

# 特別講演

## **Imaging and manipulating cortical blood flow with light: New insights into neurovascular coupling and stroke**

**Prof. David Kleinfeld**

(Department of Physics, University of California at San Diego)

The surface vasculature of the cerebral cortex forms a highly interconnected 2-D network that supplies, via penetrating arterioles, blood to the 3-D networks of subsurface microvessels. What is the function of these different topologies, and how resilient are they to single-point blockages to flow? I will discuss the dynamics of flow throughout the cortical vasculature and demonstrate that the penetrating arterioles act as a singular bottleneck to flow. The impact of this and related data on the control of blood flow in the normal and diseased brain will be discussed, along with progress toward a general relationship between flow and vascular topology. An underlying technical theme of this work is the use of ultra-short laser pulses as a tool to image as well as perturb femtoliter-volumes for neurovascular studies.

## 生活習慣病モデルラットにおける spironolactone の腎・血管保護効果に関する検討

Y01

鳥羽裕恵，平 正輝，村上昌史，三谷卓哉，小原 幸，  
中田徹男  
京都薬大・臨床薬理

**背景・目的：**Angiotensin IIとは独立した aldosterone の炎症惹起作用が立証されるとともに、抗 aldosterone 薬の降圧を超えたイベント抑制効果が報告されている。以前我々は DOCA-salt ラットおよび遺伝的メタボリックシンドロームモデルである SHR/NDmc-cp における蛋白尿と血管内皮機能低下を spironolactone が改善したことを確認した。そこで本研究では spironolactone の臓器保護効果について、血管・腎組織に着目し検討を行った。

**方法：**<実験 1> 片腎摘出後 streptozotocin (STZ) を投与した糖尿病モデルラットに spironolactone (50 mg/kg/day by gavage) を 3 週間投与し、血圧、心拍数、血糖値、HbA<sub>1c</sub>、血漿 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度と尿中蛋白排泄量、creatinine clearance (CCr)、尿素窒素 (BUN) を測定した。摘出腎組織を用いて組織学的評価を Masson's trichrome 染色にて行い、NADPH oxidase、collagen I/IV、TGF-β、ACE、mineralocorticoid receptor (MR)、CYP11B2 の mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。<実験 2> 飲料水として L-NAME (0.7 mg/mL) を負荷して作成した高血圧モデルラットに spironolactone (50 or 100 mg/kg/day by gavage) を 2 週間投与した後、血圧、心拍数、血漿 aldosterone、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度を測定した。摘出胸部大動脈組織における NADPH oxidase、ICAM-1、VCAM-1、osteopontin、LOX-1 の mRNA 発現を RT-PCR 法で、NADPH oxidase のタンパク発現を Western blotting 法で、さらに osteopontin タンパク発現を免疫染色法で検討した。

**結果：**<実験 1> 片腎摘出 STZ 誘発糖尿病モデルラットの血圧、血糖値、HbA<sub>1c</sub> は、コントロール群よりも上昇したが、spironolactone はこれらと血漿 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度に影響を与えなかった。糖尿病モデル群において増大した尿中蛋白排泄量および CCr、血清 creatinine 濃度、BUN の悪化および糸球体と尿細管間質の繊維化は spironolactone 投与により改善した。また STZ 投与により NADPH oxidase、collagen I/IV、TGF-β、ACE、MR、CYP11B2 の mRNA 発現は増大したが、spironolactone はこれらを軽減した。<実験 2> L-NAME 負荷により上昇した血圧に spironolactone は影響を与えずに、NADPH oxidase、ICAM-1、VCAM-1、osteopontin の発現増大を改善し、さらに LOX-1 の mRNA 発現増大を用量依存的に抑制した。一方、血漿 aldosterone、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度は各群間で有意差は認められなかった。

**結論：**Spironolactone は NADPH oxidase 発現抑制による抗酸化作用を介し、糖尿病性腎症と高血圧性血管障害に対し保護効果を発揮する可能性が示唆された。

## Apocynin は内皮由来過分極因子シグナルを改善することにより高コレステロール負荷マウスの腸間膜動脈における収縮反応性増大を正常化させる

Y02

松本貴之，小林恒雄，鎌田勝雄  
星薬大・医薬研・機能形態

【目的】高コレステロール負荷マウスの腸間膜動脈における phenylephrine (PE)の収縮反応性の増大と内皮機能、酸化ストレスとの関連性、並びに NAD(P)H oxidase 阻害薬の apocynin 慢性投与による影響に関して検討を行った。

【方法】雄性 ICR マウス(5 週齢)に高コレステロール食(HC)あるいは通常食(normal)を 10 週間負荷し、腸間膜動脈を摘出し、PE による収縮反応性、ACh による内皮依存性弛緩反応を検討した。各種阻害薬は反応開始 30 分前より処置した。また、apocynin 慢性投与は HC を 10 週間負荷した後 4 週間処置し(HC-apocynin)、apocynin を投与していない群(HC-cont)と、同週齢の通常食群(control)とで比較検討を行った。

【結果】normal 群と比較して、HC 群における PE の収縮反応性の増大が認められた。normal 群において内皮を除去すると収縮反応の増大が認められるが HC 群ではほとんど影響が認められなかった。内皮由来過分極因子(EDHF)を阻害した条件下(ChTX+apamin)における PE の収縮反応は、normal 群と HC 群で同程度であったが、EDHF を残した条件下(L-NNA+indomethacin)においては、HC 群の方が大きな収縮であった。ACh による EDHF 弛緩反応は HC 群で減弱していた。更に、HC 群における PE の反応性増大は tempol、apocynin の処置により抑制されたが、一方、NAD(P)H oxidase の基質である NADH の処置により normal 群で特に顕著な PE 収縮の増大が認められた。apocynin を慢性投与することによって、血圧の低下、血管における superoxide 産生の低下、血中 8-isoprostane の低下、EDHF 弛緩反応の改善、PE 収縮反応の改善が認められた。

【考察】PE の収縮反応は、内皮由来の因子によって調節を受けており、特に EDHF シグナリングによって抑制されていることが明らかとなった。HC においては、この EDHF シグナリングの障害によって PE の収縮反応性が増大することが示唆された。更に、この EDHF シグナリングの障害は、apocynin 慢性投与によって著明に改善されることから、HC 病態時に亢進した酸化ストレスが大いに関与していることが示唆された。EDHF シグナリングは血管径が小さくなればなるほど重要な役割を果たすので、apocynin 慢性投与による EDHF シグナリングの改善が、血圧の低下に繋がった可能性が考えられる。

## スタチンの多面的作用発現における PI3K/Akt 経路の関与

Y03

塩田正之，日下部裕美，疋田優子，中尾隆文，泉 康雄，  
岩尾 洋  
大阪市大院・医・分子病態薬理

【目的】スタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)はコレステロール合成阻害作用の他に種々の細胞での多彩な薬理作用が知られ、その作用機序の一つに PI3K/Akt 経路を介した eNOS の活性化とそれに伴う内皮機能の改善効果が報告されている。そこで本研究ではスタチンの多面的作用発現に関わる Akt シグナル伝達経路を検討した。

【方法】ラット胸部大動脈より外植片法にて血管内皮細胞を単離・調製し、5継代までのものを実験に使用した。プラバスタチン刺激後の経時的な Akt のリン酸化、下流のシグナル経路の活性化を各種リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて評価した。またこれらの経路が細胞の遊走、eNOS 活性化に与える影響を阻害剤を用いた実験にて検討した。さらに Akt に相互作用する分子を同定する目的でアフィニティータグを付加した Akt を細胞に一過性に発現させ、アフィニティー精製を行った。

【結果】プラバスタチン刺激による Akt の一過性のリン酸化と同時に p70S6 キナーゼの活性化を認めた。内皮細胞の遊走促進作用への p70S6 キナーゼの関与が明らかとなった。また、アフィニティー精製の結果、スタチン刺激により Akt は十数種類の分子と会合すると同時に Akt 結合分子の経時的な変化を認めた。

【考察】Akt はスタチンにより活性化され、巨大複合体を形成することでシグナルを伝達し、血管内皮機能調節に関わっていることが示唆された。スタチンの内皮細胞に対する多面的作用発現には NO 産生の増加とは異なる別の作用機序が存在することが示唆された。

## Fyn チロシンキナーゼは血管平滑筋の異常収縮を担う新規シグナル分子である

Y04

川道穂津美, 岸 博子, 郭 鳳玲, 苗 俊英, 徐 丹,  
加治屋勝子, 小林 誠  
山口大院・医・生体機能分子制御

【目的】Rho キナーゼ (ROK) を介する  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性収縮 ( $\text{Ca}^{2+}$  感受性増加) は、血管攣縮などの血管異常収縮の原因とされている。我々は ROK の上流因子を探索しスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定したが<sup>1-3)</sup>、SPC はヒト血管攣縮の原因分子として注目されている<sup>4,5)</sup>。さらに我々は、SPC と ROK の間を仲介する分子として Src ファミリーチロシンキナーゼ (Src-TK) を見出したが、Src-TK の中でも、どのチロシンキナーゼ分子が関与しているかは不明なままである<sup>2)</sup>。本研究では、血管平滑筋の  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性収縮に関与している Src-TK 分子を同定・確定することを目的とした。

【方法】収縮能と高い遺伝子導入高率 (>70%) を有するヒト冠状動脈平滑筋培養細胞 (CASMC) を得た。RNA 干渉 (siRNA) により CASMC の Fyn を選択的にノックダウンさせ、収縮に対する効果を検討した。また、Fyn の活性型および不活性型のプラスミドを作成し CASMC へ導入し、過剰発現による形態変化を検討した。さらに、ブタ冠状動脈のβエスシン-スキンド血管条片へ、バキュロウイルス発現系により作成したりコンビナント Fyn (活性型・不活性型) を投与し、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存性収縮を観察した。

【結果】SPC はヒト CASMC を著明に収縮させた。Fyn をノックダウンさせた細胞では SPC による収縮が顕著に抑制された。発現プラスミドの導入により、活性型 Fyn を過剰発現した CASMC では、顕著な収縮がみられたが、不活性型では形態に変化は見られなかった。βエスシン-スキンド血管へ活性型リコンビナント Fyn を投与すると、細胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が一定 (pCa 6.3) にも拘らず、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存性収縮が認められ、ROK 阻害薬 Y27632 により抑制された。一方、βエスシン-スキンド血管において、不活性型リコンビナント Fyn は、SPC による  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性収縮を顕著に抑制した。

【考察】本研究により、Fyn が SPC/ROK 経路の血管平滑筋異常収縮に関与している事が初めて明らかとなった。最近、我々は、SPC による異常収縮が、ヒト血清あるいは血管組織コレステロール量に依存する事を見出し、コレステロールが豊富な膜ラフトの関与を提唱したが<sup>3)</sup>、Fyn が膜ラフト局在蛋白である事を考え合わせると、これらの結果は、血管異常収縮における膜ラフトの重要性を強く支持するものである。

【引用文献】1) Shirao S. et al., Circ. Res. 91:112-119, 2002; 2) Nakao F. et al., Circ. Res. 91:953-960, 2002; 3) Morikage N. et al., Circ. Res. 99:299-306, 2006; 4) Somlyo A.V. Circ. Res. 91:83-84, 2002; 5) Liao J.K. Circ. Res. 99:238-239, 2006.

