

# 抄 録 集

# 特別講演



# Nitric oxide synthases in cardiovascular signaling

Thomas Michel, MD, PhD,

Professor of Medicine and Biochemistry, Harvard Medical School, and Senior Physician  
in Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA USA

Nitric oxide (NO) synthesized by the endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS) is a key determinant of vascular homeostasis. eNOS is expressed in several cardiovascular tissues and cells, including vascular endothelium, cardiac myocytes, and blood platelets. eNOS-derived NO has well-known effects on vasorelaxation and inhibition of platelet aggregation; NO also modulates angiogenesis and endothelial cell metabolism. eNOS-dependent signaling pathways are deranged in experimental models of oxidative stress and in clinical models of diabetes, heart failure, and atherosclerosis.

The eNOS enzyme is regulated by a complex series of post-translational modifications in vascular endothelial cells, where the protein is targeted to specialized signal-transducing microdomains termed plasmalemmal caveolae. The targeting of eNOS is a fundamental determinant of NO signaling in the vascular wall. In resting endothelial cells, eNOS is robustly nitrosylated. Agonist activation of eNOS is associated with its denitrosylation and with translocation of the enzyme from peripheral to internal membranes. The re-nitrosylation of eNOS is dependent upon its re-association with plasmalemmal caveolae. Since eNOS nitrosylation inhibits enzyme activity, the blockade of eNOS denitrosylation in altered cellular redox states could lead to the attenuation of NO-dependent signaling pathways. These recent discoveries of reversible agonist-modulated eNOS S-nitrosylation have led to new insights into the regulation of NO-dependent signaling by cellular redox state. Another critical determinant of eNOS activity is phosphorylation: eNOS is phosphorylated on multiple residues by several different protein kinases. The AMP-activated protein kinase (AMPK) directly phosphorylates eNOS. AMPK is a ubiquitous protein kinase that is activated both by ADP and by specific AMPK kinases, including the calcium-calmodulin kinase kinase-beta. (CaMKK  $\beta$ ). CaMKK  $\beta$  may be activated by reactive oxygen species such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Low levels of  $H_2O_2$  play key cellular signaling roles, while higher levels of reactive oxygen species are associated with oxidative stress and vascular pathology. Our recent studies have identified a key interplay between eNOS and  $H_2O_2$  in endothelial signaling. siRNA-mediated eNOS knockdown leads to marked increases in endothelial cell-derived  $H_2O_2$ , associated with the activation of AMPK. Enhanced AMPK activation is also seen in tissues and endothelial cells isolated from eNOS knockout mice. The small GTPase Rac1 is another critical determinant of eNOS activity. Rac1 modulates the actin cytoskeleton and is a component of the NADPH oxidase complex in endothelial cells. Statins promote the activation of Rac1 both in cultured endothelial cells and in vascular preparations isolated from statin-treated mice. The role of Rac1 in eNOS activation reveals fundamental regulatory and structural relationships between plasmalemmal caveolae, the actin cytoskeleton, and the extracellular matrix. Taken together, these studies have identified interrelated signaling pathways that modulate eNOS targeting and bioactivity, and have important implications for NO-dependent signaling in vascular disease states.

## Thomas Michel, Ph.D., M.D., F.A.C.C.

Thomas Michel is Professor of Medicine and Biochemistry at Harvard Medical School, Co-Director of the Leder Program in Human Biology and Translational Medicine, and a Senior Physician in Cardiovascular Medicine at Brigham and Women's Hospital.

Michel was born and raised in Portland, Oregon, and received his undergraduate degree in Biochemical Sciences from Harvard College. He received his PhD in Biochemistry and his MD degree from Duke University, where he studied in the laboratory of Professor Robert Lefkowitz. He returned to Boston for his clinical training in medicine and cardiology at Brigham and Women's Hospital, and completed postdoctoral training at Harvard Medical School. He was then appointed to the faculty at Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital, where he has worked as an active researcher, teacher and clinician for many years.

Author of more than 130 peer-reviewed research papers in cardiovascular signal transduction, Michel has led studies on the molecular mechanisms that control the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), a key enzyme in cardiovascular homeostasis. Michel's laboratory was the first to clone and characterize eNOS more than a decade ago, and remains at the forefront of many major discoveries in this area.

Michel has garnered numerous prizes, including the John J. Abel Award in Pharmacology. He has been elected to membership in the American Society of Clinical Investigation, the American Association of Physicians, and the Association of University Cardiologists, and is a Fellow of the American College of Cardiology. Michel served as Chairman of the NIH Pharmacology Study Section, and has served on several editorial boards, including the Journal of Biological Chemistry and the Journal of Clinical Investigation.

Michel is also a cardiologist and teacher. He served for 8 years as Chief of Cardiology at the VA Boston Healthcare System. Michel was the founding Director of the Harvard Graduate Program in Human Biology and Translation Medicine, served as the first Dean for Education at Harvard Medical School, and received the Eugene Braunwald Teaching Award at Brigham and Women's Hospital. He is the author of chapters on cardiovascular pharmacology in leading textbooks, including Goodman and Gilman's *Pharmacological Basis of Therapeutics*. He continues in active teaching roles involving Harvard College undergraduates, medical students and graduate students at Harvard Medical School, as well as clinical and research trainees at Brigham and Women's Hospital.



# YIA 候補者演題

本研究では心房細胞を対象とした抗不整脈薬として有効な薬物像を探るために、ヒト心房活動電位モデルを用いて  $I_{Kr}$  阻害剤と  $I_{Kur}$  阻害剤の阻害様式がどのようにヒト心房活動電位延長作用に影響を持つかを考察した。

まず最初に特徴的な  $I_{Kr}$  阻害様式を示す3つの薬剤（ドフェチリド、キニジン、ベスナリノン）の心房活動電位延長作用の刺激頻度依存性について Courtemanche 心房活動電位モデルを用いて検討を行なった。 $I_{Kr}$  阻害下で明確な逆頻度依存性がみられないこのモデルの  $I_{Ks}$  に遅い成分を導入することで、ドフェチリドの逆頻度依存性が再現できた。この修正モデルを用いることで、他の  $I_{Kr}$  阻害剤でも検討を行なった。脱分極電位ではキニジンはベスナリノンより非常に速い  $I_{Kr}$  阻害が起こす。キニジンはドフェチリドと同様に逆頻度依存性を示したが、ベスナリノンは明確な逆頻度依存性を示さず、実験結果の逆頻度依存性と一致した。 $I_{Kr}$  阻害剤による逆頻度依存性の活動電位延長には、 $I_{Ks}$  の遅い活性化成分が重要な役割を果たしており、 $I_{Kr}$  阻害剤の活動電位延長の逆頻度依存性は  $I_{Kr}$  に対する阻害様式に大きく依存していることが明らかになった。 $I_{Kur}$  阻害特性の検討では、薬物の  $I_{Kur}$  阻害進行の速さにより活動電位延長作用に違いがでることが分かった。脱分極電位での  $I_{Kur}$  阻害進行が速いほど活動電位延長作用が強くなり電位非依存性阻害に近づいた。しかし、阻害進行が遅い場合、活動電位延長作用は非常に弱く、実験での  $I_{Kur}$  阻害効果の確認では短いテストパルスを用いることで  $I_{Kur}$  阻害進行が速い薬物を探す必要があることが分かった。さらに過分極電位での  $I_{Kur}$  阻害からの回復が遅いと  $I_{Kur}$  阻害の蓄積が起こり、活動電位延長作用は強くなることも分かった。刺激頻度が高い場合、 $I_{Kur}$  阻害から十分に回復する前に次の刺激が入るため、 $I_{Kur}$  阻害の蓄積が起こり、活動電位延長作用が強くなる刺激頻度依存性を示した。このように、活動電位延長作用は  $I_{Kur}$  阻害様式に大きく依存することが明らかになると同時に、薬物作用の検討にモデルの使用が有効であることが示された。



## A-I-2

### エンドセリン A 型受容体作動性 $\text{Ca}^{2+}$ 流入に関する TRPC チャンネルの活性化機構

○堀之内孝広, 比嘉 綱己, 朝野 拓史, 西本 新, 西屋 禎, 三輪 聡一  
北海道大学大学院 医学研究科 細胞薬理学分野

血管平滑筋に発現するエンドセリン A 型受容体 ( $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ ) が、エンドセリン-1 ( $\text{ET-1}$ ) によって活性化されると一過性及び持続性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$ ) 上昇反応が生じる。一般に、一過性の  $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$  上昇反応は小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  の遊離、一方、持続性の  $[\text{Ca}^{2+}]_\text{i}$  上昇反応は、ストア作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel: SOCC) や受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel: ROCC) を介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入によるものと考えられている。最近、SOCC や ROCC の実体分子として、電位非依存性カチオンチャンネルとして機能する 7 種類の TRPC (transient receptor potential canonical) チャンネルアイソフォーム (TRPC1-7) が単離・同定された。しかしながら、 $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  作動性  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関する TRPC の種類やその活性化機構については、不明な点が多い。そこで、本研究では、 $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとして機能する TRPC アイソフォームの同定ならびにその活性化機構について検討した。

まず、ROCC を介した受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  流入のみを評価するため、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害薬である thapsigargin を用いて SOCC を活性化させた条件下、 $\text{ET-1}$  による受容体刺激を行った。その結果、 $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  と GFP 融合 TRPC を共発現する HEK293 細胞において、TRPC3 及び TRPC6 が、 $\text{ET-1}$  によって惹起される受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関与していることが明らかになった。また、これらチャンネルの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化したところ、TRPC3 は主に細胞質、一方、TRPC6 は細胞膜に局在していることを見出した。

次に、阻害薬や TRPC 変異体を用いて、TRPC の活性化機構を検討したところ、 $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  刺激により惹起される TRPC3 及び TRPC6 を介した受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  流入に、 $\text{G}_{\text{q}/11}$  タンパク質、ホスホリパーゼ C、Src、PI3 キナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼ、カルモジュリン (CaM) が関与していることが明らかになった。また、TRPC の C 末端に存在する CaM/ $\text{IP}_3$  受容体結合 (CIRB) ドメインを欠損させると、TRPC3 及び TRPC6 を介した受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  流入が消失すると共に、TRPC3 及び TRPC6 の局在が細胞質及び核へと変化する事を見出した。

一般に、TRPC は、ホモもしくはヘテロ四量体を形成することによって、そのチャンネル機能を発揮すると考えられている。そこで、生細胞における  $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  作動性 TRPC の多量体形成パターンを明らかにするため、蛍光タンパク質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation; BiFC 法) を用いた可視化解析を行った。その結果、細胞質において TRPC3 のホモ多量体、細胞膜において TRPC6 のホモ多量体、そして、細胞質において TRPC3/6 のヘテロ多量体の形成を認めた。

以上の知見は、ホモ・ヘテロ多量体を形成する  $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  作動性 TRPC3/6 の活性が、上述のシグナル分子や CIRB ドメインを介して制御されていることを示唆している。

<b>A-I-3</b>	<b>HSP90 は細胞膜受容体を介して血管新生を促進する</b>
	○佐藤 優子, 藤田 佳子, 垣野 明美, 小倉彩世子, 岩元 真, 善本 亮, 沢村 達也 国立循環器病センター研究所 脈管生理部

**【目的】**

Heat shock proteins (HSPs) は、細胞内において分子シャペロンとして働くことが広く知られているが、細胞外 HSPs のシャペロカインとしての細胞機能調節作用が新たな機能として注目を集めている。これまでに血中における HSPs の存在が示され、血中量と心血管病との関連が報告されてきている。本研究では細胞外 HSPs の血管壁への作用を明らかにするため、血管内皮細胞受容体を同定し、血管機能への作用メカニズムを解明することを目的とした。

**【方法・結果】**

- (1) 細胞外 HSP の内皮細胞への取り込みを仲介する受容体 HSP receptor (HSPR) を同定した。蛍光標識 HSP70 取り込み能を指標として、ウシ内皮細胞 cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、一回膜貫通型細胞膜タンパク質をコードする遺伝子が得られた。CHO 細胞でこの因子を過剰発現させ、発現量に依存して HSP70/90 の取り込みが促進されることを確認した。
- (2) HSPR がヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 管腔形成能に重要な役割を果たすことを明らかにした。HUVEC 内因性の HSPR の発現を、RNAi および抗体を用いて抑制すると、マトリゲル上の管腔形成が著しく抑えられた。この際マトリックス中に含まれる HSP が HSPR と相互作用することを免疫沈降により明らかにした。
- (3) HSPR を血管内皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、HSPR が in vivo で血管新生を促進することを明らかにした。トランスジェニックマウス皮下にマトリゲルを埋め込み、マトリゲル内に形成される新生血管を半定量的に評価したところ、野生型の約 4 倍血管新生能が亢進していることがわかった。

**【考察】**

HSP90 は、分子シャペロンとして働くだけでなく、HSPR を介して血管内皮細胞に作用し、血管新生を促進することが明らかとなった。細胞外 HSP90 による血管新生は、VEGF とは独立したメカニズムであるため、病的血管新生の新たな治療標的としても期待できる。



nitric oxide (NO) 血管内皮細胞から常時産生され、血管緊張度調節作用を持つ重要なファクターである。本研究は NO / cGMP / protein kinase G (PKG) を介したリン酸化が受容体作動性 TRPC6 channels の活性化に及ぼす作用について、HEK293 発現系または A7r5 血管平滑筋細胞を用いて検討を行った。

TRPC 6 の活性化様式には、少なくとも受容体刺激・機械刺激・自発活性の3つのモードが知られている。TRPC6 蛋白質を発現した細胞に、ホスホリパーゼ C 共役型受容体のアゴニストであるカルバコールを投与すると、ノイズ増加を伴う非特異的陽イオン電流が活性化され ( $I_{\text{TRPC6}}$ )、この後に機械刺激を与えると、更に強い電流の増大が観察された。この受容体刺激による  $I_{\text{TRPC6}}$  活性化や機械刺激による  $I_{\text{TRPC6}}$  増大作用は、数分間の PKG 活性化物質処置 (SNAP ; 100  $\mu$  M、8Br-cGMP ; 100  $\mu$  M) によってほぼ完全に抑制された。この  $I_{\text{TRPC6}}$  抑制効果は guanylyl cyclase や PKG 阻害剤 (ODQ, KT5823, DT-3) を加えることによって消失した。A7r5 血管平滑筋細胞の TRPC6 様陽イオン電流においても同様な効果が見られた。また TRPC6 の PKG のリン酸化部位の候補の mutant を作成した結果、TRPC6-T69A において、SNAP や 8Br-cGMP による  $I_{\text{TRPC6}}$  抑制効果が消失した。更に Yeast two-hybrid assay の結果から、TRPC6 の N 末 (N1-90) と PKG1  $\alpha$  が cGMP 依存的に interaction していることが示唆された。

一方、細胞内に長時間 (20 分) 以上にわたり PKG 活性化物質 8Br-cGMP を投与すると、受容体刺激や機械刺激の非存在下においても、 $I_{\text{TRPC6}}$  様特性を示す自発性電流の再出現が観察され、この電流の出現は PKG 阻害薬 KT5823 の同時投与によって完全に抑制された。以上より、PKG による TRPC 6 チャンネル蛋白質のリン酸化は、受容体・機械刺激によるチャンネル活性化を抑制するだけでなく、自発活性モードへの転換を促進することが示唆された。

