

第18回日本循環薬理学会

— 分子から見た生体機能と循環薬理学 —

<http://www.m.chiba-u.jp/class/pharmacology/CVP18/>

平成20年11月21日(金)
京成ホテルミラマーレ

当番幹事：中谷晴昭

千葉大学大学院医学研究院薬理学

〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1

Tel : 043-226-2051

Fax : 043-226-2052

協賛：(社)日本薬理学会

第18回日本循環薬理学会

9：00～9：05	開会挨拶 第18回日本循環薬理学会当番幹事 中谷 晴昭
9：05～10：05	Session 1 YIA 候補者演題発表 (1)
10：05～10：15	休憩
10：15～11：15	Session 2 YIA 候補者演題発表 (2)
11：15～12：03	Session 3 YIA 候補者演題発表 (3)
12：04～13：30	昼食休憩 (幹事会)
13：30～14：30	特別講演
14：30～14：40	休憩
14：40～15：28	Session 4 YIA 候補者演題発表 (4)
15：28～15：35	休憩
15：35～16：23	Session 5 一般演題発表 (1)
16：23～17：23	Session 6 一般演題発表 (2)
17：23～17：45	YIA 授賞式 学会会長挨拶 日本循環薬理学会会長 岡村 富夫 次回当番幹事挨拶 辻本 豪三 (京都大院・薬・ゲノム創薬科学) 閉会挨拶 第18回日本循環薬理学会当番幹事 中谷 晴昭
17：45～19：30	懇親会 16階スカイバンケット「イル・ミラマーレ」

口演プログラム

9:05～10:05 Session 1 YIA候補者演題発表（1）

座長 服部裕一（富山大院・医薬・分子医科薬理）

田中 光（東邦大・薬・薬物）

**Y01 心虚血再灌流後の機能障害とノルエピネフリン過剰放出における外因性
ビッグエンドセリン-1の影響**

○田和正志^{1,2}, 福本大起², 大喜多守², 安屋敷和秀¹, 岡村富夫¹, 松村靖夫²

¹滋賀医大・薬理, ²大阪薬大・病態分子薬理

**Y02 Cardiac troponin T (TNNT2) ノックダウンによるゼブラフィッシュ
心不全モデルの作製と心機能評価**

○梅本紀子¹, 殊 黎清², 島田康人^{1,3,4}, 西村有平^{1,3,4}, 西村訓弘²,

田中利男^{1,3,4}

¹三重大院・医・薬理ゲノミクス, ²トランスレーショナル医科学,

³三重大・生命科学研究支援セ・バイオインフォマティクス,

⁴三重大・VBLメディカルケモゲノミクス

Y03 薬物誘発性QT延長症候群の性差におけるエストロゲンの影響のメカニズム

○黒川洵子¹, 浅山真秀子¹, 玉川正次², 中谷晴昭², 古川哲史¹

¹東京医歯大・難研・生体情報薬理, ²千葉大院・医・薬理

**Y04 DCMモデルマウスにおける心筋イオンチャネル発現の経時的变化と突然死
の関係**

○鈴木 剛¹, 中里祐二¹, 村山 尚², 櫻井 隆², 森本幸生³, 吳林なごみ²

¹順天堂大・医・¹循環器内科, ²薬理, ³九州大院・医・臨床薬理

**Y05 Monocrotaline誘発肺高血圧症ラットの右心室dystrophin-related glycoprotein
複合体の含量変化**

○大長卓也, 大聖頼子, 小島 秀, 高野幸織, 手島悠吾, 丸ノ内徹郎,

高木教夫, 竹尾 聰, 田野中浩一

東京薬大・薬・分子細胞病態薬理

10:15～11:15 Session 2 YIA候補者演題発表 (2)

座長 三輪聰一（北海道大院・医・細胞薬理）

鎌田勝雄（星葉大・医薬研・機能形態）

**Y06 モルモット肺静脈心筋における自発的電気活動の発生機序：選択的
Na⁺/Ca²⁺交換機構阻害薬SEA0400を用いた検討**

○行方衣由紀, 恒岡弥生, 杉本貴彦, 竹田 潔, 島田英朗, 高原 章,
田中 光
東邦大・薬・薬物

**Y07 フローサイトメーターを用いた脂肪酸受容体のリガンド受容体直接相互作用
の解析**

○原 貴史, 平澤 明, Sun Qi, 井坪千怜, 定金恵子, 辻本豪三
京都大院・薬・ゲノム創薬科学

**Y08 エイコサペンタエン酸慢性投与は2型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮由来
因子のバランス異常を改善する**

○松本貴之, 小林恒雄, 鎌田勝雄
星葉大・医薬研・機能形態

**Y09 心血管受容体作動性Ca²⁺チャネルTRPC6とその負の制御因子PKGとの相互
作用の検討**

○本田 啓, 菅 忠, 海 琳, 高橋眞一, 井上隆司
福岡大・医・生理

Y10 L-NAME慢性投与ラットにおける臓器障害に及ぼすnifedipine代謝物の影響

○石澤啓介¹, 福原弥生¹, Narantungalag Dorjsuren¹, 堀ノ内裕也¹,
恒石鉄兵¹, 山口邦久¹, 富田修平¹, 土屋浩一郎², 玉置俊晃¹
徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研・¹薬理, ²医薬品機能解析

11:15～12:03 Session 3 YIA候補者演題発表（3）

座長 田中利男（三重大院・医・薬理ゲノミクス）

今泉祐治（名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析）

Y11 レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系を介した血管インスリン抵抗性と動脈硬化の分子メカニズムの解明

○人見浩史，中野大介，西山 成

香川大・医・薬理

Y12 Hsc70（Hsp70ファミリー）の内皮機能における役割

○塩田正之，泉 康雄，中尾隆文，岩尾 洋

大阪市大院・医・分子病態薬理

Y13 C-reactive protein (CRP) は酸化LDL受容体LOX-1と協調して補体系活性化を引き起こす

○藤田佳子，垣野明美，山口三郎，沢村達也

国立循環器病センター研・脈管生理

Y14 新規エンドセリンA型受容体（ET_AR）結合蛋白質Jab1によるET_ARレベルの調節

○西本 新，魯 凌云，西屋 祐，堀之内孝広，三輪聰一

北海道大院・医・細胞薬理

13:30～14:30 【特別講演】

座長 中谷晴昭（千葉大院・医・薬理）

『心不全の新しい発症機序と治療』

小室一成 教授

(千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学)

14:40～15:28 Session 4 YIA候補者演題発表 (4)

座長 辻本豪三（京都大院・薬・ゲノム創薬科学）

井上隆司（福岡大・医・生理）

Y15 血管平滑筋の増殖性変化におけるPDGF-BB, endothelin-1の相乗効果：器官培養法を用いた検討

○貴田大樹, 中馬絃子, 村田幸久, 山脇英之, 松本重子, 堀 正敏,
尾崎 博

東京大院・農学生命科学・獣医薬理

Y16 ドミナントネガティブRyR3の血管平滑筋における発現と機能

○加藤大樹¹, 山村寿男¹, 大矢 進¹, 竹島 浩², 今泉祐治¹

¹名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析, ²京都大院・薬・生体分子認識

Y17 ラット in vivo におけるホスホジエステラーゼ 4 阻害薬の網膜血管拡張効果

○三輪朋代, 森 麻美, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄
北里大・薬・分子薬理

Y18 ヒト冠状動脈内皮細胞の高血糖によるアポトーシス誘導にはデスレセプター高発現が関与する

○影山俊一郎¹, 松田直之², 影山夏子³, 山本誠士¹, 高野健一¹, 福岡順也⁴,
横尾宏毅¹, 服部裕一¹

¹富山大院・医・分子医科薬理, ²京都大院・医・初期診療救急医学,

³富山大・和漢医薬総合研・消化管生理, ⁴富山大附属病院・病理

15:35～16:23 Session 5 一般演題発表（1）

座長 吉栖正典（奈良県医大・薬理）

岩本隆宏（福岡大・医・薬理）

A01 Protease-activated receptor (PAR) を介した血管内皮細胞内カルシウム応答に対するブラジキニン受容体拮抗薬の作用

○竹内和彦, 渡邊裕司

浜松医大・臨床薬理

A02 エンドセリンA型受容体により誘発される持続性Ca²⁺流入の分子機構

○堀之内孝広¹, 西屋 祢¹, 西本 新¹, 森島 繁², 村松郁延², 三輪聰一¹

¹北海道大院・医・細胞薬理, ²福井大・医・薬理

A03 V1bバゾプレッシン受容体ノックアウトによる血圧上昇機構の解明

○輿水崇鏡¹, 奈佐吉久², 田上昭人³, 及川 玲⁴, 土屋裕義¹, 竹尾 聰⁴, 辻本豪三⁵

¹自治医大・医・分子薬理, ²日本薬大・医療薬・機能形態・病態生理,

³国立成育医療センター研・薬剤治療, ⁴東京薬大・分子細胞病態薬理,

⁵京都大院・薬・ゲノム創薬科学

A04 LPA 刺激が血管平滑筋細胞に誘導する組織因子発現と活性酸素を介したシグナル伝達機構

○伊豫田拓也, 岩本隆宏

福岡大・医・薬理

16:23～17:23 Session 6 一般演題発表（2）

座長 石井邦明（山形大・医・循環薬理）

田野中浩一（東京薬大・薬・分子細胞病態薬理）

A05 第Ⅲ群抗不整脈薬によるhERG電流量の増強作用機構の解析

○稻野辺厚, 古谷和春, 倉智嘉久

大阪大院・医・薬理

A06 AT₁受容体刺激によるI_{Ks}の修飾とKCNQ1のinternalizationの分子機序

○大倉正道¹, 岡崎 雅¹, 野呂田郁夫¹, 山崎良彦², 石井邦明¹

¹山形大・医・循環薬理, ²神経機能統御

A07 モルモット心室筋細胞における新規Na/Ca交換体抑制薬YM-244769の作用

○渡邊泰秀¹, 山下寛奈¹, 木村純子², 岩本隆宏³

¹浜松医大・医・健康科学, ²福島医大・医・薬理, ³福岡大・医・薬理

A08 心房筋におけるL型Ca²⁺チャネル電流のサブタイプ特異的調節機構

○中瀬古寛子, 伊藤雅方, 水流弘通, 赤羽悟美

東邦大・医・薬理

A09 オキシトシンのミトコンドリアATP感受性カリウムチャネルを介する心筋保護作用

○西田洋文, 稲村直樹, 小倉武彦, 中谷晴昭

千葉大院・医・薬理

抄錄集

特別講演

特別講演

心不全の新しい発症機序と治療

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 小室一成

絶えず収縮と弛緩を繰り返している心臓は、様々なストレスに対して、代償機構として心肥大を形成することによって、心機能の低下を防いでいる。しかし長年過度なストレスが続くことにより、この適応は破綻し、収縮機能が低下して心不全を発症するが、その分子機序は不明であった。我々は、マウスの圧負荷モデルを用いて、心不全発症の機序を解析した。圧負荷後2週間目までは、心重量が漸増し、血管数も増加、心機能も維持されていたが(代償期)、それ以降、心重量の増加は停止し、血管数は逆に減少し、心機能が低下した(非代償期)。血管数減少の機序について、血管増殖因子を解析したところ、2週間目までは増加していたが、それ以後低下した。血管を人為的に増加させたところ、さらに心肥大が進行し、心機能は維持されたが、逆に血管新生を抑制したこと、早期に心肥大の形成は停止し、心機能が低下した。このような血管増殖因子の発現と同様にその転写因子であるHIF-1の発現レベルも変動しており、HIF-1の発現低下が、代償の破綻を起こすと考えられた。圧負荷2週間後、心臓においてがん抑制遺伝子であるp53の発現が増加しており、これがHIF-1の発現を減少させることができた。心肥大の形成、心機能の維持に心臓内血管が重要であり、それをp53が調節していることを初めて明らかにした。さらにp53は、肥大心ばかりでなく、心筋梗塞や心筋症の心臓においても発現が増加しており、抑制することにより、心機能は改善した。最近心臓において、p53を低下させる分子を同定したが、その活性化により、心筋梗塞が改善することを見いだした。

