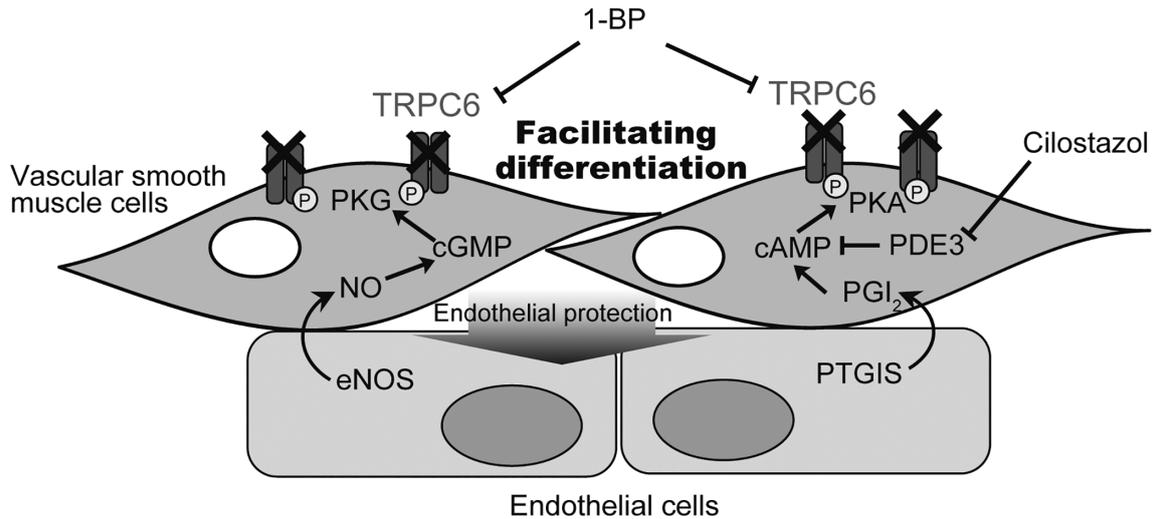


図4 TRPC6の抑制は血管平滑筋の分化を促進し、内皮保護効果を向上させることにより虚血後の機能的血管形成を促進する

血管平滑筋細胞は内皮細胞と協調し、内因性因子により TRPC6の機能をリン酸化で抑制することにより血管成熟を促す機能を本来備えている。1-BP およびシロスタゾールはこの TRPC6抑制を持続させることにより虚血後の血流回復を亢進させることができる。

る PTEN が TGFβ1刺激により細胞膜から解離することが明らかになった (図3)。すなわち TGFβ1刺激は PTEN の活性を抑制することで Akt の活性化を誘導していることが強く示唆された。次に人為的に細胞膜を脱分極させるため高塩化カリウム (KCl) 濃度の細胞外液中で TGFβ1刺激をした結果、PTEN の形質膜からの解離が有意に抑制されることが明らかになった。すなわち細胞膜が脱分極していると PTEN は形質膜に結合しやすい状態が維持されることが明らかになった (図3A)。この結果と一致して、高 KCl 濃度の細胞外液中では、TGFβ1刺激による C3H10T1/2細胞の血管平滑筋細胞系への分化が強く抑制されることが明らかになった。以上の結果から、TRPC6は細胞膜電位を脱分極させることにより PTEN の活性化を維持する因子として働いていること、そしてその抑制は Akt の活性化を促し、血管平滑筋細胞系への分化を促進することが明らかになった。

Ⅶ 血管平滑筋の TRPC6抑制が内皮細胞に与える影響

上述のように、TRPC6を抑制すると血管平滑筋の分化が亢進し、それにより血管成熟が促進されることが明らかになった。次に、血管平滑筋の分化が内皮細胞に与える影響について考察したい。下肢虚血後の血流回復には、内皮細胞からの血管弛緩因子 (NO および