## A-I-5

### Exercise training による生理的心肥大の分子メカニズムに対する ASK1-p38 MAP キナーゼ伝達経路の関与

○谷池 正行, 山口 修, 大津 欣也  
大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学

MAP キナーゼ (MAPK) 伝達経路は心肥大や心不全の形成において重要な役割を果たしている。しかし生理的心肥大の分子メカニズムと MAPK 系の関連については不明な点が多い。我々はこれまで apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) が圧負荷や心筋梗塞モデルにおける病的な心臓リモデリングに重要な機能を担うことを報告している。今回我々は ASK1 ノックアウトマウス (ASK1<sup>-/-</sup>) を用いて生理的心肥大における ASK1-p38 シグナル伝達経路の役割について検討した。ASK1<sup>-/-</sup> と野生型マウス (WT) に対し、1日2回1回90分間のスイミングトレーニング (swimming) を4週間実施したところ、ASK1<sup>-/-</sup> は WT に比べ、心重量 / 体重比、左室拡張末期径、LV mass index の有意な増大を認めたが、間質の線維化や胎児性遺伝子発現に各群間で差は認めなかった。swimming 中に採取した WT の心筋において ASK1 の downstream target である p38 のリン酸化の増大を認めたが、ASK1<sup>-/-</sup> では認められなかった。そこで心筋特異的 p38 ノックアウトマウスに同様の swimming を実施したところ、p38 非ノックアウトマウスに比べ、ASK1<sup>-/-</sup> と同様に生理的心肥大の増大を示した。生理的心肥大の key molecule である Akt の swimming 中のリン酸化は WT に比し、ASK1<sup>-/-</sup> において有意な増加を認めた。これらの結果より、ASK1-p38 シグナル伝達経路が Akt の活性の抑制を介して生理的心肥大を制御していることが示唆された。



## A-I-6

### リアノジン受容体を介するカルシウム放出活性の経時的なスイッチング がもたらす細胞間不均一性

○中村 直俊, 山澤徳志子, 大久保洋平, 飯野 正光  
東大院・医・細胞分子薬理学教室（飯野研究室）

血管平滑筋細胞の収縮制御には、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルともに、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が重要な役割を担っている。平滑筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  ストアには、 $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルとしてリアノジン受容体とイノシトール三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) 受容体が発現しているが、我々の以前の研究により、リアノジン受容体活性を持たない  $\text{Ca}^{2+}$  ストアのコンパートメントがあることが示唆されていた。そこで、組織構造を維持した門脈平滑筋細胞層の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を共焦点顕微鏡で観察したところ、リアノジン受容体アゴニストのカフェイン投与に対して反応する細胞と反応しない細胞が存在することが明らかになった。これは、同じ組織に属する細胞であっても、個々の細胞が異なる表現型を持つことを示している。なぜこのような細胞間不均一性が生じるのかを探る過程で、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にも同様なカフェイン応答の細胞間不均一性があり、約 4 割の細胞だけでカフェイン応答が観察されることを見いだした。そこで、HEK293 細胞をモデル系として、細胞間不均一性が生じるメカニズムを解析した。限界希釈法でクローン化して遺伝的背景を揃えても、約 4 割の細胞だけがカフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$  放出を示すという表現型の分離現象は変わらず見出された。リアノジン受容体発現レベルは、細胞間で 2 群に別れるようなことはなかった。細胞間不均一性を担う細胞内過程として、細胞間のリアノジン受容体活性のわずかな差が  $\text{Ca}^{2+}$  による  $\text{Ca}^{2+}$  放出メカニズムにより増幅され、個々の細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答に閾値的な特性を与えることが考えられ、実際それを支持する結果が得られた。さらに、HEK293 細胞の長時間経時的  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行ったところ、個々の細胞が平均約 60 時間で「 $\text{Ca}^{2+}$  応答陽性」と「 $\text{Ca}^{2+}$  応答陰性」を示す状態間を遷移するスイッチ現象が明らかになった。以上の結果より、遺伝的に同一な哺乳類細胞が異なる表現型を示す現象が存在し、異なる表現型の間の経時的スイッチ現象によって細胞間不均一性がもたらされることが示された。

## A-II-1

### Pharmacological intervention for prevention of left ventricular remodeling and improving prognosis in myocardial infarction.

○石井 秀樹, 天野 哲也, 松原 達昭, 室原 豊明  
名古屋大学医学部循環器内科学 愛知学院歯学部内科学講座

急性心筋梗塞の治療は、発症早期に主に冠動脈インターベンションにより、冠動脈の再灌流を得ることが主要な戦略となっている。急性心筋梗塞に対する再灌流療法は、閉塞ないしそれに近い状態の冠動脈の flow をとることができ、梗塞心筋の縮小効果、左室リモデリングの抑制、長期的な予後改善効果が得られるようになった。しかしながら、再灌流療法自体が、新たな心筋障害を生じさせるという現象、つまり再灌流障害は、冠動脈インターベンションなどによる再灌流療法のメリットを減弱させてしまうものであり、予後を悪化させる因子として知られている。よって、その対策を講じることは極めて重要な戦略となる。従来、虚血心筋保護のメカニズムとして、本格的な心筋梗塞が発症する直前にみられるプレコンディショニングという現象が注目されてきた。また、最近では虚血再灌流後に再度心筋を虚血にさらすポストコンディショニングの概念も広がっている。虚血プレコンディショニング現象は、本格的な虚血に先行して起きる短時間の虚血が梗塞による心筋のダメージを軽減するという知見であり、一方ポストコンディショニングは、心筋梗塞後に虚血と再灌流が短時間に複数回繰り返されると、梗塞範囲の縮小効果が見られ、再灌流障害による心筋ダメージを軽減させる現象のことを言う。そして、現実的な方法として、虚血プレコンディショニング、ポストコンディショニングの概念を応用する薬理的インターベンションが実践されている。これまで、アデノシン、ニコランジル、カルペリチド、スタチン等が、薬理的に同様の効果を上げるのではないかと期待され、臨床的な研究もなされてきた。特に本邦で開発されたニコランジルは、プレコンディショニングのエンドファクターであると考えられるミトコンドリア K-ATP チャネルを直接開口させる作用と、NO donor というユニークな作用を持ち合わせており、多くの研究で虚血性心疾患症例に対して、良好な結果を及ぼすことが報告されている。我々は、急性心筋梗塞患者に対して、冠動脈インターベンション前に経静脈的に 12mg のニコランジルを単回投与することで、梗塞サイズ縮小効果、微小循環改善効果を認め、慢性期の左室リモデリングを強く抑制し、極めて強い予後改善効果を発揮することを発表した (*Circulation*. 2005; 112: 1284-1288, *Diabetes Care*. 2006; 29: 202-206)。この中で、虚血プレコンディショニング効果が薄れるとされる高血糖の患者でもニコランジルを投与すると効果があるという面白い結果を認めた。

今回の論文 (*Circulation*. 2008;118:2710-2718) は、上記の自験例を主として、急性心筋梗塞の再灌流療法に追加する薬理的インターベンションにつき、最近の治験をまとめたものである。



## A-II-2

### グレリンのミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャンネルとホスファチジルイノシトール 3 キナーゼを介する心筋保護作用

○稲村 直樹, 西田 洋文, 原田新太郎, 友野 尚弘, 花開 孝宏, 松本 明朗,  
中谷 晴昭  
千葉大学大学院医学研究院 薬理学

【目的】 成長ホルモン分泌促進物質受容体 (GHSR1a) の内因性リガンドである Ghrelin (GHR) が心筋保護効果を持つことが近年報告されているが、その作用機序の詳細は明らかとなっていない。GHSR1a は Gq/G11 共役型の GPCR であり、ホスホリパーゼ C とジアシルグリセロールを介して PKC を活性化する。虚血再灌流障害に対する心筋保護効果において重要な役割を果たすミトコンドリア ATP 感受性  $K^+$  (mitoK<sub>ATP</sub>) チャンネルは PKC によって活性化されることから、GHR が GHSR1a から PKC を介して mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルを活性化するという仮説が立てられる。また、GHR はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3-K) を活性化させることが知られているが、この PI3-K は虚血再灌流傷害に対する防御機構として注目されている RISK (reperfusion injury salvage kinase) pathway の構成要素である。これらのことから、われわれは GHR の虚血再灌流障害に対する心筋保護効果に mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルもしくは PI3-K が関与するか否かを検討した。

【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<sub>ATP</sub> チャン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】 GHR (1 nM) は単独でフラボプロテイン蛍光に対して影響を及ぼさなかったが、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル開口薬 diazoxide (DIAZ) によるフラボプロテイン蛍光増強効果 (ミトコンドリア脱共役剤 2,4-dinitrophenol 投与時の蛍光強度を 100% として  $28.5 \pm 3.4\%$ ) を  $40.6 \pm 3.3\%$  まで有意に増強した ( $p < 0.05$  vs. DIAZ)。その GHR のフラボプロテイン蛍光増強効果は mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル遮断薬、5-hydroxydecanoate (5HD、500  $\mu$ M) および GHSR1a antagonist である [D-Lys-3]-GHRP-6 (10  $\mu$ M) により完全に抑制されたものの、PI3K 阻害薬である LY294002 (5  $\mu$ M) では抑制されなかった。また、Langendorff 灌流心モデルにおける虚血再灌流傷害に対して GHR (0.3, 1, 3 nM) は再灌流時 10 分間の適用により、梗塞サイズを対照群 ( $66.9 \pm 2.2\%$ ) に比して濃度依存的に縮小させた ( $60.5 \pm 3.8\%$ ,  $52.9 \pm 3.3\%$ ,  $44.2 \pm 2.7\%$ )。そして GHR (1 nM) の梗塞サイズ縮小効果は 5HD、PKC 阻害剤 chelerythrine (1  $\mu$ M) および LY294002 で抑制された ( $69.3 \pm 4.0\%$ ,  $66.3 \pm 3.1\%$ ,  $66.6 \pm 3.3\%$ )。

【結論】 以上の結果より、GHR は GHSR1a から PKC の活性化を介する mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの開口と PI3-K の活性化の両経路を介して虚血再灌流傷害に対して心筋保護効果をもたらすことが示唆された。

## A-II-3

### 虚血性心不全に対する内皮－心筋共培養細胞シートの移植

○関根 秀一, 清水 達也, 関谷佐智子, 大和 雅之, 岡野 光夫  
東京女子医科大学先端生命医科学研究所

虚血性心疾患や拡張型心筋症にともなう重症心不全に対して、脳死患者からの心臓移植が最終的な治療法となっているが、ドナー不足が大きな問題となっている。そこで近年、新たな治療法として注目されているのが細胞を用いて欠損した組織を治療する再生医療であり、すでに骨髄由来細胞や筋芽細胞を不全心筋に移植し血管あるいは心筋を再生させることで心機能を改善させる治療法が臨床応用されている。また細胞浮遊液の注入に次ぐ次世代の治療法としてティッシュエンジニアリングによって再構築した心筋組織を移植する研究が始まっており、世界的には生分解性3次元スキャフォールドや脱細胞化組織に心筋細胞を播種し組織を再構築する方法や、心筋細胞とコラーゲンを混合して鋳型に播種し心筋組織に成型する技術が用いられている。一方、我々は細胞シート工学の技術を用い細胞シートを積層化することによりパッチ状の機能的な心筋組織を再生し、それを心筋梗塞部へ移植することで心機能が改善することを示してきた。心機能改善効果のメカニズムとして細胞シートから分泌される種々のサイトカインによる血管新生がひとつの重要な因子であることが明らかとなっている。本研究では心筋虚血部位に移植する再生心筋グラフト内へ内皮細胞を導入することで、さらに血管網新生を促進させ、より心機能改善効果を高めることができるのではないかと考え、内皮－心筋共培養細胞シートの移植を試みた。具体的には、GFP陽性新生仔ラット心室から磁気細胞分離装置（MACS）により分画したCD31陽性細胞（GFP陽性内皮細胞）とGFP陰性新生仔ラット心筋細胞を混和することにより内皮－心筋共培養細胞シートを作製した。内皮細胞は単独の培養で見られるような敷石状の形態はとらず、心筋細胞間で網目状に進展・増殖した。この内皮細胞の網目構造を維持したまま共培養細胞シートを積層化して、左冠動脈前下降枝結紮後2週間のラット心筋虚血モデルの心外膜表面に移植した。コントロール群として心筋細胞単独の積層化細胞シートの移植を行った。移植4週間後、心臓超音波検査装置により心機能解析を行ったところ、内皮－心筋共培養細胞シート移植群では心筋細胞単独シート移植群に比べ、より高い心機能改善効果を示した。実体蛍光顕微鏡観察では移植グラフトが心外膜表面へしっかりと生着し、グラフト由来GFP陽性の新生血管が宿主血管と結合していることが確認された。さらに免疫組織染色によりグラフト内の新生血管は共培養した内皮細胞と宿主由来内皮細胞の双方で再構築されることやグラフト由来内皮細胞が心筋虚血部位にも遊走し、血管壁の一部を構成することも明らかとなった。本研究の結果は血管を構成する細胞をあらかじめ細胞シート内に導入しておくことで、血管新生能力ならびに心機能改善効果の高い再生移植組織の作製が可能であることを示すものであった。



## A-II-4

### 心筋細胞の容積調節はイノシトールリン脂質によって制御される

○山本信太郎<sup>1,2</sup>, 喜多紗斗美<sup>1</sup>, 市島久仁彦<sup>2</sup>, 瀬原 嗣尚<sup>2</sup>, 岩本 隆宏<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>福岡大学医学部薬理学, <sup>2</sup>佐賀大学医学部生体構造機能

#### 【目的】

心筋細胞における細胞容積調節の破綻は心機能障害につながるため、そのメカニズムの解明は心肥大・心不全の病態の理解および新規創薬ターゲットの発掘の観点から重要である。これまで我々は心筋細胞の一過性膨張に対する調節性容積減少 (regulatory volume decrease; RVD) には、細胞容積調節性アニオンチャネル (volume-regulated anion channel; VRAC) が重要な働きをしていることを明らかにしてきた。本研究では、イノシトールリン脂質が新たな VRAC 制御因子として細胞容積調節に重要な役割を果たすことについて報告する。

#### 【方法・結果】

- 1) マウス心室筋細胞を酵素処理により急速単離し、細胞外液の低浸透圧刺激による細胞容積変化を CCD カメラを用いて画像解析した。さらにホールセルパッチクランプ法を適用して、VRAC を介するクロライド電流を記録した。
- 2) 低浸透圧刺激による VRAC の活性化は、LY294002 (PI3 キナーゼ阻害剤)、抗 PIP2 抗体および抗 PIP3 抗体の細胞内投与により抑制された。LY294002 による VRAC 抑制作用は、PIP3 の細胞内投与により消失したが、PIP2 の細胞内投与では変化しなかった。また抗 PIP2 抗体の VRAC 抑制作用も PIP3 の細胞内投与により消失したが、抗 PIP3 抗体の抑制作用は PIP2 の細胞内投与により影響されなかった。
- 3) 次に LY294002 の RVD 自体への効果を検討した。LY294002 の前投与は低浸透圧刺激による初期の容積増加に影響を及ぼさず、RVD のみを有意に抑制した。これは、LY294002 の VRAC 抑制作用に基づく効果と考えられた。
- 4) Gq 蛋白を介した PLC 活性化による PIP2 減少の影響を調べるために、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体、エンドセリン受容体、アンジオテンシン II 受容体の作動薬および PLC 刺激薬 m-3M3FBS を投与したところ、これらの薬物はいずれも RVD と VRAC 活性化を抑制した。
- 5) さらに PIP3 産生が減弱した動物モデル (I 型糖尿病モデルマウス、PIP5 キナーゼドミナントネガティブ高発現マウス) およびカベオリン 3 欠損マウスの心筋細胞で細胞容積調節機構を調べると、RVD はいずれも減弱または消失していた。

#### 【考察】

以上の結果より、イノシトールリン脂質シグナルは VRAC を介する細胞容積調節に重要な役割を果たすことが示された。PIP3 の単独投与では VRAC 活性化を誘導できないが、抗 PIP3 抗体や PIP3 産生抑制が低浸透圧刺激による VRAC 活性化を抑制したことから、PIP3 は VRAC の浸透圧センサーの主要な制御因子である可能性が考えられた。この細胞容積調節のシグナル伝達には細胞膜ミクロドメイン (カベオラ) の関与が示唆された。