心不全の治療法は確実に進歩しているものの、最終的には心臓移植しかするのが現状である。ドナーの不足をはじめとして多くの限界をもつ心臓移植に代わる治療法として、再生治療が注目されている。心臓の再生には2つの方法が考えられる。1つは、in vitroにて、心筋細胞ないしは心筋細胞に分化する細胞を培養し、それを心臓に移植するという方法である。現在のところ、心筋細胞に高率に分化することが知られている細胞は、胚性幹細胞、いわゆるES細胞と京大の中山博士が作成したiPS細胞である。ともに浮遊状態で培養し、胚葉体を形成することにより、自律拍動する心筋細胞に分化する。分化した心筋細胞は、種々の解析により、真の心筋細胞と類似した性質を持つことが示されている。このように、ES細胞とiPS細胞は、無限に増殖することが可能であり、比

較的容易に、しかも高率に心筋細胞に分化させることが可能である点、移植の候補として有力ではあるが、その分化効率は高いと言っても、1%以下であり、他の細胞は何の細胞に分化しているのか、または未分化な細胞が混入しているのか、不明である。

もう一つの方法は、体内で心臓内の幹細胞を増殖、遊走、分化させ、心臓を再生させようとするものである。心臓内には、Sca-1, c-kit, isl-1, SP 細胞など複数の幹細胞の存在が知られている。しかもそれらの細胞は、心臓の傷害時に、そこに遊走し、心筋細胞や内皮細胞に分化していることもわかつてき。つまり僅かではあるが、ほ乳類の心臓においても、再生が起こっているのである。しかしその程度が余りにも少ないためにほとんどその効果をみることができない。そこで心筋細胞の分化を促進する因子を同定しようと考えた。種々の細胞と ES 細胞を共培養し、ES 細胞が心筋細胞に分化する細胞として、OP9 細胞を同定した。次に OP9 細胞の培養上清を ES 細胞に添加したところ、ES 細胞は高率に心筋細胞に分化した。そこでシグナルシーケンストラップ法ならびに DNA chip 法にて、OP9 の分泌する因子を網羅的に解析し、ES 細胞に発現させた。すると IGFBP-4 という分子を入れたところ、ES 細胞は心筋細胞に分化し、逆に IGFBP-4 の中和抗体をいれたところ、OP9 培養上清による心筋細胞分化促進効果は消失した。IGFBP-4 はアフリカツメガエルの胎仔において、肝臓に発現し、心臓の発生に必須な役割を果たしていた。IGFBP-4 が心筋細胞分化を促進する分子機序をふくめて、紹介する。

参考文献

- Sano M et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007;446:444-8
Zhu W et al. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 2008;454:345-9

YIA候補者演題

心虚血再灌流後の機能障害とノルエピネフリン過剰放出における外因性ビッグエンドセリン-1の影響

○田和正志^{1,2}、福本大起²、大喜多守²、安屋敷和秀¹、岡村富夫¹、
松村靖夫²

¹滋賀医大・薬理、²大阪薬大・病態分子薬理

【背景・目的】エンドセリン-1 (ET-1)、ノルエピネフリン (NE) 並びに一酸化窒素 (NO) などの血管作動性物質は心臓の虚血再灌流障害に関与することが知られている。以前当研究室では、心虚血再灌流時において内因性の ET-1 が ET_A 受容体/ Na^+ - H^+ 交換体系を介して NE 放出に促進的に作用し、再灌流後の心機能を悪化させることを明らかにした。本研究では、心虚血再灌流時の交感神経系と ET-1 との関係についてさらに詳しく調べる目的で、ET-1 の前駆体である big ET-1 を用いて検討を行った。

【方法】SD 系雄性ラットから心臓を摘出し、心灌流標本を Langendorff 法に準じて作製した。安定放置後、虚血処置として灌流を 40 分間停止し、再灌流を 30 分間実施した群を対照群とし、虚血開始 15 分前から再灌流開始後 5 分間にかけて big ET-1 を灌流した群を big ET-1 処置群とした。また、各併用薬は big ET-1 処置の 15 分前からあらかじめ前灌流し、その影響を観察した。

【結果】対照群では、心虚血再灌流により最大左心室圧、左心室圧一次微分値の低下並びに左心室拡張末期圧の上昇が観察された。また、再灌流後の灌流液中 NE 量は著しく増大した。big ET-1 処置は灌流液中の ET-1 量を著明に増大したにもかかわらず、対照群でみられた虚血再灌流後の心機能低下を改善し、NE 放出も有意に抑制した。big ET-1 を灌流することにより再灌流後の灌流液量が顕著に増大していたことから、big ET-1 処置により NO 産生が亢進する可能性が考えられた。そこで、再灌流後の灌流液中に含まれる NO_x 量を測定した結果、big ET-1 処置群では対照群と比較して NO_x 放出量が有意に増大していた。なお、big ET-1 によるこれらの作用は、エンドセリン変換酵素阻害薬 SM-19712、 ET_B 受容体拮抗薬 A-192621、NO 合成酵素 (NOS) 阻害薬 N^G-nitro-L-arginine 並びに NOS1 阻害薬 N^ω-propyl-L-arginine をそれぞれ前処置することにより消失した。

【結語】心虚血再灌流時において、外因的に加えた big ET-1 は ET-1 へと変換されるが、この ET-1 は ET_B 受容体 / NOS1 経路を活性化することにより NO を放出させ、その結果 NE 放出が抑制され再灌流後の心機能が改善することが判明した。

Cardiac troponin T(TNNT2)ノックダウンによるゼブラフィッシュ心不全モデルの作製と心機能評価

○梅本紀子¹、臧 黎清²、島田康人^{1, 3, 4}、西村有平^{1, 3, 4}、
西村訓弘²、田中利男^{1, 3, 4}

¹三重大院・医・薬理ゲノミクス、²トランスレーショナル医科学、

³三重大・生命科学研究支援セ・バイオインフォマティクス、

⁴三重大・VBLメディカルケモゲノミクス

現在、世界の心不全患者は約2,300万人に上り、米国では約500万人、わが国においても約160万人と推定され、心不全を含む心疾患は死因の第2位を占めている。そして人口高齢化やリスクファクターの増加により、心不全患者数は今後大幅に増加することが予想されている。心不全の標準的薬物治療法は急性・早期患者に奏効し、生存率の向上につながっている。しかしながら、長期的にみると、重症心不全へ進行する場合も少なくない。従って、様々な心不全モデル動物の作製や心機能評価法の開発は、効果的な治療法を探索する上で極めて重要である。

Troponin T type 2 (TNNT2) は心臓特異的な遺伝子であり、家族性拡張型心筋症および肥大型心筋症における原因遺伝子のひとつである。近年、糖尿病や肥満においてTNNT2の発現量が変動することが報告されている。また、糖尿病や肥満において冠動脈の異常を伴わない心不全病態が報告されており、TNNT2の発現変動との関連が示唆されている。

本研究では、ゼブラフィッシュに対してMorpholino antisense oligo (MO) を用いたTNNT2のノックダウンを行った。その際TNNT2・MOと蛍光色素によりラベル化したControl MOを混合して受精卵へ注入した。そこでゼブラフィッシュ体内の蛍光量を測定することにより、TNNT2発現量と心臓における表現型との関係を解析した。これまでの報告のように過剰量のTNNT2・MOを注入すると、心停止や房室弁形成不全など、形態変化が著しい心不全病態を示した。一方、私たちは心機能解析に適したTNNT2の発現抑制により、房室弁形成不全による血液の逆流がない心不全モデルを構築した。そこでこの心不全モデルに対して心機能を解析する目的で、蛍光 *In vivo* イメージングによる新しい心機能評価法を開発した。具体的には、心筋を染色せず、血漿および細胞外液を染色する性質をもつ蛍光色素を応用し、心室内腔を可視化した。その動画解析により心室内径を測定し、収縮末期および拡張末期容積、一回拍出量、%Fractional shortening (%FS)、Ejection fraction (EF)などを算出した。この方法により、TNNT2の発現低下に伴う心不全モデルにおける定量的心機能評価を行った。

ゼブラフィッシュは、薬物介入や遺伝子介入が容易であり、発生分化が速く、ハイスクロープットスクリーニングが可能なモデル動物のひとつである。本研究で作製したゼブラフィッシュ心不全モデルおよび心機能評価法は、心不全の治療に有効となる新しい薬物のスクリーニングや、TNNT2発現低下に伴う心不全の病態解明において有用であると考えられる。

薬物誘発性QT延長症候群の性差におけるエストロゲンの影響のメカニズム

○黒川洵子¹、浅山真秀子¹、玉川正次²、中谷晴昭²、古川哲史¹

¹東京医歯大・難研・生体情報薬理、²千葉大院・医・薬理

心電図QT間隔延長を伴う薬物誘発性QT延長症候群はhERG電流の抑制を主な原因とし、薬物クラスに依らず発症するため予測が難しく、医薬品開発におけるQT延長リスク問題として緊急な解決が望まれている。致死性不整脈の発症頻度は女性で多いことが知られ、男性に対して2倍以上の報告がある。臨床においてエストロゲンがQT延長リスクを増悪することは示唆されてきたが、心筋イオンチャネルの転写調節を介したゲノム作用の研究からは詳しい機序は明らかにならなかった。そこで、本研究ではモルモット心筋活動電位と心筋イオンチャネルに対する17 β -estradiol(E2)の急性作用と、hERGブロッカーの作用へのE2の影響をパッチクランプ法により検討した。

