

第17回日本循環薬理学会の開催にあたって

第17回日本循環薬理学会をお世話させていただくにあたり一言ご挨拶申し上げます。

日本循環薬理学会は、1991年に設立された循環薬理研究会が発展し、1999年に学会となりました。学術集会を重ねて今年で第17回に至り、我が国における循環薬理学の学術交流の場として重要な役割を果たしてきたと思います。このような伝統ある学会をお世話できることを大変に光栄に感じております。

本学会は、循環薬理学およびその関連分野における基礎から臨床まで様々な背景の研究発表が行われます。本年度も皆様の多数のご参加を頂き、活発な意見の交換が行われる学術集会になればと思っております。本年の学術集会のテーマには、「素子と統合の循環薬理学：フィジオームとシステムバイオロジー」を設定いたしました。薬物と機能蛋白質の相互作用から始まる薬物作用であります。分子・細胞・組織・器官、そして個体レベルと多階層の統合的理解が今後のこの分野の発展にとって重要ではないか、という趣旨で設定させて頂きました。そこで、心筋細胞機能や不整脈のモデル化を扱った演題を集めた「Key Note Session」を、シンポジウム形式で行う予定にしております。今後、生命科学の中心になっていくと予想されるフィジオーム・システムバイオロジーとその応用についての最先端の情報を得る絶好の機会となればと思っております。また、予想を上回る多数の一般演題を皆様から登録して頂き、盛会となることを確信しております。また、本学術集会では、次代を担う人材育成のために、若手研究者の口頭発表を積極的に奨励しております。その中から優秀な発表2題に「Young Investigator's Award (YIA)」と副賞を贈呈いたします。本学術集会が、新たな統合生命科学の潮流と循環薬理分野がどのように融合発展して行くのかを考えるよい場になっていくことを期待いたします。

会場は大阪大学吹田キャンパスの医学部銀杏会館を使用いたします。吹田キャンパスは大阪郊外に位置しており、緑が豊富ですので、一時都会の煩わしさをお忘れ頂き、サイエンスを満喫頂けると存じます。また、学会後の懇親会では、ゆったりとご歓談頂ければ幸いです。

最後になりますが、本学会を有意義なものとするため、活発なご討論をお願い申し上げます。

第17回 日本循環薬理学会

当番幹事 倉智 嘉久

大阪大学大学院 医学系研究科
薬理学講座 分子細胞薬理学教室

第 17 回日本循環薬理学会

9:00~ 9:05	開会挨拶 第 17 回日本循環薬理学会当番幹事 倉智 嘉久
9:05~10:20	Session 1 YIA 候補者演題発表(1) 「血流制御機構・チャネル」
10:20~10:30	休憩
10:30~11:55	Session 2 YIA 候補者演題発表(2) 「血管と疾患・薬理」
11:55~13:00	昼食休憩（幹事会）
13:00~14:25	Session 3 YIA 候補者演題発表(3) 「血管分子機構・心臓」
14:25~14:35	休憩
14:35~16:25	Session 4 Key Note Session 「素子と統合の循環薬理学： フィジオームとシステムバイオロジー」
16:25~16:35	休憩
16:35~17:25	Session 5 一般演題発表(1) 「血流制御機構」
17:25~17:35	休憩
17:35~18:35	Session 6 一般演題発表(2) 「心筋チャネル・疾患・薬物」
18:35~19:00	YIA 授賞式 次回当番幹事挨拶 中谷 晴昭（千葉大院・医・薬理） 学会会長挨拶 日本循環薬理学会会長 岡村 富夫 閉会挨拶 第 17 回日本循環薬理学会当番幹事 倉智 嘉久
19:00~	懇親会「レストラン・ミネルバ」

口演プログラム

発表時間（質疑応答含む）：一般演題 12 分，主題講演 30 分

9:05~10:20 Session 1 YIA 候補者演題発表(1)

「血流制御機構・チャネル」

座長： 岡村 富夫（滋賀医大・薬理）

赤羽 悟美（東邦大・医・薬理）

- Y01 ラット腸間膜動脈における methoxamine 誘発過剰収縮に及ぼす
内皮由来弛緩因子の影響
○金 鑫, 音無由紀子, 川崎博己
岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学
- Y02 Farnesoid X Receptor の長期刺激は血管内皮依存性弛緩
反応を阻害する
○貴田大樹, 村田幸久, 堀 正敏, 尾崎 博
東京大院・農学生命科学・獣医薬理
- Y03 α_1 受容体刺激による血管収縮における NCX1/TRPC3 共役系の
役割
○喜多紗斗美¹, 荒井勇二³, 井上隆司², 岩本隆宏¹
福岡大・医・¹薬理, ²生理, ³国立循環器病セ・研・バイオサイエンス
- Y04 神経活動に引き起こされる脳血流動態の蛍光イメージング
○関谷 敬、大久保洋平、飯野正光
東京大院・医・細胞分子薬理
- Y05 大動脈平滑筋細胞に発現する電位依存性ナトリウムチャネル
(Na_v 1.7) の機能とその役割
○目黒健太郎, 中島敏明, 飯田陽子, 高野治人, 佐田政隆, 森田敏宏,
永井良三
東京大院・医・循環器内科
- Y06 大動脈平滑筋細胞における BK チャネルの一分子動態可視化解析
○山村寿男, 池田知佳子, 大矢 進, 今泉祐治
名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析学

10:30~11:55 Session 2 YIA 候補者演題発表(2)

「血管と疾患・薬理」

座長： 三輪 聡一（北海道大院・医・細胞薬理）

岩尾 洋（大阪市大院・医・分子病態薬理）

- Y07 糖尿病血管を用いたインスリンによるニトロ化 SERCA の増加と弛緩反応の減弱
○小林恒雄, 田口久美子, 竹之内康広, 松本貴之, 鎌田勝雄
星薬大・医薬研・機能形態
- Y08 2 型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮機能障害に対する AMP-activated protein kinase の関与
○松本貴之, 小林恒雄, 鎌田勝雄
星薬大・医薬研・機能形態学
- Y09 食後高血糖時の急性高インスリン状態における CGRP 神経機能減弱と Angiotensin II Type 1 受容体の関与
○座間味義人¹, 高取真吾², 藪前奈々¹, 宮下智子¹, 細田美穂¹, 高山房子¹, 見尾光庸³, 川崎博己¹
¹岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学, ²日本新薬(株)創薬研究所, ³就実大・薬・薬効解析学
- Y10 Prostaglandin D2 受容体 DP の腫瘍新生血管透過性における役割
○村田幸久¹, Lin ML², 有竹浩介³, 成宮 周⁴, 尾崎 博¹, 裏出良博³, 堀 正敏¹, Sessa WC²
¹東京大院・獣医薬理, ²Yale 大・医・薬理, ³大阪バイオサイエンス研・分子行動生物学, ⁴京都大院・医・神経・細胞薬理
- Y11 DGLA による抗動脈硬化作用
○木村麻紀^{1,2}, 高井真司¹, 金 徳男¹, 河島 洋³, 白石明子³, 田中一彦², 木曾良信³, 宮崎瑞夫¹
¹大阪医科大・薬理, ²大阪薬科大・臨床薬剤, ³サントリー・健康科学研
- Y12 長鎖脂肪酸の GPR120 を介したアディポネクチン分泌促進作用
○伊賀朋世, 足達哲也, 興水崇鏡, 平澤 明, 辻本豪三
京都大院・薬・薬理ゲノミクス

- Y13 ヒト血管内皮細胞における nifedipine 代謝物による細胞障害抑制効果
○福原弥生¹, 石澤啓介¹, 堀ノ内裕也¹, 田岡千明², 山口邦久¹, Narantungalag Dorjsuren¹, 折野早紀子¹, 土屋浩一郎², 玉置俊晃¹
¹徳島大院・HBS 研・情報伝達薬理, ²医薬品機能解析学

13:00~14:25 Session 3 YIA 候補者演題発表(3)

「血管分子機構・心臓」

座長： 石井 邦明（山形大・医・循環薬理）
安屋敷 和秀（滋賀医大・薬理）

- Y14 虚血性急性腎不全における性差発現
ープロテオーム解析からのアプローチー
○高山淳二¹, 高岡昌徳², 野原麻美¹, 山本真也¹, 松村靖夫¹
大阪薬科大・¹病態分子薬理, ²生体機能解析学
- Y15 エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) の蛋白質分解における新規結合蛋白質 Jab1 の役割
○西本 新, 魯 凌云, 西屋 禎, 堀之内孝広, 三輪聡一
北海道大院・医・細胞薬理
- Y16 Cyclin-dependent Kinase-9 は p300 の Histone Acetyltransferase 活性に必須である
○砂川陽一¹, 森本達也¹, 川村晃久¹, 高谷智英¹, 和田啓道¹, 藤田正俊³, 島津 章¹, 北 徹², 長谷川浩二¹
¹国立病院機構京都医療セ・展開医療, 京都大院・医・²循環器内科, ³人間健康科学
- Y17 The role of nNOS in cardiac ischemia reperfusion and ischemia preconditioning in mice
○Xiao-mei Lu, Guo-xing Zhang, Shoji Kimura, Akira Nishiyama
Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Kagawa University
- Y18 Ménage-à-trois 1 は心筋の代謝機能保持に不可欠である
○泉 康雄, 塩田正之, 中尾隆文, 岩尾 洋
大阪市大院・医・分子病態薬理

Y19 新しい心不全モデルの創成と治療遺伝子ネットワーク解析
○島田康人, 臧 黎清, 梅本紀子, 田中利男
三重大院・医・薬理ゲノミクス, 三重大・生命科学研究支援セ・
機能ゲノミクス・バイオインフォマティクス

Y20 マウス洞房結節細胞における ATP 感受性 K⁺チャネルの
電気生理学的役割の解析
○福崎紘一¹, 佐藤俊明¹, 三木隆司², 清野 進², 中谷晴昭¹
¹千葉大院・医・薬理, ²神戸大院・医・細胞分子医学

14:35~16:25 Session 4 **Key Note Session**

「素子と統合の循環薬理学：

フィジオームとシステムバイオロジー」

座長： 倉智 嘉久（大阪大院・医・分子細胞薬理）
野村 泰伸（大阪大院・基礎工・生体工学）

主題講演 1

細胞性不整脈と除細動に関するコンピュータシミュレーション
○荻原貴司
滋賀医大・循環器内科・不整脈センター

主題講演 2

薬物誘発心臓不整脈発生予測の多階層シミュレーション
○倉智嘉久
大阪大院・医・分子細胞薬理

Y21 性周期による QT 延長症候群不整脈リスク変動のメカニズム
○黒川洵子¹, 中村浩章¹, コリーン・クランシー², 玉川正次³,
中谷晴昭³, 古川哲史¹
¹東京医歯大・難研, ²コーネル大・医, ³千葉大院・医・薬理

A01 心房筋 L 型 Ca²⁺チャネル Ca_v1.2 と Ca_v1.3 の開閉制御機構とペース
メーカー活動電位における役割
○中瀬古(泉)寛子¹, 村上慎吾², 倉智嘉久², 水流弘通¹, 赤羽悟美¹
¹東邦大学・医・薬理, ²大阪大院・医・分子細胞薬理

A02 細胞内微細構造に基づくカルシウム動態モデルシミュレーション
○河津俊宏¹, 村上慎吾², 鈴木慎悟², 赤羽悟美³, Ian Findlay⁴,
倉智嘉久², 野村泰伸¹
¹大阪大院・基礎工・生体工学, ²医・分子細胞薬理, ³東邦大・医・薬理,
⁴Université de Tours

A03 心臓興奮の神経制御のモデルシミュレーション
村上慎吾, 鈴木慎悟, 倉智嘉久
大阪大院・医・分子細胞薬理

16:35~17:25 Session 5 一般演題発表(1)

「血流制御機構」

座長： 辻本 豪三（京都大院・薬・ゲノム創薬科学）
中田 徹男（京都薬科大・臨床薬理）

A04 G タンパク質共役型受容体を介した持続性 Ca^{2+} 濃度上昇反応の
分子メカニズム
○堀之内孝広¹, 三宅由美恵¹, 西屋 禎¹, 西本 新¹, 森島繁²,
村松郁延², 三輪聡一¹
¹北海道大院・医・細胞薬理, ²福井大・医・薬理

A05 レニン分泌に影響する腎皮質内プロスタグランジン $\text{E}_2(\text{PGE}_2)$ 濃度
調節における PG トランスポーターの役割
○波多野亮^{1,2}, 平田 拓³, 武藤重明⁴, 金井 好克¹, 松原 光伸²
¹大阪大院・医・生体システム薬理, ²東北大院・医・遺伝子医療開発,
³杏林大・医・薬理, ⁴自治医大・腎臓内科

A06 脳および腸間膜動脈支配神経刺激作用に及ぼすシロスタゾールの
影響
○安屋敷和秀, 王 春梅, 篠崎一哉, 岡村富夫
滋賀医大・薬理

A07 無麻酔・無拘束ラットの Clonidine 脳内投与による昇圧反応機序：
中枢 GABA 神経系の関与
○花房伸幸¹, 岡本和明¹, 北村佳久², 高山房子¹, 川崎博己¹
¹岡山大院・医歯薬総合・臨床薬学, ²医薬管理学