## A-II-5

### 心筋梗塞後治癒過程と左室リモデリングにおける high-mobility group box 1 protein の役割

○河野 隆志<sup>1</sup>, 安齊 俊久<sup>2</sup>, 内藤広太郎<sup>2</sup>, 宮庄 拓<sup>3</sup>, 岡本 実<sup>3</sup>,  
横田 博<sup>3</sup>, 山田 晋吾<sup>4</sup>, 前川裕一郎<sup>2</sup>, 高橋寿由樹<sup>2</sup>, 吉川 勉<sup>2</sup>,  
石坂 彰利<sup>2</sup>, 小川 聡<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京歯科大学市川総合病院循環器科, <sup>2</sup>慶應義塾大学循環器内科,

<sup>3</sup>シノテスト中央研究所

心筋梗塞後左室リモデリングは心筋梗塞後の予後を決定する重要な因子であり、炎症と関連することが近年注目されている。High-mobility group box 1 protein (HMGB1) はクロマチン編成に関与する DNA 結合蛋白として初めは同定されたが、組織損傷の結果として壊死細胞より細胞外に放出されると炎症性サイトカインとしてマクロファージの活性化に関与することが明らかにされた。また活性化マクロファージからも HMGB1 は分泌されることが報告され、HMGB1 が梗塞後炎症及び左室リモデリングの key mediator となる可能性が考えられた。我々は急性心筋梗塞症例における血清 HMGB1 値測定の有用性について評価した後に、ラット心筋梗塞モデルに抗 HMGB1 中和抗体を投与し梗塞後左室リモデリングにおける HMGB1 の役割について検討した。

ST 上昇型急性心筋梗塞患者 35 例において血清 HMGB1 値を測定し（入院時、入院後 6、12、18、24、72 時間及び 7 日）、血清 HMGB1 値と C 反応性蛋白（CRP）値及び入院中合併症（ポンプ不全、心破裂、心臓死）との関連について検討した。最大 HMGB1 値は最大 CRP 値と正の相関を示し（ $p<0.01$ ）、ポンプ不全、心破裂、心臓死の合併例では非合併例と比較して有意に高値であった（ $p<0.05$ ）。

次に雄ウィスターラットを用いて左冠動脈近位部結紮による心筋梗塞モデルを作成し、梗塞部の HMGB1 mRNA 及び蛋白を定量解析し、免疫組織化学的染色を用いて HMGB1 発現の局在について検討した。さらに抗 HMGB1 中和抗体投与群（10mg/kg/ 日 連続 7 日間皮下注射）とコントロール抗体投与群に分け、炎症性サイトカイン mRNA 及びマクロファージ浸潤について定量解析し、左室機能、血行動態、左室リモデリングについても検討した。

HMGB1 の発現は梗塞後 3 日より有意に上昇し 14 日においても亢進しており（ $p<0.05$ ）、変性した心筋細胞、炎症細胞、筋線維芽細胞などに由来していた。中和抗体投与により、梗塞後 3 日の梗塞部における tumor necrosis factor- $\alpha$  及び interleukin-1 $\beta$  の発現及びマクロファージ浸潤が抑制された（ $p<0.05$ ）。しかしながら中和抗体投与群では、梗塞後 14 日目の左室拡張末期径増大、左室駆出率低下、左室収縮期最大圧増加率低下、左室拡張末期圧上昇を呈し（ $p<0.05$ ）、組織学的検討でも梗塞部瘢痕の菲薄化及び非梗塞部の肥大を認めた（ $p<0.05$ ）。従って、中和抗体による HMGB1 の抑制は梗塞後炎症を抑制したが、左室リモデリングをむしろ助長させることを明らかにした。

急性心筋梗塞症例において血清 HMGB1 値は院内合併症及び予後の有用な予測因子となる一方で、HMGB1 は左室リモデリングを規定する梗塞後炎症及び治癒過程において重要な役割を果す可能性が示唆された。

## A-II-6

### 多菌性敗血症マウスモデルでの心筋リモデリング関連分子の変化に対する pitavastatin の治療効果

○富田 賢吾<sup>1,2</sup>, 高野 健一<sup>1</sup>, 山本 誠士<sup>1</sup>, 横尾 宏毅<sup>1</sup>, 松田 直之<sup>3</sup>,  
畠山 登<sup>2</sup>, 山崎 光章<sup>2</sup>, 服部 裕一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富山大学大学院 分子医科薬理学講座, <sup>2</sup>富山大学大学院 麻酔科学講座,

<sup>3</sup>京都大学大学院 初期診療・救急医学分野

【はじめに】敗血症は手術後感染などで起こりうる病態で、種々の抗菌薬が上市されている現在においてなお死亡率が高い。その理由の一つは、敗血症が細菌感染をきっかけに全身性に炎症反応を及ぼす結果、心臓においては心筋虚血、心機能障害を引き起こすからだと考えられている。そこで本研究では、敗血症における急性期心リモデリングに着目し、心筋線維化に関する検討をおこなった。また、大規模臨床試験結果より、その投与歴が敗血症予後に正の相関を示すことが知られるスタチンを用い、敗血症に対する効果について検討した。

【方法】8-10 週齢の雄性 BALB/c マウスに CLP (cecal ligation and puncture) を施行し多菌性敗血症マウスモデルを作成し解析をおこなった。CLP マウスおよび対照マウスには手術 4 日前から脂溶性スタチンの pitavastatin 3 mg/kg/day あるいは同等量の生理食塩水の腹腔内投与をおこなった。生理食塩水投与の対照群、CLP 群および pitavastatin 投与の対照群、CLP 群の 4 群について、セボフルレン麻酔下でそれぞれの群のマウスより心臓を摘出し、リモデリングに関与する matrix metalloproteinase (MMP) ファミリーの活性、遺伝子発現、およびその関連分子について、Gelatin zymography、Western blotting、Real-time RT-PCR を用いて評価した。

【結果】線維化が形成されるときに発現するとされる MMP9 および MMP2 の活性について Gelatin zymography による解析をおこなった。CLP 群では MMP9、MMP2 の活性化が上昇したが、pitavastatin を投与した CLP 群においてはその上昇は軽度であった。また、Real-time RT-PCR の解析では、CLP 群において MMP9、TIMP1、コラーゲン type III 遺伝子の発現上昇が認められることから、心リモデリングの初期変化が進行していることが予想された。これに対し、pitavastatin 投与はこれらの遺伝子発現を減少させた。

【結語】敗血症によって引き起こされる心機能障害は、救命率を左右する大きな問題である。CLP 誘発性敗血症マウスを用いた本研究の結果から、スタチンは、敗血症時の心臓リモデリングを改善して心機能障害を軽減する可能性が示唆される。



## A-III-1

### 人工多能性幹（iPS）細胞からの心血管細胞分化誘導と応用

○榑崎 元太, 山下 潤

京都大学 再生医科学研究所 幹細胞分化制御研究領域

【背景】人工多能性幹（iPS）細胞は、分化した細胞にいくつかの転写因子を導入することで作製される胚性幹（ES）細胞様の新たな幹細胞であり、拒絶のない移植材料や病因解明の新たなツールとしての利用が期待されている。作製された iPS 細胞を医学領域へ応用するためには、特定の細胞系列への分化誘導方法が必要である。そこで、我々の確立した ES 細胞分化システムを応用することで（1）iPS 細胞から中胚葉及び心血管系細胞への誘導を試み、ES 細胞との比較を行うこと。また、（2）樹立された iPS 細胞分化誘導系を応用した創薬スクリーニングシステムの樹立を試みた。

【方法 - (1)】未分化 ES 細胞、iPS 細胞はフィーダー細胞上で維持した。分化は IV 型コラーゲン上にて分化培地を用いて 4.5 日間培養して行い、誘導された Flk1 陽性中胚葉（Flk1+）細胞を FACS により純化した。Flk1+ 細胞を VEGF 存在下に再培養することで動静脈内皮細胞を誘導した。心筋・血球・リンパ管内皮細胞は、マウス骨髄ストローマ細胞 OP9 と共培養により誘導した。各分化段階の細胞を遺伝子発現（RT-PCR）や免疫染色、電気生理学的検討等により評価した。

【方法 - (2)】iPS 細胞より誘導した Flk-1 陽性細胞をコラーゲンゲル中で培養することで、血管内皮細胞と壁細胞から構成される血管様構造が *in vitro* で誘導された。この血管新生誘導システムに、以前我々が海洋無脊椎動物ライブラリーより同定した新規 HDAC 阻害剤 Azumamide（Az）を添加しその生物作用を検討した。

【結果 - (1)】ES 細胞及び iPS 細胞は、ほぼ同様の分化動態を示した。すなわち、分化誘導 3-4 日後より Flk1 陽性細胞が出現した。Flk1 陽性細胞から、動静脈リンパ管内皮細胞、心筋細胞、血球細胞が ES 細胞と同様の方法により誘導可能であった。分化誘導による遺伝子発現変化及び Flk1 陽性率や心筋・血管内皮細胞の分化効率も ES 細胞とほぼ同等であった。

【結果 - (2)】Az は、濃度依存的に血管新生を阻害した。iPS 細胞血管形成モデルにより、Az の血管新生抑制作用を検証できた。

【結論】マウス iPS 細胞は *in vitro* での中胚葉系細胞分化に関し、ES 細胞と同等の分化能及び分化動態を示した。従って、iPS 細胞は特定の胚葉への分化に関して、ES 細胞と同等のレベルまで十分に再プログラミングされており、ES 細胞において開発・確立された分化誘導法は、iPS 細胞にも応用可能と考えられる。また、我々の樹立した iPS 細胞血管誘導システムは、新規血管作用物質のスクリーニングシステムとして、応用可能で有ることが示唆された。iPS 細胞を分化誘導及び創薬研究へ応用するための基本的研究システムの構築に成功した。



## A-III-2

### 脳内アドレナリン $\alpha 2$ 受容体を介した昇圧反応機序における視床下部室傍核 (PVN) 内神経系の関与

○岡本 和明, 坂田 貴昭, 花房 伸幸, 川崎 博巳  
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 臨床薬学

#### 【目的】

我々はこれまでに、無麻酔無拘束ラットにおいて脳室内にアドレナリン $\alpha 2$ 受容体作動薬を投与すると昇圧反応が生じる事、その昇圧反応はPentobarbital麻酔下で抑制され、降圧反応に転じることを報告してきた。また、血管運動中枢の一つである視床下部室傍核 (PVN) への $\alpha 2$ 受容体作動薬の微量投与によっても昇圧反応が惹起されることから、PVNが $\alpha 2$ 受容体作動薬投与による昇圧反応の発現部位であることを示唆してきた。一方、PVNには抑制性神経であるGABA作動性神経や興奮性神経であるグルタミン酸作動性神経など、多くの神経が密に存在し、*in vitro*の実験においてPVN内 $\alpha 2$ 受容体はGABA神経系出力を抑制的に調節していることが知られている。そこで今回、無麻酔無拘束ラットへの $\alpha 2$ 受容体作動薬の脳内投与による昇圧反応におけるPVN内GABA作動性神経、およびグルタミン酸作動性神経の関与について検討した。

#### 【実験方法】

Wistar系雄性ラットに側脳室内およびPVN内薬物投与用カニューレと腹部大動脈内に血圧測定用カニューレを慢性的に留置した。ラットを無麻酔無拘束下で脳内に $\alpha 2$ 受容体作動薬であるClonidineを投与し、血圧、心拍数変化を観察した。また、PVN内GABA作動性神経の関与を検討するため、GABA、GABA<sub>A</sub>受容体作動薬Muscimol、GABA<sub>A</sub>受容体遮断薬Bicuculine、GABA<sub>B</sub>受容体作動薬BaclofenをそれぞれPVN内前処置した時のClonidineによる血圧と心拍数変化を観察した。さらにグルタミン酸作動性神経の関与を検討するため、イオンチャネル型グルタミン酸受容体遮断薬であるKynurenic acidをPVN内前処置した際のClonidineによる血圧、心拍数変化を観察した。

#### 【結果】

Clonidineの側脳室内またはPVN内投与により、濃度依存的で持続的な昇圧反応と心拍数の減少が観察された。これらの昇圧反応はGABAのPVN前処置により有意に抑制された。またClonidine PVN内投与による昇圧反応において、Muscimol、BaclofenのPVN前処置により有意に抑制された。さらに、BicuculineのPVN前処置によっても有意に抑制された。Kynurenic acidのPVN前処置ではClonidineによる昇圧反応に影響はみられなかった。

#### 【総括】

無麻酔無拘束ラットにおいて、ClonidineのPVN内投与により生じる昇圧反応は、PVN内のGABA<sub>A</sub>受容体、およびGABA<sub>B</sub>受容体を介したGABA神経作動性抑制性神経活動が $\alpha 2$ 受容体刺激によって抑制された結果、グルタミン酸作動性神経以外の興奮性神経系の脱抑制が生じて昇圧反応が惹起される機序が示唆される。

# A-III-3

## 中枢神経発生期におけるペリサイト前駆細胞の脳微小血管網へのリクルートメント

○山本 誠士<sup>1</sup>, 村松 昌<sup>2</sup>, 大澤 毅<sup>2</sup>, 高橋 宏行<sup>3</sup>, 東 英梨月<sup>1,4</sup>,  
堂本 光子<sup>4</sup>, 高野 健一<sup>1</sup>, 生谷 尚士<sup>5</sup>, 長井 良憲<sup>5</sup>, 高津 聖志<sup>5</sup>,  
薄井 勲<sup>6</sup>, 戸邊 一之<sup>6</sup>, 新飯田俊平<sup>7</sup>, 澁谷 正史<sup>2</sup>, 松田 直之<sup>8</sup>,  
服部 裕一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富山大学大学院 分子医科薬理学講座, <sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院 分子腫瘍医学, <sup>3</sup>東京大学 保健・健康推進本部,  
<sup>4</sup>金沢工業大学 ゲノム生物工学研究所, <sup>5</sup>富山大学大学院 免疫バイオ・創薬探索研究講座, <sup>6</sup>富山大学 医学部 第一内科,  
<sup>7</sup>国立長寿医療センター研究所 遺伝子蛋白質解析室, <sup>8</sup>京都大学 医学部 初期診療・救急医学分野

【はじめに】脳微小血管は血管内皮細胞とペリサイトによって構成される。近年、ペリサイトが脳微小血管の血流をコントロールすることが報告され、脳血管における生理学的重要性が示された。また脳血管周囲のペリサイトが血液脳関門（blood-brain barrier; BBB）の機能発現に重要であるとも考えられている。一般的に、ペリサイトは血管周囲に存在する結合組織由来の間葉系（幹）細胞から発生・分化すると考えられているが、中枢神経系におけるペリサイトリクルートメントの詳細に関する検討はなされていない。

【方法】免疫組織化学的検討では、共焦点顕微鏡を用いて胎生期の脳血管発生を詳細に観察した。胎仔頭部より調整した細胞を flow cytometry 法で分画し、培養後ペリサイトマーカーで染色を行った。また、GFP マウス胚頭部より分画した細胞を用い、matrigel in vivo assay および explant culture を試み、GFP 陽性細胞の動態を観察した。さらに、macrophage 形成不全マウスを用いた免疫組織化学的検討も行った。また、macrophage 形成不全マウスと野生型マウス胎仔脳を用い、ペリサイト関連遺伝子の発現を micro array によって比較検討した。