## ラット後大脳動脈における圧誘発性血管収縮反応の細胞内情報伝達機構の時間的变化

Y05

柏原俊英, 中山貢一, 石川智久  
静岡県大院・薬・分子薬理

【目的】脳血管では、内腔圧上昇などの血行力学刺激により、筋原性収縮が惹起される。この反応は、伸展活性化カチオンチャネルの活性化に続く、膜の脱分極、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性化が主な機序と考えられているが、プロテインキナーゼ C (PKC) や Rho キナーゼの活性化を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性亢進機構がこの反応に関与することも示唆されている。しかし、これまでの報告の殆どは、力学刺激直後の即時的な反応を解析したものであり、より生理的な状態と考えられる持続的な内腔圧上昇に対する反応を解析した報告は殆どない。そこで本研究では、アーテリオグラフを用いた解析により、摘出ラット後大脳動脈における圧誘発性血管収縮反応、特に持続的な内腔圧上昇に対する反応の細胞内情報伝達機構を詳細に検討した。

【方法】ペントバルビタール麻酔下の Wistar 系雄性ラット (200 ~ 300 g) より外径約 100  $\mu\text{m}$  の後大脳動脈を単離し、両端にガラスカニューレを挿入してアーテリオグラフに装着した。血管に fura-2 を負荷した後、内腔圧を 5 mmHg から 60 mmHg へと上昇させて 60 分間持続させ、この間の血管外径と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化を経時的に測定した。全ての実験は、L-NNA (100  $\mu\text{M}$ ) および indomethacin (10  $\mu\text{M}$ ) 存在下で行った。また、後大脳動脈平滑筋に存在する PKC アイソフォームを免疫組織染色により解析した。

【結果】60 分間の内腔圧上昇により、持続的な収縮および  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が惹起された。PKC 阻害薬 RO31-8220 (0.5  $\mu\text{M}$ ) は、内腔圧上昇後 10 分程度まで (初期相) では  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  に影響せずに収縮のみを有意に抑制したが、10 分後以降 (持続相) では収縮と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇の両方を有意に抑制した。初期相の収縮抑制は conventional PKC (cPKC) 阻害薬 Go6976 (3  $\mu\text{M}$ ) でも認められ、一方、持続相の収縮と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇の抑制は PKC $\delta$  阻害薬 rottlerin (3  $\mu\text{M}$ ) でも認められた。すなわち、初期相の反応には cPKC が、持続相の反応には PKC $\delta$  が関与することが示唆された。また、免疫組織染色により、ラット後大脳動脈平滑筋には PKC $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  は存在するが、PKC $\beta$  は存在しないことが示された。一方、Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 (1  $\mu\text{M}$ ) は、初期相、持続相共に、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制することなく、収縮を有意に抑制した。すなわち、Rho キナーゼの関与は時間経過により変化しないことが示唆された。

【考察】以上の結果より、ラット後大脳動脈の圧誘発性収縮において、cPKC (PKC $\alpha$  あるいは  $\gamma$ ) は主に初期相の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性亢進機構に、PKC $\delta$  は持続相の持続的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に関与することが示唆され、時間により圧誘発性収縮に係わる PKC アイソフォームが異なることが示された。一方 Rho キナーゼは、時間経過に関係なく、圧誘発性収縮における  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性亢進機構に関与することが示唆された。

## カルシウムイオンによる Rho, Rho キナーゼ依存的なミオシン軽鎖 ホスファターゼの抑制 PI3 キナーゼ・クラス II の関与

Y06

吉岡和晃, Mohammed Ali Azam, 多久和典子, 杉本直俊,  
Wang Yu, 多久和 陽  
金沢大院・医・血管分子生理

【背景及び目的】カルシウムイオンは主要な平滑筋収縮制御因子であり、20 kDa ミオシン軽鎖(MLC)リン酸化を介して収縮をトリガーする。カルシウムによって引き起こされる MLC リン酸化は、もっぱらリン酸化酵素である MLCK の活性化によるとこれまで考えられてきた。ところが、私達は最近、カルシウムが MLC を脱リン酸化する酵素ミオシンホスファターゼ(MLCP)の抑制を引き起こすことを見出した。この発見により、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は MLCK 活性化と MLCP 抑制の二つの作用を介して、効率的に MLC リン酸化レベルの上昇、さらには平滑筋収縮を引き起こすことが明らかとなった。カルシウムによる MLCP 抑制は低分子量 G 蛋白 Rho を介するが、私達は、カルシウムによる Rho 活性化にホスホイノシチド 3-キナーゼ(PI3K)が関与していることを示す結果を得た。PI3K 阻害薬に対する相対的な感受性や血管平滑筋に発現している PI3K アイソフォームの検討から、PI3K クラス II $\alpha$  酵素(PI3K-C2 $\alpha$ )の関与が示唆された。本研究では、RNAi 法による遺伝子発現ノックダウンの適用が可能でありかつ収縮能を保持している分化型ラット血管平滑筋細胞(dRASM)を使用して、PI3K-C2 $\alpha$  がカルシウムによる MLCP 抑制に関与している PI3K アイソフォームであることを同定した。

【結果及び考察】dRASM 細胞に GFP を発現させて蛍光顕微鏡下で観察すると、イオノマイシン刺激に対して強い収縮を示した。PI3K-C2 $\alpha$  を標的とした siRNA を遺伝子導入した細胞では、コントロール細胞と比較してイオノマイシン刺激に対する収縮応答は強く抑制された。一方、PI3K p110 $\alpha$  siRNA 及びスクランブル配列 siRNA を遺伝子導入した細胞ではコントロールと同様にイオノマイシンによる収縮が観察された。また、このイオノマイシン収縮は、PI3K 阻害薬 LY294002 により強く抑制された。コントロール細胞でイオノマイシン刺激により Thr<sup>695</sup> 及び Thr<sup>850</sup> 両残基における MYPT1 リン酸化レベルの上昇が見られたに対し、PI3K-C2 $\alpha$  siRNA を遺伝子導入した細胞では何れの残基における MYPT1 リン酸化もほぼ完全に抑制された。Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 はイオノマイシンによる MYPT1 リン酸化レベルを強く抑制した。更に、イオノマイシンは MLC Ser<sup>19</sup> 一リン酸化及び Thr<sup>18</sup>、Ser<sup>19</sup> ニリン酸化を増加させた。PI3K-C2 $\alpha$  ノックダウンは MLC の一リン酸化、ニリン酸化いずれも抑制した。GFP 付加 dominant negative Rho (N19-RhoA)の発現及び Y-27632 は、イオノマイシン収縮を抑制した。受容体アゴニストであるノルアドレナリン(NA)刺激もイオノマイシンと同様に、MYPT1 リン酸化、MLC リン酸化及び収縮を惹起した。NA に対するこれらの応答は  $Ca^{2+}$  キレート剤である BAPTA-AM 前処理により有意に減弱した。PI3K-C2 $\alpha$  siRNA は、NA による収縮、MYPT1 及び MLC リン酸化を抑制した。以上の結果より、PI3K-C2 $\alpha$  は血管平滑筋収縮において  $Ca^{2+}$  依存的な Rho/Rho キナーゼ経路活性化に必須であり、この作用を介して MLCP を負に制御していることが明らかになった。

## ブレビスタチンによる平滑筋ミオシン・モーター活性阻害と平滑筋遊走阻害について

Y07

王 洪輝, 田中秀幸, 秦 宵然, 趙 鉄軍, 叶 麗虹,  
岡垣 壮, 片山 豪, 中村彰男, 小濱一弘  
群馬大院・医・臓器病態薬理

Blebbistatin was reported to selectively inhibit the ATPase activity of class II myosin (Straight AF et al, Science. 299(5613):1743-7. 2003). The ATPase activities of skeletal muscle myosin II and non-muscle myosin II were inhibited at very low concentration. However, the effect was only slight on the activity of smooth muscle myosin II (Limouze J et al, J Muscle Res Cell Motil. 25(4-5):337-41. 2004). We eventually observed that blebbistatin inhibited the migration of vascular smooth muscle cells at very low concentration as follows. We allowed cultured vascular smooth muscle cells to migrate toward sphingosylphosphorylcholine (SPC) and toward platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). We chose them as chemoattractants, because the migration toward SPC was associated with the elevation of myosin light chain phosphorylation but that toward PDGF-BB was not. Both kinds of migration were inhibited by blebbistatin to the same extent; with  $IC_{50}=34.4\pm1.26\ \mu M$  for SPC and  $34.2\pm0.56\ \mu M$  for PDGF-BB. To examine if blebbistatin inhibits the migration through smooth muscle myosin II, we purified smooth muscle myosin II based upon Prof. Ebashi's method (Ebashi. J Biochem (Tokyo). 79(1):229-31.1976) and found that the ATPase activity was inhibited with  $IC_{50}=12.6\pm1.6\ \mu M$  for unphosphorylated myosin and  $15.0\pm0.6\ \mu M$  for phosphorylated myosin. We interpreted that these figures can explain the inhibitory effect in terms of the inhibition of myosin motor activity. We confirmed that ATPase activities of myosin fragments, i.e. heavy meromyosin (HMM) and subfragment 1 (S1) were also inhibited by the low concentration of blebbistatin with  $IC_{50}=14.5\pm0.8\ \mu M$  for HMM and  $5.15\pm0.19\ \mu M$  for S1. Next, we allowed actin-filaments on the surface coated by phosphorylated smooth muscle myosin, the movement was also inhibited by blebbistatin. When the same surface was washed by the buffer for the movement assay to remove the blebbistatin, the movement was recovered, indicating the effect of blebbistatin was reversible. We mixed smooth muscle myosin with blebbistatin followed by the observation with an electron microscope after the rotary shadow of the myosin, finding the swelling of myosin heads. This shape change conforms with the idea that the site of blebbistatin is within the heavy chain that composes myosin heads.