17:35~18:35 Session 6 一般演題発表(2)

「心筋チャネル・疾患・薬物」

座長： 今泉 祐治

(名古屋市立大・薬・細胞分子薬効解析学)

中谷 晴昭 (千葉大院・医・薬理)

A08 AT_1 受容体刺激による I_{Ks} 修飾における KCNQ1 の C 末端の関与

○大倉正道, 岡崎 雅, 野呂田郁夫, 石井邦明

山形大・医・循環薬理

A09 天然物成分クルクミンによる核内アセチル化をターゲットとした
新規心不全治療の可能性

○森本達也¹, 砂川陽一¹, 川村晃久¹, 高谷智英¹, 和田啓道¹, 米田正始³,
藤田正俊⁴, 島津 章¹, 北 徹², 長谷川浩二¹

¹国立病院機構京都医療セ・展開医療, 京都大院・医・²循環器内科,

³心臓血管外科, ⁴人間健康科学

A10 トロポニン T 変異に起因する拡張型心筋症モデルマウスの不整脈
発生機構

○鈴木 剛^{1,2}, 中里祐二², 西澤寛人^{1,2}, 中郡昭人¹, 村山 尚¹,
櫻井 隆¹, 代田浩之², 森本幸生³, 呉林なごみ¹

¹順天堂大・医・薬理, ²循環器内科, ³九州大院・医・臨床薬理

A11 心肥大での局所ステロイド合成とグルココルチコイド作用についての
検討

○大谷朋仁, 真野敏昭, 坂田泰史, 竹田泰治, 西尾まゆ, 山本一博,
堀 正二

大阪大院・医・循環器内科

A12 心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの同定と機能解析

○高島成二^{1,2}, 山崎 悟³, 瀬口 理³, 北風政史³

¹大阪大・保健センター, ²大阪大院・医・循環器内科,

³国立循環器病センター

抄録集

主題講演

主題講演 1

細動性不整脈と除細動に関するコンピュータシミュレーション

芦原貴司

滋賀医科大学循環器内科・不整脈センター

臨床において、細動性不整脈すなわち心室細動や心房細動を防ぐには、種々の抗不整脈薬や電氣的除細動（電気ショック）が用いられる。個々の不整脈患者に対し、最適の抗不整脈薬を選択したり、電氣的除細動による心筋ダメージや痛みを軽減したりするには、抗不整脈薬や電気ショックによって心筋がどのような反応を示すのかを十分に理解し、またそのメカニズムを正確に理解する必要があるだろう。しかしながら、薬理的または電氣的な除細動のメカニズムについては十分には解明されていないのが現状である。本講演では、最近、*in vivo* や *in vitro* に続く第3の実験的手法として注目を集めているコンピュータシミュレーション（*in silico*）を紹介した上で、細動性不整脈の誘発および停止のメカニズムに関するコンピュータシミュレーション研究について、私のこれまでの研究成果を中心に紹介する。また、コンピュータシミュレーションで用いるヴァーチャルリアリティー（仮想現実）の心筋組織を構築する方法には、細胞内電位だけを計算するモノドメインモデルと、細胞内と細胞外の両方の電位のバランスを考慮しながらそれらを同時に計算するバイドメインモデルとがあるが、両モデルにおける興奮伝播様式や電気刺激に対する心筋反応の違いと、その生理学的意味についても言及したい。

主題講演 2

薬物誘発心臓不整脈発生予測の多階層シミュレーション

倉智 嘉久

大阪大学大学院 医学系研究科

大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター

ポストゲノム科学の時代を迎え、転写レベル・蛋白質レベル・蛋白質間相互作用など、各階層の網羅的データが集積しつつある。これらのデータ集積の目的は、生命・人体機能の網羅的理解、各種疾患の病態・病因の解明、有用な治療薬開発の効率化などである。これまでの実験生命科学の成果を基礎に、さらに網羅的データを活用し、細胞・生体機能を統合的かつ定量的に捉える方法を開発し発展させることは、今後のポストゲノム科学の中でも最も重要な課題である。

この課題に取り組むため、我々は、文部科学省リーディングプロジェクト「細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト」において「循環・呼吸器疾患病態・治療薬作用のモデルシステムの開発」を行ってきた。この開発の目的は、医学・生命科学と情報科学・工学が協力・融合し、細胞・生体機能の生理、その破綻による疾病病態、さらには治療薬作用についての充分に実用に耐えるモデル化とシミュレーションを行う技術を開発すること、さらにはこれを広く臨床医学や産業界で利用できるシステムを確立することである。

循環薬物作用モデルシステム開発プロジェクトでは、循環器疾患を対象とし、薬物誘発心臓不整脈発生予測システムの開発を行っている。薬物起因性の致死性不整脈の誘発の危険性を予測し、創薬や臨床における実用的なシミュレーションシステムを構築するために、‘薬物の化学構造から心臓不整脈発生の危険度を予測するシステムを開発する’ことを最終目標としている。心臓不整脈の原因となるイオンチャネルに対する薬物作用動態とその分子機構から、薬物ドッキング、分子動態、活動電位変化等の異なる階層におけるマルチスケール・マルチフィジックスシミュレーションを実現し、薬物起因性の致死性不整脈の誘発の危険度判定のシステム構築を行っている。このシミュレーションシステムの完成により、薬物の安全使用の向上や創薬過程の格段の効率化に寄与すると考えられる。

本講演では、われわれの開発した「心臓興奮性 I_{kr} - I_{ks} 2変数マップ解析法」について、その考え方と有用性を主としてご紹介する。

YIA 候補者演題

ラット腸間膜動脈における methoxamine 誘発過剰収縮に 及ぼす内皮由来弛緩因子の影響

Y01

○金 鑫, 音無由紀子, 川崎博己
岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学

【目的】 血管内皮細胞は物理的な刺激(ずり応力)や内因性物質による血管反応に対応して内皮由来弛緩物質(EDRF)を遊離し、血管の緊張を調節している。これらの刺激に対してどのような EDRF が対応しているかは不明である。そこで本研究では、末梢抵抗血管であるラット腸間膜動脈を用いて、methoxamine 誘発過剰収縮反応に対する血管内皮由来弛緩因子の抑制機序について検討した。また、この抑制機序の加齢による変化に関しても検討した。

【方法】 ラット摘出腸間膜動脈血管床の灌流実験を用いて 8-16 週齢の Wistar 系雄性ラットの標本について methoxamine ($2-7 \mu\text{M}$)を含む Krebs 液で血管を収縮させ、灌流圧の経時的変化を測定した。また、アセチルコリン及び A23187 を注入することによる弛緩反応および内皮依存性弛緩因子の作用に影響を与えられと考えられる各試薬の検討も行った。

【結果及び考察】 8 週齢の内皮保持標本においてメキシサミンを4時間灌流することより、Phasic 収縮相と Tonic 収縮相が観察され、両収縮相に対する主に一酸化窒素(NO)と内皮由来過分極因子(EDHF)が抑制していることが明らかとなった。この過剰な収縮反応の刺激により生じる EDHF 反応は腸管膜動脈抵抗血管に存在する種々の K^+ チャネル, Na^+ ポンプ及び gap junction を介して作用することが示唆され、アセチルコリン及び A23187 を注入することによる生じる一過性弛緩反応の作用機序と異なることが考えられる。一方、8 週齢と比較して 16 週齢の標本において Phasic 収縮相が小さくなり、Tonic 収縮相では 3 時間以上持続し減弱は見られなかった。これより、腸間膜動脈抵抗血管における過剰な収縮反応の調節は加齢により変化することが示唆される。

Farnesoid X Receptor の長期刺激は血管内皮 依存性弛緩反応を阻害する

Y02

○貴田大樹, 村田幸久, 堀 正敏, 尾崎 博
東京大院・農学生命科学・獣医薬理

【背景・目的】核内受容体の一種である Farnesoid X Receptor (FXR)は胆汁酸を生理的リガンドとし、その代謝を制御する。FXR の発現は主に肝臓や腸管、腎臓に確認され、近年では FXR が脂質やグルコースなどの代謝にも関わることを示唆されてきており、FXR アゴニストの臨床応用が期待されている。一方血管平滑筋細胞や内皮細胞においても FXR の発現が確認されているが、それらの機能に対する FXR アゴニストの直接作用については明らかにされていない。そこで本研究は FXR の長期刺激が血管の生理機能、特に収縮・弛緩反応に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】ウサギ腸間膜動脈を無菌的に摘出し、リング状標本を作製した。これらを FXR アゴニストである GW4064 (0.1-10 μ M)を加えた培養液中で 1 週間培養した後、HE 染色、whole-mount immunostaining、収縮張力測定、cGMP 量測定に用いた。【結果】HE 染色及び whole-mount immunostaining による形態学的観察の結果、1 週間の GW4064 処置による内皮細胞や平滑筋細胞の形態的变化は見られなかった。収縮張力測定において、1 週間の GW4064 (0.1-10 μ M)処置は腸間膜動脈の高濃度 K^+ (15-65 mM)、Norepinephrine (0.1-100 μ M)、Endothelin-1 (0.1-100 nM)による収縮反応に影響を与えなかった。一方で高濃度 K^+ (25 mM)収縮における Substance P (0.1-30 nM)による内皮依存性弛緩反応は、GW4064 により濃度依存的に抑制された。同様の抑制が Ca^{2+} イオノフォアである Ionomycin (0.1 nM-1 μ M)による内皮依存性弛緩反応においても認められたことから、1 週間の GW4064 処置による内皮依存性弛緩反応の減弱は、内皮細胞における Ca^{2+} 流入以降の障害に起因することが示唆された。続いて腸間膜動脈の内皮剥離標本を用い、NO ドナーである SNP (3 nM-10 μ M)による弛緩反応を検討したところ、GW4064 により濃度依存的に平滑筋の NO に対する感受性は抑制された。また GW4064 (1-10 μ M)処置群では、無刺激時、Substance P (1 nM, 5 min)刺激時、そして SNP (1 μ M, 5 min)刺激時いずれにおいても平滑筋組織における cGMP 産生量の低下が観察された。

【考察】GW4064 の処置による FXR の長期刺激は血管平滑筋細胞、内皮細胞の形態的变化を伴わずに、腸間膜動脈の内皮依存性弛緩反応を抑制することが示された。この抑制は NO に対する平滑筋細胞の cGMP 産生量の低下を伴う NO 感受性の低下に起因することが示唆された。

α_1 受容体刺激による血管収縮における NCX1/TRPC3 共役系の役割

Y03

○喜多紗斗美¹, 荒井勇二³, 井上隆司², 岩本隆宏¹

福岡大・医・¹薬理, ²生理, ³国立循環器病セ・研・バイオサイエンス

【背景・目的】 α_1 受容体は、さまざまな臓器血管の神経性調節に重要な役割を果たしている。 α_1 受容体を介する血管収縮機序には、TRP チャネルなどの受容体活性化カチオンチャネルの関与が考えられているが、未だにその全容の解明には至っていない。最近我々は、 α_1 受容体刺激による血管収縮に 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)を介する Ca^{2+} 流入が関与することを見いだした。本研究では、遺伝子改変マウスおよび特異的 NCX 阻害薬を用いて、その分子機序について解析した。

【方法】 実験には、血管平滑筋特異的 NCX1 高発現マウスおよび野生型マウス(WT)の摘出灌流腸間膜動脈を用いた。血管に Fluo4-AM を負荷した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度および血管径の変化を同時測定した。また、NCX1 と TRP チャネルとの機能連関を調べる目的で、TRPC3 の野生型および抑制型(ドミナントネガティブ変異体)の血管平滑筋特異的高発現マウスを作製した。

【結果・考察】 血管平滑筋特異的 NCX1 高発現マウスの動脈では WT に比べて、フェニレフリン刺激時の細胞内 Ca^{2+} シグナルおよび血管収縮が有意に増大しており、これらの血管反応は特異的 NCX 阻害薬により抑制された。この機序を解析する目的で、NCX1 と TRP チャネルの免疫沈降実験を行ったところ、NCX1 は TRPC3 と分子相互作用をすることが示唆された。そこで、TRPC3 の血管平滑筋特異的高発現マウスを作製したところ、摘出腸間膜動脈におけるフェニレフリン刺激時の細胞内 Ca^{2+} シグナルが有意に増大していることを観察した。一方、NCX1 ヘテロ欠損マウスおよび抑制型 TRPC3 高発現マウスでは、同刺激の細胞内 Ca^{2+} シグナルが顕著に減弱していた。また、NCX1 高発現マウスおよび TRPC3 高発現マウスに高濃度のノルエピネフリンを静脈内投与すると、冠スパズムに起因する心電図 ST 上昇および房室ブロックが誘発されることを見いだした。この冠スパズムは特異的 NCX 阻害薬投与により抑制可能であった。一方、NCX1 高発現マウスに抑制型 TRPC3 高発現マウスを掛け合わせたダブル遺伝子改変マウス、および TRPC3 高発現マウスに NCX1 ヘテロ欠損マウスを掛け合わせたダブル遺伝子改変マウスでは、ノルエピネフリン誘発の冠スパズムは誘発されなかった。これらの結果は、NCX1 と TRPC3 の機能共役系が α_1 受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} シグナル・血管収縮および冠スパズム誘発に重要な役割を果たすことを示唆している。NCX 阻害薬は、血管スパズムへの治療応用の可能性が期待される。