モルモット心室筋細胞において、生理的濃度範囲よりも高濃度のE2(100nM)は有意に活動電位幅(APD₉₀)を10分以内に短縮し、非ゲノム経路を介して外向き整流性K⁺電流(I_{Ks})を増大しL型Ca²⁺電流を抑制した。一方、生理的濃度範囲のE2(<1 nM)は有意にAPD₉₀を延長し、外向き整流性K⁺電流(I_{Kr})を受容体非依存的に20~30%程度抑制した(K_d値:1.3 nM)。このE2による受容体非依存的なI_{Kr}抑制は、エストロゲン受容体を持たないヒトI_{Kr}(hERG)過剰発現株HEK293細胞においても再現できたことから、E2存在下、非存在下における各種hERGブロッカーのhERGに対する作用をHEK293細胞で検討した。選択性の高いhERG抑制薬剤であるE-4031によるhERG抑制作用は、1 nM E2を添加することにより有意に増強した。さらに、モルモット摘出心臓標本にて、E-4031によるQT延長がE2添加により増強することも示した。一方、QuinidineやMoxifloxacinのhERG抑制作用には、E2が影響しなかった。

以上の結果から、女性の薬剤起因性不整脈リスクが高い要因の一つとして、一部のhERG抑制薬剤の薬剤感受性がE2により増強する可能性が示唆された。本研究の結果は、エストロゲンによる薬剤感受性増強の新たな機序として、より臨床予測性の高い医薬品開発に役立つことが期待される。

DCMモデルマウスにおける心筋イオンチャネル発現の経時的变化と突然死の関係

○鈴木 剛¹、中里祐二¹、村山 尚²、櫻井 隆²、森本幸生³、
呉林なごみ²
順天堂大・医・¹循環器内科、²薬理、³九州大院・医・臨床薬理

背景および目的:拡張型心筋症(Dilated cardiomyopathy:DCM)は進行性の左室拡大と収縮不全から心不全を呈する疾患で、死因として心不全死や不整脈死が多い。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210番目のリジン残基を欠損させたノックインマウスを作製した。このホモ変異マウス(△K210)は生後4週ではほとんどが生存しているが、生後8~10週になると約50%が死亡し、死因の多くは不整脈による突然死と考えられた。これまでに我々は生後8~10週の△K210の左室壁および心室中隔が高頻度の自動能を示し、活動電位持続時間(APD)には有意な延長が見られる事を報告した。今回は、このマウスの不整脈発生と突然死の原因を明らかにするために4週齢と8~10週齢の△K210心筋の性質の違いについて更なる検討を行った。

方法:野生型(WT)および△K210の心臓を左室・右室・心室中隔に分けて切り出し、張力測定によって自発的収縮の頻度を測定した。また、心筋に膜電位指示薬またはCa²⁺指示薬を負荷し、膜電位およびCa²⁺シグナルを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。さらに、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、不整脈発生に関係する可能性のあるイオンチャネルおよび関連蛋白の mRNA 発現量について検討した。

結果:生後4週齢の△K210左室心筋ではWTと比較し、自動能のわずかな亢進が見られたが、8週齢ではその数倍に亢進していた。また、APDは生後4週齢時において△K210の方がWTに比べて約1.4倍延長していたが、8週齢では更に顕著(約2倍)となつた。活動電位形成に寄与すると考えられる各種イオンチャネルについて mRNA 発現量を比較すると、△K210では4週齢で Kv4.2 が WT と比べて明らかに低く、Kv1.4は増加していた。また、Cav3.1は4週齢・8週齢共に△K210において増加していた。一方、Kv1.5やKir3.1は4週齢では有意差がなかったが、8週齢になると△K210で有意に減少していた。

結語:生後4週齢の△K210では、Kv4.2やCav3.1の変化が APD 延長や静止膜電位の不安定化の一因である事が示唆された。また Kir3.1 や Kv1.5 の遺伝子発現量は加齢に伴い減少に転じ、上記の変化を更に強める方向に働くと考えられた。こうした電位依存性カリウムチャネルや内向き整流性カリウムチャネル、T型カルシウムチャネル等複数のイオンチャネル発現量の経時的变化が△K210ホモマウスの不整脈の悪化や突然死に関与していると考えられた。

Monocrotaline誘発肺高血圧症ラットの右心室dystrophin-related glycoprotein複合体の含量変化

○大長卓也、大聖頼子、小島秀、高野幸織、手島悠吾、
丸ノ内徹郎、高木教夫、竹尾聰、田野中浩一
東京薬大・薬・分子細胞病態薬理

【目的】 Dystrophin-related glycoprotein (DRGP) 複合体は細胞骨格と細胞外マトリックスとを連関させる細胞接着分子の1つで,dystrophin,sarcoglycan (SG) および dystroglycan (DG) などから構成されている.筋ジストロフィー症での先天的欠損だけでなく,ラット心筋梗塞後不全心でも DRGP 構成タンパク質の減少が明らかにされ,その減少に calpain の関与が示唆された.しかしながら,右心室不全心での DRGP 含量および calpain の関与は不明である.そこで本研究では monocrotaline (MCT) 誘発右心室不全ラットの右心室 DRGP 含量および calpain 活性の変化について検討した.

【方法】 ラットに MCT を皮下投与し (MCT 群), 投与後 2,4,6 および 8 週目に心エコーでの右心室機能測定,Western blotting による DRGP 含量測定および casein zymography で calpain 活性の評価を行った.なお,対照群には MCT の代わりに生理食塩水を投与した (control 群).

【結果】 MCT 群の右心室重量は対応する control 群と比較して 4 週目から増加し,右心室機能は 6 週目以降で低下した.MCT 群の右心室 α -SG 含量は 4,6 および 8 週目にそれぞれ対応する control 群の 75%,46% および 37% に, β -DG 含量は 65%,29% および 15% まで減少した.一方,MCT 群の右心室 β -SG 含量は 6 および 8 週目に対応する control 群の約 40% に減少し, γ -SG 含量は 8 週目に対応する control 群の 64% まで減少した.これら複合体減少への calpain の関与について検討したところ,MCT 群の右心室筋での calpain 含量増加およびその活性上昇が 4 週目から観察された.さらに,これら DRGP 複合体の減少と右心室機能の関係について検討したところ, α -SG, β -SG および β -DG 含量減少は右心室機能低下に相関することが認められた.

【考察】 β -DG は細胞質側の dystrophin と細胞外マトリックス側のタンパク質を直接連結する膜貫通タンパク質である.この右心室筋での β -DG の減少が DRGP 複合体の障害を誘発し,右心室肥大から右心室不全へ進展させる可能性が示された.本研究は,MCT 誘発肺高血圧症ラットの右心室機能低下と DRGP 含量減少の関連性を示し,DRGP の分解に calpain が一部寄与することを示唆した.

モルモット肺静脈心筋における自発的電気活動の発生機序：
選択的Na⁺/Ca²⁺交換機構阻害薬SEA0400を用いた検討

○行方衣由紀、恒岡弥生、杉本貴彦、竹田 潔、島田英朗、
高原 章、田中 光
東邦大・薬・薬物

【背景と目的】肺静脈の起始部には心房筋から連続する心筋細胞の層が存在する。心房細動の引き金となる心房性期外収縮の約90%が肺静脈起源であると報告されたこともあり、肺静脈心筋がいかなる性質を有するのか注目されている。そこで本研究では、モルモット摘出肺静脈組織標本に微小電極法を適用し、肺静脈心筋の活動電位波形を記録・解析した。また、肺静脈心筋でしばしば観測された自発電気活動の発生機序を明らかにするために、NCXの選択的阻害薬SEA0400およびryanodine等を適用し、肺静脈自動能におけるNa⁺/Ca²⁺交換機構(NCX)の関与を薬理学的に検討した。

【結果と考察】Masson-trichrome染色および平滑筋型 α アクチン(α -SMA)抗体染色によって、モルモット肺静脈には内膜に平滑筋層、中膜に心筋層が存在していることが確認された。定頻度刺激(1Hz)下での肺静脈心筋の活動電位は左心房筋標本に比べ、静止膜電位(最大拡張期電位)が浅く、amplitudeが小さいものであった。ほぼすべての標本で第4相で緩徐な脱分極が観測され、その傾きはSEA0400により抑制された。肺静脈起始部から2mmまでをproximal、2~4mmをmiddle、4~6mmをdistalとし、各部位の活動電位波形を比較すると、起始部から遠い部位ほど静止膜電位が浅く、amplitudeが小さい傾向が認められた。また、血管径が細いdistal以遠では刺激電極の位置に関わらず活動電位が発生しなかった。

モルモット摘出肺静脈の約15%に自発活動が観察され、上下左右4本の肺静脈のうち、左上の発生率が比較的高値であった。自発活動を有する肺静脈にSEA0400(1 μM)を処置すると、自発活動の頻度が徐々に低下し、最終的には自発活動の消失が見られた(6例中6例)。また、ryanodineによっても同様に自発活動の頻度の減少と停止が見られた(6例中5例)。自発活動を示さない肺静脈標本にouabain(1 μM)を処置すると15例中13例(86.7%)で自発活動の出現が認められた。SEA0400(1,10 μM)は濃度依存的にそれぞれ15例中7例(46.7%)、11例中2例(18.2%)までouabain誘発性自発活動の出現を抑制した。また、ryanodineはouabain誘発性自発活動の発生を完全に抑制した(7例)。一方モルモット心房筋では、1 μMのouabainは自発活動を誘発しなかった。

【結論】モルモット肺静脈心筋は心房筋とは異なる活動電位波形を有し、自発活動を発生しやすい傾向があることが判明した。また、筋小胞体から放出されたCa²⁺がNCXのforward modeを活性化して緩徐な脱分極に寄与していること、筋小胞体のCa²⁺負荷量の増加によりこの機序が顕在化し、自発活動につながることが示唆された。

フローサイトメーターを用いた脂肪酸受容体のリガンド受容体直接相互作用の解析

○原 貴史、平澤 明、Sun Qi、井坪千怜、定金恵子、辻本豪三
京都大院・薬・ゲノム創薬科学

【目的】G タンパク質共役型受容体(G protein coupled receptor; GPCR)は、細胞内外の様々な刺激に応答するシグナル伝達機構の重要な役割を担い、各種循環器疾患の創薬ターゲットとしても非常に重要である。近年、我々を含むいくつかの研究グループにより、遊離脂肪酸をリガンドとする受容体が明らかとされ、その生理機能と各種代謝疾患との関連が注目されている。脂肪酸受容体についてはこれまでin vitro、in vivo の両面からその生理機能に関する研究が行われているが、特異的なプローブや有用な実験系が確立されていないためリガンドと受容体との直接相互作用に関する解析は未だ行われていない。そこで本研究では、脂肪酸受容体のうちGPR40について、蛍光標識脂肪酸プローブ及びGPR40-bead 複合体を用いた、フローサイトメーターによる新たな直接相互作用解析系の確立を試みた、またこれまでGPR40を活性化することが報告されている化合物について結合実験レベルでの検討を行った。