【結果】胎生 10.5 日のマウス胚の脳血管発生を詳細に観察した結果、ユニークな血球系マーカー陽性細胞（CD31+F4/80+CD45+ 細胞）が中脳背側部にリクルートされてくることを見出した。また、GFP 陽性細胞を用いた matrigel plug assay および explant culture の結果、GFP 陽性細胞はペリサイトに分化し、inside vasculature を被覆することが示された。Macrophage 形成不全マウスを用いた免疫組織化学的検討では、ペリサイトマーカーである NG2 陽性細胞の劇的な減少が観察された。Micro array 解析では、macrophage 形成不全マウスにおけるペリサイト関連遺伝子群の発現減少が認められた。

【結語】ペリサイトは血管周囲に存在する結合組織由来の間葉系（幹）細胞から発生・分化すると考えられているが、本研究の結果から、脳血管発生期における NG2 陽性ペリサイトの少なくとも一部は、造血幹細胞が起源であることが強く示唆された。



○土屋 裕義<sup>1</sup>, 津田 英利<sup>2</sup>, 藤村 昭夫<sup>2</sup>, 輿水 崇鏡<sup>1</sup>  
自治医科大学医学部薬理学講座 分子薬理学部門

アドレナリン  $\beta 2$  受容体作動薬リトドリン (Ritodrine) は切迫早産治療薬として子宮収縮を抑制するが、使用の際には全身性に投与するため、心血管系を始め子宮以外の様々な組織でも強力な  $\beta 2$  受容体刺激効果が観察される。今回私達は動脈硬化性病変の進展に重要な役割を果たす肝臓に注目し、 $\beta 2$  受容体作用薬が引き起こす遺伝子発現変化を網羅的に解析することによって得られた新知見を報告する。

まずリトドリン長期投与動物モデルを作成し、その肝臓での遺伝子発現変化を対照群と比較することにより、 $\beta 2$  受容体刺激による変動遺伝子を導出した。すなわち、C57 BL/6 マウスにリトドリン (200 mg / kg i.p.) を2週間連続投与し肝臓の遺伝子発現変化を解析したところ、2.0 倍以上発現が亢進した遺伝子は71個存在し、その中には lipocalin 2 (Lcn2), metallothionein 2 (Mt2), CD36, ELOVL family member 6 (Elovl6) などが含まれていることがわかった。一方で0.5 倍以下に発現低下した遺伝子は79個あり、その中には V1A vasopressin receptor (Avpr1a), T-box 3 (Tbx3), lipase endothelial (Lipg) などが見られた。これらの顕著な発現変化が見られた遺伝子を DAVID プログラムを用いて遺伝子オントロジーごとにまとめて順位付けを行ったところ、発現亢進した遺伝子も、発現低下した遺伝子も上位に脂質・糖代謝関連のプロセスが多く見られた。このことから、 $\beta 2$  受容体刺激により何らかの脂質・糖質代謝の変化が肝臓で引き起こされていることが考えられる。

これまでの研究から  $\beta 2$  受容体欠損マウスでは野生型に比べて体重が減少し、組織脂肪量も低下することが示されている (Chruscinski et al. 1999)。そこで実際に2週間連続投与したマウスの体重変化を見てみると、リトドリン投与群で顕著な体重増加が観察された。また、グルコース負荷時の血中グルコース濃度はリトドリンの単回投与によって saline 群に比べて速やかに定常レベルへと低下することが観察された。加えて興味深いことに、この速やかな血中グルコース濃度の低下は2週間リトドリンの連続投与を行ったマウスでは観察されなかった。

以上の解析の結果から  $\beta 2$  受容体刺激は肝臓で脂質・糖質代謝関連の遺伝子発現を変化させることにより、生体の脂質・糖質に対する反応性に影響を及ぼすことが示唆された。このことは  $\beta 2$  受容体作用薬の新たな利用法に繋がるだけでなく、その副作用解明の一助になることが期待される。また、循環系における  $\beta 2$  受容体作用解明にも大きな役割を持つものと思われる。



## A-III-5

### スピロラク톤は DOCA/ 食塩高血圧ラットの傍尿細管毛細血管 (PTC) の減少を抑制し尿細管間質線維化を阻止する

○岩津 好隆<sup>1</sup>, 武藤 重明<sup>1</sup>, 藤澤 元郎<sup>2</sup>, 中澤 英子<sup>1</sup>, 草野 英二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学腎臓内科, <sup>2</sup>ふじさわ内科クリニック

【目的】近年、尿細管間質の慢性低酸素状態または虚血が尿細管間質障害の原因として注目され、『chronic hypoxia hypothesis』と提唱されている。尿細管細胞や間質の血流は PTC によって供給され、PTC が減少すると尿細管間質は慢性の低酸素状態に陥り、最終的に線維化すると考えられている。そこで我々は、PTC が DOCA/ 食塩高血圧ラットの尿細管間質線維化にどのような機序で関与するのか検討した。【方法】左腎摘後、DOCA + 食塩水 (D 群)、DOCA + 食塩水 + スピロラクトン (S 群)、vehicle + 食塩水 (C 群) を 1 週または 4 週投与した 3 群のラットで、以下の項目を比較した。機能的解析として、収縮期血圧 (sBP)、尿蛋白排泄量 (UPE)、尿中 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)、クレアチニンクリアランス (CCr) を測定した。形態的解析は腎皮質組織切片を用いて以下の染色を行った。picro-sirius red 染色による尿細管間質線維化の程度の評価と、免疫組織化学染色にて尿細管間質の PTC 密度や、線維化関連増殖因子 [transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ) と結合組織増殖因子 (CTGF)]、低酸素で誘導される血管新生促進因子 [血管内皮増殖因子 (VEGF)]、血管新生阻害因子 [thrombospondin-1 (TSP-1)] および癌抑制転写因子 (p53) の尿細管間質での発現を検討した。また、TUNEL 法と免疫組織化学染色によるアポトーシス陽性 PTC と、二重免疫組織化学染色による PCNA 陽性 PTC の検出を行った。【結果】4 週の D 群では C 群に比べ、sBP、UPE、尿中 NAG の増加、CCr の低下および尿細管間質の線維化と TGF- $\beta$ 、CTGF 発現の増加を認め、これらは全て S 群で正常化した。1 週では 3 群で不変であった。1 週と 4 週の D 群では C 群に比べ、PTC 密度の減少と、アポトーシス陽性 PTC および VEGF 発現の増加を認め、これらは S 群で改善した。一方、4 週の D 群では TSP-1 と p53 の発現増加を認め、S 群で抑制されたが、1 週では TSP-1 の発現は 3 群間で不変であった。4 週の D 群では 1 週に比べ VEGF の発現が著明に増加していたにもかかわらず、PCNA 陽性 PTC は 3 群間で差がみられなかった。【結論】1) DOCA/ 食塩高血圧ラットでは、尿細管に機能的、形態的異常がみられない病初期 (1 週) に、まず PTC の減少とそれによる尿細管間質の低酸素状態が生じ、その後 (4 週) 尿細管間質の低酸素状態が持続・増強することにより TGF- $\beta$  や CTGF が誘導され尿細管間質の線維化が出現すること、2) DOCA/ 食塩高血圧ラットの 2 つの病期で PTC 減少の機序は異なり、1 週では TSP-1 とは無関係に内皮細胞のアポトーシスが PTC 減少に関与したのに対し、4 週では p53 によって誘導された TSP-1 が PTC 内皮細胞のアポトーシスと増殖抑制を引き起こし、VEGF の内皮細胞増殖促進作用をブロックすることで PTC の減少が生じたこと、3) ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬のスピロラク톤はこれらを抑制することにより尿細管間質線維化の発症を阻止することが明らかとなった。

## A-III-6

### 食塩 / アルドステロンによる心臓の炎症と線維化促進の分子機序 -ASK1 を介する組織レニン・アンジオテンシン系活性化と酸化ストレス亢進の重要性 -

○中村 太志<sup>1</sup>, 小川 久雄<sup>2</sup>, 光山 勝慶<sup>1</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院生体機能薬理学, <sup>2</sup>熊本大学大学院循環器病態学

【目的】アルドステロン (Aldo) の直接的な心血管障害作用が注目されているが、その分子機序は不明である。今回、MAPKKK のひとつである ASK1 が、Aldo の心血管障害の機序に中心的役割を演じていることを初めて証明した。【方法】野生型マウスと ASK1 ノックアウトマウス (ASK1<sup>-/-</sup>) に 1% 食塩水を飲水投与し、それぞれのマウスを生理食塩水投与群 (コントロール群)、Aldo 投与群、Aldo 投与 + カリウム補充群の 3 群に分けた。浸透圧ポンプを用いて生理食塩水あるいは Aldo を 4 週間持続注入後、心血管および腎障害、炎症、酸化ストレス、および RA 系への影響を比較検討した。【結果】Aldo の投与により血圧上昇と尿アルブミン排泄の増加、血中カリウム値の低下を認めたが、野生型マウスと ASK1<sup>-/-</sup> 間で有意差はなかった。すなわち、ASK1 は Aldo による高血圧、腎障害、低カリウム血症に関与しないことがわかった。野生型マウスでは、Aldo 投与により心臓 ASK1 のリン酸化が亢進し、その下流分子 p38 も活性化された。さらに、Aldo 投与により著明な冠動脈周囲や心筋間質でのマクロファージ浸潤、心筋間質線維化、MCP-1 mRNA 発現の増加、TGF- $\beta$  1 や 1 型コラーゲンの mRNA 発現増加がみられたが、Aldo によるこれらの障害は野生型マウスと比べ ASK1<sup>-/-</sup> で著明に減少した。また、カリウム補充により低カリウム血症を補正しても、Aldo による心血管障害は ASK1<sup>-/-</sup> で同様に減弱した。以上から、血圧上昇、腎障害、低カリウム血症とは無関係に、ASK1 は食塩 / Aldo による心血管での炎症や線維化の促進機序に直接的に関与していることがわかった。さらに、Aldo による心血管障害と関連の深い NADPH オキシダーゼや RA 系に注目し、ASK1 との関連性を検討した。野生型マウスでは、Aldo 投与により心臓での NADPH オキシダーゼ活性化を介するスーパーオキシドの著明な増加、心臓の ACE と AT1 受容体の mRNA および蛋白の著明な発現増加がみられたが、これらの増加は ASK1<sup>-/-</sup> で有意に減少した。また、野生型マウスでは、Aldo 投与により NADPH オキシダーゼサブユニット Nox2 や Nox4 蛋白の発現増加がみられたが、この中で Nox2 の発現は ASK1<sup>-/-</sup> で著明に減少した。すなわち、食塩 / Aldo による心臓での酸化ストレス亢進、RA 系活性化に ASK1 が関与していることがわかった。【結語】(1) 食塩 / Aldo による心臓の間質および冠動脈周囲における炎症、線維化の機序に ASK1 の活性化が関与している。(2) ASK1 は、Nox2 を介した NADPH オキシダーゼ由来のスーパーオキシド産生増加と、ACE や AT1 受容体の upregulation による局所 RA 系の活性化を介し、食塩 / Aldo による心血管障害に関与している。以前から指摘されている RA 系活性化と酸化ストレス亢進を介した食塩 / Aldo の心血管障害の分子機序を明らかにした。



## A-III-7

### マウス腸間膜動脈灌流標本における血管反応性の解析

○和家 祥大<sup>1</sup>, 藤原 弘喜<sup>1</sup>, 高山 房子<sup>1</sup>, 北村 佳久<sup>2</sup>, 川崎 博己<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・臨床薬学, <sup>2</sup>岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・医薬管理学

#### 【目的】

我々はこれまでに、抵抗血管に富むラット腸間膜動脈血管床を用いた灌流実験において血管緊張度調節が、血管収縮性交感神経と血管拡張性 CGRP 含有神経によって、相互に調節されていることを見出し、さらに、高血圧等の病態下ではこれら神経調節機能が変化していることを明らかにしてきた。今後、さらに病態時における血管周囲神経機能変化の解析を進めるために、遺伝子欠損マウスなどの病態モデルを用いることは、非常に有用であると考えられる。そこで、本研究では、マウス抵抗血管反応の基礎的知見を得る目的で、マウス腸間膜動脈血管床を用いて灌流標本を作製し、その血管反応について薬理的に検討した。

#### 【方法】

C57BL/6 系雄性マウスから、腸間膜動脈血管床を摘出し、灌流標本を作製した。Krebs 液を一定流量で灌流し、灌流圧変化を血管緊張度変化として測定した。経壁電気刺激（PNS）を行い、神経性の血管反応を、また、acetylcholine を用いて内皮依存性弛緩反応を、sodium nitroprusside を用いて内皮非依存性弛緩反応を観察した。さらに、sodium deoxycholate を用いて血管内皮除去を行った標本を用いて血管反応性変化を検討した。

#### 【結果・考察】

静止緊張下において PNS を行うと、刺激頻度依存的な血管収縮反応が観察された。この反応は  $\text{Na}^+$  チャネル遮断薬 tetrodotoxin、交感神経遮断薬 guanethidine および  $\alpha 1$  受容体遮断薬 prazosin により抑制されたことから、交感神経由来収縮反応であると考えられる。Methoxamine にて灌流圧を上昇させ、PNS を行うと、血管弛緩反応が観察された。この反応は tetrodotoxin、capsaicin および CGRP8-37 により抑制されたことから、Capsaicin 感受性神経由来弛緩反応であると考えられる。また、内皮細胞除去標本では、acetylcholine による血管弛緩反応は、ほぼ消失したが、sodium nitroprusside による血管弛緩反応には変化がなく、また PNS による神経性反応も確認できた。以上の結果より、マウス腸間膜動脈血管床において、内皮保持標本、内皮除去標本ともに、ラットと同様な、PNS による交感神経および CGRP 含有神経を介した血管反応が観察された。今後、様々な病態モデルの標本を用いることで、病態時における血管周囲神経機能変化のより詳細な解析が可能になると考えられる。



## B-I-1

### 腫瘍新生血管への血管周囲神経分布を標的とする新規抗腫瘍薬の開発： Nerve growth factor (NGF) のマウス腫瘍増殖抑制効果

○合田 光寛<sup>1</sup>, 能木 沙織<sup>1</sup>, 網谷 慶介<sup>1</sup>, 芳原 成美<sup>2</sup>, 北村 佳久<sup>3</sup>,  
川崎 博己<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大学大学院 医歯薬総合研究科 臨床薬学, <sup>2</sup>岡山理科大学理学部 臨床生命科学科 薬理学, <sup>3</sup>岡山大学大学院 医歯薬総合研究科 医薬管理学

#### 【目的】

腫瘍の増殖、拡大には血管新生が必須であり、新生した血管から血液の供給を受けることで腫瘍は増殖することが知られている。しかし、腫瘍新生血管には血流調節に関与する血管周囲神経は分布していないことが知られている。細・小動脈の血管緊張度は、主に血管周囲神経によって制御されており、組織血流調節に重要な役割を果たしている。一方、創傷時、病的状態で誘導される新生血管は、組織への血液供給を担っており、新生血管を介した血流制御が、疾患の進展や創傷治癒に大きく関与すると考えられている。我々の研究室では、新生血管においても血管周囲神経が分布していること、また、神経成長因子である Nerve growth factor (NGF) が新生血管の血管周囲神経の分布を促進することを報告している。したがって、腫瘍新生血管に血管周囲神経を分布させ、これら神経によって腫瘍への血流が調節できれば、腫瘍の増殖・拡大を制御できる可能性が考えられる。そこで、NGF を用いて腫瘍増殖に及ぼす影響について in vivo で検討した。

#### 【方法】

腫瘍増殖実験では、BALB/c 系 nude mouse を用い、腫瘍細胞はヒト前立腺癌細胞である DU145 細胞とヒト繊維肉腫細胞である HT1080 細胞を用いた。腫瘍細胞を腹側部皮下に移植し、腫瘍移植後 21 日目から浸透圧ミニポンプ用いて NGF または生理食塩水を一定期間持続投与した。腫瘍体積を 1 週間に 2 回測定し、腫瘍摘出日までの経時的腫瘍体積変化を検討した。また、NGF または生理食塩水暴露後の DU145 細胞での腫瘍増殖試験も行った。さらに、摘出した腫瘍組織内の新生血管量、血管平滑筋量について、免疫組織化学的に検討した。