神経活動に引き起こされる脳血流動態の蛍光イメージング

Y04

○関谷 敬, 大久保洋平, 飯野正光
東京大院・医・細胞分子薬理

酸素要求性が非常に高い脳は、高度な血流調節の仕組みを持つ。断続することない血流維持のため、全身血圧の低下時に、他の臓器から血流を振り分ける機能や、神経活動に応じて脳の微小領域での血流を増加させる機能などが知られる。

全身血圧低下時には、動脈・細動脈などの大血管が拡張することで、血流維持に重要な働きをする。これらに関しては、摘出血管における研究に加え、*in vivo*においてもドップラー法やPETによる血流測定、脳表の大血管を顕微鏡で観察するなどの手法を用いて、詳細な研究がされてきた。

一方、神経活動に応じた脳の微小領域における血流増加において重要であるのは、毛細血管である。このため、*in vivo* における測定では、PETやMRIでは解像度が十分でなく、脳の深部であるので通常の顕微鏡では観察が困難である。そこで、脳スライスや摘出血管を用いた実験などが行われてきたが、生理的な血流がない状態では、毛細血管動態を明らかにすることは困難であった。さらに、これらのサンプルでは、生理的な神経活動が損なわれるため、神経活動による血流調節の機構は、まだ充分には研究されていない。このため、神経活動による脳微小血流調節は古くから知られる生理現象であり、BOLD fMRI(血中酸素依存型磁気共鳴機能画像法)シグナルなどの神経活動の指標として幅広く応用されているが、その詳細な動態や仕組みについての知見は十分ではない。

本研究では、生理的な血流と神経ネットワークを保った状態で、生理的な神経活動と、その活動により引き起こされる血流動態を、神経細胞レベル・毛細血管レベルの解像度で可視化することを試みた。我々は、現在の脳研究において標準的な手法となりつつある二光子励起顕微鏡法を用いて、ラット大脳皮質において毛細血管レベルの血流動態を *in vivo* にて可視化することに成功している。今回、生理的な感覚入力により、大脳皮質に神経活動を引き起こすシステムを構築した。そして、この感覚入力により引き起こされる神経活動を、ミトコンドリアの内在性蛋白質の蛍光強度変化を測定することで、蛍光色素導入や電極刺入をすることなく可視化し、大脳皮質における神経活動のマッピングを迅速に行う手法を確立した。

これらの手法を用いることで、神経活動に引き起こされる血管動態を詳細にとらえることが可能になると期待される。さらに、この血流調節の仕組みを解明するために、各種の蛍光インジケータを、選択的に導入する手法を検討し、神経伝達物質のグルタミン酸・毛細血管収縮に重要なペリサイトやグリア細胞の細胞内カルシウム・血流調節に関わるシグナル伝達物質の一酸化窒素などの可視化に取り組んでいる。

大動脈平滑筋細胞に発現する電位依存性ナトリウム チャンネル ($\text{Na}_v 1.7$) の機能とその役割

Y05

○目黒健太郎, 中島敏明, 飯田陽子, 高野治人, 佐田政隆,
森田敏宏, 永井良三
東京大院・医・循環器内科

背景) 電位依存性ナトリウムチャンネル (I_{Na}) は様々な種類の平滑筋細胞に出現していることが報告されている。本研究はこの I_{Na} の発現、機能及び病態生理学的な特徴をヒト培養大動脈平滑筋細胞 (hASMCs) 及びウサギ大動脈平滑筋細胞 (rASMCs) を用いて検討し、そのウサギにおける血管内膜肥厚モデルとの関わりを検討した。

方法及び結果) hASMCs にパッチクランプ法を用いて膜電流を測定したところ一過性内向き電流が、 -40mV より脱分極側で観察された。この電流は TTX にてブロックされ ($\text{IC}_{50}=17\text{nmol/L}$)、細胞外液のナトリウムを NMDG^+ で置換すると消失し、TTX 感受性の I_{Na} であった。RT-PCR 法、ならびに定量的 RT-PCR 法にて、SCN1A-SCN9A のうち、SCN9A の著明な発現が見られた。又、新鮮大動脈平滑筋での SCN9A の発現量に比して、培養細胞にて著明な SCN9A の発現が見られた。SCN9A に対する siRNA を hASMCs に導入したところナトリウム電流はほぼ完全に消失し、SCN9A の mRNA 発現量は約 1/3 までに減少した。hASMCs に発現するナトリウムチャンネルの機能を調べるため、TTX 及び siRNA を用いて検討した。TTX、siRNA とも細胞増殖には関与しなかったが、TTX 及び siRNA とも有意に遊走を抑制した ($p<0.05$, $p<0.01$)。TTX は細胞の Horse Radish Peroxidase の取り込みを有意に低下させ ($p<0.01$)、MMP-2 の分泌も有意に低下させた ($p<0.01$)。続いてウサギ大動脈平滑筋に対してパッチクランプ法を行った。新鮮平滑筋細胞にては L 型カルシウムチャンネルがみられ、 I_{Na} はみられなかったのに対して、培養細胞では I_{Na} が出現した。RT-PCR 法、定量的 RT-PCR 法及び免疫染色にて培養下での SCN9A 及びそのタンパクである $\text{Na}_v 1.7$ の発現が見られたが、新鮮大動脈平滑筋にはみられなかった。ウサギ大動脈平滑筋にてバルーン障害後 48 時間の動脈で SCN9A 及び $\text{Na}_v 1.7$ の発現が認められた。

結論) これらの結果から、通常の大動脈には SCN9A 及びそのタンパクである $\text{Na}_v 1.7$ は発現しておらず、培養下やバルーン障害後のような病的な状態で発現していた。 $\text{Na}_v 1.7$ の役割は細胞の遊走、貪食及び分泌に関与していると考えられ、 I_{Na} は内膜増殖のような病的状態を促進する役割を持つ可能性が示唆された。

大動脈平滑筋細胞における BK チャネルの一分子動態 可視化解析

Y06

○山村寿男, 池田知佳子, 大矢 進, 今泉祐治
名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析学

【目的】大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャネルは、平滑筋・分泌腺・神経等の興奮性細胞に特に多く分布しており、これらの組織の興奮時における脱分極と電位依存性 Ca^{2+} チャネル開口を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇を引き金として活性化する。BK チャネル開口に伴って生じる過分極により、細胞膜興奮と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を制限するので、BK チャネルは細胞膜興奮に対する負帰還機構を担うと考えられている。本研究では、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡を利用して、生細胞膜表面に発現する BK チャネル一分子動態をリアルタイムで画像解析した。

【方法】ラット大動脈から単離した平滑筋細胞を初代培養し、BK α チャネルの蛍光標識体 (BK α -YFP) をリポフェクション法により一過性に遺伝子導入した。TIRF 顕微鏡システムを用いて、細胞膜表面の限局した領域 (ガラス接着面より 200 nm 以内) における蛍光粒子の分布や動態を画像解析した。ラフト構造を形成するカベオリン (Cav1-CFP) との共存も検討した。また、ヒト胎児腎臓由来 293 (HEK) 細胞にも、BK α -YFP や BK β 1-CFP を再構築させた。ホールセルパッチクランプ法も同時に適用して、BK チャネル電流を記録した。

【結果】大動脈平滑筋細胞に BK α -YFP を発現させた時 (内因性の β 1 と複合体を形成すると推測される)、細胞膜表面の限局した TIRF 面に BK α -YFP の蛍光粒子およびその集積が、細胞膜表面積の約 1 % に分布していた。それらの粒子は、ほとんど分子挙動を示さなかった (拡散係数: $0.0005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 以下)。BK α -YFP 粒子の一部は Cav1-CFP と共存していた。一方、HEK 細胞に BK α -YFP 単独発現させた時には、BK α -YFP 粒子が TIRF 面上で非常にダイナミックな挙動を示すことが分かった (約 $0.0050 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。さらに、BK β 1-CFP を共発現させた場合、その拡散係数は顕著に低下した (約 $0.0025 \mu\text{m}^2/\text{s}$) が、平滑筋細胞における結果よりは有意に大きかった。

【考察】TIRF 顕微鏡を用いた生細胞膜表面の観察によって、平滑筋や HEK 細胞に再構築した BK チャネル一分子もしくはその集合体の分子挙動を可視化することができた。活性本体である BK α チャネルの分子動態は、修飾サブユニットである β サブユニットとの複合体形成やアクチン等の細胞骨格との分子間相互作用によって制限されることが示唆された。また、大動脈平滑筋細胞においては、ラフト構造の一種であるカベオラに BK α チャネルが集積している可能性も示された。本研究による BK チャネル一分子の可視化解析は、BK チャネルの生理機能の発揮や薬理学的な検討を行う上で、非常に有益な情報を提供し得ると考えられる。

糖尿病血管を用いたインスリンによるニトロ化 SERCA の増加と弛緩反応の減弱

Y07

○小林恒雄, 田口久美子, 竹之内康広, 松本貴之, 鎌田勝雄
星薬大・医薬研・機能形態

【目的】糖尿病時における高インスリン血症は、血管障害を誘発し、その一つとして血管内皮機能障害を生じる事が知られているが、詳細なメカニズムは明らかではない。最近、superoxide (O_2^-) と NO が反応して生じる peroxynitrite ($ONOO^-$) によって、a) NO 合成酵素の阻害による NO 産生の低下、b) 筋小胞体 sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase を障害による Ca 取り込みの低下による弛緩機能の障害などが報告されている。そこで今回、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈器官培養法を用いて、インスリンによって生じる内皮依存性弛緩反応の減弱と $ONOO^-$ の因果関係について検討を行った。

【方法】実験には、雄性の Wistar 系ラット、10 週齢 streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットを用い胸部大動脈を摘出した。器官培養には、胸部大動脈を serum-free Leibovitz's L-15 medium を用いて 16 時間、インスリン処置培養し、その後、KHS 液中にて ACh, NO ドナーによる弛緩反応、NOx 測定、NBT 還元法による O_2^- 測定、nitrotyrosine の免疫染色、nitro-SERCA の immunoprecipitation による測定を行った。

【結果】器官培養を用いた糖尿病血管へのインスリン処置は、a) ACh による内皮依存性弛緩反応、Angeli's salt (NO ドナー) による平滑筋弛緩反応の減弱を生じた。一方、コントロール血管では、インスリンによる弛緩の減弱は認められなかった。b) $ONOO^-$ もしくは O_2^- scavenger 処置によって、この弛緩反応の減弱への効果は抑制された。c) 培養中における NOx 産生の増加が認められたが、培養後の ACh 刺激による NO 産生は低下した。d) O_2^- 、nitrotyrosine ($ONOO^-$) の増加が認められた。e) SERCA タンパクにおける nitrotyrosine 量の増加が認められ、 $ONOO^-$ scavenger により抑制された。血管における SERCA の影響を検討するため、SERCA 阻害薬処置下による NO ドナーによる弛緩反応を検討した。コントロール血管の弛緩反応は減弱するが、インスリン処置した糖尿病血管においては、弛緩の減弱は認められなかった。

【考察】糖尿病状態の血管と高濃度のインスリンが共存する状態において、内皮依存性、非依存性弛緩反応の減弱を生じる。その原因としては、 $ONOO^-$ 増加による内皮 NO 産生の低下、SERCA のニトロ化による SERCA 機能不全の可能性が考えられる。

2 型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮機能障害に対する AMP-activated protein kinase の関与

Y08

○松本貴之, 小林恒雄, 鎌田勝雄
星薬大・医薬研・機能形態学

【目的】我々は、2 型糖尿病ラット(OLETF ラット)腸間膜動脈における内皮機能障害[内皮由来過分極因子(EDHF)の減弱及び収縮因子(EDCF)の増大]を報告している(Matsumoto et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1480-H1490, 2007)。そこで、これらの内皮機能障害がメトフォルミン慢性投与によって改善されるかどうか検討を行った。

【方法】36~42 週齢の 2 型糖尿病ラット(OLETF ラット)及び対照の LETO ラットに対して 4 週間メトフォルミン(300 mg/kg)を投与した群(OLETF+met, LETO+met)、及び非投与群(OLETF, LETO)の 4 群において、腸間膜動脈における 1) ACh 誘発内皮依存性弛緩反応、NOS 阻害薬存在下における内皮依存性収縮反応、2) ACh 刺激におけるプロスタノイド産生について検討を行った。また、メトフォルミンの作用点と考えられている AMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化薬 AICAR 処置による反応に関しても検討を行った。

【結果】LETO 群と比較し、OLETF 群にて、体重・血圧・血糖値・トリグリセリド値・インスリン値の増加が認められ、メトフォルミン処置により体重・血圧・血糖値の低下が認められた(OLETF vs. OLETF+met)。腸間膜動脈においては、intact の条件下での ACh 累積弛緩反応は、高濃度側にて弛緩反応から収縮反応に転ずるが、この反応は、インドメタシン(COX 阻害薬)前処置にて消失した。LETO 群と比較して、OLETF 群にて ACh 誘発内皮依存性弛緩反応の減弱、EDHF 様弛緩反応の減弱、並びに内皮依存性収縮反応の増大が認められた。OLETF+met 群にて、これらの異常の改善が認められた。また、OLETF 群にて増大していた ACh 誘発プロスタノイド産生も OLETF+met 群にて有意な抑制が認められた。また更に、AICAR 処置によって、内皮依存性弛緩反応の改善、収縮反応の抑制、プロスタノイド産生の抑制が認められた。

