

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性
ウイルスベクターのシードストックおよび臨床ロット
の製造とその安全性・有効性評価に関する研究

平成18年度 総括研究報告書
主任研究者 高橋 克仁

目 次

I. 総括研究報告		
肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスベクターのシードストック および臨床ロットの製造とその安全性・有効性評価に関する研究-----		1
高橋 克仁		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	3
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	4

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
 （総括・分担）研究報告書

肉腫および悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性ウイルスベクターの
 シードストックおよび臨床ロットの製造とその安全性・有効性評価に関する研究

主任研究者 高橋 克仁 大阪府立成人病センター部長

研究要旨 難治性肉腫と悪性中皮腫の治療法開発への国民の要請は極めて強い。申請者らは、遺伝子組換え技術を用いて肉腫と悪性中皮腫を標的破壊する腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスベクターを開発した。本研究では、国内ワクチンメーカーの技術協力の下、わが国初の無菌環境下閉鎖系セル・ベクタープロセッシングシステムを用いて、上記ウイルスのGMP基準に準拠した精製・安全性試験・効力試験を実施し、臨床試験に使用可能なウイルスシードストックを製造する。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

山村倫子・大阪府立成人病センター

主任研究員

川口 寧・東京大学

準教授

城野洋一郎・化学及び血清療法研究所

次長

菅原敬信・化学及び血清療法研究所

次長

に書面による同意が得られた試料のみを使用する。患者検体の解析にあたっては、個人情報の保護に細心の注意を払い、試料、検体、標本は、施設可能な冷凍庫、キャビネットに保管する。匿名化システムを用いて連結可能匿名化する。検査や解析のため外部機関に提供する場合は暗号化する。試験期間終了後の保管・管理について被験者の同意が得られた検体は主任研究者の所属部門で保管管理する。将来本研究以外の目的に使用する場合は、改めて被験者から使用について同意を得るものとする。

A. 研究目的

平滑筋肉腫など難治性肉腫と悪性中皮腫に対する腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスを用いた標的遺伝子療法の速やかかつ適切な実用化・臨床応用を目指し、1) 遺伝子治療剤d12. CALP ΔRRのマスターおよびワーキングウイルスシードストックをGMPに準拠して製造すること、2) 生物学的評価試験、安全性試験、効力試験を経て臨床試験に使用可能なバルク標品を製造することにある。

B. 研究方法

- 1) 単純ヘルペスウイルスのα遺伝子群に属する転写因子であるICP4を恒常的発現するVero細胞のデザイナーセルを用いて、d12. CALP ΔRRを無血清培地で増殖させ、精製法を確立する(平成18年度)。
- 2) 悪性中皮腫に対するin vivoでの抗腫瘍効果のさらなる検討を行うため、効力試験の評価実験系を確立する(平成18年度)。
- 3) マスター、ワーキングウイルスシードストックをGMP基準に準拠した施設、設備のもとで構築する(平成19年度)。
- 4) ウイルスストックの生物学的評価試験、安全性試験を経て、臨床試験に使用可能なバルク標品を製造する(平成19、20年度)。(倫理面への配慮)
 検体の採取にあたっては本研究目的で新た

C. 結果

平成18年度は、研究方法の項1)に関して、人工合成ICP4遺伝子を発現するVero細胞デザイナーセルから無血清培地VP-SFMでd12. CALP ΔRRのラージスケール精製の条件検討を行い、感染後27～48時間の培養上清から感染性ウイルス粒子の回収に成功した。続いて臨床ロット製造ウイルス株のゲノムDNAを精製した。安定な増幅と全塩基配列決定のためBACmidへのクローニングを進めた。方法の項2)に関し、ヒト腹膜悪性中皮腫培養細胞にルシフェラーゼ標識遺伝子を導入し、SCIDマウス腹腔内に移植するオルソトピックなマウス実験モデルを確立した。

D. 考察

- 1) Veroデザイナーセルバンクを用いて、d12. CALP ΔRRを無血清培地で増殖させ、精製条件の検討を行ったことにより、平成19年度に計画されている、無菌環境下閉鎖系セルベクタープロセッシングアイソレーターを用いたウイルスストックのバンキングに向け準備が整った。
- 2) ルシフェラーゼ標識したヒト腹膜悪性中皮腫をSCIDマウス腹腔内に移植するオルソトピックな実験モデルの確立は世界初の成果で、ウイルス遺伝子治療薬のみならず悪性中皮腫に対する治療薬の開発に広く活

用できる評価系を提供するものであり、本成果の当該分野における波及効果は極めて大きいと言える。

3) ウイルスゲノムのBACmidへの挿入は、ウイルスゲノムの塩基配列の安定性に寄与し、これまで困難とされてきたウイルス遺伝子治療薬の規格を統一するのに役立つものと思われる。

E. 結論

1) バンキングされたICP4発現Vero細胞デザインナーセルを用いてd12.CALP ΔRRを無血清培地で増殖させ、精製法を確立した。
2) 腹膜悪性中皮腫に対するin vivoでの効力試験の評価実験系を初めて確立した。

F. 健康危険情報 (該当しない)

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋克仁、山村倫子 中皮腫破壊ウイルスの開発
成人病 46, 33-39, 2006

G.J. Babu,, G. Celia, A.Y. Rhee, H. Yamamura, K. Takahashi, et al.
Effects of h1-calponin on the contractile properties of bladder vs. vascular smooth muscle in SM-B null mice.
J. Physiol. (London) 577, 1033-1042, 2006.

A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi.
Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates the viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31.
J. Virol. 80: 1476-1486, 2006

J. Arii, O. Hushur, K. Kato, Y. Kawaguchi, Y. Tohya and H. Akashi. Construction of an infectious clone of canine herpesvirus genor as a bacterial artificial chromosome.
Microbes and Infection 8: 1054-1063, 2006

2. 学会発表

高橋克仁、山村倫子 悪性中皮腫における平滑筋分化マーカーカルポニンとカルデスモンの発現
第64回日本癌学会学術総会 (於横浜)
9月29日、2006年

山村倫子、高橋克仁、カルポニン標的化腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスによる悪性中皮腫に対する新治療法の開発 第64回日本癌学会学術総会 (於横浜) 9月30日、2006年

H. Yamamura, K. Takahashi et al.
A novel oncolytic gene therapy for malignant mesothelioma. 2006 ISCGT Japan, (Chiba, Japan), October 13-15, 2006

H. Yamamura, K. Takahashi et al.
Calponin-targeting oncolytic herpes simplex virus (HSV-1) as a novel therapeutic agent for sarcomatous mesothelioma.
8th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, (Chicago, U.S.A), October 19-22, 2006

H. Yamamura, K. Takahashi et al.
A novel therapeutic for leiomyosarcoma with an engineered oncolytic herpes simplex virus type targeting to smooth muscle calponin.
12th Annual CTOS Meeting, (Venice, Italy), November 2-4, 2006

K. Takahashi, H. Yamamura, et al.
Loss of calponin expression in vascular smooth muscle is associated with enhanced VEGF production and dysregulation of the TSC2-mTOR signaling.
5th US-Japan Workshop on Cellular and Molecular Aspects of Vascular Smooth Muscle Function. (Kona, USA), January 7-9, 2007/04/09

H. Yamamura, K. Takahashi et al.
Calponin-targeting herpes simplex virus as a novel therapeutic agent for malignant mesothelioma.
7th Joint Conference of the AACR-JCA (Kona, USA), January 21-25, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

「カルポニン標的化腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスのマスターウイルスシードストック」
高橋克仁、山村倫子 (出願予定)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
高橋克仁、山村倫子	中皮腫破壊ウイルスの開発	成人病	46	33-39	2006
G.J. Babu, , G. Celia, A. Y. Rhee, H. Yamamura, K. Takahashi, et al	Effects of h1-calponin on the contractile properties of bladder vs. vascular smooth muscle in SM-B null mice.	J. Physiol. (London)	577.	1033-1042	2006
A. Kato, M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, Y. Kawaguchi.	Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates the viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31.	J. Virol.	80	1476-1486	2006
J. Arii, O. Hushur, K. Kato, Y. Kawaguchi, Y. Tohya H. Akashi.	Construction of an infectious clone of canine herpesvirus genome as a bacterial artificial chromosome.	Microbes and Infection	8	1054-1063	2006

中皮腫破壊ウイルスの開発

¹大阪府立成人病センター 病態生理学部門 部長

²大阪府立成人病センター 病態生理学部門 主任研究員

高橋 克仁¹ 山村 倫子²

はじめに

アスベストによる中皮腫の発生は、近年、先進諸国において増加の一途をたどっています。日本においても1973年の腹膜中皮腫の報告以来増え続け、2004年度の死亡者数は1995年度比で2倍のおよそ1000人に達しています。厚生労働省の2003年の資料によると、アスベストへの暴露から中皮腫発生までの期間は11～54年（中央値38.6年）であり、日本でアスベストが最も多く使用された時期が1970～90年であることから、2030年まで中皮腫患者が増え続けると予測されています。さらに、2025～30年の中皮腫による死亡者数は上限予測で年間10000人を超えると見られており、これは現在の乳がんに匹敵する数字です。