## ラット腸間膜動脈血管床における cGMP を介する血管弛緩反応の内皮細胞除去による増大機序

Y08

岩谷有希子<sup>1</sup>，能木沙織<sup>1</sup>，高山房子<sup>1</sup>，見尾光庸<sup>2</sup>，  
川崎博己<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大院・医歯薬総合・臨床薬学，<sup>2</sup>就実大・薬効解析

【目的】 ラット腸間膜動脈抵抗血管において、一酸化窒素 (NO) 供与体である sodium nitroprusside (SNP) による血管弛緩反応が内皮細胞除去によって増強することを本研究室で明らかにしている。この機序として、内皮細胞由来収縮因子 (EDCF) が血管弛緩に対して抑制的に働いているが、内皮細胞を除去することでこの抑制機構が消失することによる、という仮説を提唱している。一方、血管内皮細胞除去後における、血管平滑筋細胞の変化については不明である。SNP は NO を通して細胞内 cGMP 産生を介して弛緩反応を起こすことが知られている。そこで本研究では、内皮細胞除去による弛緩反応増大の機序を明らかにする目的で、血管平滑筋の細胞内情報伝達系、特に cGMP を介する経路に着目し検討を行った。

【実験方法】 実験は、Wistar 系雄性ラット (300 ~ 400 g) を用い、ラット摘出腸間膜動脈血管床の灌流標本を作製した。標本は毎分 5 ml の一定流量で Krebs 液を灌流し、この時の灌流圧変化を血管緊張度変化として測定した。灌流圧を上昇させた後、cGMP アナログ、または、間接的に cGMP を増加させる物質を 5 分間灌流し、血管反応を検討した。その後、同一標本の血管内皮細胞を sodium deoxycholate (SD) を用いて内皮細胞を除去した後、再び灌流圧を上昇させ、血管弛緩物質を 5 分間灌流して血管反応を観察した。また、グアニル酸シクラーゼ (GC) 活性化前後の血管平滑筋の cGMP 量を EIA キットにより測定した。

【結果および考察】 選択的に膜型 GC を活性化させる atrial natriuretic peptide (ANP) ( $10^{-9} \sim 10^{-7} \text{M}$ )、PDE5 選択的阻害薬である sildenafil ( $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{M}$ )、および PKG を活性化させる 8-Br-cGMP ( $10^{-7} \sim 10^{-4} \text{M}$ ) による弛緩反応は、内皮細胞除去後に増大した。この結果から、EDCF が PKG 経路とする細胞内情報伝達系を抑制的に調節していることが示唆される。一方、可溶性型 GC 活性化薬である YC-1 ( $10^{-9} \sim 10^{-5} \text{M}$ ) および BAY-412272 ( $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{M}$ ) による弛緩反応は、内皮細胞保持時と除去時の間で有意な差は認められなかった。従って、内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF) が可溶性型 GC 活性を促進させている可能性も考えられる。また、可溶性型 GC 抑制薬のメチレンブルー ( $10^{-7} \text{M}$ ) 存在下における 8-Br-cGMP の弛緩反応は、内皮細胞保持時においても内皮細胞除去時の反応とほぼ同程度まで弛緩反応が増大した。以上のことから、cGMP を介する弛緩反応の内皮細胞除去後に増大する機序は、単に EDCF による弛緩反応に対する抑制機構が消失したからだけではなく、血管平滑筋細胞内の情報伝達系にも変化が生じたためと考えられる。

## 海綿由来生理活性物質 Stelletamide A の血管平滑筋肥厚および血管新生抑制効果

Y09

村田幸久, 荒巻沙也香, 堀 正敏, 松永茂樹, 尾崎 博  
東京大院・農学生命科学・獣医薬理

【目的】Stelletamide A (St.A)は海綿から単離された新規イソプレノイド誘導体で、生理活性として  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害作用を持つことを報告した。 $\text{Ca}^{2+}$ はあらゆる細胞生理機能、病態に関わるセカンドメッセンジャーであることから、その制御は高血圧を始めとする様々な血管病態の治療ターゲットとなっている。本研究では天然物由来生理活性物質 St.A の治療への応用検討を目的とし、St.A と哺乳類生体内に存在するイソプレノイド誘導体と同様に  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害作用をもつ Farnesol (FNS)の様々な血管病態に対する作用を比較、検討した。

【方法・結果】 )ウサギ腸間膜動脈組織培養法を用いた検討において、1  $\mu\text{M}$  St.A、10  $\mu\text{M}$  FNS は血清処置による平滑筋肥厚を有意に抑制した。両薬物は平滑筋肥厚抑制に加え血清増殖刺激による血管の収縮障害も回復したが、FNS の収縮障害回復作用は St.A の回復作用よりも有意に小さかった。

)次にウシ大動脈内皮細胞に対する両誘導体の影響を検討した。St.A と FNS はともに VEGF や Thrombin 刺激による遊走、透過性亢進、脈管形成を有意に抑制したが、その抑制効果は FNS と比較し St.A で有意に大きかった。細胞増殖に対する影響を検討したところ、1、10  $\mu\text{M}$  の St.A は細胞毒性を示すことなく増殖を抑制した一方で、1、10  $\mu\text{M}$  FNS は内皮細胞に細胞死を起こすことが明らかになった。

)続いて *in vivo* ラット角膜血管新生モデルに St.A を処置したところ、St.A は VEGF、IL-1 $\beta$ 刺激による血管新生を有意に抑制した。

)上記 St.A と FNS の平滑筋、内皮細胞活性抑制効果のメカニズムとして St.A 、FNS は  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル抑制作用をもつこと、加えて St.A は calmodulin (CaM)結合能があることから、相加的に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM シグナルを抑制する可能性が示唆された。

【考察】St.A は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを効率的に抑制し、毒性作用なく血管平滑筋肥厚や、血管透過性亢進、血管新生を抑制する新規薬剤のリード化合物として期待される。

## マウス局所性冷却誘発皮膚血流減少反応における $\alpha_{2C}$ アドレナリン受容体の関与

Y10

本多正樹，中山貢一，石川智久  
静岡県大院・薬・分子薬理

【目的】生体は周囲環境の温度変化に応じた体温調節機構を有している。例えば寒冷環境下では、皮膚血管は収縮して皮膚血流を減少させ、体表面からの熱の放散を防ぐ。この冷却による皮膚血管の収縮反応には、中枢神経系を介さない局所性血管応答反応も関与することが摘出した表在血管を用いた *in vitro* 実験により示唆されてきた。しかし、皮膚循環は全身血圧の変化等による反射の影響を強く受けるために *in vivo* での解析は難しく、これまで *in vivo* でこの局所性反応を詳細に解析した報告は殆んどない。我々は最近、tetrodotoxin (TTX) 処置により中枢からの神経支配を除去したラットを用いて、この反応の局所性メカニズムを *in vivo* で解析し、報告した (*Br J Pharmacol.* 2006; **148**: 579-86)。今回、マウスでの検討を行った結果、局所性メカニズムがラットと異なることを見出したので報告する。

【方法】ddY 系雄性マウスにペントバルビタール麻酔をしたのち、TTX を静脈内投与し人工呼吸を施した。足底部の皮膚血流量をレーザードップラー血流計により測定した。また、頸動脈に挿入したカニューレを介して全身血圧および心拍数を測定した。冷却刺激は、左後肢に装着した局所冷却装置の装置内温度を 25 から低下させる空冷により行った。

【結果および考察】装置内温度を 10 まで低下させると、再現性のある皮膚血流減少反応が惹起された。この反応は非選択的 $\alpha$ 受容体遮断薬 phentolamine、 $\alpha_1$  受容体遮断薬 bunazosin および $\alpha_2$  受容体遮断薬 RS79948 により、それぞれ有意に抑制されたが、bunazosin よりも RS79948 による抑制効果のほうが大きかった。また、交感神経終末からの noradrenaline 遊離阻害薬 brethylum、guanethidine は反応に影響を与えず、一方、副腎摘出により血中カテコールアミン濃度を低下させると反応は有意に低下した。すなわち、マウスにおける冷却誘発皮膚血流減少反応は、冷却により血中に存在しているカテコールアミンに対する受容体の感受性が増大し、皮膚血管が収縮することにより惹起されることが示唆された。さらにこの反応は、選択的 $\alpha_{2C}$  受容体遮断薬 MK-912 により用量依存的に抑制された。副腎摘出マウスに $\alpha_2$  受容体刺激薬 clonidine を動脈内投与し、左後肢局所的に作用させると、一過性の皮膚血流減少反応が観察されたが、この反応は 10 において顕著に増大した。この clonidine による血流減少反応を RS79948 は 25、10 の両者ともにほぼ完全に抑制したが、MK-912 は 10 における増大反応を選択的に抑制した。すなわち、感受性が増大したのは $\alpha_2$  受容体の中でも $\alpha_{2C}$  受容体であることが示唆された。

【結論】局所性冷却誘発皮膚血流減少反応のメカニズムはマウスとラットで異なり、マウスでは冷却により $\alpha_{2C}$  アドレナリン受容体のカテコールアミンに対する感受性が増大することで皮膚血管が収縮し、血流減少反応が惹起されるということが *in vivo* の検討から示唆された。

## $\alpha_1$ アドレナリン受容体欠損( $\alpha_1$ ARトリプル KO)マウスの薬物反応性

Y11

藤原葉子<sup>1</sup>, 三部 篤<sup>1</sup>, 田中芳夫<sup>2</sup>, 小池勝夫<sup>2</sup>, 辻本豪三<sup>3</sup>,  
田上昭人<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 国立成育医療センター研・薬剤治療, <sup>2</sup> 東邦大・薬・薬理,  
<sup>3</sup> 京都大院・薬・ゲノム創薬科学