【考察】本研究によって、メトフォルミンは体重の低下や血糖値低下作用のみならず、糖尿病病態時における内皮機能障害を改善させることが明らかとなった。その機序の一端として、メトフォルミンが、持続的に AMPK を活性化して、その結果血管収縮性のプロスタノイド産生を抑制し、EDCF 反応の抑制、さらには EDHF 様弛緩反応の改善に繋がったと考えられる。

食後高血糖時の急性高インスリン状態における CGRP 神経機能減弱と Angiotensin II Type 1 受容体の関与

Y09

○座間味義人¹, 高取真吾², 藪前奈々¹, 宮下智子¹,
細田美穂¹, 高山房子¹, 見尾光庸³, 川崎博己¹

¹ 岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学,

² 日本新薬(株)創薬研究所, ³ 就実大・薬・薬効解析学

【背景・目的】

近年増加傾向にある糖尿病発症以前の境界型の患者に食後の高血糖を抑える α -グリコシダーゼ阻害薬 (α -GI) を投与すると高血糖の発症が有意に抑制されるという報告があることから、食後高血糖が糖尿病における高血糖の原因の一つになっていると考えられている。これまで我々は、中枢性の循環反射が消失した脊髄穿刺ラットを用いて、食後高血糖を想定した急性の高血糖および高インスリン状態下における神経性および血管作動物質による血圧反応を *in vivo* 系において検討し、高血糖は血管収縮性の交感神経機能を亢進し、高インスリンは血管弛緩性の CGRP 神経機能を減弱させるという知見を得ている。そこで本研究では高インスリンによる CGRP 神経機能減弱の機序を明らかにするために AT₁ (angiotensin II type 1) 受容体拮抗薬である losartan を用いて検討を行った。

【実験方法】

脊髄穿刺ラットを作製し人工呼吸下に心拍数と血圧を測定した。頸静脈よりインスリン (8 pmol/kg/min) と正常血糖を保つ目的で 14% グルコースを同時に持続注入し高血中インスリン単独の条件にした Insulin 群、コントロールとして生理食塩液を持続注入した Saline 群、各々の群に losartan (50 nmol/kg/min) を同時に持続注入した Saline + losartan 群および Insulin + losartan 群に分けた。これらの群について自律神経節遮断薬 hexamethonium で自律神経節を遮断し、 α_1 受容体作動薬 methoxamine で平均血圧を 100 mmHg 程度に上昇させた状態で脊髄電気刺激 (SCS) および calcitonin gene-related peptide (CGRP) による降圧反応を観察した。

【結果・考察】

自律神経活動を遮断し、血圧を上昇させた脊髄穿刺ラットにおいてグルコースとインスリン注入を行うと血清インスリン値のみが上昇した。このような高インスリン条件下では、SCS による CGRP 神経性降圧反応は Saline 群に比べ有意に小さな値を示した。一方、losartan 存在下 (Insulin + losartan 群) ではインスリン注入による CGRP 神経性降圧反応の減弱が抑制され、Saline 群や Saline + losartan 群とほぼ同じ値を示した。一方、CGRP 静脈内投与による降圧反応はインスリン注入および losartan によって影響されなかった。したがって、食後高血糖状態に見られる一時的な血中インスリン濃度上昇は CGRP 神経機能の低下を起し、この機序に CGRP 神経終末上の AT₁ 受容体が関与していると推察される。

Prostaglandin D2 受容体 DP の腫瘍新生血管透過性における役割

Y10

○村田幸久¹, Lin ML², 有竹浩介³, 成宮 周⁴, 尾崎 博¹,
裏出良博³, 堀 正敏¹, Sessa WC²

¹ 東京大院・獣医薬理, ²Yale 大・医・薬理,

³ 大阪バイオサイエンス研・分子行動生物学,

⁴ 京都大院・医・神経・細胞薬理

【背景・目的】Cyclooxygenase-2 とその代謝産物である Prostaglandin(PG)類の腫瘍成長における役割は盛んに研究されている。中でも PGE₂ とその受容体(EPs)の固形腫瘍における血管新生促進作用については多く報告されているが、PGD₂ については報告されていない。本研究では PGD₂ 受容体である DP の腫瘍成長における役割を検討した。

【方法・結果】DP 受容体欠損マウス(DP KO)背部皮下にマウス由来 Lewis Lung Carcinoma(LLC)を移植し、14 日間腫瘍の成長を観察した。結果、DP KO へ移植した腫瘍の成長速度は野生型マウス(WT)のそれよりも有意に速く、マウスの寿命を短縮した。一方で、DP 受容体作動薬 BW245C の投与は WT へ移植した腫瘍の成長を抑制し、その寿命を延長した。病理切片観察において、DP 受容体蛋白質の腫瘍内新生血管内皮での局在が確認されたため、血管における DP 受容体の役割を中心に解析を進めた。WT、DP KO への移植腫瘍や BW245C を処置した WT 腫瘍において、細胞増殖マーカー(PCNA)の発現量に変化はなかったが、DP KO 移植腫瘍の内部において、血管新生(PECAM-1)の亢進と血管透過性の指標となる Fibrinogen の血管外漏出の亢進、それに伴う腫瘍壊死部の縮小が観察された。反対に、WT 移植腫瘍に対する BW245C の投与は Fibrinogen の漏出と新生血管量を減少させ、腫瘍内部に観察される壊死部を拡大した。次に DP 受容体の血管透過性・血管新生に対する直接作用を検討した。マウス耳への Evans Blue 色素の拡散をみる Mile's assay とマウス角膜血管新生モデルを用いた実験の結果、DP KO において IL-1 β が誘発する色素の拡散と血管新生の亢進がみられ、BW245C 処置はそれらを強力に抑制した。興味深いことに DP KO において VEGF が誘発する透過性や血管新生には、変化が確認されなかった。DP 受容体刺激の透過性、血管新生に対する制御機構をさらに詳細に解析するため、単離内皮細胞を用いた *in vitro* アッセイを行った。その結果、BW245C は内皮細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、透過性を抑制する一方で、血管新生に関与する内皮細胞の増殖、遊走、脈管形成能には影響しないことが明らかになった。

【考察】これらの結果より腫瘍血管内皮に発現する DP 受容体は、血管透過性とそれに続く血管新生を抑制し、LLC 腫瘍の成長を抑制していることが示された。今後 DP 受容体作動薬の抗癌剤としての応用が期待される。

○木村麻紀^{1,2}, 高井真司¹, 金 徳男¹, 河島 洋³, 白石明子³,
田中一彦², 木曾良信³, 宮崎瑞夫¹

¹大阪医科大・薬理, ²大阪薬科大・臨床薬剤,

³サントリー・健康科学研

【背景・目的】ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)は、シクロオキシゲナーゼ(COX)によって主にプロスタグランジン(PG) E_1 に変換されるn-6系列の高度不飽和脂肪酸である。PGE $_1$ には抗動脈硬化作用が知られているが、その前駆物質であるDGLAについては不明である。今回我々は、DGLAの抗動脈硬化作用と作用機序の検討した。

【方法】〈実験1〉雄性10週齢、動脈硬化モデルApoEノックアウトマウスをDGLA含有餌または非含有餌(Vehicle)で飼育した。コントロールとして同週齢のC57 Blackを用いた。6ヶ月後大動脈を採取し、アセチルコリン(Ach)依存性弛緩反応の検討、脂質染色(oil red O)、単核球/マクロファージ染色を行った。また、NADPHoxidase subunitsのp22^{phox}、gp91^{phox}と接着因子ICAM、VCAMの遺伝子発現量を測定した。

〈実験2〉雄性10週齢、動脈硬化モデルApoEノックアウトマウスに高コレステロールを負荷し、DGLA含有餌、DGLA含有餌とCOX阻害薬ナプロキセン(10mg/kg bw BID)を併用し、1ヶ月間飼育した。普通食を与えたApoEノックアウトマウスをControlとした。大動脈を採取し、Ach依存性弛緩反応、oil red O染色を行った。

【結果】〈実験1〉動脈硬化面積/中膜面積比(%)は、DGLA群3.8%、Vehicle群36.7%で、有意差を認めた(p<0.01)。Control群に比してVehicle群では有意な内皮機能の減弱、p22^{phox}、gp91^{phox}、ICAM、VCAM、単球/マクロファージは高値を示した。一方、DGLA群では内皮機能の保持に加えてp22^{phox}、gp91^{phox}遺伝子発現はVehicle群と比して、それぞれ34%、43%有意に低値を示した。また、Vehicleに比してICAMは46%有意に低く、VCAMは、有意差は見られなかったが41%の低下傾向を示した。また、単球/マクロファージ陽性細胞も少なかった。

〈実験2〉Control群に比してVehicle群では有意な内皮機能の低下およびプラーク形成が見られた。DGLA群では内皮機能の保持、プラーク形成抑制が見られた。一方DGLAとCOX阻害薬を併用した群ではDGLAによる内皮機能の改善とプラーク形成抑制効果は阻害された。

【考察】実験1よりDGLAによる抗動脈硬化作用が確認できた。DGLAの投与によりNADPHoxidase subunitsのp22^{phox}、gp91^{phox}遺伝子発現が低減していたことから血管組織のNADPHオキシダーゼ構成因子が減少することで酸化ストレスが軽減していることが示唆された。また、単核球/マクロファージ染色、ICAM、VCAMの減少は血管組織の接着因子の減少が単球接着および浸潤抑制を示すことを明らかにした。実験2ではDGLAの抗動脈硬化作用がCOX阻害薬により阻害されたことから、DGLAはPGE $_1$ に変換されることにより薬効を発揮する事実が示唆された。

長鎖脂肪酸の GPR120 を介したアディポネクチン分泌促進作用

Y12

○伊賀朋世, 足達哲也, 興水崇鏡, 平澤 明, 辻本豪三
京都大院・薬・薬理ゲノミクス

【目的】 脂肪組織は、内分泌組織として種々の因子(アディポカイン)を分泌し、インスリン感受性、摂食やエネルギー代謝を調節している。特にアディポネクチンは、インスリン感受性の改善だけでなく、抗動脈硬化作用をもち、糖尿病や心血管病において重要な役割を果たすと考えられている。また、アディポカインの一種であるレプチンの分泌を短鎖脂肪酸がGPR41を介し調節していること¹⁾が示され、脂肪酸の脂肪細胞における役割に注目が集まっている。さらに、我々は長鎖脂肪酸によって GPR120が活性化されること²⁾、脂肪組織において発現し、さらに脂肪細胞分化に伴いその発現量が上昇することをすでに報告している³⁾。そこで本研究では、GPR120 のリガンドである長鎖脂肪酸(リノレン酸)のアディポネクチン分泌に及ぼす影響を検討した。

【方法】3T3-L1 脂肪細胞をコンフルエントより48時間後に分化誘導を行い、14日間分化させた。分化0、7、14日目においてRT-PCR法を用いPPAR γ 2、GPR120 mRNA発現量を測定した。さらに、培地中にリノレン酸を添加し、120分間インキュベーションを行った後、ELISA法を用いアディポネクチン分泌量を測定した。また、リノレン酸によるERK1/2のリン酸化をwestern blotting法を用い解析した。15週齢のC57BL/6Jマウス脂肪組織より成熟脂肪細胞を単離した後、リノレン酸を緩衝液中に添加し30分間インキュベーションを行い、アディポネクチン分泌量を測定した。

【結果】3T3-L1 脂肪細胞において、GPR120は脂肪細胞分化に伴いその発現量が上昇した。また、リノレン酸は、ERK1/2を活性化した。また、ERK1/2の抑制剤であるU0126をリノレン酸とともに培地中に添加したところ、リノレン酸のみ添加した場合と比較し、アディポネクチン分泌は抑制された。さらに、3T3-L1脂肪細胞と同様にマウス成熟脂肪細胞において、リノレン酸はアディポネクチンの分泌を促進し、U0126とともに処理するとその分泌が抑制された。以上の結果より、リノレン酸はGPR120を介し、ERK1/2を活性化することによりアディポネクチンの分泌を促進することが示された。

【参考文献】

- 1) Xiong Y et al., Proc Natl Acad Sci U S A 101: 1045-1050, 2004.
- 2) Hirasawa A et al., Nat Med 11; 90-94, 2005.
- 3) Gotoh C et al., Biochem Biophys Res Commun 354:591-597, 2007.