中皮腫の治療については、胸膜肺全摘術などの外科的治療、シスプラチン、アリムタなどの抗がん剤による化学療法及び放射線療法を組み合わせた集学的治療法が試みられていますが、予後は不良で世界的にみても2年生存率は20～30%です。大阪府立成人病センターの大島調査部長、津熊調査課長ら

による1975～2001年の大阪府がん登録による調査では、男性の5年生存率は5%で生存期間の中央値は6ヶ月未満です¹⁾。特に、病理組織分類で全体の30～40%を占める肉腫型および二相型（上皮型＋肉腫型）中皮腫には外科的切除以外に有効な治療法がなく、新治療法の開発研究が切望されています。

私たちは、1988年に血管平滑筋細胞の目印となるタンパク質を発見し、カルポニンと命名しました²⁾。カルポニンは成体では分裂増殖を停止した正常平滑筋細胞に発現していますが、平滑筋肉腫など多くの肉腫細胞にも発現していることを見つけました。続いて、遺伝子組換え技術を用いて、カルポニンのあるなしによって増殖が制御される単純ヘルペスウイルス（HSV-1）変異体を作成し、このウイルスが正常細胞には影響を与えず、カルポニンをもつ肉腫でのみ選択的に増殖し細胞を破壊することを明らかにしました^{3),4)}。一方、最近私たちは、ヒト中皮腫細胞でのカルポニンの発現を調査し、予後の悪い肉腫型および二相型中皮腫がカルポニンをもつことをつきとめました。さらに、肉腫を破壊す

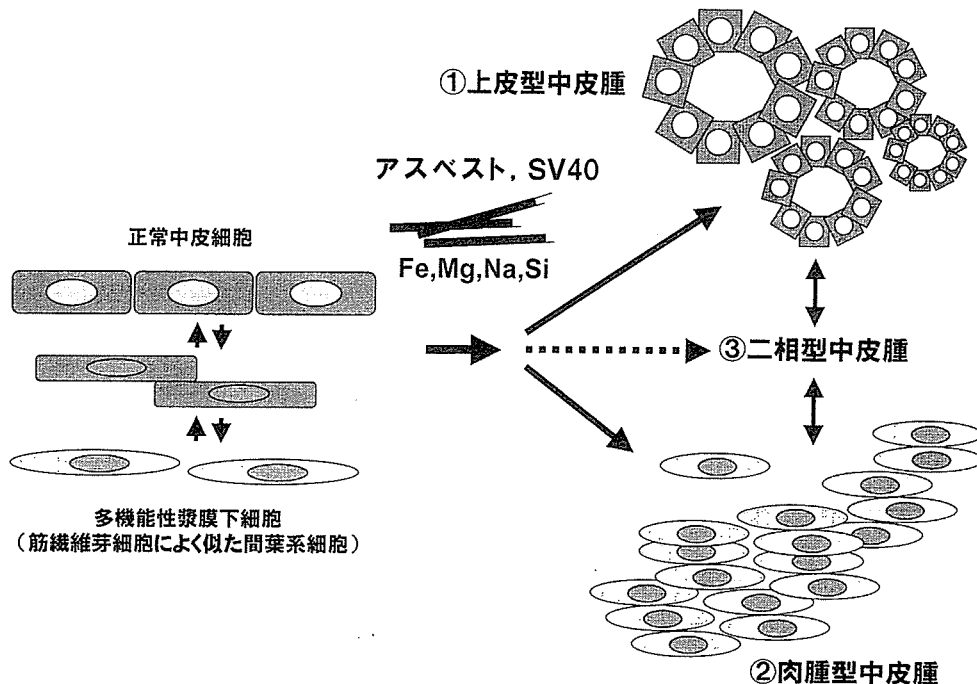


図1 中皮腫の発生と3つの病理組織学的分類

るウイルスをカルボニンをもつ肉腫型中皮腫に作用させると、中皮腫細胞を破壊できることがわかりました⁵⁾。

以上のような経緯から、私たちは、中皮腫および肉腫に対する革新的治療法の実用化に向けた調査・研究を強力に推進するため、研究グループ「肉腫中皮腫先端治療研究センター」(通称;サルコーマ中皮腫センター)を設立しました。カルボニン標的化 HSV-1 など最先端の治療法開発を推進・支援することにより、厳しい状況におかれている多くの患者様やご家族に希望を与えることを目的の一つにしています。大阪府立成人病センターは、森永前調査部参事(現産業医学総合研究所部長)、呼吸器外科、病理・細胞診断科のグループにより1980年からはじまった全国ではじめての中皮腫の病理検討会であ

る「大阪中皮腫パネル」の開催施設となるなど、中皮腫の疫学・臨床研究のよき伝統をもち、大阪府のみならず全国的にも中皮腫の研究・医療の推進に貢献してきました。

1. アスベストによる中皮腫の発生

中皮腫は間葉系細胞に属する多機能性漿膜下細胞から中皮細胞ができてくるどこかの時点でアスベスト繊維に暴露されて細胞のがん化がおこり、その分化の程度に応じて上皮型、肉腫型、両者が混ざりあった二相型の大きく3つの病理組織学的形態をとるものと考えられています(図1)⁶⁾。多機能性漿膜下細胞の性質については不明な点が多いのですが、低分子サイトケラチンという繊維をもつことが特徴とされ⁷⁾、肉腫型中皮腫の免疫組織化学的診断には、低分子サイトケラチン

陽性細胞の存在が必要といわれています。

平滑筋細胞や筋繊維芽細胞と多機能性漿膜下細胞との類似性、肉腫型中皮腫細胞に平滑筋 α アクチンが存在するという報告などから、肉腫型中皮腫にも平滑筋の蛋白であるカルポニンがあるのではないかと考え、検討しました。

2. ヒト肉腫および中皮腫におけるカルポニンの発現

私たちは、1998年に平滑筋の目印であるカルポニンが、後に筋肉や骨、軟骨、腱、脂肪細胞などになる胎児期の未分化な多機能性間葉系細胞にも存在していることを、偶然見つけました。そこで、間葉系細胞を発生母体とする「がん」である肉腫にもカルポニンがあるのではないかと考え検討したところ、多くの肉腫にカルポニンがあることを見つけ報告しました⁸⁾。同様に、肉腫型および二相型中皮腫の腫瘍組織と中皮腫培養細胞の解析では、90%以上の症例、細胞株でカルポニンの発現を認めました。カルポニンは正常および反応性中皮細胞にはないことから、中皮腫細胞を標的化するのに優れたマーカーであると考えられました。米国のグループは、DNAマイクロアレーという技術を用いて、正常な中皮組織と中皮腫組織の遺伝子発現を網羅的に解析し、中皮腫においてカルポニンが増えていることを示しています⁹⁾。

カルポニンは、1988年に著者の一人である高橋らが血管平滑筋からはじめて単離精製し、命名したアクチン結合蛋白で^{2),10)}、平滑

筋の収縮や弛緩に重要な役割を果たしています^{11)~13)}。カルポニンは、成体では増殖しない平滑筋細胞にのみあることから、私たちは、カルポニンをもちかつ増殖する細胞で選択的に増殖できるウイルスを開発すれば、正常な平滑筋には影響を与えずカルポニン陽性の肉腫細胞のみを標的にして破壊することができるものと考え、HSV-1の遺伝子を改変し、2001年にウイルスをつくることに成功しました³⁾。

3. カルポニンを標的にして増殖するウイルス

微生物を使ったがん治療の試みは1893年のニューヨークスローンケタリングがんセンターのWilliam B. Coleyの報告以来長い歴史があります。野生型のウイルスを使った1950-70年代を経て、1990年代は弱毒化ウイルス、2000年に入って遺伝子組換えウイルスの臨床試験がはじまりました。安全性や治療効果を高めるためには特定の細胞だけを攻撃する技術を開発する必要がありました。リボヌクレオチド還元酵素 (RR) やチミジンキナーゼ (TK) などヘルペスウイルスの増殖に必須な酵素は、ヒトの腫瘍細胞でも多く産生されていますが、正常細胞では増殖する時にだけ現れます。つまり、RRやTKのないウイルスは、増殖細胞やがん細胞に感染した場合にだけ、腫瘍細胞からのRRやTKを利用して増殖することができるため細胞を内部から破壊することができます。