【背景・目的】交感神経の受容体の一つである $\alpha_1$  アドレナリン受容体 ( $\alpha_1$ ARs)は、 $\alpha_1$ A、 $\alpha_1$ B、及び $\alpha_1$ D のサブタイプに分類される。 $\alpha_1$ ARs の組織発現分布はサブタイプ毎に様々で、それぞれの受容体サブタイプの生理的機能も異なっている。現在使用されている $\alpha_1$ ARs 拮抗薬は、受容体サブタイプに対し特異的ではなく、薬物投与による主作用および副作用は全ての $\alpha_1$ ARs を介して現れると考えられる。そのため、 $\alpha_1$ ARs 受容体を介する拮抗薬の生理作用を詳細に解析するには、全ての受容体を欠損させた場合の解析を行い、その結果とそれぞれの受容体のみを欠損させた場合とを比較する必要がある。そこで本研究では、3つのサブタイプ( $\alpha_1$ A、 $\alpha_1$ B、及び $\alpha_1$ D)全てを欠損させたマウス( $\alpha_1$ ARトリプルKO)を作製し、そのマウスの循環動態および各種薬物への反応性を検討することにより、 $\alpha_1$ ARs 受容体拮抗による循環器への影響を検討した。

【方法】 $\alpha_1$ ARs 受容体結合実験は、 $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$  をリガントとし、マウス脳の膜タンパク質を用いて行った。意識下での血圧は、tail cuff 法にて、および麻酔下での血圧は総頸動脈内へ挿入したカテーテルを介し、圧トランスデューサーを用いて測定した。また、単離胸部大動脈標本を用い、norepinephrine、5-hydroxytryptamine (5-HT)、及びPGF2 $\alpha$ 等に対する収縮反応性の違いについて検討を行った。

【結果】結合実験の結果より、 $\alpha_1$ ARトリプル KO マウスでは $\alpha_1$ AR 受容体に対するリガンドの特異的な結合が消失した。すなわち、 $\alpha_1$ ARs が完全に欠損していることが示された。*in vivo* 条件下でのフェニレフリン投与による昇圧反応は、 $\alpha_1$ ARトリプル KO マウスでほぼ消失していた。また、大動脈標本の norepinephrine に対する収縮反応も完全に消失していた。すなわち、 $\alpha_1$ ARトリプル KO マウスでは $\alpha_1$ AR を介する薬物反応性が完全に消失していた。一方、 $\alpha_1$ ARトリプル KO マウスの意識下血圧は、有意に低下していたものの、その低下程度は既に報告されている $\alpha_1$ BD ダブルKO マウスと比較して変わらなかった。カテコールアミンとは対照的に、 $\alpha_1$ ARトリプル KO マウスでは、5-HT、PGF2 $\alpha$ に対する大動脈の収縮反応の亢進、および *in vivo* でのPGF2 $\alpha$  に対する昇圧反応の反応性亢進が観察された。

【考察】 $\alpha_1$ AR トリプル欠損マウスでは交感神経の調節による血管収縮作用が消失し、慢性的に低血圧を示すことが示唆された。一方、このマウスでは 5-HT、PGF2 $\alpha$  等、他の昇圧物質に対する反応性の亢進が認められ、他の血管収縮作用物質による血圧維持の代償作用が存在することが考えられた。

## イヌ脳動脈支配神経終末のニコチン受容体サブタイプの検討

Y12

玉山卓己, 安屋敷和秀, 篠崎一哉, 岡村富夫  
滋賀医大・薬理

【目的】我々は摘出血管における血管支配神経機能を検討する薬理学的方法として、ニコチン適用による化学的刺激および経壁電気刺激を用いてきた。両者により惹起される血管反応が部位や動物種の違いに関わらず同様であることから、ニコチンによる血管作用は支配神経終末から遊離される神経伝達物質による作用と考えられる。一般に中枢神経系および自律神経節におけるニコチンの神経刺激作用はよく知られているが、節後神経終末におけるニコチン受容体の特性に関する報告は乏しい。そこで、摘出イヌ脳動脈を用いて、NO 作動性神経終末刺激に關与するニコチン受容体サブタイプについて薬理学的に検討した。

【方法】摘出イヌ脳動脈標本を用いて、ニコチン受容体刺激薬および外来性 NO 適用による等尺性張力変化を記録した。実験は、プロスタグランジン F2 $\alpha$ による前収縮下で行った。

【結果】ニコチン適用により脳動脈標本は一過性に弛緩し、NO合成酵素阻害薬処置により消失した。ニコチン受容体刺激薬であるエピバチジン、アナトキシン-a は、同標本を弛緩し、その強さは、エピバチジン、アナトキシン-a、ニコチンの順であった。選択的な $\alpha 4$  刺激薬である RJR-2403 は、同標本を弛緩させなかった。ニコチン弛緩は、 $\alpha 7$  に拮抗する $\alpha$ -コノトキシンおよび $\alpha 1$  および $\alpha 7$  から 10 に拮抗する $\alpha$ -ブンガロトキシン処置で影響されず、 $\alpha 3, 4, 6$  に拮抗するヘキサメトニウムとメカミルアミンおよび $\alpha 3 \beta 4$  に拮抗するネオスルガトキシン処置により消失した。外来性 NO 適用による弛緩はこれらの阻害薬処置で影響されなかった。

【考察】脳動脈を拡張性に調節する NO 作動性神経終末には、ニコチン受容体が存在し、そのサブタイプは $\alpha 3 \beta 4$  である可能性が高いと考えられた。

## アンジオテンシン 誘導性大動脈瘤におけるキマーゼと MMPs の 関与

Y13

井上奈緒<sup>1</sup>, 村松理子<sup>1</sup>, 金 徳男<sup>1</sup>, 高井真司<sup>1</sup>, 林 哲也<sup>2</sup>,  
北浦 泰<sup>2</sup>, 片山博視<sup>3</sup>, 玉井 浩<sup>3</sup>, 宮崎瑞夫<sup>1</sup>  
大阪医大・<sup>1</sup>薬理, <sup>2</sup>第三内科, <sup>3</sup>小児科

腹部大動脈瘤は動脈硬化に関連した慢性炎症であり、破裂例の致死率は非常に高い。我々は以前より大動脈瘤の発症にアンジオテンシン II (AngII) とキマーゼ、matrix metalloprotease (MMP)-9 が深く関与しているということを報告してきた。

アポ E 欠損マウスは自然に動脈硬化を発症するモデル動物である。近年本モデルに AngII を投与すると動脈硬化の悪化に加え、大動脈瘤が惹起されると報告され、ヒト大動脈瘤動物モデルとして着目されているが、発生機序については未だ不明な点が多い。

今回我々は、アポE欠損マウスの大動脈瘤発症におけるAngIIとキマーゼ、MMPsの関わりについて検討した。

【方法】 16週齢の雄性アポE欠損マウスにAngII (1000 ng/kg/min) を Osmotic mini pump を用いて4週間持続投与した。AngII 投与前後にTail cuff 法で血圧の測定を行った。AngII 投与終了後、一部を屠殺し、残りはpumpを除去し40週齢で屠殺した。コントロールには生食水を投与したアポE欠損マウスを用いて、20週齢又は40週齢で屠殺した。大動脈を起始部から総腸骨動脈分岐部まで全て採取し、組織学的検討用にカルノア固定、酵素活性用に凍結保存した。胸部大動脈における粥腫面積と、腹部大動脈における血管内腔面積を測定し、動脈硬化と大動脈瘤の形成を定量化した。酵素はAngiotensin converting enzyme (ACE)活性、総AngII産生活性、キマーゼ活性、MMP-2、MMP-9活性を測定した。

【結果】 AngII 投与群では非投与群と比して、胸部大動脈の動脈硬化が進展しており、腎動脈分岐部上部には瘤の形成を認めた。酵素活性は AngII 投与群でキマーゼ活性、総AngII産生活性が上昇していたが、ACE活性は低下していた。また、pro MMP-2、pro MMP-9、active MMP-2、active MMP-9活性が有意に上昇しており、増加したpro MMP-9はキマーゼによって活性体に変換された。

【考察】 AngII は炎症やマスト細胞の増殖を介して、キマーゼや pro MMP-2、-9 を増加させる機序が示された。さらにキマーゼはAngIIを産生し、pro MMP-9を活性化させることにより、動脈硬化と大動脈瘤形成に深く関与していると考えられた。

大動脈瘤の治療はこれまで外科的手術に頼っていたが、これらの機序の解明は大動脈瘤の進展予防に対する新たな薬物療法の開発につながると期待される。

### 【背景】

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、各種循環器疾患の代表的な創薬ターゲットの一つであり、これらGPCRの機能を制御するリガンドを効率的に発見することは医薬品開発において多大な貢献をもたらす。我々は、GPCRとリガンドとの相互作用パターンを計算機に機械学習させることによりリガンドを効率的に探索する新規な*in silico*リガンド予測法の開発を行った。本手法は、結晶構造解析が極めて困難であるGPCRファミリーに対して、タンパク質配列情報と化合物化学情報を用いることでリガンドの予測効率を劇的に向上することに成功した新規な技術である。本研究では、この予測法から得られた結果について結合実験による検証を行い、その有用性の評価について報告する。

### 【方法】

我々が開発したリガンド予測法を評価するために、既知リガンドに関しての報告が多い $\beta_2$ アドレナリン受容体のリガンド探索を行った。リガンドと受容体に関する情報は、GPCR Ligand Database、IUPHAR Receptor Databaseなどの公共データベースから収集した。相互作用が既知のリガンド-受容体情報を元にして、相互作用が未知の組み合わせに対し予測手法を適用し、相互作用の有無を予測した。リガンドのうち予測スコアの高い化合物群(best50)、およびその対照として予測スコアの低い化合物群(worst50)について受容体結合実験による検証を行った。予測されたリガンド候補化合物の $\beta_2$ アドレナリン受容体に対する親和性は、 $\beta_2$ アドレナリン受容体強制発現細胞株と $[^{125}\text{I}]$ -cyanopindololを用いた受容体結合実験により検討した。