PGI₂) が重要であることがすでに報告されていた³⁶⁾³⁷⁾。確かに、NO 合成酵素 NOS の阻害剤である N^G-Nitro-L-arginine Methyl Ester (L-NAME) および PGI₂の受容体である IP receptor のアンタゴニスト CAY-10441は強く血流回復を抑制した。虚血肢において内皮細胞の NOS (eNOS) や PGI₂産生酵素 (Prostaglandin I2 Synthase, PTGIS) の発現を評価したところ、野生型マウスにおいては、それらの発現は虚血手術後一過的に上昇するが、その後発現が低下していくことが明らかになった。興味深いことに、TRPC6-KO マウスにおいては、eNOS および PTGIS の発現は、コントロールでは低下してしまう術後2、3週後においても高い発現を維持していることが確認された。このことから、TRPC6が抑制されて分化が亢進した血管平滑筋は、強い内皮保護作用を有することが示唆された (図4)。また NO や PGI₂を阻害した状況下においても TRPC6-KO マウスにおいては、血流回復に影響がなかったことから、NO や PGI₂による血流回復機構の標的の一つが TRPC6の抑制である可能性が考えられた。これらの結果から、内皮障害を併発する末梢循環障害における TRPC6抑制による内皮細胞保護効果の有用性が想起された。そこで、内皮障害マウスモデルである ApoE-KO マウス³⁸⁾ に対して HLI を施し、内皮障害が存在する状況においても TRPC6の抑制が血流回復改善効果を有するかを解析した。高脂血症は、

末梢循環障害の重要なリスクファクターである³⁸⁾³⁹⁾。4週間の高脂肪食負荷を施したコントロールおよびApoE-KOマウスに非選択的TRPCチャネルの阻害薬Pyr2⁴⁰⁾⁴¹⁾を処置した結果、内皮障害が強くているApoE-KOマウスにおいてもTRPC6抑制は血流回復を優位に促進した。さらに、Pyr2処置は、ApoE-KOマウスにおける内皮細胞障害に伴う血管弛緩障害、eNOSの発現低下に対しても改善効果を示すことが明らかになった。

Ⅷ TRPC6を標的とした末梢循環障害改善薬の探索

これまでの結果から、血管平滑筋細胞のTRPC6の抑制が、末梢循環障害における血流改善薬として有効である可能性が強く示唆された。そこで我々は、TRPC3/6/7チャネルファミリーの阻害剤をスクリーニングし、HLI後の血流回復を促進する薬物を探索した⁴²⁾。TRPC6に対する阻害薬は複数種類が同定されたが、血流回復亢進作用を示したのは1-benzylpyperidine (1-BP)のみであった⁴³⁾。1-BPはTRPC3およびTRPC6に対しては阻害作用を示したが、TRPC7に対しては阻害作用を示さなかった。次に1-BPの末梢循環障害改善作用について検討を行った。その結果、1-BP処置はHLI後の血流回復を有意に改善させた。さらに重要なことに、1-BP処置はHLI処置1週間後から投与開始した場合においても血流改善作用を示した。1-BPは、TRPC6-KOマウスに対してはさらなる血流改善効果を示さなかった。すなわち1-BPは確かにTRPC6を標的として作用していることが確認された。また1-BPはPyr2と同様に、高脂血症による内皮障害を伴う病態時においても下肢虚血後の血流回復改善効果を示した。以上の結果から、TRPC6が末梢循環障害に対する有効な創薬標的になりうる実証された。

IX おわりに

ここまで血管平滑筋のTRPC6が、組織虚血時に起こる血管形成において、血管の成熟を亢進することにより、末梢循環の回復を促進させる有効な分子標的となる可能性を述べてきた。TRPC6はこれまでも心不全時の心臓リモデリング⁴⁴⁾⁻⁴⁶⁾、糸球体硬化症⁴⁷⁾⁴⁸⁾などの疾患に関与することが明らかにされてきた。しかしながら、これら疾患に対しても、いまだ臨床試験にまで至った薬物は開発されていない。我々は、1-BPというTRPC3/6選択的阻害薬が末梢循環障害に対する有意な改善作用を示すことを明らかにし、今後の創薬展開が期待される⁴²⁾。この一連の研究において重要な知見が、TRPC6の抑制は血管平滑筋の分化促進に重要であり、十分に分化した血管平滑筋が維持されることが、内皮保護効果を示し、血管機能の恒常性維持に重要であるという点である(図4)⁵⁾。増殖型の血管平滑筋細胞は、動脈硬化のような血管疾患において、病態形成に関与していることがよく知られ、増殖型血管平滑筋細胞を分化型に戻す手法が心血管系疾患においても有効な治療戦略になりうると考えられている⁴⁹⁾。さらに、ガン組織において、血管平滑筋やペリサイトによる被覆を十分に受けない不安定な血管の形成により抗がん剤がガン組織まで届かないことが問題となっており、このガン組織の血管を安定化できれば、より効果的ながん治療が望めるということで、血管成熟が注目されている⁵⁰⁾。このように血管平滑筋細胞の分化を促進し、それにより血管成熟を加速するという治療戦略は、虚血性疾患だけでなくさまざまな疾患に対して有効となる可能性が十分に考えられる。TRPC6の抑制による血管平滑筋分化促進の普遍性が実証されれば、有効な創薬標的となることが強く期待される。

