

200811016A

# 厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

心筋細胞死誘導による  
心不全発症の新規モデルマウスの開発

(H20-生物資源-一般-001)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 赤澤 宏

平成21（2009）年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 心筋細胞死誘導による心不全発症の新規モデルマウスの開発 ----- 1  
赤澤 宏

### II. 分担研究報告

1. 動物モデルに対する薬物治療の効果判定 ----- 6  
小室 一成
2. 心不全誘導のプロトコールの検討 ----- 9  
塩島 一朗

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

### IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 14

研究要旨 心不全の創薬研究の推進のために、心不全発症の経過を自在にコントロールできる新規の心不全モデルマウスの作製を行っている。マウス作製のためのトランスジェンが培養細胞系で機能することを確認した後に、トランスジェニックマウスの作製を行った。心筋細胞におけるトランスジェンの発現に問題点があるが、再度インジェクションを行うことで目的とするマウスが得られると期待される。一方、ジフテリア毒素受容体の発現誘導のためのタモキシフェン投与プロトコルを確立し、このモデルマウスが薬物治療の効果判定に有用性を発揮することが確認された。

(研究代表者)

赤澤 宏 千葉大学大学院医学研究院  
循環病態医科学講師

(研究分担者)

小室 一成 千葉大学大学院医学研究院  
循環病態医科学教授

塩島 一郎 大阪大学大学院医学系研究科  
先進心血管治療学寄附講座  
准教授

## A. 研究目的

わが国では生活習慣の欧米化や高齢化にともなわぬ心不全患者が急増しているが、心不全の予後は依然として不良であり、心不全に対する創薬のニーズは非常に高い。創薬研究には、標的分子の同定や薬効試験、安定性検定のためにモデル動物が必要である。心不全は、心筋障害や心筋細胞死をトリガーとして、残存心筋に過剰な血行力学的負荷がかかることで構築変化が生じ発症すると考えられる。

本研究の目的は、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを確立し、創薬に役立てることである。私たちはジフテリア毒素 (DT) による心不全モデルマウスを作製した。DT 受容体はヘパリン結合性 EGF 様増殖因子前駆体 (proHB-EGF) で

あるが、マウス proHB-EGF は DT 受容体として機能しない。心筋特異的にヒト proHB-EGF 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスでは、DT 投与によって受容体を発現する心筋細胞が細胞死を生じる。しかし、このマウスでは約 17% の心筋細胞しか DT 受容体を発現しておらず、量的に多様な心筋細胞死を誘導することができない。そこで、全ての心筋細胞で DT 受容体の発現誘導が可能で、任意に心筋細胞死の割合を制御することで、心不全発症の経過を自在にコントロールできる新規モデルマウスの作製を計画した。

## B. 研究方法

### 動物モデルの開発と解析

Chicken  $\beta$ -actin プロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーの下流に、loxP 配列で挟まれた  $\beta$ -galactosidase 遺伝子、その下流にヒト proHB-EGF 遺伝子を組み込んだトランスジェンを作製した。このトランスジェンを用いてトランスジェニックマウス (CAG inducible proHBEGF マウス) を作製した。F1 マウスに対して、トランスジェンの発現パターンについて心臓組織を X-gal 染色することで検討を行った。

### 心不全誘導のプロトコールの検討

タモキシフェン投与によって心筋特異的にCre発現を誘導できるMerCreMerマウスにおいて、Cre/loxP系を介した遺伝子発現調節システムを作動させるためのタモキシフェン投与プロトコールについて検討を行った。MerCreMerマウスとCre/loxP系のインディケーターマウスであるCAG-CAT-LacZマウスとの交配を行い、種々のプロトコールでタモキシフェンの投与を行い、遺伝子発現誘導の最適条件を検討した。なお、CAG-CAT-LacZマウスでは、Cre/loxPによる遺伝子組換えが生じるとLacZ遺伝子の発現がオンとなるので、X-gal染色を行うことでLacZ遺伝子の発現が誘導された細胞を同定することができる。

### 動物モデルに対する薬物治療の効果判定

約17%の心筋細胞においてジフテリア毒素受容体を恒常的に発現するモデルマウスの作製は完了している。このモデルマウスでは、ジフテリア毒素を筋肉内投与すると心不全を発症する。まずはこの系において、アンジオテンシンII受容体ブロックであるオルメサルタンの心不全発症に対する抑制効果を検討した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

## C. 研究結果

### 動物モデルの開発と解析

Chicken  $\beta$ -actinプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーの下流に、loxP配列で挟ま