ヒト血管内皮細胞における nifedipine 代謝物による細胞障害抑制効果

Y13

○福原弥生¹, 石澤啓介¹, 堀ノ内裕也¹, 田岡千明², 山口邦久¹,
Narantungalag Dorjsuren¹, 折野早紀子¹, 土屋浩一郎²,
玉置俊晃¹

¹徳島大院・HBS 研・情報伝達薬理, ²医薬品機能解析学

【目的】

炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor (TNF)- α による血管内皮細胞障害は、動脈硬化の発症・進展に関与し血管リモデリングを誘導することが知られている。近年、nifedipine が Ca チャネル阻害作用を介さない pleiotropic effects を示すことが報告されているが、作用機序については不明な点が多い。Nitrosonifedipine (NO-nif)は nifedipine の光分解産物であるとともに、生体内でも代謝物として確認されている。NO-nif は Ca チャネル阻害作用をほとんど示さず、in vitro においてラジカル消去活性を有することが報告されているが、血管内皮細胞機能に及ぼす影響については明らかでない。そこで、今回 TNF- α による細胞接着分子発現及び細胞障害に対する NO-nif の影響について検討した。

【方法】

培養ヒト腎系球体血管内皮細胞 (HGEC)を用いて実験を行った。Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現は Western blotting 法にて測定した。細胞生存率は MTT assay にて評価し、細胞障害性は LDH assay を用いて解析した。

【結果】

HGEC において、TNF- α は ICAM-1 の発現を経時的及び濃度依存的に増加させた (0-12 時間、1-10 ng/ml)。TNF- α による ICAM-1 発現の増加は NO-nif 前処置により有意に抑制されたが、nifedipine は何ら影響を示さなかった。NADPH oxidase 阻害剤である DPI 前処置は TNF- α による ICAM-1 発現を有意に抑制した。また TNF- α は濃度依存的に HGEC の細胞生存率を低下させ、その細胞生存率の低下は NO-nif 前処置により有意に抑制されたが、nifedipine は影響を示さなかった。さらに酸化ストレスを介したラジカル反応開始剤である cumene hydroperoxide (CuOOH)は、HGEC の細胞生存率低下及び細胞障害を増悪させた。CuOOH による細胞障害に対して NO-nif は有意な抑制効果を示したが、nifedipine は何ら影響を示さなかった。

【考察】

NO-nifは TNF- α ならびに CuOOH による血管内皮細胞障害に対して抑制作用を示した。Nifedipine の大規模臨床試験成績における心血管イベント抑制作用において、代謝物である NO-nif による血管内皮保護作用がその一端を担っている可能性が示唆された。

虚血性急性腎不全における性差発現—プロテオーム解析からのアプローチ—

Y14

○高山淳二¹, 高岡昌徳², 野原麻美¹, 山本真也¹, 松村靖夫¹
大阪薬科大・¹病態分子薬理, ²生体機能解析学

【目的】雄性ラットにおける腎虚血再灌流障害は、雌性ラットの場合と比較してより顕著に誘発される。この性差発現メカニズムを調べる目的で、腎虚血再灌流処置によって変動するタンパク質の雌雄差について、プロテオーム解析により網羅的に探索した。その解析結果に基づいた性差発現の原因候補因子に対して、薬理学的な観点から虚血性急性腎不全との関連性を検討した。

【方法】8週齢のSD系雄性および雌性ラットの右腎摘除2週間後、左腎動静脈の血流を45分間遮断し、その後再灌流処置を施すことで虚血性急性腎不全モデルを作製した。腎虚血再灌流処置を除く同様の操作を行ったものをshamラットとして用いた。プロテオーム解析では、再灌流処置2時間後のラットおよびshamラットの左腎のタンパク質を二次元電気泳動法により分離し、peptide mass fingerprinting法により同定した。薬効評価を行う場合には、薬物またはその溶媒を虚血5分前に静脈内投与し、再灌流1日後の腎障害に対する効果より判定した。

【結果および考察】再灌流2時間後に変動する二次元電気泳動ゲルスポットを雌雄で比較し、腎虚血再灌流初期から雌雄それぞれで特異的に増減するタンパク質スポットを同定した。その結果、雄性ラット特異的に増加を示すタンパク質の中に、刷子縁に局在するmeprinの α サブユニットならびにミトコンドリア酵素であるF₁F₀-ATPaseの β サブユニットが同定された。虚血性急性腎不全の性差発現におけるこれら酵素の役割を調べる目的で、meprin阻害薬actinoninまたはF₁F₀-ATPase阻害薬oligomycinの本病態に対する効果について雌雄両ラットを用いて検討した。再灌流1日後のラットでは、shamラットと比較して、雌雄ともに腎機能低下ならびに腎組織病変が観測されたが、その腎障害の程度は雄性ラットでより重篤であった。actinoninまたはoligomycinの虚血前処置は、雄性ラットで認められる腎虚血再灌流障害に対して保護効果を発揮した。一方、雌性ラットではactinoninおよびoligomycinの保護効果は認められなかった。したがって、雄性ラットで顕著に認められる腎虚血再灌流障害には、meprin α およびF₁F₀-ATPase β のタンパク質発現増加さらには酵素活性上昇が一部関与するものと考えられる。

エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) の蛋白質分解における 新規結合蛋白質 Jab1 の役割

Y15

○西本 新, 魯 凌云, 西屋 禎, 堀之内孝広, 三輪聡一
北海道大院・医・細胞薬理

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) であるエンドセリン A 型受容体 (ET_AR) は、一般的には、G 蛋白質を介してシグナル伝達を行っていると考えられているが、近年、G 蛋白質のみを介するという概念では説明できない現象が報告されるようになってきた。そのため、G 蛋白質以外の ET_AR 結合蛋白質の存在が示唆されているが、そのような新規

ET_AR 結合蛋白質についてはほとんど知られていない。当研究室において、ET_AR と結合する新規蛋白質分子を得るために、酵母ツーハイブリッド法を用いて、その C 末端領域 (C-tail) をベイトとしたヒト心臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、11 種類の ET_AR 結合蛋白質を同定し、その中の一つに Jab1 (Jun activation domain-binding protein 1) を見出した。Jab1 は当初、転写因子 Jun と結合するコアクチベーターとして単離されたが、CDK インヒビターである p27Kip1 と結合し、核外移行およびその蛋白質分解を誘導することが知られている。ET_AR と Jab1 との蛋白質間相互作用は、GST pull-down assay 及び免疫沈降法により確認した。また ET_AR と Jab1 の細胞内局在を検討したところ、ET_AR は細胞膜上に、Jab1 は細胞質、核内に一様に存在しており、merge させると一部の Jab1 が細胞膜近傍で ET_AR と共存していた。Jab1 を過剰発現させると ET_AR の発現レベルが減少し、Jab1 siRNA により Jab1 をノックダウンさせると ET_AR レベルが増加した。また、このとき ET-1 刺激による ERK1/2 リン酸化の変動は、ET_AR レベルの変化と挙動をともにしていた。さらに Jab1 過剰発現下で新規蛋白質合成阻害剤である Cycloheximide で処理したところ、ET_AR 蛋白質の分解速度が促進された。これらの結果から、Jab1 により ET_AR の蛋白質分解が促進されていることが示唆された。また、ET_AR 蛋白質分解機構をより詳細に検討するため、リソソームあるいはプロテアソームでの蛋白質分解酵素阻害剤 (Chloroquine, MG-132) で処理したところ、ET_AR の細胞内蓄積が生じた。この際、野生型 ET_AR よりも分子量の大きなスメアー状の ET_AR が認められ、これは、免疫沈降法によりユビキチン化 ET_AR (Ub-ET_AR) であることが明らかとなった。さらに ET_AR ユビキチン化における Jab1 の役割を検討するため、Jab1 過剰発現下で免疫沈降法により Ub-ET_AR を検出したところ、Ub-ET_AR の増大が認められ、Jab1 は ET_AR のユビキチン化を促進していると考えられた。以上より、Jab1 は、ET_AR のユビキチン化・蛋白質分解を促進し、ET_AR レベルを負に制御していることが示唆された。今後、ET_AR を介したシグナル伝達の異常が病態の発症・進展において重要な役割を果たしていると考えられる心不全等を呈した心疾患患者からの臨床組織や培養細胞株を用いて、ET_AR, Jab1 の発現レベルを調べ、さらに Jab1 の発現変化(過剰発現・発現消失)に伴う ET_AR レベルの変化・ET_AR シグナル伝達の変化を検討し、その病態的意義を明らかにしていきたいと考えている。

Cyclin-dependent Kinase-9 は p300 の Histone Acetyltransferase 活性に必須である

○砂川陽一¹, 森本達也¹, 川村晃久¹, 高谷智英¹, 和田啓道¹,
藤田正俊³, 島津 章¹, 北 徹², 長谷川浩二¹
¹国立病院機構京都医療セ・展開医療,
京都大院・医・²循環器内科, ³人間健康科学

【目的】心筋特異的転写因子 GATA4 は肥大反応により、DNA 結合能が増加し、肥大反応遺伝子の転写活性を亢進する。肥大反応により、GATA4 は ERK、NFATc、ヒストンアセチル化酵素(HAT)p300 などと巨大な蛋白コンプレックスを形成する。このコンプレックスの破綻により、心筋細胞肥大反応は抑制される。そこで我々は GATA4 コンプレックスを TAP (Tandem Affinity Purification) 法にて精製し、マスペクトメトリーによって同定した。GATA4 コンプレックスの中には P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) の構成蛋白である Cdk9 および Cyclin T1 が含まれ、これらは RNA ポリメラーゼ II の C 末のリン酸化を亢進させることにより、その転写伸長反応を促進させる。そこで本研究の目的は、Cdk9/Cyclin T1 が GATA4/p300 と心筋細胞内で機能的コンプレックスを形成し、心筋細胞肥大に必要などうかを検討することである。

【方法と結果】COS 細胞にトランスフェクションにより GATA4 を発現させ、その細胞から核蛋白を抽出した。免疫沈降—ウエスタンブロットにより GATA4/p300 と Cdk9/Cyclin T1 の結合を確認した。p300 は GATA4 のアセチル化のみならず、GATA4 と P-TEFb の結合を亢進した。さらに、p300 は RNA ポリメラーゼのリン酸化を亢進させることより、p300 は Cdk9 のキナーゼ活性の制御に関与していることが示唆された。これらの効果は p300 のドミナントネガティブ体(DNp300)により抑制された。一方、1アミノ酸を変異させる事によりキナーゼ活性を消失させた Cdk9 のドミナントネガティブ体(DNCdk9)は、p300 による RNA ポリメラーゼ II のリン酸化の亢進を抑制した。DNCdk9 は p300 による GATA4 のアセチル化を抑制した。このことより、p300 の HAT 活性には Cdk9 が必要であることがわかった。DNCdk9 および Cdk9 インヒビターである DRB は GATA4/p300 による肥大反応遺伝子 ET-1 (Endothelin-1) や ANF (Atrial Natriuretic Peptide) の転写活性の亢進を抑制した。培養心筋細胞では、心肥大刺激であるフェニレフリンにより GATA4 と Cdk9/Cyclin T1 の結合は増加したが、DRB はその結合を抑制した。DRB は培養心筋細胞におけるフェニレフリンによる心筋細胞肥大や ET-1 や ANF の転写活性を抑制した。

【考察】Cdk9/Cyclin T1 と GATA4/p300 は巨大な機能的コンプレックスを形成し、相互に制御し合い、心筋細胞肥大反応に必要な事が示された。

The role of nNOS in cardiac ischemia reperfusion and ischemia preconditioning in mice

○Xiao-mei Lu, Guo-xing Zhang, Shoji Kimura, Akira Nishiyama
Department of pharmacology, Faculty of Medicine,
Kagawa University

【Objective】 Several studies have demonstrated the role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in cardiac ischemia reperfusion(IR) and ischemia preconditioning(IPC) protection, however neuronal nitric oxide synthase (nNOS) has not been investigated, the present study was designed to reveal the possible mechanisms by which nNOS plays a role in cardiac IR and IPC.

【Methods】 nNOS^{-/-} (KO) and wide type (WT) C57 mice were subjected to 30 min of ischemia by left descending branch of coronary artery ligation and then followed 3h and 24h reperfusion. IPC was induced by 3 cycles of 5 min ischemia and reperfusion before 30min ischemia. After 24h reperfusion, the ratio of infarct size(IS) and at risk area(AAR) was measured by triphenyl tetrazolium chloride(TTC) staining . After 3h reperfusion, the activities of caspase-8, -9, cleaved caspase-3, phospho-p38, and phospho -ERK mitogen activated protein kinase (MAPK) in cardiac tissue were measured.

【Results】 Our results showed that the activities of caspase-8 and -9; the cleaved caspase-3, phospho-p38, phosphor-ERK are significantly increased ($p<0.05$) in both of the two strain of mice after IR compared with sham group. However, in KO group, the activities of caspase-8, -9, -3, and phospho-p38 MAPK are significantly lower than WT group ($p<0.05$), which accompanied with smaller ratio of IS to AAR. In WT, IPC decreased caspase-8, -9, -3 activities and ratio of IS to AAR; while in KO mice IPC further increased caspase-8, -9, -3 activities and ratio of IS to AAR, without activation of p38 MAPK ($p<0.05$) compared with KO IR mice.

【Conclusion】 The present study demonstrated that NO derived from nNOS may play a dual role in cardiac IR and IPC. It can exaggerate IR induced injury and mediate the protective effect in IPC, which maybe involved p38 MAPK.