ヘルペスウイルスは直径がおおよそ100nmの

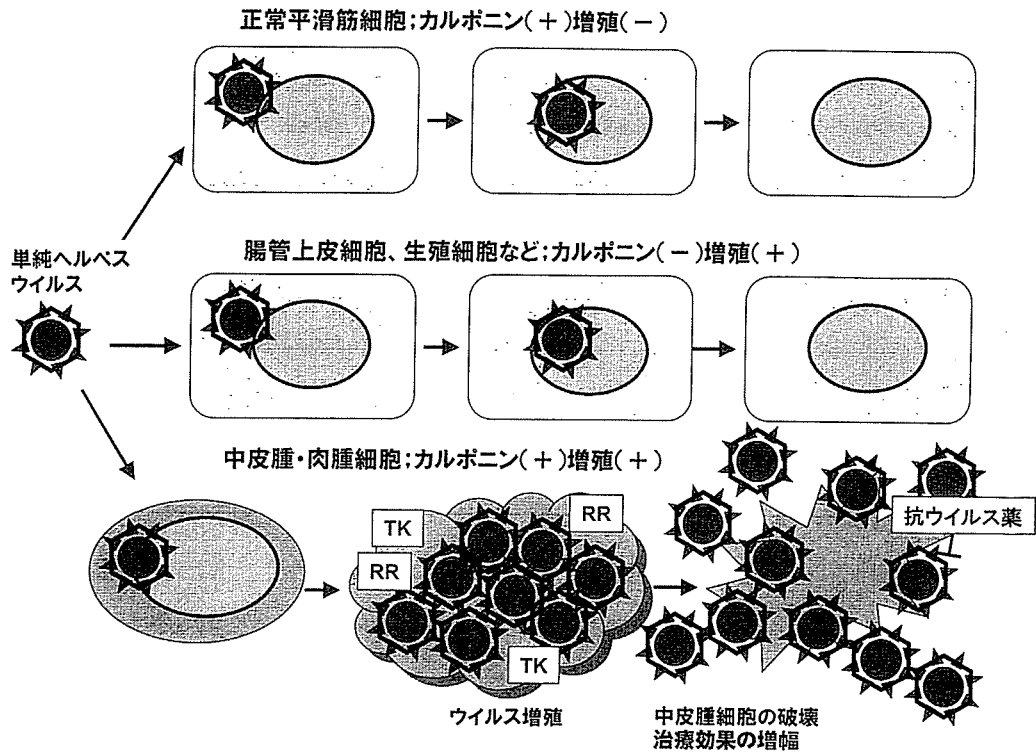
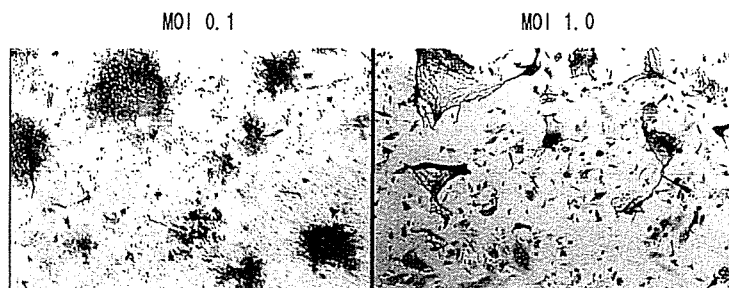


図2 カルボニン標的化ウイルスが中皮腫細胞を溶解するしくみ

2本鎖DNAウイルスで、細胞膜上の糖鎖を介して感染すると、VP16という蛋白が細胞内に注入されます。VP16は細胞の核内に入り、前初期遺伝子である α 遺伝子群の転写を促進します。 α 遺伝子群の蛋白は、DNA複製と代謝に関する β および γ 遺伝子群の転写を促進します。ヘルペスウイルスの増殖はアデノウイルスと同様、宿主細胞の染色体に組み込まれることなく行われますが、アデノウイルスに比べて増殖能が強く、遺伝子全体のサイズも約5倍大きいため大きな外来遺伝子を容易に挿入できる利点があります。また、内在性のTKをもつため、抗ヘルペスウイルス薬で増殖をコントロールできる上、PET (Positron Emission Tomography) でリアルタイムにTK活性を追跡しウイルスが増殖して

いる場所を同定できるため、臨床応用にあたって安全性が高いといえます。

まず、ウイルス増殖の開始に必須で、ウイルス感染後の最も早い時期に作用する α 遺伝子群に属する転写因子ICP4を欠失するHSV-1変異体を出発点にします。カルボニンがあるかないかを検知するプロモーターと呼ばれる部分をヒトのカルボニン遺伝子から取り出し、ウイルスのICP4遺伝子と連結した後ICP4欠失ウイルスのRR遺伝子に挿入しました^{3),4)}。このHSV-1変異体は、内在性のICP4遺伝子とRR遺伝子の両方を失った二重欠失変異体で、感染細胞でウイルスが増殖するためには、(1)カルボニンがその細胞にあり、(2)細胞がさかんに分裂増殖してRRが産生されるという2つの条件が必要です。



ウイルス感染後48時間。黒い部分でウイルスが増殖している。MOI 1.0ではほとんどの細胞が破壊され、断片化している。
 MOI 0.1；中皮腫細胞10個にウイルス1個の割合で感染させたもの
 MOI 1.0；中皮腫細胞1個にウイルス1個の割合で感染させたもの

図3 カルポニン標的化ウイルスによるヒト肉腫型中皮腫細胞の破壊

ヒト肉腫型中皮腫の培養細胞を用いて、カルポニンがある細胞と無い細胞で、このウイルスの細胞傷害性を検討したところ、カルポニンの量が最も多く、増殖の速い中皮腫細胞で最も強い細胞傷害活性を示しました。図2に中皮腫に対する溶解作用の模式図を示します。図3は、実際にこのウイルスを作用させてヒト中皮腫培養細胞を破壊した実体顕微鏡写真です。マウスを用いた安全性試験では、治療後に市販の抗ウイルス薬でウイルスを除去できることも確認しました。

4. マウスの実験でヒト平滑筋肉腫と中皮腫に対する治療効果を確認

カルポニンをもつヒト由来の子宮平滑筋肉腫を免疫不全マウスの背部皮下に移植し、腫瘍内へウイルスを直接注入しました³⁾。注入後8日目には、肉腫内でウイルス増殖と肉腫細胞の壊死が認められました。27日目には、ウイルスの増殖領域はさらに拡大し、肉腫は縮小しました。正常血管にある平滑筋細胞には、ウイルスは作用しませんでした。ウイルスで治療したマウスでは4-5週間以内

に6例中5例で肉腫が消失し、250日以上生存しましたが、治療していない対照群のマウス5例は89日以内に全例が死亡しました。

一方、ヒト手術標本から樹立した肉腫型の中皮腫培養細胞を免疫不全マウスの胸腔内、腹腔内および背部皮下に移植した実験では、ウイルスの胸腔内、腹腔内および腫瘍内直接注入により、腫瘍体積が著しく減少することを見出しました。実験結果の詳細は、第65回日本癌学会総会¹⁴⁾(9月30日)とシカゴで開催される第8回国際中皮腫会議⁹⁾(10月22日)で発表されます。

おわりに

単純ヘルペスウイルスの増殖の開始をカルポニンプロモーターで制御することにより、カルポニンをもつ中皮腫細胞を選んで破壊するウイルスを世界ではじめて開発しました。

最近の私たちの解析では、中皮腫の60%を占める上皮型にもカルポニンがあることがわかり、このウイルスは多くの中皮腫患者の治療に応用できる可能性があります。

これまで、中皮腫に対して試みられてきた遺伝子治療には大きく分けて3通りあります。第1は、自殺遺伝子と呼ばれる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) とアデノウイルスベクターを用いるもので、21例の胸膜中皮腫患者に対する第I相臨床試験が米国で実施されましたが、2例が5年以上生存したのみでした。第2は、免疫遺伝子治療です。インターロイキン2を天然痘ウイルスベクターを用いて胸膜中皮腫の6例の患者の胸腔内に投与する第I相臨床試験が米国で実施されましたが、治療効果は認められませんでした。第3は、HSV-tk 遺伝子をレトロウイルスを用いて遺伝子導入した増殖能のない卵巣がん細胞を胸腔内に投与し、その後薬剤で卵巣がん細胞を死滅させることによって中皮腫細胞に対する免疫応答を誘導する方法ですが、治療効果については報告されていません。

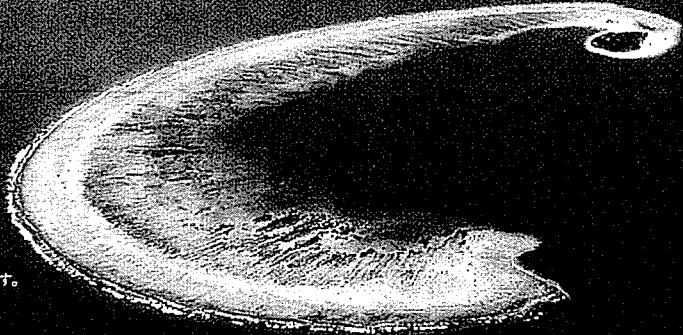
標的細胞に限定された増殖能をもつ腫瘍溶解性ウイルスを用いる私たちの方法は、胸腔や腹腔の内壁を覆って広がる中皮腫細胞を治療する場合、これらの非増殖型ウイルスを遺伝子の運び屋として用いる遺伝子治療法に比べて効力の点で圧倒的に有利です。中皮腫は他の悪性腫瘍に比べて、1) 基本的に局所の腫瘍であり、遠隔転移するまでに時間がある、2) 有効な治療法がない、3) 胸腔や腹腔など治療剤を投与しやすい環境がある、特に胸腔内に投与されたウイルスは血中に移行しにくいなどの点で、遺伝子治療を行いやすい「がん」であると考えられています。