#### 【結果】

腫瘍細胞を移植した nude mouse における腫瘍体積は徐々に増大した。NGF 2 週間投与群において、腫瘍増殖速度は生理食塩水投与群に比較して有意に抑制され、NGF 投与中止後も腫瘍増殖速度は有意に抑制された。また、NGF 投与によって、マウス生存率も延長された。しかし、NGF 曝露によって、DU145 細胞の増殖能に影響は認められなかった。さらに、NGF は腫瘍内新生血管量には影響を与えなかったが、血管平滑筋量の有意な増加が確認できた。

#### 【考察】

NGF は腫瘍細胞への直接作用ではなく、腫瘍新生血管への血管平滑筋細胞の動員を増やし、血管成熟を促進することによって腫瘍増殖を抑制する可能性が考えられる。

## B-I-2

### 心筋細胞においてフェリチン重鎖の減少は遊離鉄および酸化ストレスの増加をもたらす細胞死を誘導する

○大宮 茂幹, 彦惣 俊吾, 大津 欣也  
大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学

〔背景および目的〕 心不全の発症および進展には、酸化ストレスの亢進が関与していると考えられている。一方、遊離鉄は活性酸素種の生成を介して酸化ストレス亢進に寄与するが、その利用能はフェリチンにより制御されている。フェリチンはフェリチン重鎖（FHC）およびフェリチン軽鎖から成り、FHCのフェロオキシダーゼ活性により遊離鉄を取り込み隔離する。すなわち心不全発症機序において、FHCを介した遊離鉄制御が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、その詳細は明らかではない。

〔方法および結果〕 まず、マウスの心筋梗塞後不全心におけるFHC蛋白質の発現レベルをウエスタンブロット法を用いて検討したところ、偽手術群に比し有意に減少していた（偽手術群の36.6%,  $p < 0.05$ ）。一方、脳、肺および肝臓等におけるFHC蛋白質の発現は、両群間で有意な差を認めなかった。そこで、心筋梗塞後不全心での遊離鉄の蓄積をプルシアンブルー染色にて評価したところ、偽手術群に比し、心筋梗塞群で遊離鉄陽性細胞数は有意に増加していた。さらに、酸化ストレスの程度について、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) に対する免疫染色にて評価したところ、偽手術群に比し心筋梗塞群において染色度が有意に増強していた。以上より、in vivoの不全心筋では、FHCが減少し遊離鉄および酸化ストレスが増加していることが明らかとなった。

不全心におけるFHC発現減少の機能的意義を検討するため、単離培養したラット新生仔心筋細胞に、FHCを標的とする低分子ヘアピン型RNA（shRNA）を発現するアデノウイルスベクターを感染させた。非特異的shRNAを発現するアデノウイルスベクターを対照群とし、FHC蛋白質減少と細胞死、鉄代謝および酸化ストレスとの関係を検討した。感染4日後にFHC蛋白質の有意な発現の低下を認めた（対照群の53.7%,  $p < 0.05$ ）。ウイルス感染6日後にCell titer blue assay kitを用いて細胞死を検討したところ、FHC欠失細胞群では、対照群に比し細胞生存率の有意な減少を認めた（対照群の45.6%,  $p < 0.05$ ）。また、FHC欠失細胞群では、鉄陽性細胞数および4-HNE陽性細胞数の割合が有意に増加した。一方、鉄キレート剤のデフェロキサミン（DFO）投与で、それらの割合は有意に減少した。さらにDFOは、FHC欠失細胞群における細胞生存率の減少を有意に抑制した。抗酸化剤のN-アセチルシステインの投与も、同様の抑制効果が見られた。すなわち、FHCの減少は遊離鉄および酸化ストレス依存性に心筋細胞死を惹起することが示された。〔総括〕 不全心で認められるFHCの発現低下は、遊離鉄および酸化ストレスの増加を介して心筋細胞死を誘導し、心不全の進展に寄与する可能性が示唆された。



## B-I-3

### IGF-1 による血管平滑筋細胞の遊走に対するアディポネクチンの影響

○石澤 有紀, 石澤 啓介, 元林 有紀, 木平 孝高, 池田 康将, 富田 修平,  
土屋浩一郎, 玉置 俊晃

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部薬理学

#### 【背景・目的】

脂肪細胞由来ホルモンの一種であるアディポネクチンは、各種成長因子の作用を阻害することによって抗動脈硬化作用を有することが最近の研究により示唆されている。一方、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) は強力な生理活性物質であり、動脈硬化進展の段階に応じてその増悪と粥腫安定化の両方に寄与していることが知られている。そこで我々は本研究において、IGF-1 による血管平滑筋細胞の遊走と細胞内シグナル伝達経路に対するアディポネクチンの影響を検討した。

#### 【方法】

実験には培養ラット大動脈平滑筋細胞 (RASMC) を用いた。細胞の遊走は modified Boyden chamber 法を用いた。各種 kinase の活性化はウエスタンブロッティング法にて検討した。

#### 【結果・考察】

アディポネクチンは IGF-1 による RASMC の遊走を濃度依存的に抑制し、IGF-1 による細胞遊走に関与する extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化を抑制した。また、アディポネクチンは RASMC において 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化することを確認した。AMPK 活性化薬である 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) は、アディポネクチンと同様に、IGF-1 による RASMC の遊走及び ERK1/2 の活性化を抑制した。一方、IGF-1 により惹起される Akt の活性化および Akt の下流にあり抗アポトーシス作用を示す蛋白である Bad のリン酸化は、アディポネクチンの前処置によって影響を受けなかった。以上の結果から、アディポネクチンは AMPK の活性化を介して IGF-1 による ERK1/2 の活性化を抑制し、血管平滑筋細胞の遊走を抑制する可能性が示唆された。さらに IGF-1 に対するアディポネクチンの作用は、細胞遊走に対して選択的であり、粥腫の破綻の制御に関与する Akt-Bad リン酸化経路に対しては影響を示さなかった。すなわちアディポネクチンは血管に対する IGF-1 の作用を調節することで、動脈硬化の発症・増悪を抑制し得る可能性が示された。



## B-I-4

S1P<sub>2</sub> 受容体は三量体 G 蛋白質 G<sub>12/13</sub> および G<sub>q</sub> への共役を介して Rho 依存的、しかし Rho キナーゼ非依存的な機構により血管平滑筋細胞の Rac 活性および細胞遊走を抑制する

○高島伸一郎, 杉本 直俊, 多久和典子, 岡本 安雄, 吉岡 和晃, 高村 雅之,  
金子 周一, 多久 和陽  
金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学

【背景と目的】 血管中膜平滑筋細胞の内膜への遊走は、動脈硬化病変の形成における重要な過程である。したがって血管平滑筋細胞の遊走能を制御することは血管内膜増殖性病変を治療する上で有用な手段となり得る。リゾリン脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、さまざまな細胞において S1P 特異的 G 蛋白結合型受容体 (GPCR) ファミリーを介して多様な生理作用を引き起こす。特に興味深いのは S1P が血管平滑筋細胞において S1P レセプターに結合し血小板由来増殖因子 (PDGF) による Rac の活性化と細胞遊走を抑制することである。今回、S1P による Rac と細胞遊走抑制のシグナル伝達機構を明らかにした。【方法】 Wistar ラット大動脈培養平滑筋細胞を用い、PDGF、S1P、アンジオテンシン II などの細胞遊走におよぼす効果をボイデントチェンバー法にて評価した。細胞内 Rho、Rac 活性はプルダウン法を用いて測定した。各 G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの C 末端ペプチド (G $\alpha$ -CT) をアデノウイルスを用いて発現させ、各々の G 蛋白質と受容体 (GPCR) との結合を特異的に抑制した。アンジオテンシン II 受容体 AT1 受容体と G $\alpha_{12}$  の融合タンパク発現プラスミドを遺伝子導入した。【結果】 血管平滑筋細胞において PDGF によって惹起される細胞遊走と Rac の活性化の S1P による抑制は選択的 S1P<sub>2</sub> 受容体遮断薬によって解除された。アデノウイルスを用いて G $\alpha_{12}$ -CT, G $\alpha_{13}$ -CT, G $\alpha_q$ -CT を発現させると PDGF によって惹起される細胞遊走と Rac 活性化の S1P による抑制は解除されたが、G $\alpha_s$ -CT の発現や百日咳毒素の前処理では解除されなかった。すなわち、S1P による遊走・Rac 抑制には G<sub>12/13</sub> かつ G<sub>q</sub> が不可欠であることが示された。また、G $\alpha_{12}$ -CT, G $\alpha_{13}$ -CT, G $\alpha_q$ -CT の発現は S1P による Rho 活性化を抑制した。Rho を不活化するボツリヌス C3 毒素は PDGF による Rac 活性化および細胞遊走の S1P 抑制を解除したが、Rho キナーゼ阻害剤や Rho キナーゼの優性抑制変異体の発現は影響を与えなかった。AT1 は G<sub>q</sub> を介して Ca<sup>2+</sup> を動員したが、Rho の活性化や PDGF による Rac 活性化および細胞遊走は抑制しなかった。すなわち G<sub>q</sub> 単独の活性化では Rho 活性化や Rac 抑制をひき起こすには不十分と考えられた。ところが、G $\alpha_{12}$  融合 AT1 受容体を発現させるとアンジオテンシン II 刺激により Rho 活性化がおり、さらに PDGF による Rac 活性化および細胞遊走の抑制も認められた。PLC 阻害薬は S1P による Rho の活性化に影響を与えず、またホルボールエステルによる PKC 活性化は S1P のようには Rho を活性化しなかった。すなわち S1P の細胞遊走や Rac の抑制効果は PLC 系経路を介さなかった。【結論】 血管平滑筋細胞において、S1P<sub>2</sub> 受容体は G<sub>12/13</sub> および G<sub>q</sub> の両者に共役して協調して Rho を活性化する結果、Rac および細胞遊走を抑制することが明らかとなった。

## B-I-5

### 大動脈縮窄症における Ventricular-Vascular Stiffening

○岩本 洋一, 先崎 秀明, 河野 一樹, 増谷 聡, 石戸 博隆, 竹田津未生,  
小林 俊樹  
埼玉医科大学国際医療センター小児心臓科

【はじめに】大動脈縮窄症 (CoA) では、治療により狭窄部圧差が軽快した後も高血圧を示す事がある。これまで、大動脈近位部血管壁の硬化がこの主因として理解されてきた。今回我々は、CoA 術後残存高血圧は血管壁のみならず、左心室壁の硬化が重要な役割を演じているという新しい知見を得たので報告する。【方法】バルーン拡大、Stent 留置、手術のいずれかにより、CoA 部圧差が 5 未満となった 16 例の術前後のカテテル検査時に、IVC 閉塞中の心室圧断面積関係を構築した。心室壁硬度は収縮末期 Elastance (Ees)、血管壁硬度は動脈 Elastance (Ea) から求め、術後の経時変化とともに、対照群としての小短絡 VSD 22 例と比較した。【結果】術前 CoA 患者における Ees は、Ea と共に、対照群に比し有意に高値をとった ( $P < 0.01$ )。術後  $6.7 \pm 7.2$  ヶ月の時点で、Ea は動脈 Stiffness と共に有意に低下し ( $P < 0.001$ )、心室後負荷の軽減と動脈壁硬度の低下が示唆されたが、その値は対照群に比し尚も高値を示した ( $120 \pm 39\%$ ,  $P < 0.01$ )。一方、Ees も術後有意に低下したが、対照群に比し高値を示し ( $150 \pm 51\%$ ,  $P < 0.001$ )、Ea の低下から予測される収縮期血圧を平均  $25 \pm 12\%$  増加させ、血圧上昇の約 75% 分が心室壁硬度上昇により説明された。さらに Ees 高値は、Balloon 拡大術直後の Paradoxical Hypertension の一因である事も判明した。また、CoA 術後患者では、左心室壁硬化が関与して、ドブタミン負荷による血圧上昇が対照群に比し顕著で ( $P < 0.05$ )、CoA 術後患者にみられる運動時高血圧の原因である事も示唆された。【結語】CoA 術後患者では、血管壁硬度の上昇と共に、左室壁硬度の増加があり、安静時、運動時血圧上昇の大きな原因となっている。従って、CoA 術後患者においては、血管壁のみならず心室壁の Reverse-Remodeling を図る内科的治療の積極的介入の必要性が示唆され、今後その有効性につき前方視的に検討する必要があると考えられた。



## B-I-6

### 海洋由来新規化合物 halichlorine の薬理作用：血管平滑筋細胞および血管内皮細胞を用いた検討

○壺阪 義記, 村田 幸久, 木下 一哉, 山田 薫, 上村 大輔, 堀 正敏,  
尾崎 博

東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医薬理学教室

【背景・目的】 Halichlorine (HCLN) はクロイソカイメンから抽出されたアザスピロ [4.5] デカン環を持つ海洋性アルカロイドで、その生理・薬理作用については報告されていない。そこで本研究では、①血管平滑筋の収縮能 ②血管内皮の血球接着能に対する HCLN の薬理作用について検討した。

【方法】 ① SD ラットから摘出した内皮除去大動脈を用い、収縮張力の測定と  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬である fura-2 を用いた平滑筋組織の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の測定を行った。さらに、ラット大動脈平滑筋細胞株 (A7r5) を用いて Whole-cell パッチクランプ法を行い、脱分極刺激によって生じる内向き  $\text{Ba}^{2+}$  電流を測定した。② ウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) を用い、血球接着因子 (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin) の発現を RT-PCR 法で、ヒト単球系細胞株 (U937) を用いて内皮細胞との接着能を検討した。さらに免疫染色法にて、内皮細胞の NF- $\kappa$ B p65 活性を核内移行が観察される細胞数をカウントして定量した。

【結果】 ① HCLN (10 nM-10  $\mu$ M) の累積投与はラット大動脈平滑筋に対して収縮作用を示さなかったが、高濃度  $\text{K}^+$  (65 mM) および phenylephrine (1  $\mu$ M) による収縮を濃度依存的に抑制した。HCLN による収縮抑制の程度は phenylephrine 収縮と比べて、高濃度  $\text{K}^+$  収縮においてより大きかった。また、HCLN (10  $\mu$ M) は高濃度  $\text{K}^+$  刺激による大動脈平滑筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を有意に抑制した。さらに、HCLN (10  $\mu$ M) の前処置は、A7r5 の脱分極刺激による内向き  $\text{Ba}^{2+}$  電流を強く抑制した。② BAEC において、HCLN の前処置 (10  $\mu$ M, 2 時間) は LPS 刺激 (3  $\mu$ g/ml, 3-6 時間) によって上昇する VCAM-1, ICAM-1, E-selectin の発現量と U937 の接着を強く抑制した。次に内皮細胞の接着因子発現を制御する NF- $\kappa$ B の活性に対する HCLN の作用を検討した。HCLN の前処置 (10  $\mu$ M, 2 時間) は LPS 刺激 (3  $\mu$ g/ml, 1 時間) による NF- $\kappa$ B p65 の核内移行を有意に抑制した。

【考察】 以上の結果より、① HCLN は血管平滑筋の電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを阻害し、脱分極刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇とそれに伴う平滑筋収縮を抑制すること、② HCLN は LPS 刺激による血管内皮細胞の NF- $\kappa$ B の活性化を阻害して、細胞接着因子の発現を抑制し、単球との接着能を抑制することが示唆された。