### 【結果】

スコアの高い化合物群のうち、21種類について検討を行った。その結果、17種類について受容体親和性が認められた(ヒット率80.9%)。次に、スコアの低い化合物群のうち、9種類について検討をおこなった。その結果、5種類は親和性を示さず、2種類について親和性が認められた(ヒット率22.2%)。今回検討した化合物はいずれも、 $\beta_2$ アドレナリン受容体リガンドとして報告のない新規のリガンドである。今回、我々が作成したリガンド予測法が既知のGPCRに対する新規リガンドを効率的に予測できることを確認した。この予測法を応用することで、治療標的となり得るオーファンGPCRに対する新規リガンドの合理的かつ効率的探索が実現するものと期待される。

## 血管平滑筋における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の生理的意義の解明

Y15

村田秀道<sup>1</sup>，山村寿男<sup>1</sup>，大矢 進<sup>1</sup>，岩本隆宏<sup>2</sup>，  
今泉祐治<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析，

<sup>2</sup> 福岡大・医・薬理

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 (以下 NCX) は、細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Na}^+$  を  $\text{Na}^+$  濃度勾配依存的に交換輸送する膜タンパクである。心筋や血管をはじめとする平滑筋細胞において、NCX は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に寄与することにより、筋の収縮はもとより、遺伝子・タンパク発現制御にまで関わる重要なイオン輸送体である。NCX は、通常、細胞の興奮時に上昇した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞外へ排除する役割を主に担っているが、生理的条件下における一部の興奮性組織や病理的条件下ではこの輸送方向の逆転が生じ、局所的な  $\text{Ca}^{2+}$  hotspot や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を招くことが知られている。平滑筋組織における NCX の機能解析は、現在までに盛んに研究がなされている心筋に比べ、そのタンパク発現量の少なさもあり、現在まであまり報告がなされていなかった。しかし、近年、NCX 1.3 を平滑筋特異的に 6~8 倍程度に高発現させた遺伝子改変マウス (NCX1.3 TG) が作製され、このマウスにおいて食塩感受性高血圧症の発症が確認されたことから、血管平滑筋における NCX の収縮制御機構ならびに疾患への関与が注目されている。そこで、我々は野生型マウス (WT) と NCX 1.3 TG を用いることにより血管平滑筋 NCX の収縮制御機構への寄与を検討した。

WT、NCX 1.3 TG から胸部大動脈を採取し酵素法により得られた単離平滑筋細胞 (mASMCs) に whole cell patch-clamp 法を適用し、自発一過性外向き電流 (STOCs) を測定したところ、NCX 1.3 TG 群において発生頻度および電流量の増加が確認された。さらに、NCX 1.3 TG mASMCs に NCX 選択的阻害薬である  $3 \mu\text{M}$  KB R7943 を投与することで STOCs の発生頻度ならびに電流量の減少が確認された。mASMCs における電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルや大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネルそれぞれの電流量は両群でほぼ同程度であることから、NCX 1.3 TG における STOCs の増加は、NCX を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が増加したものによると考えられる。

よって、血管平滑筋 NCX は静止時において細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路の一部であり、STOCs の制御を介して静止膜電位を制御している可能性が示唆された。



## 心筋イオンチャネルに対するプロゲステロンの急性作用

Y16

黒川洵子，中村浩章，大石咲子，白 長喜，古川哲史  
東京医歯大・難治研・生体情報薬理

【背景】 QT 延長症候群の女性患者では、血中プロゲステロン濃度が下がる産後において心事故のリスクが高いことや、プロゲステロン濃度が上がる黄体期では薬物誘発性不整脈の発生頻度が有意に低いことが臨床的に知られており、心臓再分極に対するプロゲステロンの保護的な作用が示唆される。しかし、これまで心筋イオンチャネルに対するプロゲステロンの作用に関する詳細な報告はなかった。

【方法と結果】 そこで我々は、モルモット心室筋細胞から穿孔パッチクランプ法により記録したイオン電流に対するプロゲステロンの作用を検討した。プロゲステロンは、緩徐遅延整流  $K^+$  チャネル電流 ( $I_{Ks}$ ) を  $EC_{50}$  値 5.7 nM で濃度依存的に増大した。女性の血中プロゲステロン濃度は、性周期により 2 nM - 40 nM の間を変動するので、 $I_{Ks}$  に対する作用は大きく変化することが予測され、心臓再分極にも影響することが示唆される。この増大作用は、5 - 10 分で安定し、プロゲステロン受容体 (PR) の阻害剤である mifepristone により阻害されることから、転写調節を介さない非ゲノム作用であることが示された。以前、我々はテストステロンによる  $I_{Ks}$  増大作用が非ゲノム経路による NO 産生を介することを示したことから、今回のプロゲステロンによる  $I_{Ks}$  増大作用に関しても同様の非ゲノム経路を検討し、PR の Akt 依存性非ゲノム経路を介して NOS3 を活性化し、NO が産生されることを示した。一方、ホールセルパッチクランプ法により細胞内に 0.2 mM cAMP を与えたところ、プロゲステロンによる  $I_{Ks}$  増大に加え、L 型  $Ca^{2+}$  電流 ( $I_{Ca, L}$ ) 抑制が見られた。 $I_{Ca, L}$  抑制は濃度依存的 ( $EC_{50} = 37$  nM) であり、生理的濃度範囲で作用が見られることが示唆された。 $I_{Ks}$  と同様の非ゲノム経路を介した急性効果であることが、阻害剤を使用した実験により示唆された。

【結論】 この非ゲノム経路を介したプロゲステロンによる心筋イオンチャネル制御は、臨床的に報告されているプロゲステロンの心臓再分極に対する保護的な効果を少なくとも一部は説明すると考えられる。交感神経系刺激により、プロゲステロンの心臓保護作用のターゲットが変化することが示唆された。

## 電気生理学的手法を用いた3種のβアドレナリン受容体と三量体G蛋白質の共役能の解析

Y17

稲生大輔<sup>1,2</sup>, 稲野辺 厚<sup>1</sup>, 倉智嘉久<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大院・医・分子細胞薬理,

<sup>2</sup>東京大・医科研・機能解析イン・シリコ分野

### 【目的】

βアドレナリン受容体はG蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーで、β1、β2、β3の3種のサブタイプがある。β1受容体は心筋、β2受容体は平滑筋、β3受容体は脂肪細胞に主に存在し、それぞれ交感神経刺激に応答して、促進型三量体G蛋白質(Gs)を介した情報伝達を惹起することが知られている。しかしながら、近年、他種のG蛋白質を介したシグナル経路も報告されており、βアドレナリン受容体とG蛋白質の共役様式には未だ不明な点が多い。本研究では、異所性に発現させた3種のβアドレナリン受容体と種々のG蛋白質の機能的共役を、電気生理学的手法を用いて検討した。

### 【方法】

β1、β2 またはβ3 受容体、心筋型 G 蛋白質制御内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネル(GIRK1/GIRK4 ヘテロチャネル: K<sub>G</sub> チャネル)を HEK293 細胞に共発現させ、イソプロテレノールによる受容体の刺激に応じた電流変化をパッチクランプ法で測定した。受容体とGsの共役の指標を内因性に発現するCl<sup>-</sup>チャネルの活性化、受容体とGi/oの共役の指標をK<sub>G</sub>チャネルの活性化、さらに受容体とGqの共役の指標をK<sub>G</sub>チャネルの不活性化として、受容体とG蛋白質の共役を評価した。

### 【結果】

- (1) β1受容体の刺激により、Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化、K<sub>G</sub>チャネルの活性化が観察された。
- (2) β2受容体の刺激により、Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化、K<sub>G</sub>チャネルの活性化、K<sub>G</sub>チャネルの不活性化が観察された。
- (3) β3受容体の刺激により、Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化は観察されたが、K<sub>G</sub>チャネルの電流の変化は観察されなかった。
- (4) 上記のK<sub>G</sub>チャネルの活性化は全て百日咳毒素により消失した。

### 【考察】

本研究では、種々のイオンチャネルの活性を指標に、3種のβアドレナリン受容体のG蛋白質共役能について検討した。その結果、(1) β1受容体はGs、Gi/oと、(2) β2受容体はGs、Gi/o、Gqと、(3) β3受容体はGsと、機能的に共役しうることが明らかとなった。本手法は、細胞を破砕せずに測定可能、高い時間分解能、高いシグナルノイズ比、Gs、Gi/o、Gqの3種のG蛋白質とGPCRの共役を同時に検出可能という利点を有しており、機能未知のGPCRとG蛋白質の共役を評価する系としての応用が期待できる。

## 抗不整脈薬のカリウムイオンチャネル(HERG)に対する作用機序の解明と効果予測法の開発

岩田美紀<sup>1</sup>, 保坂幸男<sup>2</sup>, 神谷成敏<sup>3</sup>, 木下賢吾<sup>4</sup>,

稲野辺 厚<sup>1</sup>, 中村春木<sup>5</sup>, 倉智嘉久<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大院・医・薬理, <sup>2</sup>新潟大院・医・循環,

<sup>3</sup>神戸大院・医・CGI, <sup>4</sup>東京大・医科研, <sup>5</sup>大阪大・蛋白研

【目的】 hERG 遺伝子でコードされる電位依存性カリウムイオンチャネル(HERG チャネル)による心臓  $I_{Kr}$  電流を阻害する化合物は致死的心室性不整脈薬として研究されている。これらの薬物の HERG チャネルへの作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を行っている。

【結果】 HERG チャネルを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に HERG 阻害薬ニフェカラントを投与し 2 電極膜電位固定法でカリウムイオンによる巨視的な電流を測定し解析した。HERG チャネルに強い脱分極パルス(プレパルス)を与えると、-50mV 付近で一過性に電流が増加するファシリテーションの効果がみられた。一方、同じ HERG 阻害薬ドフェチリドではその効果はみられなかった。続いて開状態 KvAP チャネルを鋳型にしたホモロジーモデリングを行い HERG チャネル構造を決定した。これを参考にチャネルポアの部分を改変した変異体 HERG を作成し、カリウムイオン電流のニフェカラントによる阻害と薬物結合下でのプレパルスによるファシリテーション効果について調べた結果、Y652 と F656 がチャネル開口阻害に関与するアミノ酸残基であること、また、ポア親水性部分に面している S624 と S649 が、ファシリテーション効果に関与することが示唆された。続いて S624 と S649 をスレオニン、バリン等に改変した変異体 HERG の実験で S649 残基とニフェカラントとの相互作用が、ファシリテーションに大きく関与していることが明らかになった。この実験結果を利用し、HERG と各種阻害薬の結合をフレキシブルドッキングシミュレーションを行った結果、ファシリテーション効果のある薬物との相互作用に特徴がある結合モデルが得られた。