私たちの研究グループでは、2006年度から厚生労働省の科学研究費により、ウイルスの臨床ロットを製造するプロジェクトが始まっています。私たちは、大阪府立成人病センターで開発されたこの新しい治療法が、一日でも早く中皮腫制圧のための一助となるよう、臨床試験の実施に向け研究を続けています。中皮腫による死亡者数が国内の都道府県で最も多く、今後10-15年間に多数の中皮腫患者の発症が懸念される泉南地域を抱える大阪府にとって、中皮腫の先端治療の開発研究は緊急を要する課題です。

参考文献

- 1) Kanazawa, N. et al. Jpn J. Clin. Oncol. 36, 254-257, 2006.
- 2) Takahashi, K. et al. Hypertension 11, 620-626, 1988.
- 3) Yamamura, H. et al. Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001.
- 4) Yamamura, H. and Takahashi, K. Mol. Ther. 7, 293-294, 2003.
- 5) Yamamura H. et al. Abstract, The 8th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group (in Chicago), October 19-22, 2006.
- 6) Churg, A. et al. AFIP Atlas of Tumor Pathology, Series 4 Vol.3, pp33-82, 2006
- 7) Bolen, J. W. Et al. Am. J. Surg. Pathol. 10, 34-47, 1986
- 8) Takahashi, K. Yamamura, H. Adv.

- Biophys. 37, 91-111, 2003.
- 9) Singhal S. et al. Clin. Cancer Res. 9, 3080-3097, 2003
- 10) Takahashi, K. et al. J. Biol. Chem. 266, 13284-13288, 1991.
- 11) Stafford, W. F., Mabuchi, K., Takahashi, K. et al. J. Biol. Chem. 270, 10576-10579, 1995.
- 12) Taniguchi, S., Takeoka, M., Ehara, T., Hashimoto, S., Shibuki, H., Yoshimura, N., Shigematsu, H., Takahashi, K. et al. Cancer Res. 61, 7627-7634, 2001.
- 13) Babu, G. J. Celia G., Rhee, A. Y., Yamamura, H., Takahashi, K. et al. J. Physiol. (London) in press, 2006.
- 14) 山村倫子他 第65回日本癌学会総会(横浜)抄録, 9月28-30日, 2006



紺碧の海に浮かぶ、なんとも不思議なカタチ。
 実はこれ、サンゴが作った自然の芸術品です。


オーストラリア北東部、グレート・バリア・リーフ。
 一年に約1cmしか成長しない造礁サンゴが
 200万年かけて作り上げた、
 世にも珍しい光景が広がります。


そこにあるのは、
 自然に宿るいのちの、神秘的な力。

三共は、この、いのちの不思議に取り組んでいます。
 「ひとりでも多くの人のいのちを、健康を、
 確かな医薬品で支えていきたい」

私たちが世界中に製品をお届けしているのは、そんな思いから。
 健康への願いに、国境はありません。

Challenge、そしてCARE & CUREの気持ちを
 シンボルマーク“C”に込めて、世界へ。
 グローバルにいのちを支えていく、私たち三共株式会社です。

 CARE & CUREで人と向き合う。
 三共株式会社
 SANKYO

 Daiichi-Sankyo
 GROUP

Effects of h1-calponin ablation on the contractile properties of bladder *versus* vascular smooth muscle in mice lacking SM-B myosin

Gopal J. Babu¹, Gerard Celia², Albert Y. Rhee³, Hisako Yamamura⁴, Katsuhito Takahashi⁴, Frank V. Brozovich³, George Osol² and Muthu Periasamy¹

¹Department of Physiology and Cell Biology, The Ohio State University, College of Medicine and Public Health, 304 Hamilton Hall, 1645 Neil Ave, Columbus, OH 43210, USA

²Department of Obstetrics and Gynecology, University of Vermont College of Medicine, Given C-217A, 89 Beaumont Dr, Burlington, VT 05405, USA

³Department of Physiology and Biophysics, Case Western Reserve University, 10900 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44106, USA

⁴Department of Molecular Medicine and Pathophysiology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka University, Osaka 537-8511, Japan

The functional significance of smooth muscle-specific h1-calponin up-regulation in the smooth muscle contractility of SM-B null mice was studied by generating double knockout mice lacking both h1-calponin and SM-B myosin. The double knockout mice appear healthy, reproduce well and do not show any smooth muscle pathology. Loss of h1-calponin in the SM-B null mice bladder resulted in increased maximal shortening velocity (V_{\max}) and steady-state force generation. The force dilatation pressure, which was decreased in the SM-B null mesenteric vessels, was restored to wild-type levels in the double knockout vessels. In contrast, the half-time to maximal constriction was significantly increased in the double knockout vessels similar to that of SM-B null mice and indicating decreased shortening velocity in the double knockout vessels. Biochemical analyses showed that there is a significant reduction in smooth muscle α -actin levels, whereas h-caldesmon levels are increased in the double knockout bladder and mesenteric vessels, suggesting that these changes may also partly contribute to the altered contractile function. Taken together, our studies suggest that up-regulation of h1-calponin in the SM-B null mice may be necessary to maintain a reduced level of cross-bridge cycling over time in the absence of SM-B myosin and play an important role in regulating the smooth muscle contraction.

(Resubmitted 7 August 2006; accepted after revision 7 September 2006; first published online 14 September 2006)

Corresponding author G. J. Babu: Department of Physiology and Cell Biology, The Ohio State University College of Medicine and Public Health, 304 Hamilton Hall, 1645 Neil Ave, Columbus, OH 43210, USA. Email: babu.10@osu.edu

In smooth muscle, the kinetics of the actin–myosin interaction are considered to be the major determinant of the maximal shortening velocity (V_{\max}) and rate of tension development (reviewed in Somlyo *et al.* 2004). The contractile properties of various smooth muscle tissues are well correlated to different smooth muscle myosin heavy and light chain isoforms (Matthew *et al.* 1998; Somlyo *et al.* 1998; Lofgren *et al.* 2002; Arner *et al.* 2003). Several *in vitro* studies suggest that the V_{\max} is determined by the presence (SM-B myosin) or absence (SM-A myosin) of a 7 amino acid insert in the myosin head (reviewed in Babu *et al.* 2000; Karagiannis & Brozovich 2003). Using an *in vitro* motility assay, Kelley *et al.* (1993) have shown that the actin-activated ATPase activity and velocity of actin movement of myosin isolated from phasic smooth muscle is greater than that of tonic smooth muscle tissues. The femoral/saphenous arteries, which express predominantly

the SM-B isoform, have a twofold higher ATPase activity and V_{\max} , similar to phasic smooth muscle (DiSanto *et al.* 1997). Rovner *et al.* (1997) have expressed smooth muscle heavy meromyosin molecules with or without the 7 amino acid insert specific for SM-B myosin, and demonstrated that the SM-B myosin isoform had a twofold higher actin-activated myosin ATPase activity and actin filament velocity. Using laser trap experiments, Lauzon *et al.* (1998a,b) have shown at the level of a single myosin molecule that the 7 amino acid insert (specific for SM-B myosin) does not affect the myosin's ability to generate force and motion, but rather affects the rates at which the myosin transitions through the cross-bridge cycle. Specifically, the 7 amino acid insert increases both the rate of MgATP binding and MgADP release from the active site.

To determine the role of SM-B myosin in smooth muscle physiology, we have generated a mouse model

deficient only in SM-B myosin (*smb*^{-/-}). Removal of SM-B-specific exon 5B results in a switch to SM-A, but does not affect survival or cause any overt smooth muscle pathology (Babu *et al.* 2001). Physiological analysis reveals that loss of SM-B myosin results in a significant decrease in velocity of muscle shortening in bladder and in mesenteric vessels which express high levels of SM-B myosin (Babu *et al.* 2001, 2004; Karagiannis *et al.* 2003, 2004). These studies suggest that the 7 amino acid insert could be involved in the kinetics of smooth muscle contraction. However, there are reports which show no correlation between SM-B myosin content and mechanical performance of the smooth muscle (Haase & Morano, 1996; Siegman *et al.* 1997). In pregnant hypertrophied rat myometrium (Haase & Morano, 1996) and in the mouse megacolon of Hirschsprung's disease (Siegman *et al.* 1997) the maximal shortening velocity was increased, while the SM-B myosin isoform content was decreased. We have also observed altered expression of thin-filament proteins like h1-calponin (h1-CaP) and h-caldesmon (h-CaD) in the *smb*^{-/-} mice, suggesting that these proteins could possibly be involved in the regulation of smooth muscle contractility in *smb*^{-/-} mice (Babu *et al.* 2004).