文 献

- 1) 日本循環器学会, 日本血管外科学会. 2022年改訂版 末梢動脈疾患ガイドライン2022. https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2022/03/JCS2022_Azuma.pdf (2023年12月26日アクセス可能)
- 2) Kherallah RY, Khawaja M, Olson M, Angiolillo D, Birnbaum Y: Cilostazol: a Review of Basic Mechanisms and Clinical Uses. *Cardiovasc Drugs Ther* 36: 777-792, 2022
- 3) Faber JE, Chilian WM, Deindl E, van Royen N, Simons M: A brief etymology of the collateral circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1854-1859, 2014
- 4) LeBlanc AJ, Krishnan L, Sullivan CJ, Williams SK, Hoying JB: Microvascular repair: post-angiogenesis vascular dynamics. *Microcirculation* 19: 676-695, 2012
- 5) Numaga-Tomita T, Shimauchi T, Kato Y, et al: Inhibition of transient receptor potential cation channel 6 promotes

- capillary arterialization during post-ischaemic blood flow recovery. *Br J Pharmacol* 180 : 94-110, 2023
- 6) Numata T, Kozai D, Takahashi N, et al : [Structures and variable functions of TRP channels]. *Seikagaku* 81 : 962-983, 2009
 - 7) Rosenbaum T, Islas LD : Molecular Physiology of TRPV Channels : Controversies and Future Challenges. *Annu Rev Physiol* 85 : 293-316, 2023
 - 8) Huang Y, Fliegert R, Guse AH, Lü W, Du J : A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium* 85 : 102111, 2020
 - 9) Meents JE, Ciotu CI, Fischer MJM : TRPA1 : a molecular view. *J Neurophysiol* 121 : 427-443, 2019
 - 10) Takahashi N, Chen HY, Harris IS, et al : Cancer Cells Co-opt the Neuronal Redox-Sensing Channel TRPA1 to Promote Oxidative-Stress Tolerance. *Cancer Cell* 33 : 985-1003. e1007, 2018
 - 11) Spix B, Chao YK, Abrahamian C, Chen CC, Grimm C : TRPML Cation Channels in Inflammation and Immunity. *Front Immunol* 11 : 225, 2020
 - 12) Hofherr A, Köttgen M : TRPP channels and polycystins. *Adv Exp Med Biol* 704 : 287-313, 2011
 - 13) Ramsey IS, Delling M, Clapham DE : An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68 : 619-647, 2006
 - 14) Trebak M, Vazquez G, Bird GSJ, Putney Jr JW : The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33 : 451-461, 2003
 - 15) Parekh AB, Putney Jr JW : Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews* 85 : 757-810, 2005
 - 16) Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G : Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397 : 259-263, 1999
 - 17) Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, et al : Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 : 2278-2286, 2011
 - 18) Takahashi S, Lin H, Geshi N, et al : Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol* 586 : 4209-4223, 2008
 - 19) Yao X : TRPC, cGMP-dependent protein kinases and cytosolic Ca²⁺. *Handb Exp Pharmacol* 179 : 527-540, 2007
 - 20) Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J : Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86 : 1-23, 2006
 - 21) Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F : Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system : insights from genetically modified mice. *Circ Res* 93 : 907-916, 2003
 - 22) Lincoln TM, Dey N, Sellak H : Invited review : cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle : from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 91 : 1421-1430, 2001
 - 23) Horinouchi T, Terada K, Higashi T, Miwa S : Endothelin receptor signaling : new insight into its regulatory mechanisms. *J Pharmacol Sci* 123 : 85-101, 2013
 - 24) Schaper W : Collateral circulation : past and present. *Basic Res Cardiol* 104 : 5-21, 2009
 - 25) Numaga-Tomita T, Shimauchi T, Oda S, et al : TRPC6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential-dependent coupling with PTEN. *FASEB J* 33 : 9785-9796, 2019
 - 26) Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR : Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84 : 767-801, 2004
 - 27) Bennett MR, Sinha S, Owens GK : Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 118 : 692-702, 2016
 - 28) Davis-Dusenbery BN, Wu C, Hata A : Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 : 2370-2377, 2011
 - 29) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, et al : Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 66 : 543-551, 2005
 - 30) Lasala GP, Silva JA, Minguell JJ : Therapeutic angiogenesis in patients with severe limb ischemia by transplantation of a combination stem cell product. *J Thorac Cardiovasc Surg* 144 : 377-382, 2012