これらの成績により、HCLN は高血圧や動脈硬化を含む血管の病態に対する新たな治療薬開発の糸口となることが期待される。

## B-II-1

### 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における神経性血管反応の異常

○座間味義人<sup>1,2</sup>, 高取 真吾<sup>1</sup>, 金 鑫<sup>1</sup>, 細田 美穂<sup>1</sup>, 佐々木健二<sup>2</sup>, 川崎 博己<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 臨床薬学,

<sup>2</sup>岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 医薬分子設計学

【目的】 糖尿病発症以前の境界型患者に食後の高血糖を抑える  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬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。そこで本研究では、*in vivo* 系において神経性血管反応を観察できる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と高インスリンが共存する状態における神経性および血管作動物質による血圧反応を検討した。また、高血糖あるいは高インスリンの各単独条件下における血圧反応についても検討した。さらに、高血糖あるいは高インスリンの各単独条件下における血圧反応性変化の機序を明らかにするためにレニン-アンジオテンシン系 (RAS) の関与についても検討した。

【方法】 脊髄穿刺ラットを作製し、急性の高血糖と高インスリンが共存する状態を作製するために頸静脈よりグルコースを持続注入した。また、高血糖単独の条件にするために内因性のインスリン分泌を抑制する octreotide を前投与した状態でグルコースを持続注入した。また高インスリン単独の条件にするためにインスリン持続注入と同時に正常血糖を保つ目的でグルコースを持続注入した。持続注入開始 30 分後に脊髄電気刺激および noradrenaline の静注による昇圧反応を観察した。また hexamethonium で自律神経節を遮断し、methoxamine で平均血圧を 100 mmHg 程度に上昇させた後に脊髄電気刺激および calcitonin gene-related peptide (CGRP)、acetylcholine、sodium nitroprusside による降圧反応を観察した。RAS 抑制薬として losartan を用い、インスリンと同時に持続注入した。

【結果・考察】 高血糖および高インスリンが共存する条件下において、脊髄電気刺激による交感神経性の昇圧反応はコントロール群に比べて有意に大きくなった。一方、自律神経節を遮断し平均血圧を上昇維持した脊髄穿刺ラットにおいて、グルコース群における脊髄電気刺激による CGRP 神経性の降圧反応はコントロール群に比べて有意に小さくなった。それに対して各種血管作動物質による血圧反応はグルコース注入によって影響されなかった。また、高血糖単独条件下では、交感神経性昇圧反応はコントロール群に比べて有意に大きくなったが、CGRP 神経性降圧反応では有意な差は認められなかった。一方、高インスリン単独条件下における交感神経性昇圧反応はコントロール群に比べて有意に大きくなったが、CGRP 神経性降圧反応では有意に小さくなった。さらに高血糖単独条件下における神経性血管反応の変化は losartan の併用持続注入により抑制されなかったが、高インスリン単独条件下における反応の変化は losartan により有意に抑制された。

以上の結果から、食後高血糖における急性の高血糖と高インスリンは神経性血管反応の異常を引き起こすという知見が得られ、その機序の一部にはレニン-アンジオテンシン系が関与していると推察される。このような食後高血糖の繰り返しによって、血管緊張度調節異常が生じ、高血糖発症に寄与している可能性が示唆される。



<div data-bbox="217 309 384 371" data-label="Section-Header"> <h2>B-II-2</h2> </div>	<div data-bbox="436 203 1369 284" data-label="Section-Header"> <h3>Oxidative stress in mononuclear cells plays a dominant role in their adhesion to mouse femoral artery after injury.</h3> </div> <div data-bbox="436 309 1143 383" data-label="Text"> <p>○萩田 澄彦<sup>1,2</sup>, 大坂 瑞子<sup>1</sup>, 下門顕太郎<sup>2</sup>, 吉田 雅幸<sup>1</sup>  <sup>1</sup>東京医科歯科大学生命倫理研究センター, <sup>2</sup>同血流制御内科学</p> </div>
--	---

**Background** Leukocyte recruitment plays a pivotal role during inflammation after vascular injury. The importance of oxidative stress in vascular injury and its modulation by Angiotensin II receptor blockers (ARB) are demonstrated. We examined the contribution of leukocyte-associated oxidative stress in acute phase leukocyte recruitment and its modulation by ARB.

**Methods and Results** Male C57BL/6 mice were treated with Olmesartan (5 mg/kg/day) or vehicle for 7 days prior to the transluminal wire injury of the femoral artery. Intravital microscopy of the artery revealed that the mechanical injury increased adherent leukocytes at both 24 hours and 7 days after injury, which was significantly reduced by olmesartan treatment. Dihydroethidium (DHE)-associated fluorescence intensity, an indicator of oxidative stress, observed in vehicle-treated mice was significantly diminished after olmesartan treatment. Moreover, apocynin (10 mg/kg/day), a nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NAD (P) H) oxidase inhibitor, showed a similar inhibitory effect on the leukocyte adhesion at 24 hours and 7 days after injury. When adoptive transfer of peripheral mononuclear cells (MNCs) were carried out, MNCs harvested from mice after wire injury, but not from those without wire injury, exhibited adhesion to the recipient injured artery. Further, olmesartan treatment of MNCs, but not of injured vasculature, reduced MNCs recruitment to the injured artery. When we tried adoptive transfer of PMN to check potential contribution of neutrophils (PMN) in observed leukocyte adhesion after injury, in contrast with MNCs, adhesion of PMN was prominent at 24 hours, but not 7days after injury. And olmesartan treatment significantly reduced PMN adhesion at 24 hours after injury. Moreover, flow cytometric analysis showed oxidative stress and expression of CD11b of MNC from injured mouse slightly increased compared to these from no injured mouse and olmesartan treatment reduced them to basal level.

**Conclusion** These data indicate that leukocyte recruitment to the mechanically injured artery is mediated by oxidative stress in MNCs, but not in vasculatures. Treatment with olmesartan blocked leukocyte recruitment by antagonizing MNC-associated oxidative stress.

## B-II-3

### 心臓腱索に特異的に発現している血管新生抑制因子 Tenomodulin と腱索断裂発症との関連について

○木村 成卓<sup>1,2</sup>, 伯野 大彦<sup>2</sup>, 四津 良平<sup>2</sup>, 福田 恵一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>済生会宇都宮病院, <sup>2</sup>慶應義塾大学医学部

【目的】心臓において、弁膜は無血管組織であることが知られているが、様々な弁膜疾患でその無血管性が破綻していることが知られている。Chondromodulin- I は軟骨組織より抽出された血管新生抑制因子であり、心臓弁膜に豊富に発現し、正常な弁構造を維持するのに重要な役割を果たしていることを我々は明らかにした。一方弁膜同様無血管組織である腱索の構造維持及び病態発症にいたる分子メカニズムについてはいまだ未知である。今回我々は Chondromodulin- I の C 末端と相同性を有し、腱組織から抽出された Tenomodulin という膜貫通蛋白質に特に注目し、腱索の構造維持及び病態発症にいたる分子メカニズムについて解析した。

#### 【方法・結果】

- (1) マウス各胎生期、成獣およびブタの心臓を用いて、RT-PCR 法、Western blotting 法により腱索における Tenomodulin の発現を解析した。胎生 14.5 日より Tenomodulin の発現は認められ、腱索特異的であった。
- (2) ヒト剖検例及び手術例における腱索組織標本を作製し、HE・EVG 染色及び各種一次抗体（Tenomodulin, VEGF-A, MMP-1,2,3,9,13 等）を用いた免疫組織化学染色を施行、病態発生のメカニズムについて解析した。正常ヒト腱索において、Tenomodulin は内皮下のエラスチンが豊富な層に同心円状に発現していた。ヒト腱索断裂症例では Tenomodulin の発現は断裂部に一致し消失しており、同部位には VEGF-A、MMP-1, 2, 13 の強い発現、炎症性細胞浸潤、異常な新生血管が認められた。
- (3) 腱索間質細胞の初代培養を行い、その培養上清を用いてヒト冠動脈内皮細胞の血管管腔形成能、遊走能に対する作用を解析した。腱索細胞の培養上清には血管内皮細胞の管腔形成能及び遊走能を抑制する作用が認められ、これらの作用は Tenomodulin の siRNA を用いることにより減弱させることができた。
- (4) 犬の腱索損傷モデルを作成し、腱索の組織学的変化を経時的に評価した。腱索の内部（中心部）に向かい経時的に新生血管、VEGF-A、MMP の発現が認められるようになり、ヒトの腱索断裂組織における所見と酷似していた。

【結語】Tenomodulin は血管新生抑制因子として腱索構造の維持に重要であり、Tenomodulin の欠失・血管新生促進・MMP 活性化が複合的に関与し腱索の変性さらには断裂をきたすメカニズムが示唆された。



<div>B-II-4</div>	Prostaglandin D <sub>2</sub> は肥満細胞から産生される腫瘍血管新生阻害物質である
	○村田 幸久 <sup>1</sup> , 有竹 浩介 <sup>2</sup> , 中川 貴之 <sup>3</sup> , 堀 正敏 <sup>1</sup> , 裏出 良博 <sup>2</sup> , 尾崎 博 <sup>1</sup> <sup>1</sup> 東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医薬理, <sup>2</sup> 大阪バイオサイエンス研究所 分子行動生物学部門, <sup>3</sup> 東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医外科

【目的】

COX-2 とその産生プロスタノイドの一つである PGE<sub>2</sub> の腫瘍血管新生促進作用については多く報告されているが、PGD<sub>2</sub> についての詳細は明らかにされていない。本研究では造血管型 PGD<sub>2</sub> 合成酵素（H-PGDS）の腫瘍成長における役割を検討することを目的とした。

【方法・結果】

H-PGDS 欠損マウス（KO）の背部皮下に移植した腫瘍（Lewis Lung Carcinoma）では PGD<sub>2</sub> 産生は検出されず、その成長速度は野生型マウス（WT）への移植腫瘍と比較して有意に速かった。病理切片を観察したところ、H-PGDS KO 移植腫瘍の内部では血管新生とマクロファージの浸潤が亢進しており、それに伴う腫瘍壊死部の縮小が確認された。腫瘍内の血管新生関連遺伝子の mRNA 発現を解析した結果、H-PGDS KO への移植腫瘍では WT と比較して TNF α、VEGF、MCP-1 の有意な発現上昇が確認された。

H-PGDS の全身欠損により観察される移植腫瘍の成長亢進は、KO マウスへ WT の骨髄を移植することにより抑制されたため、血球細胞由来の PGD<sub>2</sub> が腫瘍の成長抑制に寄与していることが示唆された。H-PGDS 発現細胞をさらに特定するために免疫染色を行った結果、腫瘍内の肥満細胞にその強い発現が確認された。また、KO への移植腫瘍で発現上昇が確認された TNF α も肥満細胞に強く発現していることを確認した。H-PGDS KO と WT の両マウスの骨髄から分化させた肥満細胞を肥満細胞欠損マウスに移植して腫瘍成長を観察した結果、H-PGDS KO 肥満細胞の移植は WT のそれよりも腫瘍成長を有意に加速した。これらの結果から肥満細胞由来の PGD<sub>2</sub> が腫瘍血管新生抑制物質であることが示された。

最後に、腫瘍刺激を与えた H-PGDS KO の腹腔肥満細胞では、WT のものと比較して TNF α を含む血管新生関連遺伝子の発現上昇が認められたが、BW245C の腹腔投与による PGD<sub>2</sub> 受容体 DP の刺激はこれらの遺伝子発現の上昇を抑制した。

【考察】

以上の結果より、PGD<sub>2</sub> は肥満細胞の H-PGDS によって産生される新たな腫瘍血管新生抑制物質であることが証明された。その抑制機序として、PGD<sub>2</sub> が肥満細胞自身の DP 受容体を刺激することで、TNF α を含む血管新生関連遺伝子の発現を抑制することが示された。

## B-II-5

### スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 輸送体 Spns2 による心臓発生の制御機構

○久野 悠, 川原 敦雄, 山口 明人, 西 毅, 望月 直樹  
大阪大学産業科学研究所

【目的】脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、標的細胞膜上に存在する S1P 受容体 (S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>) を介して細胞増殖・細胞遊走など多彩な生理活性を発揮する。ゼブラフィッシュの初期発生において、S1P は心臓前駆細胞の移動を制御しており、S1P<sub>2</sub> が破壊された *s1p2* 変異体は心臓前駆細胞の移動異常により二股心臓の表現型を示す。我々が作製した *ko157* 変異体は *s1p2* 変異体と類似した二股心臓の表現型を示すことから、*ko157* の原因遺伝子が S1P シグナル伝達を制御しうると考えられた。本研究は *ko157* 変異体の原因遺伝子を同定し、その原因遺伝子の S1P シグナル伝達における役割を明らかにすることを目的とする。

【方法】*ko157* 変異体の原因遺伝子の同定はマーカー遺伝子を用いたゲノム・マッピングより行った。*ko157* の原因遺伝子と *s1p2* との遺伝学的な相互関係は、mRNA や S1P の受精卵への注入実験により解析した。*ko157* 変異体の原因遺伝子が S1P の輸送を制御しうるのは、S1P の放出を測定することにより解析した。

【結果・考察】我々は、遺伝学的解析により、*ko157* 変異体の原因遺伝子が新規膜分子 *spns2* であることを明らかとした。S1P<sub>2</sub> 機能阻害胚が示す二股心臓の表現型は、*spns2* mRNA の注入により回復できなかった。これに対し、*ko157* 変異体の表現型は、S1P の注入により回復できたことから、Spns2 は、S1P<sub>2</sub> の上流で機能していると考えられた。Spns2 は、12 回膜貫通型の輸送体と相同性を示した。そこで、我々は、Spns2 が S1P の輸送体として機能しうるか検討した。CHO 細胞に S1P の合成酵素であるスフィンゴシンキナーゼを強制発現させると、細胞内におけるスフィンゴシンから S1P への変換は増強されたが、CHO 細胞の S1P 放出活性は低く、生成された S1P は細胞内に蓄積された。この CHO 細胞に *spns2* を遺伝子導入すると、S1P の細胞外への放出が観察されたことから、Spns2 が S1P の輸送体として機能していることが示唆された。*spns2* の初期発生における発現は厳密に制御されていることから、Spns2 は初期発生における S1P の局在を制御することにより、心臓前駆細胞の移動を制御していると考えられた。



## B-II-6

### 定量的 Cardiac troponin T ノックダウンによるゼブラフィッシュ心不全モデルの心機能解析

○梅本 紀子<sup>1</sup>, 臧 黎清<sup>2</sup>, 島田 康人<sup>1,3,4</sup>, 西村 有平<sup>1,3,4</sup>, 西村 訓弘<sup>2</sup>, 田中 利男<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>三重大院・医・薬理ゲノミクス, <sup>2</sup>トランスレーショナル医科学,

<sup>3</sup>三重大学生命科学研究支援センターバイオインフォマティクス,

<sup>4</sup>三重大学 VBL メディカルケモゲノミクス

Cardiac troponin T (TNNT2) は心筋症における原因遺伝子のひとつであり、肥大型、拘束型、拡張型という3種類の異なる病態を誘発することが知られている。TNNT2 とこれらの病態との関係は、*in vitro* および *in vivo* による多面的手法により明らかにされつつある。しかしながら、病態における TNNT2 機能の定量的解析は未だ報告されていない。そこで我々は、ゼブラフィッシュ TNNT2 の定量的ノックダウン法を開発し、心機能における TNNT2 の分子機能を明らかにすることを目的とした。