Calponin, an actin-binding regulatory protein, has been found in smooth muscle and non-muscle tissues and is encoded by three different homologous genes (reviewed by Morgan & Gangopadhyay, 2001). Basic (h1) CaP is the major calponin found in the smooth muscle and has been extensively studied (reviewed by Takahashi & Yamamura, 2003). Several *in vitro* studies have suggested that h1-CaP inhibits actin-activated myosin ATPase activity (Horiuchi & Chacko, 1991; Haeberle, 1994; Winder *et al.* 1998) in a dose-dependent manner (Itoh *et al.* 1994; Jaworowski *et al.* 1995; Uyama *et al.* 1996). Ablation of h1-CaP resulted in faster unloaded shortening velocity of smooth muscle contraction (Matthew *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2000; Fujishige *et al.* 2002). The finding that h1-CaP levels are increased in the SM-B null mice (Babu *et al.* 2004) may suggest that h1-CaP plays a role in the decreased velocity of shortening observed in this model. However, it is unclear whether the up-regulation of h1-CaP in the SM-B null mice is a compensatory mechanism to maintain function or the cause for a decrease in contractile function. To critically assess the role of h1-CaP in SM-B null mice, we generated a double knockout mouse model lacking both h1-CaP and SM-B and studied smooth muscle contractility of non-vascular (urinary bladder) and vascular (mesenteric arteries) tissues.

Methods

Animals were killed by exposure to rising concentrations of CO₂, in accordance with the ethical treatment of animals, using a protocol approved by the Ohio

State University and Case Western Reserve University, or by cervical dislocation and thoracotomy following isoflurane anaesthesia, according to a similarly approved protocol at the University of Vermont. The mice used for the following studies were F3 generations of both sexes and between 18 and 25 weeks old.

Generation of double knockout (*smb*^{-/-} & *Cnn1*^{-/-}) mice

The generation of SM-B myosin-isoform-specific knockout mice (Babu *et al.* 2001) and CaP null (*Cnn1*^{-/-}) mice (Yoshikawa *et al.* 1998) has been described previously. In order to eliminate genetic differences among mouse strains, we first transferred mutated SM-B and CaP alleles to Black/Swiss background by backcrossing to Black/Swiss wild-type mice. Heterozygous mice from each generation (up to 6 generations) were crossed to wild-type Black/Swiss mice. After six crossings, the individual heterozygous mice were bred together to generate SM-B or CaP single knockout mice. To generate double knockout (*smb*^{-/-} & *Cnn1*^{-/-}) mice, SM-B and CaP null mice were bred together. The *smb*^{-/-} & *Cnn1*^{+/-} (heterozygous) mice were then crossed to generate *smb*^{-/-} and double knockout (dKO) mice. Genotyping was carried out using the PCR method as described previously (Yoshikawa *et al.* 1998; Babu *et al.* 2001).

Reverse-transcription PCR analysis

To determine the expression levels of neutral (h2) and acidic (h3) CaP mRNA, reverse transcription (RT)-PCR analysis was carried out. Total RNA from wild-type (WT), *smb*^{-/-} and dKO bladder tissues was extracted as described earlier (Babu *et al.* 2001). The reverse transcription of 2 µg of total RNA was carried out according to the manufacturer's manual using a StrataScript First-Strand Synthesis System (Stratagene, Catalogue no. 200420). Following oligo-(dT)-primed first-strand cDNA synthesis, a 1 µl portion of the first-strand cDNA mixture was subjected to PCR as described earlier (Yoshikawa *et al.* 1998) using the following primers: h2-CaP (forward 5'-CCCTCTGCCGGTCCCGCTGG-3' and reverse 5'-CA-ACTGATGTGAAGAGAT-3'), h3-CaP (forward 5'-AA-CAGCCAGACCCACTTCAAC-3' and reverse 5'-TCGGG-GTATTCTGCTGATAATC-3' and mouse GAPDH (forward 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3' and reverse 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3'). The PCR products were analysed on 1.2% agarose gel electrophoresis and signals were quantified by UVP BioImaging systems. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers were used along with CaP primers as internal controls.

Histology

Bladder tissues from *smb*^{-/-} and dKO mice were fixed in 10% neutral-buffered formalin, dehydrated through a gradient of alcohol, and embedded in paraffin. Sections were stained with haematoxylin and eosin as described previously (Karagiannis *et al.* 2003).

Western blot analysis

Western blotting was carried out as previously described (Babu *et al.* 2001, 2004). Briefly, total proteins extracted from bladder or mesenteric vessels were separated on 8% (for smooth muscle myosin isoforms SM1 and SM2), 10% (for smooth muscle α -actin, β -actin, γ -actin, h1-CaP and h-CaD) or 15% (for light chain 17 and light chain 20 (LC₁₇ and LC₂₀)) SDS-polyacrylamide gels (PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were probed with the following primary antibodies: sheep polyclonal anti- γ -actin (Chemicon), rabbit polyclonal antibodies specific for SM1, SM2, h1-CaP and h-CaD (Babu *et al.* 2004), mouse monoclonal antibodies specific for smooth muscle α -actin, β -actin, myosin light chain 20 (Sigma), and myosin light chain 17 as described previously (Babu *et al.* 2001, 2004). Signals were detected by SuperSignal West Dura extended substrate (Pierce) and quantified by densitometry.

Mechanical experiments

Bladder. All solutions and the methods for tissue preparation are described in detail elsewhere (Karagiannis *et al.* 2003), and solutions included 250 units ml⁻¹ of calmodulin. Briefly, bladder tissues were cut into strips of approximately 800 μ m by 200–300 μ m by 20–50 μ m and mounted between aluminium foil T-clips. Strips were then transferred to a mechanics workstation (Model 600, Aurora Scientific, Aurora, Canada) and mounted between a force transducer (Akers AE 801, MEMSCAP, San Jose, USA) and servomotor (Aurora Scientific, Aurora, Canada) in relaxing solution (pCa 9). Strips were stretched to just develop tension and then stretched to maximal length (L_0) (an additional 30%). Then the strips were skinned in pCa 9 with 1% Triton solution for 15–20 min, after which the smooth muscle strips were thiophosphorylated with a protocol consisting of bathing the fibre in rigor solution without Ca²⁺ (mM: 5 TES, 1.2 MgCl₂, 30 EGTA, 26 HDTA) for 10 min, followed by rigor with Ca²⁺ (mM: 50 TES, 1.2 MgCl₂, 28 Ca-EGTA, 1 EGTA, 26 HDTA) for another 10 min and then 30 min in rigor with Ca²⁺ and 10 mM ATP γ S, then placed back in rigor solution. Tissue strips were then transferred to relaxing solution containing ATP (mM: 5.5 Na₂ATP, 56.5 potassium methane sulphonate, 7.2 MgCl₂, 25 creatine phosphate, 25 *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulphonic

acid (Bes), and 0.02 CaCl₂, pH 7.0) and force increased to a steady-state plateau. Once reaching steady state, the maximal shortening velocity (V_{max}) was determined.

To determine shortening velocity, force was rapidly lowered by shortening the preparation and using a computer program to adjust muscle length to clamp force at a new isotonic level (50%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1%). The velocity of shortening was defined as the linear fit between the times of 80 ms and 90 ms to the length *versus* time trace. The resulting data of force *versus* velocity was then fitted to the Hill equation $(V + b)(P + a) = b(P_0 + a)$, where V is the rate of shortening, P is the clamped force, P_0 is the maximal force (force at L_0), and a and b are constants. The maximal shortening velocity is extrapolated as the velocity at $P = 0$.

Mesenteric arteries. Mice were shipped to the University of Vermont and allowed to acclimate for 1 week prior to experimentation. They were then anaesthetized as described above and killed by cervical dislocation. The abdomen was opened by longitudinal incision, and a section of the gut and its vessels, approximately 5–10 cm distal to the pylorus, was excised and transferred to a Petri dish filled with ice-cold *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (Hepes)-buffered physiological saline solution (Hepes-PSS). Using microdissection tools, tertiary branches of the mesenteric arcade (unpressurized arterial diameter approximately 100 μ m) were dissected free of surrounding connective and fat tissue and transferred to the experimental chamber of a small-artery arteriograph. Vessels were then tied onto two glass cannulas and pressurized to 50 mmHg using a pressure-servo apparatus. Changes in vessel diameter were measured with a video dimension analyser (Living Systems Instrumentation) and recorded on a PC computer using specialized imaging software. A more detailed description of the small artery pressure system can be found elsewhere (D'Angelo & Osol, 1993).