れた $\beta$ -galactosidase遺伝子、その下流にヒトproHB-EGF遺伝子を組み込んだトランスジーンを作成した。このトランスジーンはCOS7細胞に遺伝子導入すると $\beta$ -galactosidase遺伝子が発現してX-gal染色で青染すること、およびCreの発現ベクターと共に遺伝子導入するとヒトproHB-EGF遺伝子の発現が誘導されることを確認した。

このトランスジーン用いてトランスジェニックマウス(CAG inducible proHBEGFマウス)を作成しF0マウス21匹を得た。このうち4ラインでgermline transmissionが確認でき、トランスジーン発現パターンについて心臓組織をX-gal染色することで検討した。その結果、2ラインでトランスジーン発現が認められたが、発現がモザイク状で、発現比率にも個体差が見られた。すべての心筋細胞でトランスジーンを発現するマウスを得るために、受精卵へのマイクロインジェクションを再度行っている。

### 心不全誘導のプロトコールの検討

コーンオイルに溶解したタモキシフェンを20mg/kg/dayの用量で1日1回、5日間腹腔内投与することで、全ての心筋細胞においてCre/loxPによる遺伝子組換えを誘導することができることが明らかとなった。

さらに、この投与プロトコールを軸に、投与日数あるいは投与量を変えることで、Cre/loxPによる遺伝子組換えが生じる割合を制御できることを確認した。

### 動物モデルに対する薬物治療の効果判定

ジフテリア毒素の筋肉内投与2日前からオルメサルタン(1.5mg/kg/day)を浸透圧ポンプにて28日間投与した。オルメサルタン投与群では心筋細胞死誘導は変化なかったが、心内腔の拡大や心収縮の低下、心筋線維化が軽減され、心不全の進行が著明に遅延した。

#### D. 考察

新規モデルマウス作製のためのトランスジーンが培養細胞系で機能することを確認した後に、トランスジェニックマウスの作製を行った。しかし、得られた2ラインのトランスジェニックマウスでは、トランスジーンが発現に関して問題点が見つかっている。受精卵へのマイクロインジェクションを再度行うことで、目的とするモデルマウスが得られ、プロジェクトを推進できるものと考えている。

一方、CAG-CAT-loxP インディケーターマウスを用いた検討により、タモキシフェン投与のプロトコルが確定した。今後、ジフテリア毒素受容体の発現誘導にも適応できると考えられる。

また、心筋細胞死誘導による心不全モデルマウスにおいて、アンジオテンシン II 受容体ブロッカーは早期からの投与によって、心臓リモデリングを抑制することが可能であることが示唆された。現在作製中の新規モデルマウスにおいては、ジフテリア毒素受容体の発現を量的、時間的、空間的に任意に制御することが可能であり、薬物治療の評価にさらに有用性を発揮すると期待される。

#### E. 結論

ジフテリア毒素投与により心筋細胞死を特異的に、さらに任意にコントロールすることができる新規モデルマウスの作製を行っている。ジフテリア毒素受容体の発現誘導のためのタモキシフェン投与プロトコルを確立した。このモデルマウスは薬物治療の効果判定に有用であると期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yasuda N, Akazawa H, Qin Y, Zou Y, Komuro I. A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1 receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 37, 393-399, 2008.
- Ajima R, Akazawa H, Kodama M, Takeshita F, Otsuka A, Kohno T, Komuro I, Ochiya T, Yokota J. Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations. *Genes Cells.* 13, 987-999, 2008.
- Fujita T, Ohtsuka M, Uchida E, Yamaguchi H, Nakajima T, Akazawa H, Takano H, Nakaya H, Komuro I. Takayasu arteritis evaluated by multi-slice computed tomography in an old man. *Int J Cardiol.* 2008;125:286-7.
- Utsumi T, Ohtsuka M, Uchida E, Yamaguchi H, Nakajima T, Akazawa H, Takano H, Nakaya H, Komuro I. Abdominal aortic pseudoaneurysm caused by prolonged methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis. *Int J Cardiol.* 2008;128:294-5.
- Minamino T, Komuro I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 5:637-48, 2008.
- Toko H, Minamino T, Komuro I. Role of heart shock transcriptional factor 1 and heart shock proteins in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med.* 18:88-93, 2008.
- Nishi J, Minamino T, Miyauchi H, Nojima A, Tateno K, Okada S, Orimo M, Moriya J, Fong GH, Sunagawa K, Shibuya M, Komuro I. Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive

activation of Akt. *Circ Res.* 103:261-268, 2008.

・ Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE.* 3:e2407, 2008.

・ Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito, AT, Nishi JI, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature.* 454:345-9, 2008.

・ Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, Shiojima I, Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, Nagai R, Komuro I. A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol.* 10:567-574, 2008.

・ Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, Walsh K, Bernal-Mizrachi E. mTORC1 activation regulates  $\beta$ -cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem.* 284:7832-42, 2009.