【方法】大量発現が期待される昆虫細胞発現系を用いて、受容体のN末端にFLAG タグを結合させたヒトGPR40タンパク質の発現系を構築した。GPR40発現細胞を可溶化し、抗FLAG 抗体及びprotein G magnet beads を用いて免疫沈降を行い、GPR40タンパク質を bead 上に固定化した。この複合体に対して、各脂肪酸の蛍光プローブを添加し、受容体に結合したプローブからの蛍光をフローサイトメーターを用いて検出した。また、Doxycyclin 誘導型GPR40発現細胞株を構築し、各化合物刺激によるERK の活性化を評価するとともに、内因性にGPR40を発現するマウスインスリノーマ(MIN6)細胞を用いて、細胞内Ca²⁺ 濃度を測定し、各化合物のGPR40に対する生理学的な作用を検討した。

【結果】アルキル鎖長の異なる脂肪酸蛍光アナログについてGPR40-bead 複合体に対する相互作用をそれぞれ評価し、アルキル鎖長と結合能についての関係を明らかとした。また、これまでGPR40を活性化することが報告されている化合物について、蛍光プローブとの結合阻害実験を行い、その結合能を系統的に評価した。さらにERK活性化および細胞内Ca²⁺ 濃度についても検討を行い結合能との相関を確認した。

【まとめ】本研究ではGPR40についてリガンドとの相互作用を結合実験レベルで初めて証明することに成功した。また今回確立した実験系は、脂肪酸受容体を始めとした親和性の低い受容体に対する相互作用の解析を可能とし、特異的な蛍光プローブの探索やリガンドスクリーニング系としての応用が期待できる。

Y08

エイコサペンタエン酸慢性投与は2型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮由来因子のバランス異常を改善する

○ 松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄

星葉大・医薬研・機能形態

【目的】長鎖n-3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)は、心血管障害の発症・進展の抑止に有用であることが近年示唆されている。一方、我々は、2型糖尿病ラット(OLETFラット)腸間膜動脈において内皮由来因子のバランス変化[内皮由来過分極因子(EDHF)の減弱及び収縮因子(EDCF)の増大] (Matsumoto et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H1480-H1490, 2007) が生じていること、また、メトフォルミンを慢性投与することによりこれらが是正されること(第17回日本循環薬理学会; Matsumoto et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 295:H1165-H1176, 2008)を報告している。そこで、今回は、これらの内皮機能障害がEPA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】**46~50週齢の対照LETOラット、OLETFラット及びOLETFラットに対して4週間EPA(100, 300 mg/kg)を投与した群(EPA100, EPA300)において、腸間膜動脈における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、アラキドン酸による収縮反応、およびACh刺激におけるプロスタノイド産生、胸部大動脈におけるERK活性、NF κ -B活性について検討を行った。**【結果】**LETO群と比較し、OLETF群にて、体重・血圧・血糖値・コレステロール値・トリグリセリド値の増加が認められた。EPA300群において、これらの値に変化は認められなかったが、HDL値は有意に増加していた。腸間膜動脈においては、ACh弛緩反応は、LETO群と比較して、OLETF群にて減弱が認められたが、EPA300群において、LETO群レベルにまで弛緩反応の改善が認められた。AChによるNO依存性弛緩反応、EDHF様弛緩反応は、LETO群と比較して、OLETF群で減弱が認められたが、EPA300群では、これらの異常が有意に改善した。また、ACh誘発COX依存性収縮反応、EDCF依存性収縮反応、アラキドン酸誘発収縮反応はいずれもOLETF群で増加したが、EPA300群で有意な低下が認められた。ACh刺激によるTXA₂、PGE₂産生はOLETF群で増加したが、EPA300群で有意な低下が認められた。胸部大動脈によるリン酸化ERK2並びに、NF κ B活性はOLETF群で増加傾向にあったが、EPA300群で有意な低下が認められた。**【考察】**本研究によって、EPAは、糖尿病状態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。EPAは、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NOやEDHF様弛緩反応の改善に繋がったと考えられる。EPAがこれらを改善する機序は、完全に明らかではないが、ERKやNF κ B活性の抑制がこれらの改善に関与している可能性が示唆された。

Y09

心血管受容体作動性Ca²⁺チャネルTRPC6とその負の制御因子PKGとの相互作用の検討

○本田 啓、菅 忠、海 琳、高橋眞一、井上隆司

福岡大・医・生理

TRPC6蛋白質は、transient receptor potential (TRP) チャネルスーパーファミリーに属する受容体作動性Ca²⁺流入チャネルである。最近の研究から、この蛋白質は、心血管系の種々の生理機能やその破綻による病態に密接に関与していることが明らかとなってきた。TRPC6チャネルの活性化過程には、ジアシルグリセロールやCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼによるリン酸化が重要な役割を果たしている。しかし、その活性を抑制する負の制御機構についてはほとんど知られていなかった。近年、我々のグループは、TRPC6の活性がNO/sGC/cGMP/PKGパスウェイを介し、PKGによるT69のリン酸化を介して抑制されることを明らかにした (Takahashi et. al, J. Physiol. 2008, 586: 4209-4223)。そこで今回は、我々はもう一つのcGMP/PKG活性化経路であるANP/pGC/cGMP/PKGパスウェイが同様のTRPC6の負の制御を行っているか否かについて検討し、更にyeast two-hybrid systemを用いてTRPC6とPKGの相互作用を起こす機序の分子的基盤について探索を行った。

TRPC6を強制発現したHEK293細胞にANP(100 μM)を作用させたところ、NOの作用よりも緩徐に進行する強い抑制が観察された。この抑制もPKGによるT69のリン酸化を介していることが、TRPC6変異体などを用いた実験から強く示唆された。一方、TRPC6のN末端側410アミノ酸をbaitとしてPKGI αとの相互作用をyeast two-hybrid systemを用いて観察したところ、TRPC6のアミノ酸残基1-410とPKGI αとの間には物理的な相互作用があることが示唆された。

L-NAME 慢性投与ラットにおける臓器障害に及ぼす nifedipine 代謝物の影響

○石澤啓介¹、福原弥生¹、Narantungalag Dorjsuren¹、堀ノ内裕也¹、恒石鉄兵¹、山口邦久¹、富田修平¹、土屋浩一郎²、玉置俊晃¹
徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研・¹薬理、²医薬品機能解析

【背景・目的】

Nifedipine はカルシウム拮抗薬として広く使用されており、臓器保護作用を有することが知られている。しかし nifedipine による臓器保護作用は、降圧作用のみでは説明できず、その機序に関しては不明な点が残っている。今回我々は nifedipine の還元代謝物である nitrosonifedipine に注目し、検討を行った。Nitrosonifedipine は Ca チャネル阻害作用を示さないが、脂質膜由来ラジカルに対して強い消去活性を持つことが示唆されている。我々はすでに、nitrosonifedipine が培養正常ヒト腎系球体血管内皮細胞において酸化ストレスによる細胞障害を抑制することを確認している。本研究では、L-NAME 慢性投与により作製した高血圧モデルラットを用いて、nitrosonifedipine 投与による臓器保護作用の検討を行った。

【方法】

SD 系雄性ラットを、コントロール群、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME (30-40 mg/rat/day) 慢性投与群、L-NAME + nitrosonifedipine (5 mg/kg/day) 投与群、L-NAME + nitrosonifedipine (30 mg/kg/day) 投与群に分けて、3 週間各薬物投与を行い、各種パラメーターの比較検討を行った。

【結果・考察】

L-NAME 慢性投与は有意な血圧上昇作用を示した。Nitrosonifedipine は L-NAME 慢性投与による血圧上昇を抑制しなかった。摘出大動脈標本において、nitrosonifedipine は L-NAME 慢性投与によるアセチルコリン誘発血管弛緩反応の低下を改善した。L-NAME 慢性投与により、大動脈における ICAM-1 発現の増加が認められたが、nitrosonifedipine 投与はそれを抑制した。Nitrosonifedipine は L-NAME 慢性投与による血清クレアチニン値の上昇を抑制した。また nitrosonifedipine は、L-NAME 慢性投与によるクレアチニンクリアランスの低下を抑制した。さらに nitrosonifedipine は、L-NAME 慢性投与による蛋白尿排泄量の増加を抑制した。以上の結果より、nitrosonifedipine は L-NAME 慢性投与ラットにおける血管障害および腎障害を改善する可能性が示唆された。

Y11

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系を介した血管
インスリン抵抗性と動脈硬化の分子メカニズムの解明

○人見浩史、中野大介、西山 成
香川大・医・薬理

【目的】大規模臨床研究では、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)の抑制が循環の糖代謝に影響を与えるに、糖尿病に伴う動脈硬化や糖尿病の新規発症を抑制することが報告されており、RAASがインスリン抵抗性に深く関与していることを示唆しているが、その分子生物学的機序は明らかとなっていない。そこで、本研究では血管平滑筋細胞におけるRAASによるインスリン抵抗性と増殖性変化について、その機序を解明することを目的とした。**【方法】**培養ラット血管平滑筋細胞を用い、インスリン受容体基質(IRS-1)蛋白発現量、Akt、MAPキナーゼのリン酸化はWestern Blot法を用いて測定した。糖の取り込み、細胞肥大、増殖については³H標識グルコース、ロイシン、チミジンを用いて評価した。細胞径は細胞係数分析装置を用いて計測した。**【成績】**アンジオテンシンII(Ang II, 100nM, 18時間)およびアルドステロン(Aldo, 10nM, 18時間)はインスリンシグナルの主要分子であるIRS-1を減少させた。この減少は、抗酸化剤やカタラーゼ過剰発現細胞で抑制された。またSrc阻害剤やアンジオテンシン受容体拮抗薬ARB、ミネラロコルチコイド受容体拮抗薬であるエプレレノンによっても抑制された。Ang IIおよびAldoはIRS-1 mRNAに影響を与えなかったが、プロテアーゼ阻害剤は、この減少を抑制した。Ang IIとAldoは、インスリンによるAktリン酸化と糖の取り込みを抑制した。Ang IIおよびAldoおよびsiRNAによるIRS-1の減少は、インスリンによるロイシンとチミジンの取り込みを増加させ、細胞径も増大させた。さらにMAPキナーゼ(JNK, p38MAPキナーゼ)のリン酸化も増加させた。これらはARBやエプレレノンで抑制された。**【結論】**Ang IIおよびAldoは血管平滑筋細胞において酸化ストレスを介してIRS-1を分解し、糖代謝を減弱化させ、インスリンシグナルを糖代謝から細胞増殖や肥大のシグナルにシフトした。RAASは酸化ストレスを介して血管インスリン抵抗性を惹起し、動脈硬化を引き起こす可能性が示唆された。

Hsc70 (Hsp70 ファミリー) の内皮機能における役割

○塩田正之、泉 康雄、中尾隆文、岩尾 洋

大阪市大院・医・分子病態薬理

【背景】Heat shock protein (Hsp) は分子シャペロンとしての機能の他に熱や活性酸素に対する生体防御系であるストレスタンパク質としての機能を有する。近年、Hsp ファミリーの一つである Hsp70 ファミリーが動脈硬化病巣で発現亢進していることが報告されている。そこで Hsp70 ファミリーの中でもストレスによって発現誘導されない Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) の内皮機能への関与を検討した。