Morpholino antisense oligonucleotide (MO) による mRNA 翻訳阻害において、MO 導入量を微調整することによりノックダウンレベルを自在に操ることが可能になった。その鍵となるのは、個々の受精卵における MO 導入量の定量化にある。実際に、TNNT2-MO と内部標準物質としての蛍光ラベル Control-MO を混合し、受精卵へ注入することにより、ゼブラフィッシュ体内の蛍光強度と心臓における表現型との関係は相関した。高い蛍光強度をもつ個体は心停止や房室弁閉鎖不全による血液の逆流などを発症し、全身浮腫が著しい心不全病態を示した。一方、中程度の蛍光強度をもつ個体は血液の逆流や全身浮腫はないが、静脈洞に著大な血液貯留を認めた。このように、定量的 TNNT2 ノックダウン法により、心機能解析に適した新しい心不全モデルを確立した。そこで、このモデルに対する *in vivo* イメージングによる新しい心機能解析法を開発した。具体的には、特殊な蛍光色素の生体染色により、血漿は染まるが心筋壁は染まらない性質を利用して心室内腔を可視化した。このイメージング法により、心室内径と心室壁運動速度を測定し、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。これらの結果より、TNNT2 の発現低下により、拡張末期径の選択的な短縮と、収縮および拡張速度の低下を伴う心機能障害を明らかにした。また、この心不全モデルは、TNNT2 mRNA の導入により症状が著明に改善された。これらの結果から、心不全病態が TNNT2 の発現低下によることが明らかとなった。

本研究では、TNNT2 の定量的ノックダウンにより、心室の拡張機能障害と収縮期および拡張期における運動速度の低下が誘導され、心不全を発症することを明らかにした。私たちが開発したゼブラフィッシュ心不全モデルおよび心機能解析法は、TNNT2 の分子機能解析だけでなく、TNNT2 発現低下に伴う心不全の病態解明や新しい治療薬スクリーニングにおいて有用であると考えられる。

## B-III-1

### 心筋梗塞の病因における NO 合成酵素システムの役割

○中田 靖<sup>1</sup>, 筒井 正人<sup>2</sup>, 下川 宏明<sup>3</sup>, 柳原 延章<sup>4</sup>, 尾辻 豊<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>産業医科大学医学部第2内科学, <sup>2</sup>琉球大学医学部薬理学, <sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科循環器病態学, <sup>4</sup>産業医科大学医学部薬理学

【目的】一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) システムは、神経型 (nNOS)、誘導型 (iNOS)、内皮型 (eNOS) の3種類のアイソフォームで構成されている。従来、生体内における NOS システムの役割が、L-NAME や L-NMMA などの非選択的 NOS 阻害薬を用いて薬理的に研究されてきた。しかし、これらの NOS 阻害薬には、様々な非特異的作用が報告されている。事実、我々も、NOS 阻害薬の長期投与による血管病変形成が、実は NOS 阻害と無関係の機序で惹起されるという意外な事実を見出した (*Circulation* 2002, *ATVB* 2004)。このように、生体内における NOS システムの真の役割は、未だ十分に解明されていない。この点を検討するために、我々は、NOS システム完全欠損マウス (トリプル n/i/eNOSs 欠損マウス) を世界に先駆けて開発した (*PNAS* 2005)。本研究では、このマウスにおける心血管系の異常を検討した。

【方法及び結果】トリプル NOSs 欠損マウスは幸運にも胎生致死ではなく誕生したが、生存率は野生型マウスに比して著明に低下していた。死因の病理学的検索では、このマウスの実に半数以上が、高度の冠動脈硬化を伴う自然発症の心筋梗塞で死亡していた。さらに、冠動脈の外膜には肥満細胞の浸潤が認められ、心筋梗塞の発症における冠スパズムの関与も示唆された。我々の知る限り、このマウスは実験に有用な世界初の自然発症心筋梗塞マウスモデルである。冠危険因子の検索では、このマウスに、内臓肥満、高血圧、高脂血症、耐糖能異常、インスリン抵抗性などのメタボリックシンドロームの病態がすべて揃って認められた。重要なことに、このマウスの心血管組織にはレニン・アンジオテンシン系の活性化が認められ、さらに、アンジオテンシン II 1 型受容体 (AT<sub>1</sub>) 拮抗薬 (ARB) をこのマウスに 10 ヶ月間長期経口投与すると、上記心血管病と予後はすべて有意に改善した。

【結論】生体内の NOS システムが破綻すると、自然発症の心筋梗塞が惹起されることを初めて明らかにした。この機序には、AT<sub>1</sub> 経路の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された (*Circulation* 2008)。



## B-III-2

### タウリントランスポーター遺伝子欠損マウスは心筋細胞萎縮を伴い心筋症を発症する

○伊藤 崇志<sup>1</sup>, 木村 康<sup>2</sup>, 高井 美佳<sup>2</sup>, 魚住 頼子<sup>2</sup>, 村岡 聡子<sup>2</sup>,  
大石 昇平<sup>2</sup>, 藤尾 慈<sup>2</sup>, 東 純一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>兵庫医療大学薬学部, <sup>2</sup>大阪大学大学院薬学研究科

背景: タウリンは全身に広く分布し、心筋において豊富に存在するアミノ酸である。タウリンの生理作用は抗酸化、細胞内浸透圧調節、カルシウムハンドリング、胆汁酸抱合など多岐にわたる。これまでにタウリンの種々の心疾患に対する改善効果が報告されているが、タウリンの心筋における病態生理学的意義は不明である。そこで、我々はタウリンの細胞内輸送を担うタウリントランスポーター (TauT) の遺伝子欠損マウス (TauTKO マウス) を作製し、組織中タウリン量低下の心筋に及ぼす影響を解析した。

方法: TauTKO マウス心筋の表現型の解析は、心エコー法による心機能解析、組織学的解析、ノーザンブロット法による心不全マーカー遺伝子の解析により行った。また、遺伝子発現変動の網羅的解析のため DNA マイクロアレイを用いて解析し、得られたデータはリアルタイム PCR 法により確認した。

結果: TauTKO マウスにおいて心筋中タウリンの欠乏が確認された ( $6.7 \pm 2.7$  (wild) v.s.  $< 0.01$  (TauTKO)  $\mu\text{mol/g wet weight}$ )。TauTKO マウスは野生型マウスに比較して体重、心重量が低く、また、心機能の解析から心拍出量の低下が認められた (FS%:  $32.3 \pm 3.6$  vs  $22.5 \pm 2.2$ )。組織学的検討から、TauTKO マウスの心臓切片において心室壁の非薄化、心室の拡張が見られ、さらに、心筋細胞横断面積の減少が認められた ( $211.2 \pm 5.0$  v.s.  $153.6 \pm 5.2 \mu\text{m}^2$ )。また、TauTKO 心筋における心不全マーカー遺伝子 (ANP, BNP,  $\beta$ -MHC) の顕著な発現増加が確認された。これらの結果より、タウリン欠乏が心筋細胞萎縮に起因して心筋症の発症に関与することが示唆された。さらに、DNA マイクロアレイの結果より、TauTKO マウスにおいて細胞内浸透圧調節に関わる遺伝子群の発現増加が見られたことから、浸透圧負荷に応答するシグナル経路の代償的な活性化が考えられた。

結論: 以上より、タウリンは心筋において浸透圧調節物質としての機能から細胞サイズの保持に関わり、心機能の恒常性に寄与することが示唆された。

## B-III-3

### 生体内分子イメージングによる慢性炎症病態の解析 ～肥満脂肪組織リモデリングと血栓形成過程～

○西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三  
東京大学循環器内科・TSBML, JST さきがけ

慢性炎症を背景とする動脈硬化・肥満・メタボリックシンドロームといった病態では、実質細胞の機能異常のみでなく、間質の免疫・炎症性細胞や血管機能異常が重要であると考えられる。これらの細胞のダイナミクスを生体内で検討するために、我々は、「生体内で細胞をみて、働きを知る」ことのできる「生体内分子細胞イメージング」を開発し、従来の分子生物学的手法を用いた研究の限界点へアプローチを重ねてきた。

近年、心血管イベントのリスク要因としてメタボリックシンドロームが注目されている。内臓肥満は慢性炎症に伴い脂肪組織の再構築（リモデリング）と機能異常を引き起こすと考えられている。肥満脂肪組織では、脂肪細胞の肥大・増殖に加え、各種炎症性細胞や血管内皮細胞を含んでおり、多細胞からなる複雑病変といえる。

我々は、「生体内分子細胞イメージング」を脂肪組織に適応し、肥満脂肪組織で、脂肪細胞分化・血管新生が空間的に共存して生ずることを示した（Nishimura et al, 2007 Diabetes）。さらに、慢性炎症を基盤として肥満脂肪組織の微小循環において炎症性の細胞動態が生じていることを示した。血管内皮・マクロファージ・血小板の相互の活性化が内臓肥満に伴う慢性炎症を増幅し、肥満脂肪組織のリモデリングと機能異常に寄与していた（Nishimura et al, 2008 J Clin Invest）。

さらに、脂肪組織の間質には多くのリンパ球が存在し、肥満に伴い CD8 陽性 T 細胞が増加していた。この T 細胞はマクロファージの分化・遊走・活性化を促しており、脂肪組織へのマクロファージ浸潤の初期のトリガーが CD8T 細胞の浸潤であることが示された（Nishimura et al, 2009 Nature Medicine）。

また、本手法では生体内の単一血小板の細胞動態も明らかとなり、血栓形成過程における単一血小板の動態・形態変化が示された。血小板機能に異常を来す各種遺伝子改変動物を用いて、「生体内の血小板における遺伝子機能」が明らかになった。本手法では、血小板・血管内皮・白血球といった各種細胞の体内動態に加え、血流やずり応力なども同時に評価可能であり、詳細な血栓形成メカニズムの解析が可能になっている（Nishimura et al, 2009 J Clin Invest under minor revision）。

このように、慢性炎症病態では、複数の細胞種からなる細胞間ネットワークの破綻が本態と考えられ、単一の臓器や細胞の異常では全てを説明できない。今後、本イメージング手法によって、細胞ネットワークの病的破綻の詳細な分子メカニズムが明らかになるとと思われる。



## B-III-4

### マウスウイルス性心筋炎におけるマスト細胞の役割：2系統の mutant mice を用いた検討

○樋口 博一<sup>1,2</sup>, 松森 昭<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科循環器内科学, <sup>2</sup>大津赤十字病院循環器科

【目的】マスト細胞は、細胞内顆粒に多種多様な化学伝達物質、サイトカインを含んでおり、さまざまな炎症性疾患で大きな役割を果たすことが知られているが、近年、動脈硬化、心疾患におけるマスト細胞の関与が報告されている。今回我々は、2系統のマスト細胞欠損マウスを用いて、脳心筋炎（EMC）ウイルスによる心筋炎を作製し、心筋炎におけるマスト細胞、SCF（マスト細胞増殖因子）-c-kit（SCF 受容体）の関連について調べた。【方法】2系統のマスト細胞欠損マウス（① W/W<sup>V</sup> : c-kit receptor 欠損 ② Sl/Sl<sup>d</sup> : SCF 欠損）とその WT マウスに対し、EMC ウイルスを 10pfu 腹腔内接種して心筋炎モデルを作成し、7 日後の心臓の組織学的所見、14 日後の生存率を検討した。さらに、これら 2 系統のマウスに対しそれぞれの方法でマスト細胞を再構築させて、同様に心筋炎モデルを作成し、心筋炎組織の評価と、mMCP-4、-5、MMP-9 の遺伝子の発現を検討した。マスト細胞の再構築の方法は、W/W<sup>V</sup> マウスに対しては、その WT の骨髓細胞を SCF, IL-3 存在下に 4 週間培養し、経静脈的に移植する方法を、Sl/Sl<sup>d</sup> マウスに対しては mouse recombinant SCF (30 μg/kg/day) を 21 日間連日皮下投与する方法を利用した。【結果】W/W<sup>V</sup>、Sl/Sl<sup>d</sup> 群は、それぞれの WT 群に対して、生存率は良好であった。また組織学的評価でも、炎症細胞浸潤、壊死ともに軽度であった。マスト細胞を再構築させた W/W<sup>V</sup>、Sl/Sl<sup>d</sup> 群では、その対照群（normal W/W<sup>V</sup>、Sl/Sl<sup>d</sup>）に対して、炎症細胞浸潤、壊死ともに悪化を認めた。さらに、mMCP-4、-5、MMP-9 の遺伝子発現は、マスト細胞を再構築させた W/W<sup>V</sup> 群では、その対照群（normal W/W<sup>V</sup>）に対して、有意に上昇しており、mMCP-4 と MMP-9、mMCP-5 と MMP-9 で相関関係も認められた。

【総括】マウスウイルス性心筋炎において、マスト細胞による線維化のプロセスが、急性期に始まっているということが示唆され、マスト細胞活性化抑制や、SCF - c-kit シグナル伝達の制御により心筋炎の治療が可能となることが示唆された。

## B-III-5

### 救命の連鎖の継続的な改善と院外心停止後の救命率向上～大規模地域網羅研究 ウツタイン大阪プロジェクトより～

○石見 拓, 川村 孝  
京都大学 保健管理センター

#### <背景>

心疾患による死亡の多くは病院外での突然死であり、日本では、毎年5万人が心臓突然死で亡くなっている。突然心停止となった方を救命するためには、早期の通報、心肺蘇生、電気ショック、二次救命処置からなる「救命の連鎖」が機能することが重要であると古くから言われているが、「救命の連鎖」を改善する試みが実際に、院外心停止例の救命率改善に寄与しているか否かは、よく分かっていない。本研究は、病院前救急医療の改善が院外心停止後の救命に与える効果について検討することを目的とした。

#### <方法と結果>

1998年5月から2006年12月までの間に発生した、院外心停止の連続症例を対象とする前向き・人口ベースの観察研究を行った。主要評価項目は、神経学的に良好な状態での1ヶ月生存とした。脳機能良好な状態での生存と関係する要因を評価するため、多変量ロジスティック回帰分析を行った。42873例の蘇生の試みられた成人院外心停止例のうち、目撃のある心原性心停止8782例を解析対象とした。虚脱（心停止）から119番通報、心肺蘇生開始、最初の電気ショックまでの時間は、それぞれ、中央値（4分位）で4（2－11）分から2分（1－5）、9（5－13）分から7（3－11）分、19（13－22）分から9（7－12）分へと短縮していた。目撃のある心原性心室細動からの脳機能良好な状態での1ヶ月生存は6%（6/96）から16%（49/297）へと増加していた（ $p<0.001$ ）。全ての目撃のある心原性心停止においては、早期の心肺蘇生（1分経過することに対する多変量調整オッズ比0.89、95%信頼区間0.85-0.93）と早期の気管挿管（1分経過することに対する調整オッズ比0.96、95%信頼区間0.94-0.99）が良好な転帰と関係していた。心室細動症例においては、早期の電気ショックのみが良好な転帰と関係していた（1分経過することに対する調整オッズ比0.84、95%信頼区間0.80-0.88）

#### <結論>

大規模な人口ベースのコホート研究から、救命の連鎖の改善により、院外心停止からの生存が継続的に増加することが示された。院外心停止からの救命における早期の二次救命処置の追加効果も示唆された。本研究により、「救命の連鎖」という従来から指摘されていた、心停止例救命のための救急システム構築の必要性が客観的に証明されたことで、各地の救急システム改善を促し、院外心停止例の救命率向上に寄与することが期待される。



## B-III-6

### フルクトース飲水負荷誘発インスリン抵抗性モデルラットにおけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 神経枯渇の影響

○細田 美穂<sup>1</sup>, 岩田久美子<sup>1</sup>, 座間味義人<sup>2</sup>, 川崎 博巳<sup>1</sup>  
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 <sup>1</sup>臨床薬学, <sup>2</sup>医薬分子設計学

#### 【目的】

我々は、15%フルクトース溶液を自由飲水させて作製したインスリン抵抗性モデルラット (Fructose Drinking Rat; FDR) において、血圧上昇とともにカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 含有神経性血管弛緩反応が減弱していることを明らかにしている。このように CGRP 神経機能の変化がインスリン抵抗性病態の進行に関与している可能性が示唆されるため、今回、フルクトース負荷ラットに CGRP 枯渇物質である Resiniferatoxin (RTX) 処置を行い、インスリン抵抗性病態と血管周囲神経の機能および分布変化について検討した。