Following 60 min equilibration at 37°C, the vessels were constricted with a solution containing phenylephrine (10 μ M) and a high concentration of potassium (124 mM) to induce maximal constriction. Time to half-maximal constriction ($T_{1/2}$, s), slope of maximal velocity during the initial phase of constriction (normalized to diameter by expressing the data as the percentage change in diameter per second), and the extent of maximal constriction (percentage reduction in lumen diameter) were determined from experimental records. Vessels were then subjected to step increases in transmural pressure in 20 mmHg increments until loss of constriction was observed (forced dilatation, FD, at pressures above 180 mmHg). The pressure at which FD occurred in each vessel was used to calculate average FD pressure (mmHg), thereby providing an index of the maximal force

production by vascular smooth muscle within the arterial wall.

Results

The double knockout mice lacking SM-B and h1-CaP do not show any gross abnormalities

We have previously shown that a complete switching from SM-B myosin to SM-A in the *smb*^{-/-} mice resulted in decreased smooth muscle contractility, and an increased expression of h1-CaP and mitogen-activated protein kinase activity (Babu *et al.* 2001, 2004). To address the functional significance of h1-CaP up-regulation in the contractile properties of smooth muscles of SM-B null mice, we have generated a double knockout (dKO) mouse model for SM-B myosin and h1-CaP. The smooth muscle-specific h1-CaP knockout mouse model (Yoshikawa *et al.* 1998) maintained by Dr Katshuhito Takahashi, Japan was bred to the SM-B null mice (Babu *et al.* 2001). The heterozygous (*smb*^{+/-} & *Cnn1*^{+/-}) males and females were crossed to generate mouse models with genotypes of *smb*^{-/-} and *Cnn1*^{+/-}. The male and female *smb*^{-/-} and *Cnn1*^{+/-} mice were then bred together to generate homozygous (*smb*^{-/-} and

Cnn1^{-/-}) dKO mice. Mice were genotyped by polymerase chain reaction as described earlier (Yoshikawa *et al.* 1998; Babu *et al.* 2001) to confirm the successful generation of dKO mice. The pups were delivered in a Mendelian ratio and reached adulthood without any gross morphological abnormalities, suggesting that loss of both SM-B myosin and h1-CaP did not affect smooth muscle growth and development and survival of the mice.

To verify that h1-CaP is not expressed in the smooth muscles of dKO mice, Western blot analysis was carried out using total homogenate from bladder and mesenteric vessels of wild-type (WT), *smb*^{-/-} and dKO mice. Figure 1 shows that CaP expression was increased in the *smb*^{-/-} null bladder (2.79 ± 0.10 fold; $P < 0.05$, $n = 3$, Fig. 1A and C) and in the mesenteric vessels (2.33 ± 0.03 fold; $P < 0.05$, $n = 3$, Fig. 1B and C) compared to their respective WT tissues as reported earlier (Babu *et al.* 2004), but was completely absent in the dKO mice. The expression level of non-muscle β -actin protein determined as internal loading control was unchanged between the groups. These results additionally confirm the successful generation of dKO mice lacking both SM-B and CaP proteins.

To determine if loss of h1-CaP expression alters the expression of other CaP isoforms, mRNA levels of neutral

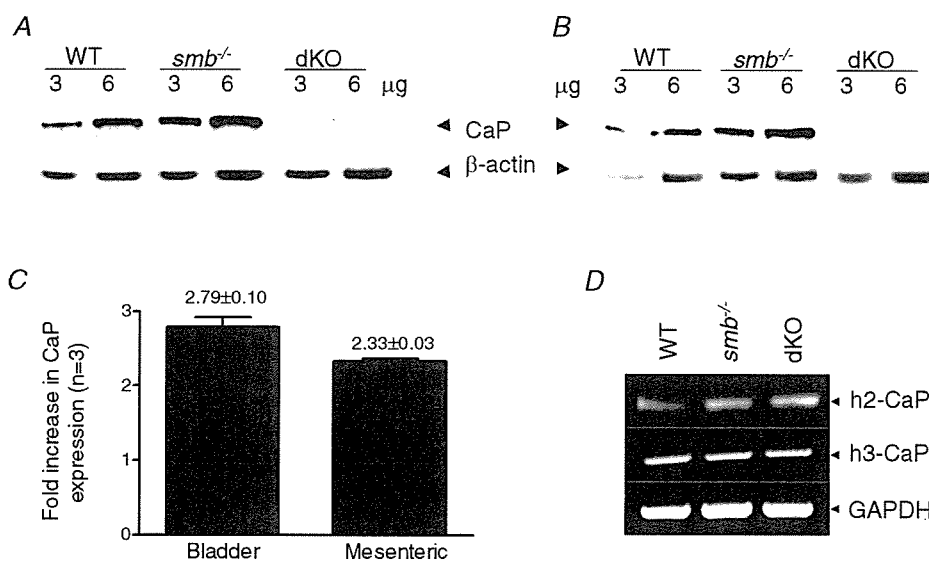


Figure 1. Calponin expression in SM-B null and dKO mice bladder

Two different concentrations (3 and 6 μ g) of total protein extracted from wild-type (WT), *smb*^{-/-} and double knockout (dKO) bladder (A) and mesenteric vessels (B) were separated on a 10% SDS-PAGE and analysed by Western blot analysis using anti-h1-calponin and β -actin antibodies. Results in A and B represent 3 independent experiments. C, bar graph shows the relative levels of CaP in the SM-B null bladder and mesenteric vessels compared to respective WT tissues. Calponin expression is increased over twofold in the SM-B null mice and completely abolished in the dKO mice. D, reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of h2- and h3-CaP expression. Total RNA isolated from WT, *smb*^{-/-} and dKO bladder tissues were used for the PCR analysis and GAPDH was used as internal control. Results in D represent 3 independent experiments. Expression levels of h2- and h3-CaP isoform mRNA levels are unaltered in the dKO bladder.

(h2)-CaP and acidic (h3)-CaP in bladder tissues were analysed by reverse-transcription-PCR. Our results shown in Fig. 1D demonstrate that loss of h1-CaP does not affect the expression of h2- or h3-CaP isoforms.

Loss of SM-B and h1-CaP did not affect the smooth muscle morphology

To determine whether loss of h1-CaP in SM-B null mice results in any structural abnormalities, histopathological analysis was carried out. Bladder tissues from *smb*^{-/-} and dKO mice were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated through a gradient of alcohols, embedded in paraffin, and sectioned and stained with haematoxylin and eosin as described earlier (Karagiannis *et al.* 2003). Results in Fig. 2 show no significant difference between *smb*^{-/-} and dKO mice bladder muscle. The smooth muscle morphology and orientation were normal and similar between single and dKO mice. These results suggest that loss of both SM-B myosin and h1-CaP did not alter smooth muscle structure and development.

Loss of SM-B and h1-CaP did not affect the myosin heavy and light chain isoform expression

To determine whether loss of both SM-B and h1-CaP proteins induced changes in myosin protein expression or isoform switching, Western blot analysis was carried out using protein extracts prepared from bladder and mesenteric vessels. Our results indicate that ablation of h1-CaP did not affect the level of SM1 (WT = 100%, *smb*^{-/-} = 101 ± 2.2%, dKO = 99.8 ± 1.6%; *P* > 0.05), SM2 (WT = 100%, *smb*^{-/-} = 104 ± 1.9%, dKO = 102 ± 1.6%; *P* > 0.05), LC₁₇ (WT = 100%, *smb*^{-/-} = 105 ± 3.0%, dKO = 101 ± 5.0%; *P* > 0.05) and LC₂₀ (WT = 100%, *smb*^{-/-} = 100 ± 4.6%, dKO = 103 ± 4.4%; *P* > 0.05) proteins in the dKO mice bladder

(Fig. 3A). Similar results were also obtained with mesenteric vessels (Fig. 3B).

Smooth muscle α -actin levels are decreased in the dKO bladder

Western blot analysis revealed that smooth muscle α -actin levels are ~40% down-regulated in the dKO bladder (Fig. 4A and B) and mesenteric vessels (Fig. 5A and B). These data are consistent with a previous report on the down-regulation of smooth muscle α -actin expression in h1-CaP single knockout bladder (Matthew *et al.* 2000). The γ -actin and non-muscle β -actin protein levels were unchanged in both bladder (Figs 1A and 4A) and mesenteric vessels (Figs 1B and 5A) of dKO mice, indicating that ablation of h1-CaP did not affect the expression of other actin isoforms.

Smooth muscle-specific h-CaD has been shown to be down-regulated in the *smb*^{-/-} mice (Babu *et al.* 2004). To determine if loss of h1-CaP affects CaD levels, Western blot analysis was carried out using smooth muscle-specific h-CaD antibody. Our results show that h-CaD protein levels are decreased in the *smb*^{-/-} bladder (Fig. 4A and C) and mesenteric vessels (Fig. 5A and C) as reported earlier (Babu *et al.* 2004). Interestingly, ablation of CaP restores the h-CaD expression in the dKO bladder (Fig. 4A and C) as well as in the mesenteric vessels (Fig. 5A and C) and its level is significantly higher than the wild-type tissues.