・ Akazawa H, Komuro I. "Change Can Happen" by PKA: Proteasomes in in vivo Hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 46:445-447, 2009.

・ Akazawa H, Yasuda, N, Komuro I. Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 302:140-147, 2009.

・ Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J.* 73:214-220, 2009.

## 2. 学会発表

国内

(赤澤 宏)

・ 第5回GPCR研究会(東京:2008年5月9日): 「インバースアゴニストによるアンジオテンシンII受容体活性の抑制機構」

・ 第12回日本心不全学会学術集会(東京:2008年10月16-18日)シンポジウム「遺伝子改変マウスを用いた心不全・心肥大の病態解明」"Homeostatic role of PDK-1 in the regulation of beta-adrenergic response and cell survival in the hearts."

・ 日本循環器学会学術集会(大阪:2009年3月20-22日)Symposium 9. Cardiomyocyte Death and Cardiac Remodeling. "Homeostatic role of Atg7 in normal and stressed hearts."

(小室 一成)

・ 第51回日本糖尿病学会年次学術集会イブニングセミナー7(平成20年5月23日、東京)「心血管イベント抑制から考えた糖尿病治療-Lessons from PERISCOPE」

・ 第50回日本老年医学会学術集会(平成20年6月19日、千葉)「高血圧治療における血管保護の重要性」

・ 第21回東海心筋代謝研究会(平成20年7月4日、名古屋)「心不全モデルマウスから考える分子メカニズム」

・ 第27回高血圧シンポジウム-基礎から臨床まで-(平成20年7月12日、大阪)「心肥大から心不全発症の分子機序」

・ 第45回日本臨床分子医学会学術集会(平成20年7月24日、大阪)「心不全発症の分子機序」

・ 日本血管生物医学会 プレスセミナー(平成20年9月24日、東京)「心肥大はなぜ怖い!? 癌より怖い心不全」

・ 第8回日本再生医療学会総会(平成20年3月6

日、東京)「老化という視点から考える血管疾患と血管新生」

(塩島 一朗)

・ Molecular Cardiovascular Conference (平成 20 年 9 月 5-7 日, 小樽) “IGFBP-4-mediated Wnt inhibition is required for cardiac myogenesis.”

海外

(赤澤 宏)

・ Keystone Symposium on GPCRs (May 18-23, 2008, Killarney, Ireland) “Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation.”

(小室 一成)

・ The 2<sup>nd</sup> Oriental Congress of Cardiology (Shanghai, China, May 30-June 1, 2008) “Molecular Mechanisms of Heart Failure.”

・ Stems of the Heart: Myocardial and Vascular Rebirth(Boston, USA, Sep 11-13, 2008) “A Novel Cardiomyocyte Differentiation Factor.”

(塩島 一朗)

・ Basic Cardiovascular Sciences Conference 2008 (Keystone, USA, July 28-31, 2008) “IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signaling required for cardiogenesis.”

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

**研究要旨** 心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを用いて、アンジオテンシン II 受容体ブロッカーであるオルメサルタンの治療効果を検討した。心筋細胞死誘導の2日前からオルメサルタンを28日間投与することで、心臓リモデリングが顕著に抑制された。このモデルマウスを原型として、さらに心筋細胞死を量的、時間的に任意に制御できる新規モデルマウスを作製中である。心筋細胞死誘導をトリガーとする心不全発症のモデルマウスを用いて薬物の治療効果の評価が可能であることが示され、とくにアンジオテンシン II 受容体ブロッカーは早期からの投与により治療効果が発揮されることが明らかとなった。

## A. 研究目的

わが国では生活習慣の欧米化や高齢化にともない心不全患者が急増しているが、心不全の予後は依然として不良であり、心不全に対する創薬のニーズは非常に高い。創薬研究には、標的分子の同定や薬効試験、安定性検定のためにモデル動物が必要である。心不全は、心筋障害や心筋細胞死をトリガーとして、残存心筋に過剰な血行力学的負荷がかかることで構築変化が生じ発症すると考えられる。本研究の目的は、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを確立し、創薬に役立てることである。分担研究者は、動物モデルに対する薬物治療の効果判定を担当している。

## B. 研究方法

本研究では、タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスを用いて、ジフテリア毒素受容体を心筋特異的に任意に発現させた後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、ジフテリア毒素受容体発現心筋細胞を傷害させて、心不全を誘導するモデルマウスの確立を目指している。一方、約17%の心筋細胞においてジフテリア毒素受容体を恒常的に発現するモデ

ルマウスの作製は完了している。このモデルマウスに対して、ジフテリア毒素を筋肉内投与すると心不全を発症する。まずはこの系において、アンジオテンシン II 受容体ブロッカーであるオルメサルタンの心不全発症に対する抑制効果を検討した。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