【方法】(1) 血管内皮増殖因子(VEGF: 10 ng/ml) が誘導するヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の遊走能 (Trans well assay) および血管新生能 (tube formation assay) に対して、Hsp70 阻害薬 KNK437 (100 μ M) および Hsc70 siRNA の効果について検討した。また、eNOS リン酸化、Akt のリン酸化 (ウエスタンプロット法) に対する効果についても評価した。

(2) C57BL/6J マウスの左大腿動脈を摘出して下肢虚血モデルを作成した。手術日より KNK437 (50 μ g/g/日) あるいは DMSO (コントロール) を毎日腹腔内投与し、虚血後の血流回復をレーザードッplerにて測定し、健常側に対する虚血側の血流比を算出した。また、下肢虚血作成 5 日目の大腿内転筋 (虚血部位) に対して抗 CD31 抗体にて免疫染色を行い、血管密度を測定した。さらに、KNK437 投与後に下肢虚血モデルを作成し、大腿部の Akt リン酸化に対する効果を検討した。

【結果】(1) KNK437 は VEGF が誘導する細胞の遊走、tube formation を有意に抑制した。また、KNK437 は Akt リン酸化、eNOS リン酸化を抑制していることが明らかとなった。さらに、HUVECs を用いて Hsc70 に対する siRNA を施行したところ、KNK437 と同様に VEGF が誘導する細胞遊走、tube formation、eNOS リン酸化を有意に抑制し、Akt および Akt の下流分子の活性も抑制した。(2) 下肢虚血モデルにおいて、虚血 5 日目の血流比はコントロール群に比べ、KNK437 投与群で 45% にまで抑制された。同様に、KNK437 は血管密度も有意に低下させた。下肢虚血作成 1 時間後、虚血側の大腿内転筋での Akt リン酸化は健常側に比して著明に増加しており、KNK437 はこのリン酸化を完全に遮断した。

【結論】Hsp70 ファミリーの中でも特に Hsc70 は Akt の活性を制御することで内皮機能を制御し、血管新生に重要な役割を演じていることが明らかになった。

Y13

C-reactive protein (CRP) は酸化LDL 受容体LOX-1と協調して
補体系活性化を引き起こす

○藤田佳子、垣野明美、山口三郎、沢村達也

国立循環器病センター研・脈管生理

【目的】 CRP は臨床で最も一般的な炎症マーカーとして使われている急性期応答反応タンパクであるが、近年、虚血性心疾患の予測因子、急性冠症候群のマーカーとしても注目されている。さらに、CRP が心血管機能を悪化させる生理活性を持つことが示唆されその作用機序についての議論が高まっている。本研究では、酸化LDL 受容体LOX-1が、循環器疾患におけるCRP の生理活性発現にどのようにかかわっているかを検討した。

【方法、結果】

(1) LOX-1がCRP に結合することを、テトラサイクリン誘導型LOX-1発現細胞を用いて証明した。LOX-1発現誘導した細胞へのAlexa546標識CRP(0.3, 1, 3, 10 μ g/ml) の結合を確認した。また、ELISA プレートにLOX-1蛋白を固相化し、CRP(1, 3, 10, 30 μ g/ml) のLOX-1への結合を anti-CRP 抗体で検出し、CRP と LOX-1が直接結合していることを無細胞の系で確認した。

(2) 生体内でのCRP の反応を見るため、LOX-1発現が顕著に亢進しているSHR-SP および対照のWKY ラットにCRP を皮内注射し、静注したエバンスブルーの漏出により血管透過性の評価を行った。SHR-SP ではWKY と比較し、CRP による強い血管透過性の亢進が見られ、それは抗LOX-1抗体の投与によって抑制された。さらに、CRP によって惹起される白血球浸潤、補体活性化を、CRP 注射部位の皮膚組織の免疫組織化学にて解析した。白血球はミエロペロキシダーゼに対する抗体、補体活性化はC3d に対する抗体を用いた検出した。CRP は白血球の浸潤、補体活性化を局所で引き起こし、それらは抗LOX-1抗体によって抑制されることが確認された。

(3) 次にCRP のLOX-1を介した補体活性化のメカニズムについてin vitro で解析を行った。C1q 欠損血清を用いる事により、CRP はLOX-1存在下でC1q 依存的に補体系を活性化することが明らかになった。CRP とC1q が相互作用することは報告されており、LOX-1、CRP、C1q の3者が複合体を形成し補体系を活性化している可能性が示唆された。

【考察】 虚血性心疾患危険因子である酸化LDL の受容体として見出されたLOX-1が、やはり独立した危険因子であるCRP の生理活性発現に強くかかわっていることが明らかとなった。これらの危険因子の共通の作用点としてLOX-1が虚血性心疾患で本質的な役割を果たしていることが示唆されるとともに、疫学研究のエビデンスを病態生理のメカニズム解明に生かすことができた。

新規エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) 結合蛋白質Jab1による
ET_AR レベルの調節

○西本 新、魯 凌云、西屋 祐、堀之内孝広、三輪聰一
北海道大院・医・細胞薬理

【背景】エンドセリン -1 (ET-1) は、強力な血管収縮性ペプチドであり、主に血管平滑筋細胞や心筋細胞の細胞膜表面に存在するET 受容体 (ETR) を介してシグナルを伝達している。生理条件下では、ETR の発現量、ET-1の分泌量は厳密に制御され、ET-1からのシグナルがETR を介して適切に細胞内へ伝達されていると考えられているが、それらの制御異常は種々の疾患と深く関わっている。実際、ETR の過剰発現およびET-1の過剰分泌によるET 系の過剰なシグナル伝達は、心不全、動脈硬化症などの病態の発症・進展において重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、ET-1およびETR レベルの制御機構は、明らかになっていない。近年のETR 変異体を用いた知見から、ETR のC-tail に結合する蛋白質によってETR レベルが制御されている可能性が示唆されており、我々はETR レベルの制御機構に着目することとした。

【目的】ET_AR の C-tail に結合する蛋白質を単離・同定し、ET_AR レベルの制御機構を解明する。

【方法・結果】ベイトとしてET_AR C-tail を用いた酵母ツーハイブリッド法により、成人ヒト心臓cDNA library のスクリーニングを行った。その結果、ET_AR C-tail 結合蛋白質としてJab1 (Jun activation domain-binding protein 1) を同定した。ET_AR C-tail とJab1の結合はGST pull-down により、full length ET_AR とJab1の結合は免疫沈降法により確認した。また、細胞膜上でET_AR とJab1が共局在していた。ET_AR レベルは、Jab1過剰発現により低下し、ノックダウンにより増加した。ET_AR レベルの変化に応じてET-1誘発性のERK リン酸化レベルは、Jab1過剰発現により減少し、ノックダウンにより増加した。シクロヘキシミド(蛋白質合成酵素阻害剤)処理後のET_AR 減少速度(分解速度)は、Jab1過剰発現により亢進した。リソソーム、プロテアソームの蛋白質分解酵素阻害剤であるクロロキン、MG-132処理によりET_AR の蓄積を認め、非刺激時におけるET_AR の分解はリソソームとプロテアソームの両方で行われていることが示された。Jab1過剰発現下では、クロロキン誘発性のET_AR の蓄積は増加したが、MG-132誘発性の蓄積は変化しなかったことから、リソソームでのET_AR の分解のみが亢進していることが示された。また、蛋白質分解に関わる翻訳後修飾として知られるユビキチン化を検討したところ、ET_AR は恒常にユビキチン化を受けていたが、Jab1過剰発現によってさらにET_AR のユビキチン化が亢進した。

【考察】Jab1はET_AR のユビキチン化を促進し、リソソームでのET_AR の分解を亢進してET_AR レベルを調節し、その結果、ET-1による細胞内シグナル伝達系を調節していると考えられた。今後、心不全や動脈硬化などの心血管系病変の発症・進展におけるJab1の病態的意義を検討する予定である。

血管平滑筋の増殖性変化におけるPDGF-BB, endothelin-1の
相乗効果：器官培養法を用いた検討

○貴田大樹、中馬絃子、村田幸久、山脇英之、松本重子、

堀 正敏、尾崎 博

東京大院・農学生命科学・獣医薬理

【背景】高脂血症、高血圧や糖尿病などに伴う動脈硬化症では血管平滑筋の増殖性変化を伴う狭窄、すなわち血管のリモデリングが観察される。これまでこの過程に関わる数々の因子やそれらの相互作用について、培養平滑筋細胞を用いて多くの研究がなされてきたが、器官培養法を用いて検討を行っているものはほとんどない。本研究では器官培養法を用いて、増殖因子PDGF-BBと血管収縮性ペプチドendothelin-1が血管平滑筋の収縮および形態に与える影響を検討し、これらが相乗的に血管平滑筋の増殖性変化を惹起することを見出した。

【方法】8週齢のSDラットから尾動脈を無菌的に摘出し、リング状標本を作製した。内皮細胞を除去したこれらの血管標本を各薬物の入った培養液中で4日間培養した後、HE染色、BrdU抗体による免疫染色、収縮張力測定、Western blotting解析を行った。

【結果】まず血管形態に対するendothelin-1(300 nM)とPDGF-BB(100 ng/ml)の効果を検討した。これらを単独で4日間処置した血管標本と無処置の対照標本との間に形態学的相違は観察されなかった。その一方、これらを同時処置した標本では平滑筋細胞の走行が乱れ、核が丸く膨大し、中膜の肥厚と内腔の狭窄が見られた。また、免疫染色においてendothelin-1とPDGF-BBを同時処置した標本ではBrdU陽性の細胞核数が有意に増加し、平滑筋細胞の増殖が認められた。続いて血管収縮張力の変化を検討した結果、endothelin-1またはPDGF-BBの単独処置は高濃度K⁺(15-65 mM)およびnorepinephrine(0.1 nM-10 μM)による収縮張力の有意な変化を起こさなかったのに対し、これらの同時処置は収縮張力を有意に低下させた。さらにWestern blotによりERK1/2とp38MAPKの活性化の変化を検討した。その結果、endothelin-1またはPDGF-BBを単独で処置した標本と無処置の対照標本との間ではこれらのMAPKのリン酸化に有意な差がなかったのに対し、同時処置した標本ではERK1/2のリン酸化のみ、有意な上昇が認められた。

【考察】器官培養法を用いた検討の結果、endothelin-1とPDGF-BBはそれぞれ単独では顕著な作用を示さなかったが、同時処置により相乗的に作用し、血管平滑筋細胞の増殖性変化、またそれに伴う血管リモデリングと収縮力低下を引き起こすことが示された。また、これにはERK1/2の活性化が関与していることが示唆された。