- 31) Lawall H, Bramlage P, Amann B: Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb Haemost* 103: 696-709, 2010
- 32) Shi N, Xie WB, Chen SY: Cell division cycle 7 is a novel regulator of transforming growth factor- β -induced smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 287: 6860-6867, 2012
- 33) Lien SC, Usami S, Chien S, Chiu JJ: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in transforming growth factor- β 1-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells. *Cell Signal* 18: 1270-1278, 2006
- 34) Kini V, Chavez A, Mehta D: A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6-mediated Ca^{2+} entry, endothelial permeability, and angiogenesis. *J Biol Chem* 285: 33082-33091, 2010
- 35) Monet M, Francoeur N, Boulay G: Involvement of phosphoinositide 3-kinase and PTEN protein in mechanism of activation of TRPC6 protein in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 287: 17672-17681, 2012
- 36) Otsuka H, Akashi H, Murohara T, et al: The prostacyclin analog beraprost sodium augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by autologous bone marrow cells. *Ann Vasc Surg* 20: 646-652, 2006
- 37) Park B, Hoffman A, Yang Y, et al: Endothelial nitric oxide synthase affects both early and late collateral arterial adaptation and blood flow recovery after induction of hind limb ischemia in mice. *J Vasc Surg* 51: 165-173, 2010
- 38) Xie D, Li Y, Reed EA, Odrionic SI, Kontos CD, Annex BH: An engineered vascular endothelial growth factor-activating transcription factor induces therapeutic angiogenesis in ApoE knockout mice with hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 44: 166-175, 2006
- 39) Pereira C, Miname M, Makdisse M, Kalil Filho R, Santos RD: Association of peripheral arterial and cardiovascular diseases in familial hypercholesterolemia. *Arq Bras Cardiol* 103: 118-123, 2014
- 40) He LP, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL: A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem* 280: 10997-11006, 2005
- 41) Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, et al: Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5400-5405, 2009
- 42) Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Kato Y, et al: A TRPC3/6 Channel Inhibitor Promotes Arteriogenesis after Hind-Limb Ischemia. *Cells* 11: 2041, 2022
- 43) Urban N, Hill K, Wang L, Kuebler WM, Schaefer M: Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction. *Cell Calcium* 51: 194-206, 2012
- 44) Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, et al: TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest* 116: 3114-3126, 2006
- 45) Onohara N, Nishida M, Inoue R, et al: TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J* 25: 5305-5316, 2006
- 46) Nishida M, Onohara N, Sato Y, et al: $\text{G}\alpha_{12/13}$ -mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J Biol Chem* 282: 23117-23128, 2007
- 47) Szabó T, Ambrus L, Zákány N, Balla G, Bíró T: Regulation of TRPC6 ion channels in podocytes - Implications for focal segmental glomerulosclerosis and acquired forms of proteinuric diseases. *Acta Physiol Hung* 102: 241-251, 2015
- 48) Chen YM, Liapis H: Focal segmental glomerulosclerosis: molecular genetics and targeted therapies. *BMC Nephrol* 16: 101, 2015
- 49) Frismantiene A, Philippova M, Erne P, Resink TJ: Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell Signal* 52: 48-64, 2018
- 50) Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A: Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 77: 1745-1770, 2020

(R 5. 12. 27 受稿)