Contractile properties of dKO mice bladder

To determine how loss of CaP affects smooth muscle contractility in *smb*^{-/-} bladder, we compared shortening velocity (V_{max}) and force generation between *smb*^{-/-} and dKO mice bladder as described earlier (Karagiannis *et al.* 2003). Steady-state forces between WT and *smb*^{-/-} bladder were not

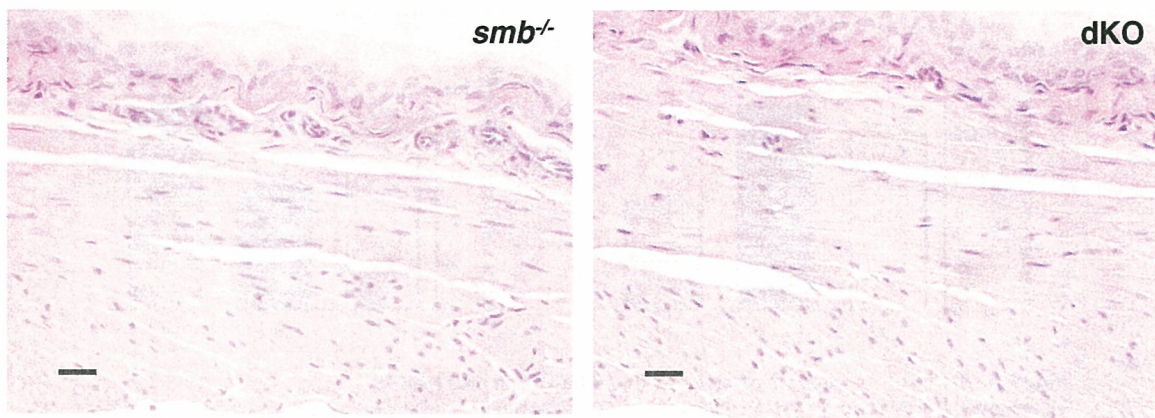


Figure 2. Histological staining of SM-B null and dKO mice bladder

Bladder tissue from *smb*^{-/-} (left panel) and dKO mice (right panel) was fixed with formalin and stained with haematoxylin and eosin. Scale bar, 10 μ m.

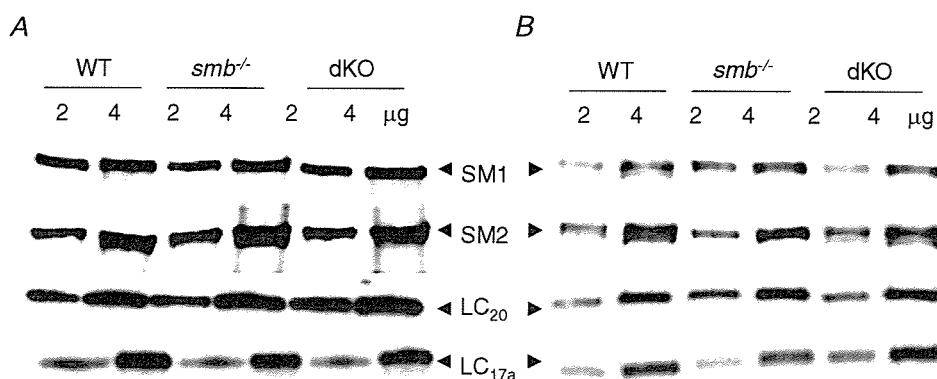


Figure 3. Expression of myosin heavy and light chain isoforms

Two different concentrations (2 and 4 μg) of total protein extracts prepared from *smb*^{-/-} and dKO bladders (A) and mesenteric vessels (B) were separated on 5% (for SM1 and SM2) or 14% SDS-PAGE (for LC₂₀ and LC₁₇) and immunoprobed with specific antibodies. Expression levels of myosin isoforms are unaltered in the dKO bladder. Signals were quantified by densitometry scanning. Data are representative of 3 independent experiments.

statistically different (WT = 9.9 ± 0.7 mN mm⁻² versus *smb*^{-/-} = 8.9 ± 0.7 mN mm⁻²); however, the steady-state force was significantly increased in the dKO bladder (dKO = 12.5 ± 0.5 mN mm⁻²) and was significantly higher than WT (Fig. 6). As reported earlier (Karagiannis *et al.* 2003), the velocity of shortening was significantly decreased in the *smb*^{-/-} bladder (WT = 0.22 ± 0.4 ML s⁻¹ ($n = 10$) versus *smb*^{-/-} = 0.18 ± 0.1 muscle lengths (ML) s⁻¹ ($n = 7$)).

Interestingly, V_{\max} in the dKO bladder (dKO = 0.24 ± 0.2 ($n = 9$)) was no different to that of WT bladder, but significantly higher than that observed in the SM-B null mice.

Contractile properties of mesenteric vessels

As summarized in Table 1, there were no differences observed in all three groups in vessel diameter at 50 mmHg

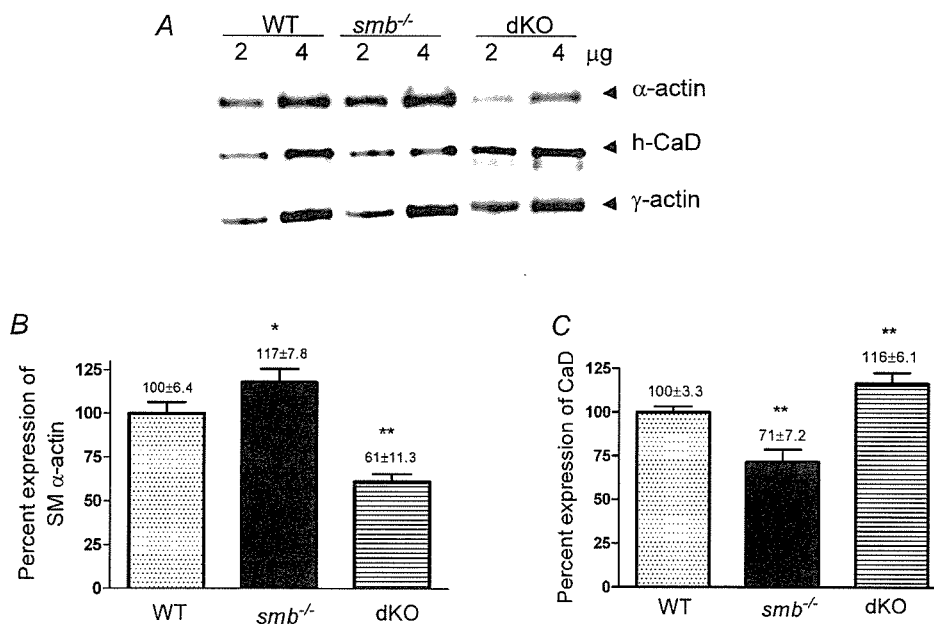


Figure 4. Expression of smooth muscle α-actin and h-CaD in dKO bladder

A, representative Western blots showing the expression of α-actin, γ-actin and h-CaD expression in dKO bladder. γ-Actin levels are unchanged between the three groups. B and C, bar graphs showing the percentage expression of smooth muscle α-actin and CaD proteins in the dKO bladder. Smooth muscle α-actin is down-regulated ~40% (B) whereas h-CaD is up-regulated (C) in the dKO bladder. *Not significantly different from WT. **Significantly different from the other two groups.