○泉 康雄, 塩田正之, 中尾隆文, 岩尾 洋
大阪市大院・医・分子病態薬理

【目的】サイクリン依存性キナーゼ 7 (Cdk7)はサイクリンに結合して細胞周期に関与するとともに、転写にも関与しており、ヒト心不全症例では心臓の Cdk7 活性が亢進することが報告されている。Ménage-à-trois 1 (MAT1)は Cdk7 およびサイクリン H (cycH)とともにヘテロ三量体を形成しているが、MAT1 の心臓における役割については不明である。本研究では、Cre-loxP システムを用いて作製された心臓特異的な MAT1 遺伝子欠失マウスを用いて、心臓における役割について検討した。

【方法】(1) MAT1 flox/flox (MAT1f/f)マウスと α ミオシン重鎖(α MHC)-Cre+ / MAT1f/+マウスとの交配により α MHC-Cre+ / MAT1F/F (=コンディショナルノックアウト:CKO)マウスを作製し、心機能、生存率、遺伝子発現について、 α MHC-Cre+ / MAT1F/+ (=コントロール)マウスと比較検討した。(2) 心筋のミトコンドリア機能を電子顕微鏡像、TCA 回路・呼吸鎖複合体の酵素活性、ランゲンドルフ灌流心を用いた血行動態及び酸素消費量、グルコース・脂肪酸代謝能について、コントロールマウスと比較検討した。(3) GST-pull down 法を用いて MAT1 が PGC-1 を直接調節できるかどうかを調べた。

【成績】(1) CKO マウスは正常に生まれ、約 4 週齢までは肉眼上の異状を呈することなく成長し、心機能も保たれていた。しかしながら、4 週齢以降に劇的・致死的な心不全を発症して死亡した。MAT1 を心筋で過剰発現させることで死亡率は改善したが、Cdk7 あるいは cycH の過剰発現では改善できなかった。マイクロアレイ法および定量 real-time PCR 法により、4 週齢の CKO マウス心臓では、peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1)を含むミトコンドリア代謝に関する多くの遺伝子発現が有意に低下していた。(2) 心不全発症前(3-4 週齢)の CKO マウス心筋では、電子顕微鏡においてミトコンドリアの形態異常を認め、TCA 回路・呼吸鎖複合体の酵素活性はコントロールマウスに比べて有意な低下を認めた。3.5 週齢におけるランゲンドルフ灌流心を用いた血行動態では、負荷のない状態では両群間に著大な差を認めなかったが、カルシウム負荷による反応性が有意に低下していた。また、酸素消費量には差がないにもかかわらず、グルコース代謝・脂肪酸代謝能は CKO マウスで有意に低下していた。さらに、ミトコンドリアの酸化的リン酸化能も CKO マウスで有意に低下していた。(3) MAT1 および Cdk7 は in vitro において PGC-1 と直接結合できた。

【結論】MAT1 は直接 PGC-1 に結合し、ミトコンドリア機能を調節している。MAT1 は心不全の発症・進展に極めて重要な役割を演じている。

○島田康人, 臧 黎清, 梅本紀子, 田中利男
三重大院・医・薬理ゲノミクス, 三重大・生命科学研究支援
センター機能ゲノミクス・バイオインフォマティクス

現在わが国の心不全患者数は推定約 160 万人、社会の高齢化に伴い患者数の著しい増加が予想されている。心不全の基礎疾患としては虚血性心疾患、不整脈、心弁膜症、心筋症などがあるが、いずれも最終的には心臓のポンプ機能の低下・消失を誘導し死にいたる。心不全に対する治療薬探索研究には、ヒト心筋培養細胞系によるスクリーニングの結果を元に、マウスやラットなどの疾患モデル動物を用いた研究がよく行われている。しかし細胞を用いたスクリーニングの結果が、より高次の哺乳類動物モデルの系に反映されない場合が非常に多く、時間・費用・倫理の面で大きな問題となっている。

我々は今回、マウス・ラットに続く第3のモデル動物として注目されている「ゼブラフィッシュ」を用いて心不全モデルを構築した。ゼブラフィッシュは魚類であるが、遺伝子配列情報・ゲノムシニテニーはヒトと約 80%の相同性がある。主要臓器・組織の発生・構造もヒトと良く似ており、生命活動に重要な、細胞内シグナル伝達・細胞増殖・がん化に関与する遺伝子・タンパク質には類似性が非常に高いことが近年判明してつつある。そして、すでに筋ジストロフィーなどの変性疾患や、クローン病・潰瘍性大腸炎などの自己免疫・炎症性疾患、急性骨髄性白血病や転移性黒色腫など、多くのヒト疾患のモデル動物として研究が活発化している。また、1) 受精卵から分化して主要臓器は完成するまで 72 時間と早く、2) 各臓器が形成される過程が透明な体を通して観察でき、3) その組織の基本構造が出来上がっても体長は 3 ミリ程度、96 ウェルプレートなどの小スペースで多数個体が同一飼育条件で取り扱えるため、ハイスループット・スクリーニングへの適用が可能である。

今回、我々が構築したゼブラフィッシュ心不全モデルは、房室弁の著しい閉鎖不全と心拍出量・抹消循環量の低下、引き続く容量負荷による心室の著明な拡大が認められた。そしてこれらの病態に対し、アドレナリンベータ受容体遮断薬をはじめとする既存の心不全治療薬により治療が成立することを明らかにした。さらにその心臓特異的遺伝子発現プロファイルを、Laser Capture Microdissection 法と DNA チップを用いて解析した。そこで得られた発現変化遺伝子群に対し、siRNA cocktail および morpholino antisense 法による発現抑制実験によるバリデーションを行い、さらに文献マイニングをベースとしたネットワーク解析を行った。In vivo, in silico 両方のアプローチにより、心不全病態に対する新しい治療遺伝子ネットワークを明らかにしたので報告する。

マウス洞房結節細胞における ATP 感受性 K^+ チャネルの 電気生理学的役割の解析

Y20

○福崎絃一¹, 佐藤俊明¹, 三木隆司², 清野 進², 中谷晴昭¹

¹千葉大院・医・薬理, ²神戸大院・医・細胞分子医学

【目的】ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルは内向き整流性 K^+ チャネルサブユニット (Kir6.0) とスルホニルウレア受容体 (SUR) から成るヘテロ八量体である。 K_{ATP} チャネルは洞房結節細胞にも存在しているが、その活動電位形成における役割は十分明らかとなっていない。我々は野生型 (WT) および Kir6.2 遺伝子欠損 (KO) マウスの摘出灌流心ならびに洞房結節細胞を用い、 K_{ATP} チャネル活性化時の活動電位変化および洞房結節機能に対する影響を検討した。

【方法】両マウスより摘出心臓標本 (Langendorff 灌流心) を作成し、低酸素暴露時における洞リズム周期長 (CL) の変化を記録した。また酵素的に洞房結節細胞を単離し、パッチクランプ法および細胞内 Ca^{2+} 蛍光イメージング法を用いて代謝阻害時の活動電位および細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を検討した。

【結果】低酸素暴露時に WT 心では著明な CL 延長を認めたが、KO 心では CL の変化が認められなかった。また、再酸素化によって WT 心では CL が回復したが、KO 心では回復率が低かった。WT 洞房結節細胞では K_{ATP} チャネル開口薬 pinacidil 存在下および 2,4-dinitrophenol による代謝阻害時に、緩徐脱分極相の抑制を伴って自動能が低下したが、KO 洞房結節細胞では同様の変化が認められなかった。また代謝阻害時に、WT 細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇抑制が認められたが、KO 細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇が認められた。

【結論】マウス洞房結節細胞において、 K_{ATP} チャネルの活性化は主に緩徐脱分極相を抑制して自動能を低下させると考えられ、代謝阻害時や低酸素状態では洞房結節に保護的な役割を果している可能性が示唆された。

○黒川洵子¹, 中村浩章¹, コリーン・克蘭シー², 玉川正次³,
中谷晴昭³, 古川哲史¹

¹東京医歯大・難研, ²コーネル大・医, ³千葉大院・医・薬理

【背景】 QT 延長症候群における不整脈リスクは女性において有意に高く、性周期や周産期により変動する。臨床的には、高プロゲステロンレベル状態では QT 間隔が短く不整脈リスクが減少し、高エストロゲン状態では QT 間隔が延長し不整脈のリスクが増大する傾向が報告されている。これらの報告は、プロゲステロンとエストロゲンが心臓再分極に対し相反する作用を有していることが示唆される。しかし、これまでの性ホルモンゲノム作用による解析ではそのメカニズムを説明できていないため、我々は膜に局限した反応である非ゲノム作用に注目している。

【目的と実験方法】 女性ホルモンの心筋再分極相への作用を調べるために、急性的な非ゲノム作用を電気生理学的手法、生化学的手法により解析した。さらに、不整脈リスクへの影響を統合的に調べるために、活動電位シミュレーション(Luo-Rudy モデル)を導入した。

【結果】 生理的濃度範囲のプロゲステロン(P₄)は、交感神経非刺激時には遅延整流カリウム電流(I_{Ks})を増大し、交感神経刺激時には L 型 Ca²⁺電流(I_{Ca,L})を減少した。これらの作用は、プロゲステロン受容体の非ゲノム経路による eNOS から産生される NO を介したものであった。シグナル分子がカベオラに局在化していることをスクロス密度勾配遠心法により示し、非ゲノム経路を担うプロゲステロン受容体の候補として 78kDa の short form を見出した。一方、生理的濃度範囲のエストロゲンでは非ゲノム経路を介した作用は見られず、I_{Kr} (hERG) チャネルの電位依存性を変化させ電流を減少し、P₄ とは逆にエストロゲンは QT 延長に寄与していることが示唆された。

性周期による不整脈リスクの統合的モデルの第一段階として、P₄ のデータをシミュレーションモデルに導入することにより、活動電位幅、不整脈に対する影響を検討した。性周期における女性の血中 P₄ 濃度の最高値 40.6 nM と最低値 2.5 nM における実験データを活動電位シミュレーションに導入したところ、性周期に伴う活動電位幅の変動を再現することができた。さらに、先天性および薬剤による不整脈に対して P₄ は保護的作用を持ち、黄体期に保護的作用が増強されることが予測された。

【結論】 女性ホルモンの急性作用を解析することにより、臨床で示唆されるプロゲステロンとエストロゲンの心臓再分極に対する相反した作用をイオンチャネル制御レベルで初めて説明しうる結果を得た。P₄ のデータを基にしたシミュレーションモデルは、女性の性周期によりダイナミックに変動する不整脈リスクを予測するという応用が将来的に期待される。今後エストロゲンのデータも順次導入していく予定である。

一般演題

心房筋 L 型 Ca^{2+} チャンネル $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の開閉制御機構 とペースメーカー活動電位における役割

A01

○中瀬古(泉)寛子¹, 村上慎吾², 倉智嘉久²,
水流弘通¹, 赤羽悟美¹

¹東邦大・医・薬理, ²大阪大院・医・分子細胞薬理

心臓ペースメーカー電位の頻度調節には電位依存性 T 型 Ca^{2+} チャンネルと L 型 Ca^{2+} チャンネルが関与しているが、心拍数の低い大動物においては L 型チャンネルの寄与が大きいことが報告されている。心臓において L 型 Ca^{2+} チャンネルの α_1 サブユニットとして $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ が発現しており、 $\text{Ca}_v1.2$ は心臓全体に、 $\text{Ca}_v1.3$ は洞房結節、心房、房室結節に発現が報告されている。本研究では異所性に発現した $\text{Ca}_v1.3$ の電気生理学的特徴を $\text{Ca}_v1.2$ と比較検討し、さらに洞房結節の自動能形成における役割を明らかにすることを目的として活動電位クランプ (AP clamp) 実験とシミュレーションを行った。

従来の報告のように、 $\text{Ca}_v1.3$ は電位依存性活性化と不活性化が $\text{Ca}_v1.2$ に比べ過分極側へシフトしていた。さらに、 $\text{Ca}_v1.3$ は電位依存性不活性化が $\text{Ca}_v1.2$ に比べ遅いことを見出した。次に定常的な不活性化からの回復を調べると $\text{Ca}_v1.3$ は $\text{Ca}_v1.2$ より回復速度が速いことが明らかになり、 $\text{Ca}_v1.3$ は不活性化状態で安定しにくいことが示唆された。電位依存性不活性化を制御する分子内領域の一つであるチャンネルの C 末端領域に着目し、 $\text{Ca}_v1.2$ の C 末端領域を $\text{Ca}_v1.3$ 型に代えたキメラチャンネル CTD を作成し解析を行った。その結果 CTD は $\text{Ca}_v1.3$ 型の遅い電位依存性不活性化を示した。一方、電位依存性不活性化からの回復速度は $\text{Ca}_v1.3$ に比較して遅く $\text{Ca}_v1.2$ 型のままであった。次に、洞房結節の自動能活動において $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ のチャンネル電流がどの程度維持され、また電位依存性不活性化キネテティクスの差異がどのような意味を持つのか明らかにするため、洞房結節の活動電位を模した AP clamp を行い、それぞれのチャンネル電流を比較検討した。 $\text{Ca}_v1.3$ はペースメーカー電位中から電流が流れはじめ、活動電位再分極相において電流の再活性化が観察された。また、回復する活動電位下で電流ピークが減衰する過程を比較したところ、 $\text{Ca}_v1.3$ と CTD は $\text{Ca}_v1.2$ に比較して電流ピークの減衰が小さかった。さらに、発現 $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ のキネテティクスからそれぞれの数理モデルを作成し検討したところ、AP clamp 下での各 Ca_v チャンネル動態を再現できた。