ドミナントネガティブ RyR3の血管平滑筋における発現と機能

○加藤大樹¹、山村寿男¹、大矢 進¹、竹島 浩²、今泉祐治¹¹名古屋市大院・薬・細胞分子薬効解析、²京都大院・薬・生体分子認識

平滑筋において細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位である筋小胞体膜上のリアノジン受容体(RyR)を介した Ca^{2+} 放出は、興奮時のみならず、静止時においても自発的な Ca^{2+} 放出(Ca^{2+} spark)として生じることが知られている。 Ca^{2+} spark は近傍細胞膜上の Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル(K_{Ca})を活性化し、自発一過性外向き電流(STOCs)を生じ、静止膜電位や筋張力の調整に寄与している。3種の RyR サブタイプのうち平滑筋においては RyR2 及び RyR3 が発現しており、興奮収縮連関における Ca^{2+} 誘発 Ca^{2+} 遊離(CICR)機構は主に RyR2 が担うと考えられている。RyR3 は各サブタイプの中で最も Ca^{2+} 感受性が低く、RyR2 と4量体を形成することで Ca^{2+} 遊離チャネルとしての活性を下げるという報告がある。一方、RyR3 が RyR2 あるいは RyR1 を介した Ca^{2+} 遊離で活性化されるため CICR 機構を増幅するという報告もあり、その生理機能はまだ不明な点が多い。さらに平滑筋ではドミナントネガティブ RyR3 異性体の発現が知られており、様相は複雑である。本研究では、3型リアノジン受容体同型接合型遺伝子欠損マウス(RyR3^{-/-})を用いて胸部大動脈における RyR3 の静止膜電位への寄与を検討した。

mRNA 発現量は RT-PCR 法及び Real-time PCR 法を用いて測定した。RyR の機能を検討するため Ca^{2+} 蛍光指示薬に fura2/AM 用い、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を Argus/HiSCa で測定した。STOCs、 K_{Ca} 電流及び電位依存性 Ca^{2+} チャネル(VDCC)電流は Whole-cell パッチクランプ法を用いて測定した。

RyR1 及び RyR2 や Ca^{2+} チャネル(Cav1.2) など各種細胞内 Ca^{2+} 濃度制御に関わるタンパクの mRNA 発現量を検討したところ、RyR3^{-/-}において野生型マウス(RyR3^{+/+})に比べて有意な差は認められなかった。RyR3^{+/+} の胸部大動脈において RyR3 は大部分がドミナントネガティブ体として存在していた。RyR 活性化薬である caffeine 刺激による Ca^{2+} 遊離反応では RyR3^{-/-}において感受性が有意に亢進していた。また K_{Ca} 及び VDCC 電流密度は両群間で有意な差は認められなかつたが、STOCs では RyR3^{-/-}において frequency が 2.8 倍、約積分値が 1.8 倍に増大していた。

以上の結果より、RyR3^{-/-}において各種細胞内 Ca^{2+} 濃度制御に関わるタンパクの mRNA 発現量や K_{Ca} 及び VDCC のチャネル自体の機能は変化していないものの、おそらく野生型においては RyR2 と4量体を組むドミナントネガティブ RyR3 により、 Ca^{2+} 遊離チャネルとしての機能が一部抑制されており、RyR3^{-/-}ではその抑制がないため、自発的 Ca^{2+} 遊離機構が亢進し STOCs の増大が観察されたと考えられる。従つて胸部大動脈においてドミナントネガティブ体が主な RyR3 は RyR2 に対して抑制的に働いており、間接的に静止膜電位に影響を及ぼす事が示唆された。

ラット *in vivo* におけるホスホジエステラーゼ 4 阻害薬の網膜血管拡張効果

○三輪朋代、森 麻美、坂本謙司、中原 努、石井邦雄
北里大・薬・分子薬理

【背景及び目的】眼循環障害は、正常眼圧緑内障、糖尿病網膜症等の網膜疾患の発症・進行と深く関わっているが、眼循環調節機構については、十分に明らかにされていない。我々は眼循環調節機構の解明及び眼循環改善薬の探索を目的として研究を進め、cAMP の産生を刺激する血管拡張性プロスタノイドやフォルスコリンの静脈内投与が、網膜血管径と眼底血流量（網膜血流量 + 脈絡膜血流量）を増加させることを報告してきた。本研究では、ラット *in vivo* において、選択的に cAMP の分解を抑制するホスホジエステラーゼ 4 阻害薬の網膜血管径と眼底血流量に及ぼす影響について検討した。

【方法】 Wistar 系雄性ラットをペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) により麻酔した後、自律神経反射と眼球運動を抑制するために、人工呼吸下、テトロドトキシン (50 μg/kg, i.v.) を投与した。テトロドトキシン処置により低下した血圧をメトキサミン (10-15 μg/kg/min, i.v.) により正常レベルにまで回復させて実験を行った。網膜血管径は、独自に構築したデジタル眼底像撮影システムにより取得した画像から、画像解析ソフトを用いて算出した。眼底血流量はレーザードップラー血流計を用いて測定した。

【結果】 ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬であるロリプラム (0.01-10 μg/kg/min, i.v.) 及び Ro-20-1724 (0.01-10 μg/kg/min, i.v.) は、有意に網膜血管径を増大させたが、眼底血流量、血圧及び心拍数には影響を及ぼさなかった。非選択的ホスホジエステラーゼ阻害薬であるテオフィリン (0.1-10 mg/kg/min, i.v.) も、網膜血管径を有意に増大させ、眼底血流量には影響を与えたかったが、ロリプラムや Ro-20-1724 とは異なり、著しい血圧低下及び心拍数上昇反応を引き起こした。

【考察】 本研究により、ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬は、ラット *in vivo* において網膜血管を拡張させることが初めて明らかになった。ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬が、眼底血流量や全身血圧に影響を及ぼさなかったことから、脈絡膜血管や末梢血管よりも網膜血管に対してより強い拡張作用を示すことが示唆された。従って、ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬は全身循環に対する影響の少ない、網膜循環改善薬の候補物質となり得るものと考えられた。

ヒト冠状動脈内皮細胞の高血糖によるアポトーシス誘導には デスレセプター高発現が関与する

○影山俊一郎¹、松田直之²、影山夏子³、山本誠士¹、高野健一¹、
福岡順也⁴、横尾宏毅¹、服部裕一¹

¹富山大院・医・分子医科薬理、²京都大院・医・初期診療救急医学、

³富山大・和漢医薬総合研・消化管生理、

⁴富山大附属病院・病理

【はじめに】高血糖状態では網膜、腎臓、神経、そして血管内皮細胞が障害されることが知られており、それが糖尿病の合併症や動脈硬化の進展に寄与する可能性が指摘されている。アポトーシスには、ミトコンドリアを介して誘導される内因系経路のほかに、Fas や TNF-R1 受容体などの Death 受容体ファミリーを介する外因系経路が存在する。本研究では、高濃度グルコース暴露による血管内皮細胞のアポトーシスと Death 受容体の関連について、培養ヒト冠状動脈内皮細胞(HCAECs)と糖尿病動物モデルを用いて検討した。

【方法と結果】EGM-2 培地で D- グルコース濃度を 100 mg/dL から 200 mg/dL, 300 mg/dL と設定した 24 時間後に、DNA fragmentation assay と TUNEL assay で HCAECs のアポトーシスを評価すると、マンニトール負荷の対照に比べ、D- グルコース濃度の増加とともにアポトーシスが有意に検出された。血管内皮細胞における Death 受容体ファミリーの発現を RT-PCR 法で評価した結果、D- グルコース濃度 300 mg/dL での 24 時間の高血糖刺激で TNF-R1 と Fas の mRNA が有意に上昇したが、DR4 と DR5 は高血糖刺激による発現誘導を受けなかった。この高濃度 D- グルコースによる TNF-R1 発現誘導は、タンパクレベルでも mRNA レベルに付随して上昇することがフローサイトメトリー法で確認された。一方、HCAECs における D- グルコースと TNF- α によるアポトーシス誘導の効力を比較した結果、D- グルコース(300 mg/dL)によるアポトーシス誘導のレベルは TNF- α (5 ng/mL) とほぼ同等だったが、TNF-R1 や Fas の発現に関しては TNF- α が D- グルコースに比べて有意に強かった。TNF-R1 中和抗体により TNF-R1 シグナルを遮断すると、高濃度 D- グルコースによる HCAECs のアポトーシス誘導が有意に抑制された。最後に、ストレプトゾトシンによる糖尿病マウスを作成し、抗 TNF-R1 抗体を用いた免疫組織染色像で摘出心筋の TNF-R1 発現を評価した結果、糖尿病マウスの冠状動脈の血管内皮においても、TNF-R1 の発現が正常マウスに比較して有意に増加していた。

【考察】高血糖状態では、TNF-R1 と Fas の高発現に伴い、アポトーシスの外因性経路を介したアポトーシスシグナルが亢進すると考えられる。しかし、HCAECs における D- グルコースと TNF- α の効力を比較した結果からは、アポトーシスの誘導の程度に差が認められないものの、TNF-R1 や Fas の発現誘導に関しては TNF- α の効力が有意に強かった。高濃度 D- グルコースによる HCAECs のアポトーシス誘導作用は、TNF-R1 と Fas の発現上昇以外の機序も関与していると考えられる。また、TNF-R1 や Fas の血管内皮細胞における発現は、TNF- α により正のフィードバックを受けると考えられる。

【結論】高濃度 D- グルコースは、血管内皮細胞で転写を高める TNF-R1 や Fas の発現の上昇を介して、血管内皮細胞にアポトーシス誘導する。糖尿病マウスの冠状動脈血管内皮細胞にも、TNF-R1 の発現が高まることが確認された。

一般演題

A01

Protease-activated receptor (PAR) を介した血管内皮細胞内
カルシウム応答に対するブラジキニン受容体拮抗薬の作用

○竹内和彦、渡邊裕司

浜松医大・臨床薬理

【目的】 PAR(1-4) は血管内皮細胞に存在し炎症や組織損傷時の血管病態生理に重要な役割を演じている。ブラジキニンも同様の血管病態生理に深く関与していることは古くから知られているが、血管内皮におけるブラジキニンとPARとの相互作用については充分に検討されていない。本研究では、PARアゴニストとしてのセリンプロテアーゼ(プラスミン、トロンビン、カリクレイン)刺激による血管内皮細胞内Ca²⁺濃度の変化を観察し、セリンプロテアーゼ誘発性Ca²⁺応答に対するブラジキニンおよびブラジキニン受容体拮抗薬の効果を検討した。

【方法】 対象としてブタ大動脈初代培養血管内皮細胞を用いた。細胞内Ca²⁺濃度はfura-2蛍光色素法により測定した。

【結果】 1) プラスミン(0.15-15 μg/ml)、トロンビン(0.1-1000unit/ml)、カリクレイン(0.01-1.0unit/ml)は、細胞内Ca²⁺濃度を用量依存的に増加させた。