#### 【方法】

5 週齢 Wister 系雄性ラットに RTX (40  $\mu$ g/kg i.p.) 処置を行い、CGRP 枯渇ラットを作製し、6 週齢時から 15%フルクトール溶液を 4 週間もしくは 10 週間自由飲水にて与え、CGRP 枯渇インスリン抵抗性モデルラットを作製した。また、対照として、溶媒投与群、フルクトース負荷溶媒投与群、RTX 処置群を作製し、その間の収縮期血圧、心拍数を測定した。実験終了時に空腹時血糖値及び血清インスリン値を測定した。実験終了後摘出腸間膜動脈血管床灌流標本を作製し、交感神経性収縮反応、CGRP 神経性弛緩反応を測定した。また、摘出腸間膜動脈の血管周囲神経を tyrosine hydroxylase (TH) 抗体及び、CGRP 抗体を用いて免疫染色し、各神経分布密度を画像解析ソフトを用いて定量した。

#### 【結果・考察】

フルクトース負荷群およびフルクトース負荷 RTX 処置群の収縮期血圧はフルクトース負荷 4 週間から溶媒投与群に比べて高値を示し、負荷 10 週間目ではさらに高値を示した。また、フルクトース負荷群およびフルクトース負荷 RTX 処置群において、正常血糖値と高インスリン血症が見られ、インスリン抵抗性が確認された。摘出灌流標本実験では、フルクトース負荷 4 週間、10 週間のいずれの時期においても RTX 処置群において、交感神経性収縮反応の有意な増大と、CGRP 神経性弛緩反応の有意な減弱が見られた。また、フルクトース負荷群・フルクトース負荷 RTX 処置群において、TH 含有交感神経の分布密度の増加が認められた。さらに、フルクトース負荷群において CGRP 含有神経分布の減少が確認された。一方、RTX 処置群では CGRP 神経分布ほぼ消失していた。以上の結果から、CGRP 神経機能減弱や喪失は交感神経機能の亢進を起こし、インスリン抵抗性病態時における交感神経亢進に寄与する可能性が示唆される。

## B-III-7

### スタチンの多面的作用発現における FGF2 の関与

○塩田 正之, 川本由貴子, 泉 康雄, 中尾 隆文, 岩尾 洋  
大阪市大院・医・分子病態薬理

【目的】 HMG-CoA 還元酵素阻害剤（スタチン）には、コレステロール合成阻害以外に心血管に対して直接的に作用し、心血管機能を亢進させること（多面的作用）が知られている。これらの分子機序としてイソプレノイド産生系の抑制と PI3K/Akt 経路の活性化、さらには MAPK 経路の活性化が知られているが、PI3K/Akt 経路や ERK 経路の活性化メカニズムに関しては依然不明なままである。そこで、スタチンによる Akt 活性化および ERK 活性化に対する塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF2）の関与を検討した。

【方法】 プラバスタチンは 1  $\mu$ M で、FGF2 の機能阻害には FGF2 中和抗体 (5  $\mu$ g/ml)、FGF 受容体 (FGFR1) の阻害には SU5402 (10  $\mu$ M) を使用した。プラバスタチンが促進する血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞遊走、脈管形成に対する FGF2 の関与は Transwell assay、Matrigel assay にて検討した。FGF 受容体、Akt、ERK の活性化はウエスタンブロットにて評価した。

【結果】 FGF2 中和抗体はプラバスタチンによる内皮細胞の増殖を優位に抑制した。また FGF2 中和抗体はプラバスタチンが誘発する細胞遊走、脈管形成をコントロールレベルにまで抑制した。プラバスタチン添加 30 分以内に FGFR1、Akt、ERK のリン酸化を認めたが、これら Akt および ERK のリン酸化は FGF2 中和抗体、SU5402 によって優位に抑制された。さらに FGF2 の由来を明らかにするために内皮細胞をヘパリンにて洗浄した後、プラバスタチンを添加したところ、ERK、Akt の活性化は認めなかった。

【結論】 スタチンの血管内皮細胞に対する多面的作用発現には FGF2 が関与していることが明らかになった。またその際の FGF2 は細胞膜表面に貯蔵されたものが関与していることが示唆された。



# Memo

# **Memo**



# Memo

# 一般演題



## 一般 No.1

Dehydroepiandrosterone as Sigma-1 receptor agonist ameliorates pressure overload-induced myocardial hypertrophy and injury in ovariectomized rats (卵巣摘出ラットにおいてシグマ-1 受容体アゴニスト dehydroepiandrosterone は圧負荷による心筋肥大と心筋障害を抑制する。)

シェニユアリン ブイヤン, ○福永 浩司  
東北大学大学院・薬学研究科・薬理学分野

**Objective:** Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) are the most abundant circulating neurosteroids secreted from the adrenal cortex and the levels decline with advancing age both in men and women. Decreased DHEA levels are associated with endothelial dysfunction and increased cardiovascular mortality in post-menopausal women. Sigma-1 receptor which is the endoplasmic reticulum (ER) protein with two transmembrane segments regulates voltage gated  $K^+$  channel and IP3 receptor (1). However, the pathophysiological relevance of Sigma-1 receptor remains unclear in the cardiac functions. We here investigated the role of DHEA, also known as Sigma-1 receptor (Sigma-1R) agonist, on pressure-overload (PO)-induced myocardial hypertrophy and injury to define mechanisms underlying its cardioprotective action (2). **Methods:** Wistar rats subjected to bilateral ovariectomy (OVX) were further treated with abdominal aortic stenosis between the right and left renal arteries. DHEA (15 and 30 mg/kg) was administered orally once a day for 14 days starting from 2 weeks after aortic banding. **Results:** Time course study indicated that the left ventricle (LV) weight : body weight (BW) ratio increased time-dependently from 1 to 4 weeks after PO with significant inverse regulation of Sigma-1R expression. Treatment with the Sigma-1R agonist, DHEA, significantly attenuated PO-induced myocardial hypertrophy with increased expression of Sigma-1R in the LV. DHEA also attenuated hypertrophy-induced impaired LV end diastolic pressure, LV developed pressure and LV contractility ( $\pm dp/dt_{max}$ ). DHEA treatment significantly restored PO-induced impaired eNOS and Akt activities. **Conclusion:** We here documented, for the first time, the potential role of Sigma-1R expression in the heart to attenuate PO-induced myocardial hypertrophy in ovariectomized rats. DHEA treatment protects PO-induced cardiac injury via upregulation of Sigma-1R and stimulation of Akt-eNOS signaling in ovariectomized rats.

1. Highly selective  $\sigma$  receptor ligands elevated inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat cardiac myocytes. Novakova M et al., Eur J Pharmacol. 353:315-327 (1998).
2. Stimulation of Sigma-1 receptor signaling by dehydroepiandrosterone ameliorates pressure overload-induced hypertrophy and dysfunction in ovariectomized rats. Bhuiyan MS and Fukunaga K. Expert Opin Ther Targets 13: 1-13 (2009)

## 一般 No.2

### ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬のデスミン心筋症病態への影響

○三部 篤, 宮内のり子, 山内 淳司, 田上 昭人  
国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部

#### 【目的】

低分子ストレスプロテイン B5 (HSPB5; 別名  $\alpha$ - $\beta$ -クリスタリン) の点変異 (アルギニン→グリシン: R120G) はデスミン心筋症の原因であることが分かっている。この疾患は、細胞内にデスミンおよび HSPB5 を含む不溶性凝集体を形成する特徴を持ち、HSPB5 R120G タンパクを心臓で過剰発現しているトランスジェニック (TG) マウスでその病態が再現される。しかし、この疾患の有効な治療法は未だに存在しない。本研究では、心肥大や心不全の病態進行阻害に有効であるとされているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬のデスミン心筋症への効果を検討した。

#### 【方法】

In vivo デスミン心筋症モデルとして、マウス  $\alpha$  ミオシン重鎖プロモーターにより心筋特異的に HSPB5 R120G タンパク質を過剰発現している TG マウスを用いた。また、in vitro モデルとして、新生児ラット心筋細胞に野生型 HSPB5 あるいは HSPB5 R120G を含むアデノウイルスベクター (10 M.O.I) を加え、それぞれのタンパク質を発現させ、その表現型を解析した。HDAC 阻害薬は、in vivo モデルではバルプロ酸 (100 mg/kg を 4 週間腹腔内投与) を、および in vitro モデルではトリコスタチン A (100 nM を 72 時間) を用いた。

#### 【結果および考察】

心臓特異的に HSPB5 R120G を発現させることにより、マウスはデスミン心筋症を発症した。HSPB5 R120G マウスにバルプロ酸を投与したところ、心筋重量の増大および心筋細胞内の不溶性凝集体量の増加を認めた。TG マウスと同様に、HSPB5 R120G を発現している心筋細胞にトリコスタチン A を処置すると、細胞内の不溶性凝集体の増大および細胞生存率の低下が認められた。すなわち、デスミン心筋症病態は、バルプロ酸やトリコスタチン A などの HDAC 阻害によって悪化することが示唆される。この機序を検討するため、HDAC6 の発現を選択的に低下させる siRNA を心筋細胞に処置した。その結果、HDAC6 の選択的ノックダウンにより、HSPB5 R120G 誘発細胞内凝集体の増大と細胞生存率の低下が認められた。

#### 【結論】

これらの知見は、デスミン心筋症病態に HDAC6 が関わっていること、および HDAC6 を阻害することによりデスミン心筋症病態が悪化することを示唆する。



## 一般 No.3

### 受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン受容体の発現レベル調節機構

○西本 新, 西屋 禎, 堀之内孝広, 三輪 聡一  
北海道大学大学院医学研究科細胞薬理学分野

GPCR (G protein-coupled receptor) の細胞内への取り込み、細胞膜への再輸送、蛋白質分解を行うリソソームへの輸送といった細胞内輸送は、ヘテロ三量体 G 蛋白質以外の GPCR kinase (GRK) や  $\beta$ -arrestin 等の GPCR 結合蛋白質群 (GPCR-interacting proteins : GIPs) によって制御されていると考えられており、実際に、最近の研究の進歩により 50 以上の新たな GIPs の存在が明らかになっている。GIPs の大半は GPCR のカルボキシ末端領域 (C-tail) に結合し、GPCR の細胞内輸送や細胞内シグナル伝達を制御しており、その制御機構の破綻は種々の疾患の発症・進展に関与していると考えられている。GPCR ファミリーに属するエンドセリン A 型受容体 ( $ET_A$ R) のレベルの増加は、心不全、高血圧、動脈硬化症等の心血管系疾患の発症・進展において重要な役割を果たしているが、 $ET_A$ R の細胞内輸送を制御する GIPs に関しては現在までのところ、明らかになっていない。そこで我々は、 $ET_A$ R C-tail と結合する新規蛋白質分子を単離・同定するため、酵母ツーハイブリッド法を用いて  $ET_A$ R C-tail をベイトとした成人ヒト心臓 cDNA library のスクリーニングを行い、10 数種類の  $ET_A$ R 結合蛋白質を同定した。これらの  $ET_A$ R 結合蛋白質の中に細胞周期制御蛋白質である p27 や黄体形成ホルモン受容体の前駆体と結合し、それらを分解に導き、ユビキチン連結酵素 (E3) の正の制御因子としての機能を持つ Jab1 (Jun activation domain-binding protein 1) が含まれていた。 $ET_A$ R と Jab1 の結合は GST pull-down や免疫沈降により確認され、両者は細胞膜近傍で共局在していた。Jab1 ノックダウンにより  $ET_A$ R 発現レベルが上昇し、それに伴って ET-1 刺激による ERK リン酸化も増加した。一方、Jab1 過剰発現によりこれらは減少した。Jab1 過剰発現下において、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理後の  $ET_A$ R turnover の速度や  $ET_A$ R のユビキチン化レベルが増加した。さらにアゴニストである ET-1 で  $ET_A$ R を刺激するとアゴニスト誘導性の蛋白質分解が引き起こされ、 $ET_A$ R レベルは時間依存的に減少していく一方、 $ET_A$ R に結合している Jab1 量は増加した。また  $ET_B$ R C-tail をベイトとした同様のスクリーニングにおいても  $ET_B$ R 結合蛋白質として Jab1 が同定され、 $ET_A$ R よりも代謝回転が速い  $ET_B$ R では、より多くの Jab1 との結合が認められ、ユビキチン化レベルが著しく高いことが明らかになった。これらの結果より Jab1 とエンドセリン受容体との結合様式とエンドセリン受容体の蛋白質分解に強い関連性が認められた。今後、エンドセリン受容体のユビキチン化に関わるユビキチン結合 / 転移酵素 (E2) , ユビキチン連結酵素 (E3) の同定を行い、Jab1 によるエンドセリン受容体蛋白質分解の分子機構の全容を解明していきたいと考えている。



【目的】さまざまな心疾患の終末像である慢性心不全に対して $\beta$ 受容体遮断薬が有効であるが、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、 $\beta$ 受容体遮断薬の薬物反応性がヒトと類似するサルを用いて心不全モデルを作成し、 $\beta$ 受容体遮断薬の作用機序を明らかにすることを試みた。

【方法】3から8才の雄性カニクイザルに対し、イソフルラン吸入麻酔下でエピネフリン  $10 \mu\text{g/kg/min}$  を3時間持続静脈内投与し、24時間後に再度、持続投与を行った。2回投与後24時間目に左室駆出率 (EF) を測定し、EF が40%以下のものを心不全モデルとした。心不全カニクイザルに対して、 $\beta$ 受容体遮断薬メトプロロール  $0.3 \text{ mg/kg}$  あるいは生食を静脈内投与し、24時間後に心機能を測定した後、心臓を摘出した。左心室は基部、中間部および心尖部に分け、組織染色を行った。さらに、基部・心尖部それぞれから RNA を抽出し、マイクロアレイ法および定量 real-time PCR 法により、遺伝子発現について検討した。

【成績】エピネフリン2回投与により、左室心尖部の壁運動が他の部位に比べて著しく低下している、いわゆる「たこつぼ型」心不全状態を呈した。メトプロロール投与により、EF は約30%から40%に有意に改善した。マイクロアレイ法による遺伝子発現では、コントロール群心尖部に比べてエピネフリン投与群心尖部における遺伝子発現が2倍以上あるいは0.5倍以下のものを選び、その中で、基部で同様に変動している遺伝子を除いた結果、約2500もの候補遺伝子が含まれた。基部に比べて心尖部ではエピネフリン投与によって発現が変動する遺伝子が多いこともわかった。BNP やオステオポンチンなどの心不全関連遺伝子、リアノジン受容体2などのカルシウムシグナル関連遺伝子、アドレナリン受容体などのアドレナリン関連遺伝子、アンジオテンシノーゲンやアンジオテンシン受容体などのレニンアンジオテンシン系関連遺伝子、チトクロームCやミトコンドリア転写因子Aなどのミトコンドリア機能関連遺伝子等の発現変化について調べた。また、ルクソール・ファースト青染色を用いて心筋障害について調べたところ、エピネフリン群で認められた心筋障害は、メトプロロール投与にて改善した。

【結論】エピネフリンをサルに投与して心不全モデルを確立した。このエピネフリン心不全モデルは心不全に対する $\beta$ 受容体遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなると考えられる。

# Memo

## 第 19 回日本循環薬理学会

### 〈要旨集の訂正〉

本学会要旨集に下記の訂正および追記がございます。

お詫びさせていただくとともに、謹んで訂正させていただきます。

・16 ページ 上方「座長多久和 陽先生の肩書について」

誤: 金沢大学恒常性制御学(旧第一内科)循環器内科

正: 金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学

・78 ページ 追記「協賛法人および企業一覧」

日本新薬 株式会社