以上より、 $\text{Ca}_v1.3$ は活性化電位が深いことと電位依存性不活性化が遅いため、活動電位において幅広い電位で活性化し、ペースメーカー電位の形成・活動電位幅の維持に重要であることが示された。また電位依存性不活性化速度は電流量の維持にも関与することが示唆された。

細胞内微細構造に基づくカルシウム動態 モデルシミュレーション

A02

○河津俊宏¹, 村上慎吾², 鈴木慎悟², 赤羽悟美³, Ian Findlay⁴,
倉智嘉久², 野村泰伸¹

¹大阪大院・基礎工・生体工学, ²医・分子細胞薬理,

³東邦大・医・薬理, ⁴Université de Tours

心筋細胞膜は、T管およびそれに近接する筋小胞体、あるいは各種チャネル・受容体等、種々の要素から構成されている。これらの構成要素の3次元的構造、およびそれらの空間的位置関係は、興奮収縮連関をはじめとする細胞機能の発現に、何らかの役割を果たすことが予想される。本研究では、T管周辺の少数個のL型カルシウムチャネル、それに隣接する筋小胞体表面、およびリアノジンレセプタからなる心筋細胞の3次元的微細構造モデルを構築し、L型カルシウムチャネルから流入したカルシウムイオンの時空間的ダイナミクス、およびそれと並行して起こるL型カルシウムチャネルの膜電位（VDI）およびカルシウム依存性の不活性化（CDI）の動態シミュレーションを行った。特に、微細構造とカルシウムの拡散に関する性質が、隣接する複数個のL型カルシウムチャネルのCDIの動特性に与える影響を調べた。その結果、T管と筋小胞体の相対的位置関係（距離）、近接するL型カルシウムチャネル間の距離、dyadic space内におけるカルシウムの拡散係数、L型カルシウムチャネルとカルシウムの結合の親和性、およびその結合サイトの空間的位置といったモデルの構造と動態を決めるパラメータの値によっては、隣接するL型カルシウムチャネル間に抑制性の相互作用、すなわちカルシウムイオンの空間的拡散に依存したCDIの促進が起き得ることを明らかにした。

A03

村上慎吾, 鈴木慎悟, 倉智嘉久
大阪大院・医・分子細胞薬理

心臓の機能は生理的・心理的要求に応じて、交感神経と副交感神経からなる自律神経によって調整される。この制御は、受容体から G 蛋白質を介したイオンチャネルへの情報伝達系によって実現されている。この情報伝達系は、受容体 (β -アドレナリン性受容体、 m_2 ムスカリン性受容体)、G 蛋白質 (PTX 感受性 G_K 、 G_s)、細胞内シグナル分子、イオンチャネル (G 蛋白質制御性カリウムチャネル、L 型カルシウムチャネル) からなる。この心臓興奮制御の定量的な理解のために、我々の実験結果を基にし、G 蛋白質制御性カリウムチャネルのムスカリン性活性化のモデル化を行うことで、副交感神経系制御のモデルを製作した。G 蛋白質制御性カリウムチャネルは、 m_2 ムスカリン性受容体にカップリングした G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットによって活性化される。今回製作したモデルでは、この情報伝達系を2つの構成要素に分けた。一つは $\beta\gamma$ サブユニットと G 蛋白質制御性カリウムチャネルで構成され、もう一つは m_2 ムスカリン性受容体と G 蛋白質で構成される。G 蛋白質制御性カリウムチャネルに対する RGS 蛋白質の役割に関する近年の我々の発見を取り込むことにより、モデルはアセチルコリンによる G 蛋白質制御性カリウムチャネルの活性化の特性を再現することができた。このモデルにより、心臓興奮の神経制御に関する定量的な理解が進むと考えられる。

G タンパク質共役型受容体を介した持続性 Ca^{2+} 濃度上昇 反応の分子メカニズム

A04

○堀之内孝広¹, 三宅由美恵¹, 西屋 禎¹, 西本 新¹,
森島繁², 村松郁延², 三輪聡一¹

¹北海道大院・医・細胞薬理, ²福井大・医・薬理

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であるエンドセリン A 型受容体 ($\text{ET}_\text{A}\text{R}$) や $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ 、 $\alpha_{1\text{A}}$ -アドレナリン受容体 ($\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$) が活性化されると、一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$) 上昇反応と、それに引き続いて持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応が生じる。従来、前者の反応は Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} の遊離、また、後者の反応は Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} の枯渇によって活性化されるストア作動性 Ca^{2+} チャネル (SOC) を介した細胞外 Ca^{2+} の流入によるものと、考えられてきた。しかし、CHO 細胞に内在性に発現している $\text{P}_{2\text{Y}}$ 受容体を ATP で刺激した場合、一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応は生じるものの、持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応は、ほとんど認められない。即ち、 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} の枯渇が、持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応をもたらすといった古典的な分子機構だけでは、上述の知見を説明することは出来ない。

そこで、本研究では、GPCR を介して引き起こされる持続性の Ca^{2+} 流入に関する分子メカニズムを明らかにするため、1) fluo-3 を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 測定実験、2) Western blot 法によるシグナル分子の活性化状態の定量的解析、ならびに、3) Cytosensor を用いた細胞外への酸排出速度 (ECAR) 測定実験を行った。

CHO 細胞に発現させた $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ 、 $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ 、 $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ を介した持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応は、TRPC チャネル阻害作用を有する La^{3+} によって、顕著に阻害された。このことから、SOC の分子実体であると考えられている TRPC チャネルが、持続性の Ca^{2+} 流入に関与している可能性が示唆された。TRPC チャネルには、NHE (Na^+/H^+ exchanger) の活性を調節する NHERF (NHE regulatory factor) と結合する PDZ ドメインが存在することから、持続性の Ca^{2+} 流入における NHE の関与について検討した。その結果、 $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ 及び $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ を介した持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応に、NHE の活性化機構が寄与していることが示唆された。実際に、これら GPCR 刺激により、NHE を介した持続的な ECAR の上昇が認められた。最近、NHE は、p38 MAPK によっても、活性化されることが報告されている。驚いたことに、 $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ 、 $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ 、 $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ を介した持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応は、p38 MAPK 阻害薬によって、有意に抑制された。さらに、これら GPCR 刺激により、p38 MAPK のリン酸化量が顕著に増大した。以上の結果と従前の知見 (Horinouchi et al., J. Pharmacol. Sci., 2007, in press) から、GPCR を介した持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ 上昇反応に、

- 1) $\text{GPCR} \rightarrow \text{p38 MAPK} \rightarrow \text{NHERF} \rightarrow \text{NHE} (\text{Na}^+ \text{の流入}) \rightarrow \text{NCX} (\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} \text{ exchanger})$ 、
 - 2) $\text{GPCR} \rightarrow \text{p38 MAPK} \rightarrow \text{NHERF} \rightarrow \text{TRPC} (\text{Na}^+ \text{の流入}) \rightarrow \text{NCX}$ 、
- といった少なくとも 2 種類の機構が関与している可能性が示唆された。

レニン分泌に影響する腎皮質内プロスタグランジン E₂(PGE₂) 濃度調節における PG トランスポーターの役割

A05

○波多野亮^{1,2}, 平田 拓³, 武藤重明⁴, 金井好克¹,
松原光伸²

¹大阪大院・医・生体システム薬理, ²東北大院・医・
遺伝子医療開発, ³杏林大・医・薬理, ⁴自治医大・腎臓内科

腎傍系球体装置からのレニンの分泌は、レニン - アンジオテンシン - アルドステロン (RAA) 系を発動させ血圧コントロールに大きな影響をあたえるが、腎レニン分泌の調節機構にはいまだに不明な点が多く残されている。特にこの15年間で、遺伝性高血圧症の背景にアルドステロン合成と腎遠位尿細管のNa輸送に関わるタンパク質群の遺伝子異常が判明したため、遠位尿細管のNa輸送とレニン分泌を密接に関連付ける腎皮質の生理機構の解明が必要となってきた。一方、我々は腎臓に局限して発現し、PGE₂を含むPGを選択的に輸送するトランスポーター (OAT-PG) を見い出した。PGE₂は腎臓における重要なオートコイドであり、腎皮質においてレニン分泌を制御することが報告されている。OAT-PGは、PGの局所濃度の決定因子のひとつとして、レニン分泌制御に関与することが示唆される。そこで本研究は、OAT-PGの腎臓内局在を決定し、またその発現変動を解析することにより、OAT-PGの生理機能について検討を加えた。

OAT-PGの局在は、ラット腎を用い、単離尿細管によるSegmental RT-PCR法と免疫染色法により決定した。発現変動は、ラット副腎不全モデルの腎組織を用い、ウェスタンブロット法、免疫染色法、半定量的RT-PCR法で検討した。加えて、遠位尿細管でPGE₂を産生し腎皮質内にPGE₂を供給する酵素であるCOX2と、近位尿細管でPGE₂を代謝して不活化する酵素15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)も検討した。病態モデルの腎皮質内PGE₂濃度と血漿レニン活性も測定した。

結果、OAT-PGは腎皮質において、近位尿細管の側底膜側に局限し、15-PGDHと共存することを見出した。また、COX2はマクラデンサを中心とした遠位尿細管に発現することを確認した。副腎不全モデルラットではCOX2の発現が増加する一方でOAT-PGの発現は減少し、腎皮質PGE₂濃度の上昇と血漿レニン活性の上昇が観察された。アルドステロンの投与時には、COX2の発現低下とOAT-PGの発現増加が認められ、腎皮質PGE₂濃度と血漿レニン活性はともに低下した。

以上より、腎皮質ではCOX2依存的に遠位尿細管でPGE₂が合成され、間質に分泌されたPGE₂は傍系球体装置からのレニン分泌を刺激し、その後、OAT-PGにより側底膜側から近位尿細管上皮細胞に回収され15-PGDHによる分解受けると考えられる。このようなレニン分泌制御に関わる腎皮質内のオートコドシステムが存在すると想定され、OAT-PGはその一環として発現制御を受けることが示唆された。遠位尿細管におけるCOX2の発現は遠位尿細管でのNa輸送を反映するとされていることから、OAT-PGは、遠位尿細管のNa輸送と血圧調節とを関連づける生理機構の重要な要素と考えられる。

脳および腸間膜動脈支配神経刺激作用に及ぼす シロスタゾールの影響

A06

○安屋敷和秀, 王 春梅, 篠崎一哉, 岡村富夫
滋賀医大・薬理

【目的と方法】近年、抗血小板薬であるシロスタゾール (CZ) による脳梗塞再発予防効果が報告されている。我々は、経壁電気刺激 (TES) およびニコチン (NIC) が神経由来の一酸化窒素 (NO) を介し、また、サブスタンス P (SP) が内皮由来の NO を介して脳動脈を弛緩させることを示してきた。他方、TES および NIC は、神経由来のノルアドレナリン (NA) を介して、腸間膜動脈を収縮させる。そこで、今回、摘出イヌ脳動脈における TES、NIC、SP、NO ドナー (酸性溶液中に溶解した亜硝酸ナトリウムおよびニトログリセリン) による弛緩と腸間膜動脈における TES および NIC 誘発性の NA 作動性神経刺激による収縮に対する CZ の作用を、マグヌス法を用いて比較検討した。

【結果】プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で前収縮させた脳動脈は、CZ の低濃度 (10^{-8} と 10^{-7} M) では反応せず、高濃度 (10^{-6} M) で内皮非依存性に弛緩した。内皮正常脳動脈標本は、TES (5Hz)、NIC (10^{-4} M)、SP (10^{-8} M) および NO ドナーにより弛緩した。CZ (10^{-7} M) 前処置は、TES と NIC 弛緩を増強させたが、SP および NO ドナーによる弛緩には影響しなかった。他方、内皮を除去した腸間膜動脈における TES ならびに NIC による神経由来 NA を介する収縮は、CZ 処置で影響されなかった。

【考察】脳動脈において、CZ は TES や NIC による神経由来の NO を介した弛緩を増強し、外来性 NO や内皮由来 NO を介した弛緩ならびに腸間膜動脈における神経由来の NA を介した収縮に影響しなかったことから、CZ は、脳動脈に分布する NO 作動性神経興奮による NO の産生・遊離を増強させると考えられた。このことから、CZ の脳梗塞再発予防効果は、抗血小板作用に加えて、NO 作動性神経機能の増強という新しい作用機序による可能性が示された。

無麻酔・無拘束ラットの Clonidine 脳内投与による昇圧反応
機序: 中枢 GABA 神経系の関与

A07

○花房伸幸¹, 岡本和明¹, 北村佳久², 高山房子¹, 川崎博己¹

¹岡山大院・医歯薬総合・臨床薬学, ²医薬管理学

【背景・目的】

我々は中枢性の降圧薬である Clonidine を無麻酔無拘束ラットの側脳室 (Intracerebroventricular: 以下 ICV) に投与した際、持続的な血圧上昇反応が出現することを明らかにし、その発現機序について検討している。これまでの研究で、Clonidine の中枢性昇圧反応の脳内作用部位として視床下部室傍核 (Paraventricular nucleus: 以下 PVN) が考えられている。PVN は中枢 GABA 神経の活動部位としても知られており、PVN における GABA 神経系が交感神経活動を調節して血圧および心拍数に影響を与えていることが報告されている。そこで今回、Clonidine による中枢性昇圧反応における中枢 GABA 神経系の関与について検討した。