2) プラスミン(15 μg/ml)、トロンビン(1000unit/ml)、カリクレイン(1.0unit/ml)刺激後溶液を洗い出し再度同じアゴニストで刺激しても細胞内Ca²⁺濃度の上昇は観察されなかった。

3) ブラジキニン(0.1-10nM)の先行投与はセリンプロテアーゼ誘発性細胞内Ca²⁺濃度上昇を用量依存的に抑制したが、セリンプロテアーゼの先行投与はブラジキニン誘発性細胞内Ca²⁺濃度上昇に影響しなかった。

4) ブラジキニン(10nM)の先行投与はセリンプロテアーゼ誘発性Ca²⁺応答を完全に抑制、その後溶液を洗い出し再度セリンプロテアーゼで刺激しても細胞内Ca²⁺濃度の上昇は観察されなかった。

5) ブラジキニン(10nM)刺激後溶液を洗い出しセリンプロテアーゼで刺激すると細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された。

6) セリンプロテアーゼ誘発性Ca²⁺応答に対するブラジキニンの抑制効果においてG蛋白-PLC-イノシトール三磷酸経路の関与を検討するために、サブスタンスPがブラジキニンと同様の効果を有するかを検討した。サブスタンスP(100 μM)は、NK1受容体を介して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させたが、セリンプロテアーゼ誘発性細胞内Ca²⁺応答に対する抑制効果を示さなかった。

7) ペプチド性ブラジキニン受容体拮抗薬HOE140(0.01-1 μM)および非ペプチド性ブラジキニン受容体拮抗薬FR172357(0.01-1nM)の先行投与は、セリンプロテアーゼ誘発性Ca²⁺応答を濃度依存的に抑制した。

【考察】 ブラジキニンは、PARペプチド鎖切断からPLC活性間のシグナル伝達に作用してセリンプロテアーゼ誘発性細胞内Ca²⁺応答を制御していることが示唆された。さらにペプチド性および非ペプチド性ブラジキニン受容体拮抗薬が非選択性PAR阻害作用を有している可能性が示された。

エンドセリン A 型受容体により誘発される持続性 Ca^{2+} 流入の分子機構

○堀之内孝広¹、西屋 穎¹、西本 新¹、森島 繁²、村松郁延²、三輪聰一¹

¹北海道大院・医・細胞薬理、²福井大・医・薬理

エンドセリン受容体やアンギオテンシン受容体などのGタンパク質共役型受容体(GPCR)を介して引き起こされる持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)上昇反応は、心血管リモデリングの発症・進展に深く関与していることが知られている。本研究では、エンドセリン A 型受容体(ET_{AR})を介した持続性 Ca^{2+} 流入の分子メカニズムを明らかにするため、ET_{AR}を強制発現させたCHO細胞から、持続性 Ca^{2+} 流入を伴うクローンと伴わないクローンを単離し、これらのクローンにおけるET_{AR}シグナリングを Ca^{2+} 測定実験、Cytosensor™ microphysiometerを用いた酸排出速度測定実験及びWestern blot法によるp38MAPKのリン酸化量測定実験により、詳細に解析した。

まず、限界希釈法により、ET_{AR}発現量が異なる2種類のクローン(高発現: 32,000 fmol/mg protein (ET_{AR}-H) 及び低発現: 900 fmol/mg protein (ET_{AR}-L))を得た。

ET_{AR}-Hにおいて、ET-1は、一過性及び持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応を引き起こした。一方、ET_{AR}-Lの場合、ET-1刺激により、ET_{AR}-Hと同レベルの一過性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が生じたものの、持続的な Ca^{2+} 流入は認められなかった。このことは、ET-1刺激によって引き起こされる持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に、 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} 枯渇によって活性化されるストア作動性 Ca^{2+} チャネルよりもむしろ、TRPCチャネルといった受容体作動性カチオンチャネルが関与していることを示唆している。そこで、受容体作動性カチオンチャネルを介した持続性 Ca^{2+} 流入に必須なシグナルカスケードの同定を行った。ET_{AR}-Hにおいて活性化されるシグナル分子を解析したところ、(1) Gq → PLC → Na^+/H^+ exchanger(NHE)、及び、(2) G₁₂ → p38MAPK → NHE、という2種類のシグナルカスケードやTRPCチャネルの活性化が、持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応に必須であることが示された。そして、(2)の機構の活性化レベルは、時間依存的に増大することが明らかになった。一方、ET_{AR}-Lの場合、Gq → PLC → p38MAPK → NHEという経路が活性化されるため、持続的な Ca^{2+} 流入が生じないと考えられた。

以上の知見は、細胞膜における受容体の発現レベルが、ET_{AR}を介した Ca^{2+} シグナリングに多様性をもたらすことを示しているだけではなく、GPCRの発現量が、心血管リモデリングの発症・進展に関与する重要な要素となりうる可能性を示唆している。

V1b バゾプレッシン受容体ノックアウトによる血圧上昇機構の解明

○輿水崇鏡¹、奈佐吉久²、田上昭人³、及川 玲⁴、土屋裕義¹、竹尾 聰⁴、辻本豪三⁵

¹自治医大・医・分子薬理、²日本薬大・医療薬・機能形態・病態生理、³国立成育医療センター研・薬剤治療、⁴東京薬大・分子細胞病態薬理、⁵京都大院・薬・ゲノム創薬科学

【背景】下垂体後葉ホルモンであるバゾプレッシン(AVP)は、血管平滑筋に分布するV1a受容体を介し強力な昇圧反応を惹起することがよく知られるが、V1b受容体サブタイプが血圧調節に関わる機序はこれまで未解明である。V1b受容体は下垂体前葉に発現し活性化によってcorticotropinの分泌を促す。しかし、V1b受容体遺伝子転写物は心臓、肺、腎臓、副腎、中枢、胸腺など循環器系を含む体内にも広く分布する。

【目的】本研究ではV1bノックアウトマウス($V_{1b}^{-/-}$)の安静時血行動態を解析し、この受容体サブタイプの血圧調節への寄与を明らかにする。

【方法】 $V_{1b}^{-/-}$ はコンベンショナルな方法により作出了した。覚醒安静時の循環動態は、尾動脈血圧測定及び頸動脈内カテーテル挿入による観血的血圧測定により評価した。血圧調節に関わる血中液性因子の濃度を8-20週齢雄 $V_{1b}^{-/-}$ とコントロールマウス($V_{1b}^{+/+}$)について比較した。抵抗血管の薬物反応性は摘出腸間膜動脈の灌流圧を指標に評価した。

【結果】 $V_{1b}^{-/-}$ は産仔数や生後の発達に異常ないものの、8週齢では有意に低体重を示した。安静覚醒時血圧は収縮期血圧が $V_{1b}^{-/-}$ で有意に高く、観血的血圧測定で $V_{1b}^{+/+}$ が147 mmHg、 $V_{1b}^{-/-}$ が172 mmHg ($p < 0.03$)であった。拡張期血圧には差が見られなかつた。さらに、血圧測定中の心拍数は $V_{1b}^{-/-}$ で有為に高値であった($V_{1b}^{+/+}$ vs $V_{1b}^{-/-}$, 553 vs 634 bpm, $p < 0.01$)。心電図モニターでは $V_{1b}^{-/-}$ は洞性頻脈であった。心臓超音波検査では $V_{1b}^{-/-}$ で左室収縮率の上昇と収縮期心内径の低値が観察され、体重あたりの心重量は $V_{1b}^{-/-}$ で有意に低下していた。静脈内投与したAVPとphenylephrineに対し $V_{1b}^{+/+}$ 、 $V_{1b}^{-/-}$ 共に用量依存性に昇圧反応を示し差は見られなかつた。血管の薬物反応性では、 $V_{1b}^{-/-}$ の摘出腸間膜動脈でphenylephrineに対する灌流圧上昇が有意に亢進していた。血中液性因子の解析では血中総トリヨードサイロニン濃度が $V_{1b}^{-/-}$ で有意に上昇していた。

【考察】 $V_{1b}^{-/-}$ は下垂体-副腎系の障害により安静時のみならずストレス時にも糖質コルチコイドホルモンの分泌反応が低下している。さらに $V_{1b}^{-/-}$ では副腎髓質からのカテコラミン分泌反応も障害され、低体重となつてゐる。これら血圧の低下傾向を来す要因を複数持つにも関わらず、 $V_{1b}^{-/-}$ の収縮期血圧は高値を示した。 $V_{1b}^{-/-}$ では甲状腺機能が亢進していることが示唆され、本研究の成果はV1b受容体の新たな血圧調節機能を明らかにする重要な知見と考えられた。

A04

LPA 刺激が血管平滑筋細胞に誘導する組織因子発現と活性酸素を介したシグナル伝達機構

○伊豫田拓也、岩本隆宏

福岡大・医・薬理

【目的】

Lysophosphatidic Acid (LPA) は oxLDL を構成する分子の1つであり、粥状動脈硬化プラーク領域への集積が報告されている。一方で凝血因子の1つである Tissue Factor (TF) も動脈硬化プラークにおける高発現が認められており、プラーク破綻に伴う血栓症において重要な役割を負っていると考えられている。これまでに LPA が血管平滑筋細胞に作用し、Egr-1 発現を介して TF の発現を誘導することが報告されているが、凝血応答を通じて活性化される血小板も LPA ソースの1つであることから、LPA によってエンドレスな凝血サイクルが回転し、これが動脈硬化病態の進行と密接に関係している可能性がある。そこで LPA が Egr-1 発現を誘導するシグナル伝達経路に着目し、その詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法】

初代培養のラット大動脈血管平滑筋細胞を $25 \mu M$ の LPA で刺激し、シグナル伝達分子の活性化や活性酸素 (ROS) 産生について検討した。

【結果】

血管平滑筋細胞において LPA による刺激は、主要な MAPK として挙げられる ERK、JNK、p38 の全てリン酸化を誘導した。また LPA による刺激は、血管平滑筋細胞内の ROS レベルの上昇も引き起こしたが、この応答は ERK 阻害剤で完全に阻害されたことから、MEK-ERK シグナルによる ROS 産生制御系の存在が示唆された。この時 NADPH oxidase 阻害剤を含む種々の抗酸化剤は、上記結果と矛盾なく ERK の活性化を阻害しなかったが、JNK の活性化を抑制した。また ERK 及び JNK 各々に対する特異的な阻害剤は、共に Egr-1 及び TF の発現を抑制した。以上の結果より ERK によって産生制御される ROS を介した JNK の活性化により、TF の発現が制御されていると考えられた。一般的に NADPH oxidase による ROS 産生制御は PKC による制御を受けることから、続けて今回の実験系における PKC 分子の関与について検討した。LPA は RASMC においても一部 PKC ファミリー分子の活性化を誘導しており、その後の種々の PKC 阻害剤やドミナントネガティブ体を用いた検討から、PKC δ が、ERK の上流に位置し、TF 発現につながるシグナル伝達経路を制御していることが示唆された。