【考察】 抗不整脈薬の効果や副作用は、HERG チャネルポアと薬物の相互作用部位の相違により制御されることが示唆され、安全に臨床使用されている抗不整脈薬ニフェカラントの特徴のひとつとして S649 付近へ薬物が相互作用することで惹き起こされるファシリテーション効果があると考えられる。

このように、薬物と HERG チャネル間の相互作用を生理学的手法、シミュレーションの手法を用いて分子レベルで明らかにして HERG チャネル阻害効果や化合物の構造を分類することで、ニフェカラントを始めとする HERG 阻害薬物の効果及び副作用の予測が可能になり、より安全な抗不整脈薬の開発に応用できると思われる。

## Nifedipine 代謝物の細胞保護効果の検討

Y19

堀ノ内裕也<sup>1</sup>, 田岡千明<sup>2</sup>, 福原弥生<sup>1</sup>, 石澤啓介<sup>1</sup>,  
兼松康久<sup>1</sup>, 土屋浩一郎<sup>2</sup>, 玉置俊晃<sup>1</sup>  
徳島大院・HBS 研・<sup>1</sup>情報伝達薬理,<sup>2</sup>薬物治療解析

### 【目的】

近年、nifedipine の Ca チャンネル阻害作用を介さない臓器保護効果が報告されるようになったが、その機序については不明である。Nitrosonifedipine (NO-nif) は光に不安定な医薬品である nifedipine の光分解産物で、生体内においても代謝物として確認されている。この NO-nif は *in vitro* の実験でオレイン酸と反応することによりラジカル体である NO-nif ラジカルを生成することが報告されているが、NO-nif と NO-nif ラジカルの生理作用についてはほとんど検討されていない。そこで、今回 NO-nif と NO-nif ラジカルの酸化ストレスに対する細胞保護効果を検討した。

### 【方法】

NO-nif がオレイン酸以外の脂肪酸と反応して NO-nif ラジカルが生成されるか検討を行うために、電子常磁性共鳴(EPR)法を用いて確認を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) による NO-nif からの NO-nif ラジカル生成も同様に確認した。また、抗酸化活性を検討するために NO-nif と NO-nif ラジカルのラジカル消去能を DPPH 法で測定した。さらに、酸化ストレスに対する細胞への保護効果を検討するために膜の過酸化を引き起こす Fe-NTA (10  $\mu$ M) で刺激した PC12 (ラット副腎髄質由来褐色腫) 細胞に NO-nif (10  $\mu$ M) を添加して細胞障害性の指標である LDH の細胞外への遊離を測定した。

### 【結果】

1) NO-nif は飽和脂肪酸とはほとんど反応しなかったが不飽和脂肪酸と反応して NO-nif ラジカルを生成した。その反応速度は、1.0 (リノール酸)、1.6 (リノレン酸)、0.3  $M^{-1}h^{-1}$  (アラキドン酸) と比較的緩やかであった。また、NO-nif は、HUVEC 内で代謝を受けて NO-nif ラジカルを徐々に生成し、6 時間後に生成量がピークに達した。2) NO-nif ラジカルは、NO-nif と比較して有意なラジカル消去活性が認められた。3) PC12 細胞において NO-nif の前処置は、無処置群と比較して LDH の遊離を有意に抑制した。

### 【考察】

以上の結果より、nifedipine の細胞保護効果は、代謝物である NO-nif が細胞と反応して生成された NO-nif ラジカルが関与しており、その作用の 1 つとして NO-nif ラジカルのラジカル消去作用が寄与することが示唆された。

## 2光子励起顕微鏡による脳血管動態の蛍光イメージング

Y20

関谷 敬，戸田千尋，大久保洋平，飯野正光  
東京大院・医・細胞分子薬理

脳の血管系は、脳の局所領域の神経活動に応じて、精密な血流の調節を行うことが知られている。局所血流は血管平滑筋の収縮・弛緩による局所的な血管径の調整により制御される。最近の知見により、脳血管系を構成する動脈・細動脈・毛細管などがそれぞれ異なる制御を受け、高度な血流調節が行われる可能性が示唆されてきた。しかし、これらの知見は摘出血管やスライス組織標本などの血流のない *in vitro* での研究に基づいており、脳血管系の血流調節機構は十分明らかになっていなかった。また、血流の保たれた *in vivo* の条件では、MRI シグナルにより血流を評価する BOLD 法、トレーサーを用いた PET スキャンなどの手法を用いた研究がなされてきたが、時空間解像度が十分ではなく、詳細な局所血流動態は不明であった。

本研究では、脳の動脈・細動脈・毛細管・静脈などの血管を十分に識別できる解像度において、血管径の動態を *in vivo* において観察することを試みた。生体組織深部への到達性の高い2光子励起顕微鏡を使用し、血中に蛍光色素を注入することで、血管の形態を *in vivo* において蛍光イメージングするシステムを構築した。そして、血中薬物投与時の脳血管を観察した。今後このシステムを用いることで、血中薬物の脳血管に対する薬理作用や、局所神経活動と脳血管動態の生理的な相互作用について、詳細な解析が可能になると期待される。

## **Intrarenal renin-angiotensin system in developing kidneys of type 2 diabetic rats**

**A01**

Yu-Yan Fan<sup>1</sup>, Yukiko Nagai<sup>2</sup>, Shoji Kimura<sup>1</sup>, Youichi Abe<sup>1</sup>,  
Akira Nishiyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Pharmacol., <sup>2</sup>Life Sci. Res. Center, Kagawa Univ. Med. Sch.

**Objective:** We previously demonstrated that intrarenal angiotensin II (AngII) levels are augmented long before diabetes becomes apparent in type 2 diabetic (Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty: OLETF) rats. Here, we aimed to characterize the pattern of intrarenal renin-angiotensin system (RAS) activity in developing kidneys of OLETF rats.

**Design and Methods:** Using radioimmunoassay, we measured AngII contents in kidneys of newborn (1, 5, 15 and 30 days postnatal) or young (7 and 11-weeks-old) OLETF and control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats (n=7-11 for each). Gene expression of angiotensinogen, rennin, angiotensin converting enzyme (ACE) or AT1a, AT1b and AT2 receptors in renal cortical tissue were also determined by real-time PCR.

**Results:** In both LETO and OLETF rats, kidney Ang II levels peaked at postnatal day 1 or 5 and decreased age-dependently during the pre- and post-weaning periods (from 15 days- to 7-weeks); periods during which Ang II levels were not different between the animals. Angiotensinogen, rennin, ACE or AT1a, AT1b and AT2 receptor expression were also similar. In LETO rats, kidney AngII levels further decreased at puberty (from 7- to 11-weeks), whereas an age-dependent decline of kidney AngII levels was not observed in OLETF rats. At 11weeks of age, kidney AngII levels and mRNA levels of angiotensinogen and renin were higher in OLETF than LETO rats.

**Conclusions:** The data here suggest that intrarenal RAS is inappropriately regulated in pubescent type 2 diabetic kidneys, and that later in life this may play a role in the development of diabetic nephropathy.

## アンジオテンシン II 投与ラット腎での鉄・脂質代謝異常と TGF- $\beta$ ・PDGF の発現調節

A02

石坂信和，斉藤 幹，古田恭子，松崎 弦，永井良三  
東京大・医・附属病院・循環器内科

### 【背景および目的】

糖尿病などの疾患において、レニン・アンジオテンシン系の活性化が腎障害発生の背景にあると考えられている。われわれは、ラットへのアンジオテンシン II を持続投与モデルを作成し、ノルエピネフリン投与による高血圧モデルの腎における障害パターンと比較検討した。

### 【方法】

アンジオテンシン II、ノルエピネフリンはいずれも、浸透圧ミニポンプを皮下に埋め込むことで、一週間持続投与した。これにより、いずれのラットも収縮期血圧が約 190 mmHg に上昇した。脂質染色は、oil red O 染色、鉄染色はベルリン青で施行し、遺伝子発現の定量は、real-time PCR で、組織局在は、*in situ* hybridization で検討した。スーパーオキシダの産生は、非固定生切片の dihydroethidium 染色で行った。

### 【結果】

アンジオテンシン II の投与により、腎における TGF- $\beta$ 、PDGF-B、PDGF-D の mRNA 発現がそれぞれ約 1.5 倍、2.0 倍、2.5 倍増加した。この現象は、AT1 受容体拮抗薬で抑制されたが、血管拡張薬による降圧では抑制されなかった。また、ノルエピネフリン投与では惹起されなかった。アンジオテンシン II 投与ラットの腎尿細管において、著明な脂質沈着を認め、脂質陽性細胞では SREBP-1、TGF- $\beta$ 、PDGF-B、PDGF-D mRNA の発現の亢進を認めた。また脂質陽性細胞では、スーパーオキシダの産生が増加していた。アンジオテンシン II 投与ラットの腎の近位尿細管では著明な鉄沈着が生じていたが、脂質沈着部位とは異なる尿細管に認められた。鉄陽性細胞では、酸化ストレスのマーカー遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ-1 の発現が亢進し、また、マロンジアルデヒド(MDA) が増加していた。PCNA 陽性の分裂細胞は脂質陽性細胞で認められたが、TUNEL 陽性のアポトーシスは鉄陽性細胞で認められた。脂質代謝関連遺伝子では FAS、LOX-1 などが、鉄代謝関連遺伝子では、DMT-1、ferroportin、トランスフェリン受容体の mRNA 発現がアンジオテンシン II 投与により増加していた。鉄代謝関連遺伝子の局在と鉄沈着の co-localization は限定的であった。