【実験方法】

実験には 300 ~ 350g の Wistar 系雄性ラットを用いた。脳内 (ICV または PVN) に薬物投与用のカニューレを、左大腿動脈に血圧測定用のカニューレをそれぞれ慢性的に留置し、回復期間をおいた後、無麻酔・無拘束下、または pentobarbital (50 mg/kg i.p.) 麻酔下で血圧、心拍数の変化を測定した。Clonidine は ICV または PVN に投与した。また、GABA 受容体の作動薬を ICV あるいは PVN 前処置し、その後同部位に Clonidine を投与した。

【実験結果および考察】

無麻酔・無拘束ラットにおいて、Clonidine の ICV (5、10、20 μ g) 投与および PVN (5、10 μ g) 投与によって用量依存的な血圧の上昇と心拍数の低下が観察された。しかし、降圧反応は殆ど観察されなかった。麻酔下ラットでは、Clonidine の ICV および PVN 投与による昇圧反応は抑制され、降圧反応に転じた。GABA 受容体作動薬である Mucimol の PVN 前投与 (1nM) によって Clonidine による昇圧反応は著明に抑制され、降圧反応が観察された。以上の結果、Clonidine 脳内投与による血圧上昇反応の脳内作用部位として PVN が考えられ、またその反応には GABA 神経系の関与が示唆される。

AT₁受容体刺激による I_{Ks} 修飾における KCNQ1 の C 末端の関与

A08

○大倉正道, 岡崎 雅, 野呂田郁夫, 石井邦明
山形大・医・循環薬理

【背景】 心筋細胞における外向き K⁺電流は活動電位の再分極に寄与する。I_{Ks} は緩徐活性型遅延整流性の外向き K⁺電流であり、KCNQ1 と KCNE1 の複合体により形成されるチャネルを流れる。I_{Ks} は種々の細胞内情報伝達系による修飾を受けることが指摘されている。心不全時にはアンジオテンシン II (AngII)、エンドセリンなどの内因性血管収縮物質の血中濃度が上昇していることが知られているが、これら内因性物質の受容体刺激による I_{Ks} の修飾機構には未だ不明な点が多い。

【方法】 AngII 受容体1型(AT₁R)、KCNQ1 および KCNE1 の cDNA クローンを用いた。AT₁R 刺激(AngII 10⁻⁶ M 投与)による I_{Ks} の修飾、およびその修飾における KCNQ1 の C 末端の関与を検討するために KCNQ1 の C 末端欠失(ΔC)変異体を作製した。アフリカツメガエル卵母細胞に、野生型あるいはΔC の KCNQ1 と KCNE1 および AT₁R を共発現させ、I_{Ks} に対する AT₁R 刺激の影響を検討した。電流の測定には2電極膜電位固定法を用い、保持電位-80 mV から 5 秒間脱分極させた後に-70 mV に再分極させるパルスを与え、その際に流れる全細胞電流を記録した。一方、緑色蛍光蛋白(GFP)で標識した野生型あるいはΔC の KCNQ1 (各々 GFP-KCNQ1 および GFP-KCNQ1 ΔC と命名)を AT₁R と共発現させた HEK293 細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡での検鏡下で、AT₁R 刺激による GFP-KCNQ1 および GFP-KCNQ1 ΔC の細胞内局在変化を観察した。

【結果・考察】 AT₁R 刺激により、野生型の I_{Ks} は一過性の増大とそれに引き続く減少の二相性変化を示した。これに対し、同様の刺激によってΔC の I_{Ks} は増大するのみで減少を示さなかった。一方、野生型および ΔC (GFP-KCNQ1 および GFP-KCNQ1 ΔC) はいずれも細胞膜に発現したものの、AT₁R 刺激により野生型は細胞内への陥入(internalization)を示したのに対し、ΔC はその局在変化を示さなかった。以上の結果より、異所性発現系において AT₁R 刺激は I_{Ks} を二相性に修飾し、そのうち後期の減少相は KCNQ1 の C 末端が関与する KCNQ1 分子自体の internalization による可能性が示唆された。

天然物成分クルクミンによる核内アセチル化をターゲットとした新規心不全治療の可能性

A09

○森本達也¹, 砂川陽一¹, 川村晃久¹, 高谷智英¹, 和田啓道¹,
米田正始³, 藤田正俊⁴, 島津 章¹, 北 徹², 長谷川浩二¹

¹国立病院機構京都医療セ・展開医療, 京都大院・医・

²循環器内科, ³心臓血管外科, ⁴人間健康科学

【目的】我々は、心不全発症における遺伝子発現調節にヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を持つ転写コアクチベーター p300 と GATA 転写因子群の協力が中心的な役割を果たしていることを見いだした。さらには HAT 活性を消失した p300 の変異体を心臓に過剰発現するマウスでは、心筋梗塞後のリモデリングの進行を抑制することより、p300 の HAT 活性が心不全治療のターゲットとなる可能性を示した。最近、健康食品として使用されている天然物ウコンの主成分であるクルクミンが p300 の特異的アセチル化阻害作用を持つということが明らかになった。我々は培養心筋細胞を用いて検討したところ、クルクミンが心筋細胞肥大を抑制することを見出した。今回の研究の目的は、2つの心不全モデル(高血圧性心不全ラットおよび心筋梗塞ラット)を用いて、クルクミンによる心不全進行抑制効果の有無の検討を行うことである。

【方法】1) 高血圧性心不全ラットモデルである食塩感受性ダール(DS)ラット11週齢39匹をランダムに2群に分け、クルクミン (50mg/Kg) およびコントロールを7週間連日経口投与した。2) 心筋梗塞作成1週間後のラット29匹をランダムに2群に分け、クルクミン (50mg/Kg) およびコントロールを6週間連日経口投与した。生存曲線、心エコーなどによる心機能評価、組織、蛋白レベルでの評価を行った。

【結果】ダールラットにおいて、心不全期での生存率がコントロール群44%に対して、クルクミン群76%と有意に改善した。さらに、心エコー検査にて、心収縮力の指標である左室短縮率(Fractional shortening, FS)が、ダールラットではコントロール群31%に対して、クルクミン投与群49%、心筋梗塞ラットではコントロール群15%に対して、クルクミン投与群30%と有意にクルクミン群で高値であった。両方のモデルにおいて、クルクミンは左室の壁厚と個々の心筋細胞径の増大を抑制した。このデータに一致して、18週齢の DS ラットでは心不全のマーカーである BNP の心室での mRNA レベルおよび血漿レベルが上昇しているが、それらはクルクミンによって有意に抑制された。さらに、18週齢の DS ラットでは GATA-4 のアセチル化や GATA-4 と p300 の結合も亢進したが、これらはクルクミンにて抑制された。

【考察】天然成分クルクミンが、少なくとも部分的に、p300/GATA4 転写経路を阻害し、心不全の進行を抑制した。この安価で安全性が確認された生薬が心不全治療に用いられることが期待される。

トロポニン T 変異に起因する拡張型心筋症モデルマウスの 不整脈発生機構

A10

○鈴木 剛^{1,2}, 中里祐二², 西澤寛人^{1,2}, 中郡昭人¹,
村山 尚¹, 櫻井 隆¹, 代田浩之², 森本幸生³, 呉林なごみ¹
¹順天堂大・医・薬理, ²循環器内科, ³九州大院・医・臨床薬理

【目的】拡張型心筋症(DCM)は心筋の収縮力が低下し、心拡張と心不全を起こす疾患であるが、多くの場合、死因は不整脈による突然死である。森本らは、ヒト遺伝性 DCM の変異を基に収縮調節蛋白のトロポニン T の1アミノ酸を欠損させたノックインマウス($\Delta K210$)を作製した。ホモ変異マウスは約2ヶ月の半減期で不整脈を起こし、突然死する。我々は、このマウスの不整脈発生機構について検討した。

【方法】野生型および $\Delta K210$ ホモマウスの心臓を摘出した。左室、右室、左心房の心筋を切り出し、張力を測定した。また心筋に膜電位指示薬 Di-4-ANEPPS あるいは Ca^{2+} 指示薬を負荷し、細胞ごとの Ca^{2+} および膜電位シグナルを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。

【結果】 $\Delta K210$ マウス心筋の興奮性を部位別に検討したところ、左心室壁、中隔では高頻度の自動能を示したが、その他の部位は野生型と差がなかった。活動電位は、測定部位により、有意な延長が見られた。各イオンチャネルブロッカーの効果を調べたところ、Na チャネル阻害薬は、自動能を強く抑制したが、K チャネル阻害薬は効果を示さなかった。Ca チャネル阻害薬は Ca^{2+} トランジエントや収縮を大きく減少させる濃度でも自動能を減らさなかった。

【結論】 $\Delta K210$ のマウスの異所性自動能は左心室付近から発生していると考えられた。自動能の発生は Ca^{2+} オーバーロードが原因ではなく、細胞膜の易興奮性によるものであると考えられた。不整脈発生機序について議論する。

心肥大での局所ステロイド合成とグルコルチコイド作用についての検討

A11

○大谷朋仁, 真野敏昭, 坂田泰史, 竹田泰治, 西尾まゆ,
山本一博, 堀 正二
大阪大院・医・循環器内科

【目的】

近年、ミネラルコルチコイド受容体(MR)遮断薬は心不全に有効な治療薬であることが明らかになりつつあるが、そのリガンドであるアルドステロンのみならずコルチゾールの血中濃度上昇も心不全患者の予後悪化因子と報告されている。心臓局所においてもステロイド合成酵素が発現しており、心臓局所での産生や取り込みを介してステロイドが心不全の病態形成に重要な役割を担っている可能性が考えられる。しかし、心臓局所におけるステロイド系の動態や、それらが心機能や心構築に及ぼす影響は十分に検討されておらず、またこれまでに報告されている報告結果も一致していない。そこで動物モデルおよび培養心筋細胞を用い、心臓におけるステロイド動態およびその心不全病態形成における役割を検討した。

【方法と結果】

心肥大から心不全に移行するモデルとしてマウスの大動脈縮窄(TAC)モデルと高食塩食投与のダール食塩感受性ラットを用いた。不全心ではステロイド合成の律速段階である Steroidogenic acute regulatory (StAR) の発現がコントロールに比べ有意に増加していたが、その増加は心肥大期より認めた。更に肥大心ではコントロール群に比し、心組織中のコルチコスロンは有意に増加(69.8 ± 3.8 vs. 41.7 ± 4.1 pg/mg, $p < 0.05$)しており、グルコルチコイド受容体(GR)の発現も亢進していた。心臓でのステロイド合成の亢進したモデルとして α -MHC-StAR transgenic mice (TG) を用いて検討したところ、自然経過では有意な phenotype を認めなかったが、TAC 負荷により TG では littermate に比しより強い心肥大(LV weight/body weight, 4.8 ± 0.2 vs. 4.3 ± 0.1 mg/g, $p < 0.05$)と心組織コルチコスロンの増加を認めた(104.5 ± 13.3 vs. 69.8 ± 3.8 pg/mg, $p < 0.05$)。また、新生仔心筋細胞ではコルチコスロン刺激により ANF 発現、蛋白合成および細胞面積の増加をきたし、さらにフェニレフリン刺激による肥大反応の増強をもたらした。その効果は MR 遮断薬では抑えられなかったが、GR 遮断薬により抑制された。

【考察】

肥大心ではステロイド合成が亢進し、心組織中コルチコスロンが増加しており、増加したコルチコスロンは GR を介し心肥大を増強すると考えられた。

A12

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの同定と機能解析

○高島成二^{1, 2}, 山崎 悟³, 瀬口 理³, 北風政史³

¹大阪大・保健センター, ²大阪大院・医・循環器内科,

³国立循環器病センター

【背景】

ミオシン軽鎖(Myosin Regulatory Light Chain=MLC)はミオシンに直接結合することにより、その機能調整をすることが知られている。特に、そのリン酸化は細胞運動や骨格筋収縮など多彩な生理作用に関与することが知られている。骨格筋においてはその特異的キナーゼが同定されていたが心筋では今日まで同定されていなかった。

【目的・方法】

重症心不全患者の心臓発現遺伝子の網羅的解析を行った。心不全重症度と平行して発現量が変化する遺伝子としてひとつの心臓特異的キナーゼを同定した。そこで基質を精製したところ MLC であったことから cMLCK と命名し、このキナーゼの役割をラット心筋細胞および zebrafish を使用して解析した。

【結果】

cMLCK はヒトおよびマウスではほぼ心臓特異的に発現し、in vitro ではカルモジュリン・Ca 依存性に MLC をリン酸化した。ラット心筋細胞において、その発現を抑制すると、GPCR リガンドなどによる MLC のリン酸化がほぼ完全に抑制されたことにより、cMLCK は心臓における MLC の主なキナーゼであることが示された。また cMLCK の発現阻害は心筋細胞におけるサルコメア構造の構築形成を障害した。さらに zebrafish を用いた機能解析でも、cMLCK とその基質 MLC の双方の発現抑制により共通した心臓の構造・機能障害が観察された。

【結語】

新規に同定した cMLCK は心筋特異的に発現し、心臓における主たる MLC キナーゼとしてサルコメア形成、収縮性に関与することが示された。