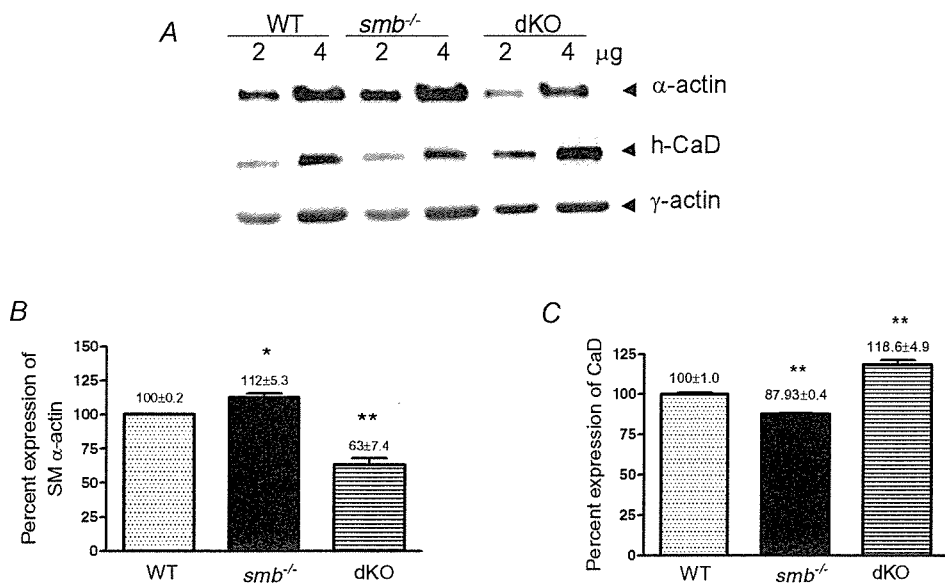


Figure 5. Expression of smooth muscle α -actin and h-CaD in dKO mesenteric vessels
 A, representative Western blots showing the expression of α -actin, γ -actin and h-CaD expression in dKO mesenteric vessels. γ -Actin levels are unchanged between the three groups. B and C, bar graphs showing the percentage expression of smooth muscle α -actin and h-CaD proteins. Smooth muscle α -actin is down-regulated \sim 40% (B) whereas h-CaD is up-regulated (C) in the dKO mesenteric vessels. *Not significantly different from WT. **Significantly different from other two groups.

in a relaxing solution containing papaverine (0.1 mM) in the extent of maximal vasoconstriction to an activation cocktail containing phenylephrine (10 μ M) and potassium (120 mM) or in the equivalent maximal reductions in lumen diameter (approximately 80%). Half-time ($T_{1/2}$) to maximal constriction was significantly increased in both knockout (*smb*^{-/-} and dKO) groups, indicating decreased shortening velocity, as was the normalized slope of constriction (percentage diameter change per second) in vessels from both the *smb*^{-/-} and dKO animals (Table 1).

Relative to vessels from the *smb*^{-/-} animals, the pressure at which forced dilatation occurred was significantly increased in the dKO mesenteric vessels, and reached the levels of WT control vessels (Table 1). Forced

dilatation (FD; used in the present study) is an indirect measure of maximal force production, and is defined as the point at which transmural pressure overcomes the ability of vascular smooth muscle to produce an adequate counterforce to circumferential tension produced by the intraluminal pressure. These data showing enhanced force production by mesenteric artery smooth muscle from dKO *versus* *smb*^{-/-} animals are in general agreement with those obtained from bladder smooth muscle and described above.

Discussion

The major goal of the current study was to determine the functional significance of h1-CaP up-regulation in

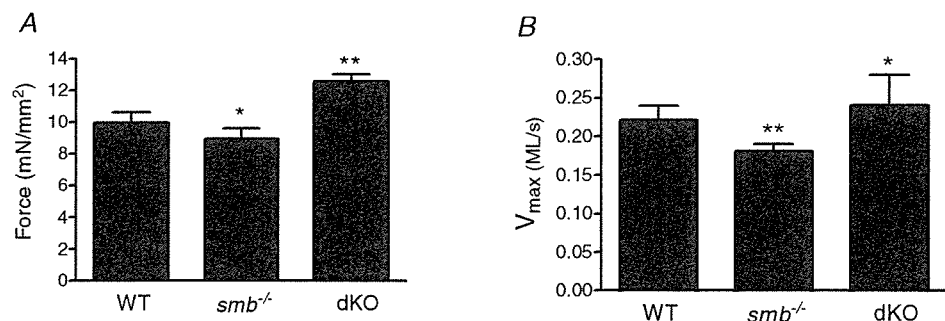


Figure 6. Functional measurements on *smb*^{-/-} and dKO bladder
 A, force; B, V_{max}. Data are means \pm S.E.M. ($P < 0.05$). *Not significantly different from WT. **Significantly different from the other two groups.

Table 1. Contractile properties of mesenteric vessels

Experimental parameters	WT (n = 5)	<i>smb</i> ^{-/-} (n = 6)	dKO (n = 5)
Maximal relaxed lumen diameter at 50 mmHg (μm)	196 \pm 17.6	198 \pm 16.5	200 \pm 10.3
Maximal constriction (% decrease in lumen diameter)	79 \pm 3.3	80 \pm 1.6	79 \pm 1.5
Time to 50% constriction (s)	4.2 \pm 0.49 \dagger	5.2 \pm 0.68*	5.6 \pm 0.58*
Slope of constriction (normalized: % change in lumen diameter s ⁻¹)	12.8 \pm 1.45 \dagger	10.5 \pm 1.33*	9.6 \pm 1.37*
Forced dilatation pressure (mmHg)	204 \pm 6.7 \dagger	183 \pm 7.8*	202 \pm 8.2 \dagger

Vessels were constricted with an activation cocktail containing phenylephrine (10 μM) and potassium (124 mM). Different symbols (\dagger ,*) indicate significant differences ($P < 0.05$) between groups; identical symbols are not significantly different from each other. All comparisons performed by two-way ANOVA.

SM-B null mice (Babu *et al.* 2004). To critically assess the role of h1-CaP in the contractile function of SM-B null smooth muscles, we ablated h1-CaP in the SM-B null background by crossing h1-CaP and SM-B single knockout mice. The key findings of this study are as follows. (1) Ablation of CaP in the SM-B null mice bladder resulted in increased V_{max} and steady-state force generation. (2) In mesenteric vessels, the maximal force as measured by forced dilatation was increased in the dKO mice, and the higher maximal force allows the vessel to shorten faster under a load. The shortening velocity, however, was decreased in both *smb*^{-/-} and dKO vessels. (3) Interestingly, these functional changes were observed with a decrease in smooth muscle α -actin levels and an increase in caldesmon levels.

We have previously shown that switching of SM-B to SM-A myosin in a SM-B null mouse model resulted in decreased velocity of shortening (Babu *et al.* 2001; Karagiannis *et al.* 2003) and increased expression of h1-CaP (Babu *et al.* 2004). The available data strongly suggest that h1-CaP is involved in the regulation of actin-myosin interaction and therefore the kinetics of smooth muscle contractility (Takahashi & Yamamura, 2003). Ablation of h1-CaP significantly increases the unloaded shortening velocity in phasic smooth muscle tissues such as bladder and vas deferens (Matthew *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2000). These findings taken together suggest that the up-regulation of h1-calponin could negatively influence the velocity of shortening in SM-B null mice. Therefore, the dKO mouse model lacking both h1-CaP and SM-B myosin provide us with an excellent model to determine the functional significance of h1-CaP up-regulation in SM-B null mice. In dKO mice, loss of both h1-CaP and SM-B myosin proteins does not affect survival or cause any overt smooth muscle pathology as observed in the individual knockout animals (Yoshikawa *et al.* 1998; Babu *et al.* 2001). Loss of h1-CaP is not compensated by other CaP isoforms (Fig. 1C) and consistent with the previous studies on h1-CaP single knockout (Yoshikawa *et al.* 1998). Interestingly, loss of CaP in the SM-B null background is associated with \sim 40% reduction in the smooth muscle α -actin levels. However, loss of h1-CaP does not affect the β - and γ -actin isoforms (Figs 1, 4 and 5). These

changes are also consistent with changes associated with CaP single knockout mice (Matthew *et al.* 2000) and indicate the preservation of the CaP null phenotype in the dKO mice.

As previously reported, the loss of SM-B myosin does not alter the unitary force generation in bladder muscle compared to the WT bladder (Karagiannis *et al.* 2003, 2004). However, ablation of h1-CaP resulted in increased steady-state force generation in the SM-B null mice. Increased steady-state force generation under conditions where LC₂₀ were maximally, irreversibly phosphorylated, and in the absence of structural changes (as observed by histology) suggests that h1-CaP may play a role in modulating bladder smooth muscle contractility. However, these results differ from the previous report using h1-CaP single knockout mice, which showed no significant difference in force development in the skinned bladder muscles between WT and h1-CaP null mice (Matthew *et al.* 2000), and rather decreased force production in intact vas deferens and aortic smooth muscles (Takahashi *et al.* 2000; Fujishige *et al.* 2002). The unexpected increase in force in the dKO bladder could be due to the complete replacement of SM-B by the SM-A myosin isoform in the bladder and/or other compensatory changes yet to be analysed.

In agreement with previous results, the WT bladder shortened at a rate 20% faster than the *smb*^{-/-} bladder (Karagiannis *et al.* 2003). The V_{max} , however, was significantly increased in the dKO bladder as compared to *smb*^{-/-} bladder, under conditions in which the levels of myosin thiophosphorylation were similar. These results indicate that myosin light chain phosphorylation does not contribute for the observed velocity changes. A similar increase in V_{max} has been reported for h1-CaP single knockout (Matthew *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2000). We have previously shown that the 7 amino acid insert regulates the earlier rate-limiting step including nucleotide binding and inorganic phosphate release (Karagiannis *et al.* 2003) whereas CaP is proposed to regulate the later steps in the cross-bridge cycle such as dissociation of high-affinity cross-bridges from actin, by binding to actin (EL-Mezgueldi & Marston, 1996; Takahashi & Yamamura, 2003). Therefore, both h1-CaP and SM-B myosin could