### 【結語】

アンジオテンシン II 投与により、腎において鉄・脂質代謝障害が生じている。これら現象は酸化ストレス亢進、細胞増殖、アポトーシスと関連している可能性がある。

## 新規エンドセリン受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン誘導性 ERK リン酸化の調節

A03

三輪聡一，魯 凌云，西本 新，西屋 禎，堀之内孝広，  
梶田絵美

北海道大院・医・細胞薬理

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つであるエンドセリン A 受容体 ( $ET_A R$ ) は、その細胞質ドメインにおいてヘテロ三量体 G タンパク質と結合し、それらを介してシグナル伝達を行なっているが、ヘテロ三量体 G タンパク質以外の GPCR 結合蛋白質を介したシグナル伝達については、ほとんど明らかにされていない。本研究において、 $ET_A R$  の C-tail に結合する新規蛋白質分子を得るために、酵母 two-hybrid 系を用いて、その 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なった。その結果、Jab1 (Jun activation domain-binding protein 1) が  $ET_A R$  の C-tail に結合することが明らかとなった。Jab1 は転写因子 Jun と特異的に結合するコアクチベーターとして単離されたが、その後 CDK (cyclin dependent kinase) インヒビターである p27<sup>Kip1</sup> とも特異的に結合し、核外移行を促進してその分解を誘導することが明らかとなっている。Jab1 が相互作用する蛋白質はこれらの蛋白質以外にも見つかり、大きく分けて、標的蛋白質あるいはそのシグナル伝達経路を活性化に導く系と分解誘導に導く系があると考えられている。実際、Jab1 は PAR-2 (protease-activated receptor-2)、LHR (lutropin/choriogonadotropin receptor) の前駆体とも結合することが報告されており、前者では Jab1 によって PAR-2 signaling が活性化され、後者では Jab1 によって LHR 前駆体の分解が促進されることが報告されている。 $ET_A R$  の C-tail と Jab1 との蛋白質間相互作用は、酵母 two-hybrid interaction assay 及び GST pull-down assay によって確認された。また full-length の  $ET_A R$  と Jab1 との蛋白質間相互作用も免疫共沈降法によって確認された。さらに、ET-1 により活性化された MAP キナーゼ系に対する Jab1 の効果を検討するため、リン酸化 ERK1/2 の発現量の変化をウェスタンブロット法にて調べたところ、ET-1 誘導性の ERK1/2 リン酸化は、Jab1 の過剰発現により減弱され、また Jab1 のノックダウンにより増強されることが明らかとなった。さらに Jab1 過剰発現は、安静時の  $ET_A R$  発現レベルに影響を及ぼさなかったが、ET-1 誘発性の  $ET_A R$  発現レベルの低下を促進した。これらのことから Jab1 の作用機構として、次のようなモデルを考えている。通常、 $ET_A R$  は ET-1 刺激により internalize し、初期エンドソームに移行した後、リサイクリングエンドソームを経て、再び、細胞膜上に局在する(リサイクリング)。Jab1 が  $ET_A R$  に結合すると、 $ET_A R$  はリサイクリングされず、ユビキチン・プロテアソーム系により蛋白質分解を受ける。蛋白質分解による  $ET_A R$  発現レベルの低下が ET-1 誘導性の ERK1/2 リン酸化の減弱を引き起こしていると考えられる。



## 糖変性産物であるグリオキサルは血管内皮細胞において炎症性反応を誘導する

A04

山脇英之， 原 幸男  
北里大・獣医畜産・獣医薬理

【背景】動脈硬化症の初期病変は血管内皮細胞の障害および炎症性変化である。虚血性心疾患のリスクファクターの1つである糖尿病においても、しばしば血管内皮細胞の障害が認められるが、その詳細機序に関しては明らかにされていない。本研究は、糖尿病性血管内皮細胞障害、特に炎症性反応のメカニズムを解明することを目的とする。

【方法・結果】ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に高血糖(High glucose: HG)、終末糖化産物(Advanced glycation endproducts: AGEs)及びその中間体である Glyoxal (GO; グルコースの自動酸化及び分解産物より生じる)を 24 時間処置し、位相差顕微鏡で細胞の形態変化を観察するとともに、ウエスタンブロットを用いてタンパク質発現解析をおこなった。HG(26 mM)あるいは AGEs (100-500  $\mu$ M)を処置しても内皮細胞の形態は正常で、炎症性マーカーである接着因子の vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 及び cyclooxygenase (COX)-2 発現も変化しなかった。一方、GO 処置により濃度(50  $\mu$ M - 5 mM)と時間(4 - 24 hr)依存性に細胞障害性の形態変化が観察された。GO (500  $\mu$ M)処置により COX-2 発現は上昇したが VCAM-1 発現は変化しなかった。一方、GO (5 mM)処置では、細胞死がおこった。GO による COX-2 発現誘導は、MEK 阻害剤の PD98059、p38MAPK 阻害剤の SB203580、PKC 阻害剤の calphostin C により影響を受けなかったが、nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 阻害剤の pyrrolidine dithiocarbamate 及び Nitric Oxide (NO)ドナーにより抑制された。

【結論】本研究の結果から、糖尿病血管内皮細胞においては、高血糖そのものよりも、むしろその変性代謝産物である Glyoxal が炎症性の細胞障害誘導に関与している可能性が疑われる。さらに、これらの炎症性変化は NF- $\kappa$ B シグナル伝達活性化を介している可能性が考えられる。

## 血管内皮細胞における流れずり応力依存性 ATP 放出の分子機構

A05

山本希美子, 安藤譲二  
東京大院・医・システム生理

血管内面を一層に覆う内皮細胞は血管のトーンスを調節し、高い抗血栓性を示すなど、循環系の恒常性の保持に中心的な役割を果たしている。近年、内皮細胞機能がホルモンやサイトカインなどの化学的刺激だけでなく、血流に起因する流れずり応力などの機械的刺激によっても調節を受けることが明らかとなった。最近我々は流れずり応力の感知に ATP 受容性チャネルである P2X4 受容体が関わっていることを明らかとした。血流センサー分子の生理的意義を評価する為、P2X4 受容体欠損マウスを作製した。P2X4<sup>-/-</sup>マウスの血管内皮細胞を培養し、流れずり応力による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度及び、NO 産生量の変化を、それぞれ蛍光指示薬である Indo-1 及び DAF-2 により観察した所、流れずり応力依存性 Ca<sup>2+</sup>流入反応が消失し、NO 産生も減少した。テレメトリ法による覚醒時の血圧は P2X4<sup>+/+</sup>の平均血圧が約 105 mmHg であるのに対して、P2X4<sup>-/-</sup>では約 125 mmHg であった。骨格筋細動脈の血流を約 50%上昇させた際の血管径の変化を測定した。P2X4<sup>+/+</sup>での血管拡張率は約 45%であるのに対して、P2X4<sup>-/-</sup>では約 21%であった。外頸動脈を結紮し、総頸動脈の血流を約 2/3 に減少させた時の血管リモデリングは P2X4<sup>-/-</sup>ではほとんど観察されなかった。以上の結果から、血流センサーである P2X4 受容体は血圧の恒常的な維持など、循環機能に重要な役割を果たすことが確認された。本研究では特に、P2X4 受容体が流れずり応力が活性化される機序について着目した。培養血管内皮細胞に流れずり応力を負荷させると、内因性の ATP が灌流液中に放出され、その濃度は流れずり応力の大きさに依存した。ATP 合成酵素の阻害剤を作用させることにより、流れずり応力依存的な ATP 放出反応が有意に抑制されたと共に、コレステロールを多く含むラフト構造を除去する試薬を処理すると、同様にして、灌流液中の ATP 濃度が顕著に減少した。更に、これらの処理により流れずり応力依存的な ATP 放出を抑制させると、P2X4 受容体の活性化が抑制され、流れ刺激に伴う Ca<sup>2+</sup>流入反応が有意に減少した。

以上の結果から、流れずり応力の感知機構に内因性 ATP 放出が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## Ca<sup>2+</sup>イメージングと膜電位イメージングによる心筋の興奮伝導遅延の検討

A06

呉林なごみ<sup>1</sup>，西澤寛人<sup>2</sup>

順天堂大・医・<sup>1</sup>薬理，<sup>2</sup>循環器内科

**背景:**心筋細胞間の興奮伝導抑制は、活動電位交代現象 (alternans) や興奮のリエントリーなどの原因となり、不整脈を誘発すると考えられている。今回、我々は多細胞心臓組織標本を用い、個々の細胞間の興奮伝導がどの程度まで遅延し得るのかをCa<sup>2+</sup>シグナルおよび膜電位シグナルを測定することにより検討した。

**方法:**モルモット心室より乳頭筋を切り出し、Di(4)ANEPPS および Rhod 2 を負荷した。共焦点顕微鏡を用い、Di(4)ANEPPS は 488 nm で、Rhod 2 は 568 nm で励起し、> 605 nm の蛍光画像を1フレームあたり 8 ~ 40 ms/frame の速さで取得した。約 0.3 mm 四方の視野の中の細胞の動態を観察した。

**結果および考察:**正常な心筋細胞では、個々の細胞のCa<sup>2+</sup>トランジエントに時間差は検出されなかった。ギャップジャンクション阻害薬ヘプタノール存在下では、隣り合った細胞間のCa<sup>2+</sup>トランジエントの立ち上がり最大で 200 ms のずれが見られた。また、低酸素下で高頻度刺激をかけたCa<sup>2+</sup>過負荷心筋においても同様の現象が見られた。このCa<sup>2+</sup>トランジエントの遅れについては(1)活動電位の細胞間伝導に遅れがある、かあるいは、(2)活動電位発生は同時で片方の細胞の興奮収縮連関に遅れが発生しているという二つの説明が考えられたので、Di(4)ANEPPS を用いて膜電位をモニターした。Di(4)ANEPPS の膜電位シグナルは小さく、個々の細胞ごとの膜電位の検出は難しかったが、ヘプタノール存在下では、150 ミクロンほど離れた部位で、活動電位の立ち上がりCa<sup>2+</sup>トランジエントと同程度のずれが生じているのが検出された。以上の結果より、個々の細胞間の興奮伝導には、最大 200 ms ほどの遅延が起こりうる事が分かった。このことは、細胞2~3個の間の興奮伝導でリエントリー回路が成立可能なことを示唆する。

## Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor の虚血心筋保護効果

A07

田野中浩一，茂木奏尊，竹永悠司，竹尾 聡  
東京薬大・薬・分子細胞病態薬理

【目的】 虚血心筋では Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger を介した Na<sup>+</sup>流入により Na<sup>+</sup> overload が誘発され、再灌流時に Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) を介した細胞内への大量の Ca<sup>2+</sup>流入による Ca<sup>2+</sup> overload で心筋細胞壊死が引き起こされると考えられている。NCX inhibitor は再灌流時の心筋 Ca<sup>2+</sup> overload を抑制することにより心筋細胞を保護すると考えられているが、虚血時の心筋への作用については明らかにされていない。そこで、本研究は NCX inhibitor KB-R7943 (KBR) の虚血心筋に及ぼす効果について検討するため企画された。

【方法】 Wistar rat の摘出灌流心臓に 20 分間虚血、それに続いて 60 分間の再灌流を行った。KBR は虚血前 10 分間のみ灌流心臓に作用させ (最終濃度 3、10、30 μM)、虚血および再灌流終了時の心収縮力 (LVDP)、組織イオン含量、ミトコンドリア呼吸能、および高エネルギーリン酸含量を測定した。

【結果】 虚血/再灌流後、薬物未処置群の心収縮力 (LVDP) は虚血前の約 55% であった。虚血終了時には心筋 Na<sup>+</sup> 含量が虚血前の約 1.8 倍に上昇し、再灌流時に心筋 Ca<sup>2+</sup> 含量が増加した (Ca<sup>2+</sup> overload)。再灌流終了時の心筋 ATP 含量は虚血前の約 40% まで低下した。虚血および再灌流終了時の心筋ミトコンドリア呼吸能は虚血前のそれぞれ約 55% および 50% に低下した。KBR を作用させると再灌流後の LVDP は虚血前の約 85%まで回復した。KBR は虚血心筋での Na<sup>+</sup>含量増加は抑制しなかったが、再灌流時の Ca<sup>2+</sup> overload を抑制した。KBR 処置により心筋ミトコンドリア呼吸能は虚血前の約 75%が維持され、薬物未処置群のそれよりも高値となった。さらに KBR の単離ミトコンドリアへの直接作用を検討したところ、KBR はミトコンドリアへの Na<sup>+</sup>および Ca<sup>2+</sup>流入を一部抑制した。

【考察】 NCX inhibitor KBR は再灌流時の Ca<sup>2+</sup> overload を抑制した。これは虚血心筋で蓄積した Na<sup>+</sup>が駆動力となり、再灌流時 NCX の reverse mode を介して流入した Ca<sup>2+</sup>による細胞障害を抑制した結果と考えられた。この心筋保護作用は従来の説で説明できるものである。一方、本研究では、KBR 処置群の心臓では、虚血終了時点の心筋ミトコンドリア呼吸能が薬物未処置群のそれよりも高値となることを見出した。この結果は、KBR には虚血心筋でのミトコンドリア機能保持すなわちミトコンドリア保護作用があることを示すもので、KBR の新たな虚血心筋保護の作用機序となることを示唆した。

## リアノジン受容 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルゲーティングにおける膜貫通セグメント 間ループの役割

A08

村山 尚<sup>1</sup>, 小山田英人<sup>2</sup>, 大羽利治<sup>3</sup>, 佐藤 治<sup>4</sup>,  
小口勝司<sup>2</sup>, 呉林なごみ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 順天堂大・医・薬理, <sup>2</sup> 昭和大・医・薬理 1,

<sup>3</sup> 名古屋市大・医・生理 1, <sup>4</sup> Univ. Massachusetts

【目的】リアノジン受容体 (RyR) は小胞体に存在する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネルで、約 5000 アミノ酸のサブユニットからなる 4 量体の巨大な蛋白質である。骨格筋および心筋には 1 型 RyR (RyR1) および 2 型 RyR (RyR2) が存在しており、興奮収縮連関に重要な役割を果たしている。MacLennan らのグループが提唱した RyR1 の構造モデルによると、RyR のチャンネル領域はカルボキシル末端の膜貫通領域に存在しており M5、M6、M7a、M7b、M8、M10 の 6 つの膜貫通セグメントから形成されている。M8 および M10 がチャンネルポアの裏打ちを形成し、その間のループ (M9) がイオン選択性フィルターであると推定されているが、他の膜貫通セグメントおよびループの役割についてははっきりとわかっていない。今回われわれは M7b と M8 をつなぐループ (M7b-M8 ループ) に注目した。このループは 10 アミノ酸からなり、(1) チャンネルポアの直近に存在すること、(2) RyR アイソフォーム間で高く保存されていること、(3) このループおよび近傍に 2 種類の悪性高熱突然変異 (Thr4825Ile および Leu4837Val) が見いだされていることから、チャンネル活性の制御に重要な役割を果たしていることが考えられる。本研究では RyR1 および RyR2 の M7b-M8 ループにアラニン変異を導入してチャンネル活性を評価した。

【方法】ウサギ RyR1 および RyR2 全長 cDNA を用いて、M7b-M8 ループに種々のアラニン変異を導入した。この cDNA を Flp-In T-Rex システムにより HEK 細胞にトランスフェクションして、テトラサイクリン誘導型安定発現細胞を作製した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性は fura-2 AM を細胞に負荷しておこなった。 $^3\text{H}$  リアノジン結合および単一チャンネル活性は HEK 細胞から調製したミクロゾームを用いて測定した。

【結果】RyR1 においてアラニン変異の多くはチャンネル活性を種々の割合 (5-80%) で低下させた。この低下はおもにチャンネルゲインの低下によるもので、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性は変化していなかった。一方、2 種類の変異 (Leu4827Ala および Asn4833Ala) では逆にチャンネル活性が亢進していた。特に、Leu4827Ala はストア  $\text{Ca}^{2+}$  の著明な枯渇が観察された。これらの変異では低濃度 ( $<10^{-7}$  M)  $\text{Ca}^{2+}$  においても有意なチャンネル活性を示したことから、静止  $\text{Ca}^{2+}$  濃度においてチャンネル活性が亢進する、いわゆる「leaky チャンネル」を形成していることが示唆された。現在、RyR2 における変異体解析を行っている。以上の結果は M7b-M8 ループが RyR チャンネルのゲーティングに重要な役割を果たしていることを示唆する。

## 血管内皮細胞局所 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルと NO 産生

A09

一色政志

東京大・医・附属病院・腎臓・内分泌内科

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は、多くの生命現象に関与する重要なシグナル分子であり、その時・空間的制御により細胞機能の多様性が維持される。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  がシグナルとして機能するためには単なる増減だけでなく、そのタイミング・周期性の他に局所性が必須の要素である。細胞膜にはカベオラとよばれるマイクロドメインの存在が知られ、複数の  $\text{Ca}^{2+}$  調節蛋白や eNOS などの多くの内皮機能に関わる分子が存在し、血管病との関連も注目されている。我々は  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの時間・空間的構成におけるカベオラの関与と NO 産生との関連をより明らかにするために従来の  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬を用いた手法に加え、FRET イメージングによる検討を行った。

血管内皮カベオラの分布は細胞辺縁の一部に集中する傾向がある。ATP で刺激したときに生じる  $\text{Ca}^{2+}$  wave の発火部位はカベオラの集中する細胞辺縁と一致しており、カベオラには  $\text{IP}_3$  受容体依存性にストアからの放出を制御する機構の存在が示された。また、このカベオラの集中する  $\text{Ca}^{2+}$  発火部位は細胞遊走やシェアストレスなどに応じて Gq 蛋白とともに細胞内を移動し、カベオラが  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルのコンテナとして機能する可能性がある。さらに、カベオラ直下での  $\text{Ca}^{2+}$  変化を測定するために、FRET を利用した  $\text{Ca}^{2+}$  センサー蛋白カメレオンをカベオラにターゲットさせ、共焦点レーザー顕微鏡で評価した。カベオラ直下での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞膜直下の平均よりも有意に高く、細胞質全体の平均 (約 60 nM) の約 10 倍もの濃度勾配を形成していた。 $\text{Ca}^{2+}$  ストア枯渇に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、カベオラにおいて膜直下平均に比べて常に 2 倍以上の  $\text{Ca}^{2+}$  流入が観察され、この  $\text{Ca}^{2+}$  流入は NO 産生と特異的にリンクした。

以上より、内皮細胞カベオラはダイナミックな膜構造物であり、その直下には高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  のサブドメインが形成され、 $\text{Ca}^{2+}$  放出と流入に関連する。特にカベオラからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は NO 産生を特異的に刺激し、血管機能調節に重要な役割を果たす事が示唆された。

## ミオシン 阻害薬 blebbistatin によるスキンド平滑筋収縮抑制

A10

渡辺 賢<sup>1</sup>, 橋本 亮<sup>2</sup>, 小濱一弘<sup>3</sup>  
東京医大・<sup>1</sup>細胞生理, <sup>2</sup>脳神経外科,  
<sup>3</sup>群馬大院・医・臓器病態薬理

ミオシン 阻害剤 blebbistatin の平滑筋収縮に対する影響を明らかにする目的で、細胞膜破壊(スキンド)標本の力学応答に対する blebbistatin の影響を検討した。

モルモット盲腸紐および頸動脈をβエスシン処理及びCa ionophore A23187 によって作成したスキンド標本において、10 μM 以上の blebbistatin は Ca<sup>2+</sup>活性化張力を非可逆的に抑制したが、収縮の Ca<sup>2+</sup>感受性には全く影響しなかった。この収縮抑制効果には温度依存性があり、25℃未満では効果がみられなかった。

一方、blebbistatin は盲腸紐標本の高濃度 Mg によるミオシンリン酸化非依存性収縮張力発生や、頸動脈標本の低濃度 ATP によるミオシンリン酸化非依存性収縮張力保持を数十μM で抑制したが、頸動脈における ATP 除去による硬直張力保持には影響しなかった。更に、blebbistatin は Ca<sup>2+</sup>除去によるスキンド平滑筋弛緩反応を顕著に促進した。

以上の結果は、blebbistatin による myosin ATPase 活性抑制が、クロスブリッジ形成を阻害することにより、平滑筋収縮が抑制されることを示唆する。異常平滑筋収縮に対する blebbistatin 投与の可能性についても、議論したい。