【考察】

TF の発現は LPA のみならず、LDL や oxLDL、AngII など他の動脈硬化危険因子によっても発現誘導が起こるが、スタートとなる刺激因子が何であれ、シグナルが TF-LPA シグナル伝達回路に集約され、病態を進行させている可能性がある。ERK-NADPH oxidase 間、そして ROS-JNK 間を取り持つ機構については今後の課題の1つであるが、これらを含むこのサイクルの詳細についての解明が、広範囲に効果を發揮する治療法・創薬の礎となる可能性があると考える。

A05

第Ⅲ群抗不整脈薬による hERG 電流量の増強作用機構の解析

○稻野辺厚、古谷和春、倉智嘉久

大阪大院・医・薬理

第Ⅲ群抗不整脈薬として現在臨床利用されている nifekalant は、心臓活動電位再分極相を担う I_{Kr} のポア構成分子 hERG の電流量を抑制するとともに、深い膜電位で電流量を増加させる(Hosaka et al., Channels 1, 198-208, 2007)。後者の現象は脱分極刺激によって惹起され、facilitation と呼ばれる。Facilitation は hERG 電流の活性化曲線が左方にシフトすることにより起こる。我々はこの facilitation の機構をさらに明らかにするために、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた hERG に対する種々の薬物(amiodarone, quinidine, carvedilol, dofetilid)の効果を検討した。Facilitation 効果の程度は、amiodarone≈nifekalant>quinidine≈carvedilol 順であった。dofetilide は電流量をまったく増加させなかった。各薬物存在下に、強い脱分極電位パルスを与えると最大電流量は変化せず、活性化曲線が左方へシフトした。そのシフトの程度は化合物の濃度によらず一定であった。即ち、ある濃度の薬物作用下の hERG チャネル電流は、コントロールの電位依存性をもつ hERG 電流成分と facilitation の特性を持つ電流成分の和で表現された。薬物による block および facilitation に関するアミノ酸は hERG の central cavity 内に分布する。従って、これら 2 つの薬理作用は 2 つの異なる化合物 -hERG 相互作用に由来し、しかも block と facilitation という 2 種類の化合物 -hERG 相互作用は遷移しないと推定された。

A06

AT₁受容体刺激によるI_{Ks}の修飾とKCNQ1のinternalizationの分子機序

○大倉正道¹、岡崎 雅¹、野呂田郁夫¹、山崎良彦²、
石井邦明¹

¹山形大・医・循環薬理、²神経機能統御

【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す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。我々は以前 AngII受容体1型(AT₁R)の刺激がI_{Ks}を二相性(初期の増大と後期の減少)に修飾し、KCNQ1を細胞内へ陷入(internalization)させること、またこの作用においてKCNQ1のC末端が関与することを報告した。本研究ではその分子機序を明らかにする。

【方法】 AT₁R、KCNQ1及び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}の修飾とKCNQ1のinternalizationにおけるKCNQ1のC末端内責任部位を検討するために、KCNQ1のC末端に存在する5箇所のPKC リン酸化モチーフを全て破壊した変異体(PKC5A)、PYモチーフを破壊した変異体(LA/PA)、及びYxxΦモチーフを破壊した変異体(ΦA)を作製した。アフリカツメガエル卵母細胞あるいはHEK293細胞に、野生型あるいは変異体のKCNQ1とKCNE1およびAT₁Rを共発現させ、I_{Ks}に対するAT₁R刺激の影響を電気生理学的に検討した。一方、緑色蛍光蛋白(GFP)で標識した野生型あるいは変異体のKCNQ1をAT₁Rと共に発現させた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標識体の局在変化を観察した。

【結果・考察】 LA/PA変異体のI_{Ks}は、野生型KCNQ1の場合と同様にAT₁R刺激により減少した。PKC5A及びΦA変異体では、同様の刺激によるI_{Ks}の減少が見られなかった。一方野生型KCNQ1及び各変異体のGFP標識体はいずれも細胞膜に発現したものの、LA/PA変異体が野生型KCNQ1の場合と同様にAT₁R刺激によるinternalizationを示したのに対し、PKC5A及びΦA変異体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刺激によるKCNQ1のinternalizationにおけるKCNQ1のC末端内責任部位は、5箇所の内のいずれかのPKC リン酸化モチーフ及びYxxΦモチーフである可能性が示唆された。

モルモット心室筋細胞における新規Na/Ca交換体抑制薬 YM-244769の作用

○渡邊泰秀¹、山下寛奈¹、木村純子²、岩本隆宏³

¹浜松医大・医・健康科学、²福島医大・医・薬理、³福岡大・医・薬理

【背景】今までに、選択的Na/Ca交換体(NCX)阻害薬として、ベンジルオキシフェニル誘導体であるKB-R7943、SEA0400、SN-6が報告されている。最近、岩本、喜多によって、新規Na/Ca交換体(NCX)阻害薬であるYM-244769が報告された(Mol Pharmacol., 2006)。

【目的・方法】今回、我々は、モルモットの単離心筋細胞を用いてホールセルクランプ法によりNa/Ca交換体(NCX)電流に対するYM-244769(N-(3-aminobenzyl)-6-{4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenoxy} nicotinamide)の作用を検討した。細胞外液、細胞内液はそれぞれ調節して、ランプ波を用いてNa/Ca交換体(NCX)電流を記録した。

【結果・考察】 YM-244769は濃度依存性に両方向型NCX電流を抑制した(IC_{50} 値=外向き $0.12\ \mu M$ 、内向き $0.1\ \mu M$)。しかし、片方向型外向き電流に対する IC_{50} 値は $0.05\ \mu M$ であった。また、片方向型内向きNCX電流に対する作用は $10\ \mu M$ で約50%の抑制を示すに過ぎなかった。細胞内Na濃度が増加すると両方向型NCX電流に対する抑制作用は強くなった。ピペット内にトリプシンを投与しても、YM-244769の両方向型NCX電流に対する抑制作用は変化しなかった。YM-244769の抑制作用は、細胞内投与したトリプシンには非感受性であり、その抑制部位は細胞内側だけないことが示唆された。

YM-244769は、同じベンジルオキシフェニル誘導体のNCX抑制薬であるKB-R7943とSN-6よりも強い効力を持ち、SEA0400とほぼ同程度の効力を持つNCX抑制薬であることが示唆された。

A08

心房筋におけるL型Ca²⁺チャネル電流のサブタイプ特異的調節機構

○中瀬古寛子、伊藤雅方、水流弘通、赤羽悟美

東邦大・医・薬理

心房筋には2種類のL型Ca²⁺チャネル α_1 サブユニット、Cav1.2とCav1.3が発現している。心室筋細胞には主としてCav1.2が発現しているのに対し、洞房結節においてはCav1.3のmRNA量がCav1.2を上回ることが報告されている。さらに心房筋には β サブユニットおよび α_2/δ サブユニットについても複数のサブタイプが発現している。そこで我々は、心房筋細胞に発現するL型Ca²⁺チャネルの活性調節機構をサブタイプ特異性に注目して解析した。

BHK6細胞およびtsA201細胞にCav1.2とCav1.3を β サブユニットおよび α_2/δ サブユニットとともに発現させ、それぞれの電流キネティクスの解析を行った。全ての実験は室温で行った。

その結果Cav1.3はCav1.2に比較して電位依存性活性化及び不活性化の電位依存性が過分極方向へ-15～-20mVシフトしていた。一方Cav1.3はCav1.2に比較して電位依存性不活性化速度が遅く、不活性化しない成分がより大きく、不活性化からの回復速度が速かった。この条件下でペースメーカー活動電位の波形で電位固定を反復して行ったところ、L型Ca²⁺チャネル電流のピーク電流密度は徐々に減衰したが、Cav1.3の電流の減衰はCav1.2よりも少なく、Ca²⁺チャネル活性が高く維持されていた。Cav1.2チャネル電流は活動電位の立ち上がりからピークにおいて流れのに対し、Cav1.3チャネル電流は緩徐脱分極相と再分極相において流れていた。よってCav1.3はペースメーカー電位の頻度と活動電位幅の維持に貢献することが示唆された。さらに β サブユニットの各サブタイプ(β_{1a} 、 β_{2c} 、 β_{2a})によるCav1.2チャネル電流またはCav1.3チャネル電流に対する活性調節を比較検討した。その結果、 β サブユニットのサブタイプ特異的なL型Ca²⁺チャネル電流に対する影響が観察された。また、 β サブユニットによる活性調節の受け方もCav1.2とCav1.3で異なっていた。

よって、心房筋細胞のL型Ca²⁺チャネルの活性は各サブユニットのサブタイプ特異的な組み合わせにより精緻に調節されていることが示唆された。

A09

オキシトシンのミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネルを介する心筋保護作用

○西田洋文、稻村直樹、小倉武彦、中谷晴昭

千葉大院・医・薬理

【目的】虚血再灌流障害に対して心筋保護効果をもたらすミトコンドリア ATP 感受性 K^+ (mitoK_{ATP}) チャネルは PKC によって活性化される。妊娠出産に関わる下垂体後葉ホルモンである Oxytocin (OT) の受容体は Gq/G11 共役型でありホスホリパーゼ C を活性化する。このセカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロールが PKC を活性化することが知られており、そのことから我々は OT が mitoK_{ATP} チャネルを活性化し心筋保護効果をもたらすと仮説をたて、検討した。

【方法】ウサギ心室筋細胞のフラボプロテイン自家蛍光反応を用いて mitoK_{ATP} チャネルの活性化を評価した。また Langendorff 灌流心モデルを用いて 30 分虚血、120 分再灌流後の梗塞サイズを 1%TTC 溶液染色で測定した。

【結果】 mitoK_{ATP} チャネル開口薬 diazoxide(DIAZ) は フラボプロテイン 蛍光を 25 ± 2%まで有意に増強した(ミトコンドリア脱共役剤 2,4-dinitrophenol 投与時の蛍光強度を 100%とした)。OT (30nM) の投与によりその蛍光はさらに 40 ± 2%と有意に増強した ($p < 0.05$ vs. DIAZ)。その DIAZ と OT の蛍光増強効果は mitoK_{ATP} チャネル遮断薬、5-hydroxydecanoate (5HD) により完全に抑制された。OT (30 nM) を虚血前に 5 分間投与すると、虚血再灌流後の梗塞サイズが対照群 (67 ± 1%) に比して有意に減少した (36 ± 3%, $p < 0.05$)。OT の梗塞サイズ減少効果はミトコンドリア Ca²⁺ 活性化 K⁺ チャネル遮断薬 paxilline では抑制されなかつたが (39 ± 6%)、5HD や PKC 抑制剤 chelerythrine では抑制された (62 ± 5%, 62 ± 3%)。

【結論】これらの結果より OT は PKC 経路を活性化することで mitoK_{ATP} チャネルの開口を増強し、梗塞サイズ縮小効果をもたらすことが示唆された。