## C. 研究結果

ジフテリア毒素の筋肉内投与2日前からオルメサルタン（1.5mg/kg/day）を浸透圧ポンプにて28日間投与した。オルメサルタン投与群では心筋細胞死誘導は変化なかったが、心内腔の拡大や心収縮の低下、心筋線維化が軽減され、心不全の進行が著明に遅延した。



## D. 考察

アンジオテンシン II 受容体ブロッカーは早期からの投与によって、心臓リモデリングを抑制することが可能であることが、このモデルマウスを用いた実験によって示唆された。現在作製中の新規モデルマウスにおいては、ジフテリア毒素受容体の発現を量的、時間的、空間的に任意に制御することが可能である。心不全に対するアンジオテンシン II 受容体ブロッカーの治療効果は心不全の重症度や経過によって影響を受けるのか、今後の検討が必要と考える。

## E. 結論

心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを用いて、薬物の治療効果の評価が可能であることが示された。心筋細胞死をトリガーとして発症する心不全に対しては、アンジオテンシン II 受容体ブロッカーを早期から投与することで治療効果が発揮されることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito, AT, Nishi JI, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*. 454:345-9, 2008.
- Minamino T, Komuro I. Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 5:637-48, 2008.
- Toko H, Minamino T, Komuro I. Role of heart

shock transcriptional factor 1 and heart shock proteins in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med*. 18:88-93, 2008.

- Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, Shiojima I, Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, Nagai R, Komuro I. A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol*. 10:567-574, 2008.
- Nishi J, Minamino T, Miyauchi H, Nojima A, Tateno K, Okada S, Orimo M, Moriya J, Fong GH, Sunagawa K, Shibuya M, Komuro I. Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt. *Circ Res*. 103:261-268, 2008.
- Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J*. 73:214-220, 2009.
- Akazawa H, Komuro I. "Change Can Happen" by PKA: Proteasomes in in vivo Hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 46:445-7, 2009.
- Yasuda N, Akazawa H, Qin Y, Zou Y, Komuro I. A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1 receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 37:393-9, 2008.
- Ajima R, Akazawa H, Kodama M, Takeshita F, Otsuka A, Kohno T, Komuro I, Ochiya T, Yokota J. Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations. *Genes Cells*. 13:987-99, 2008.
- Fujita T, Ohtsuka M, Uchida E, Yamaguchi H, Nakajima T, Akazawa H, Takano H, Nakaya H, Komuro I. Takayasu arteritis evaluated by multi-slice computed tomography in an old man. *Int J Cardiol*.

125:286-7, 2008.

・ Utsumi T, Ohtsuka M, Uchida E, Yamaguchi H, Nakajima T, Akazawa H, Takano H, Nakaya H, Komuro I. Abdominal aortic pseudoaneurysm caused by prolonged methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis. *Int J Cardiol.* 128:294-5, 2008.

## 2. 学会発表

・ 第51回日本糖尿病学会年次学術集会イブニングセミナー 7 (平成20年5月23日、東京)「心血管イベント抑制から考えた糖尿病治療-Lessons from PERISCOPE」

・ 第50回日本老年医学会学術集会 (平成20年6月19日、千葉)「高血圧治療における血管保護の重要性」

・ 第21回東海心筋代謝研究会 (平成20年7月4日、名古屋)「心不全モデルマウスから考える分子メカニズム」

・ 第27回高血圧シンポジウム-基礎から臨床まで- (平成20年7月12日、大阪)「心肥大から心不全発症の分子機序」

・ 第45回日本臨床分子医学会学術集会 (平成20年7月24日、大阪)「心不全発症の分子機序」

・ 日本血管生物医学会 プレスセミナー (平成20年9月24日、東京)「心肥大はなぜ怖い!? 癌より怖い心不全」

・ 第8回日本再生医療学会総会 (平成21年3月6日、東京)「老化という視点から考える血管疾患と血管新生」

・ The 2<sup>nd</sup> Oriental Congress of Cardiology (Shanghai, China, May 30-June 1, 2008) "Molecular Mechanisms of Heart Failure."

・ Stems of the Heart: Myocardial and Vascular

Rebirth(Boston, USA, Sep 11-13, 2008) "A Novel Cardiomyocyte Differentiation Factor."

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究要旨 心不全の創薬研究の推進のために、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスの作製を行っている。タモキシフェン投与によりジフテリア毒素受容体を心筋細胞に任意に発現させ、さらにジフテリア毒素の投与により心筋細胞死を誘導する。分担研究では、Cre/loxP による遺伝子組換えのインディケーターマウスを用いて、タモキシフェン投与による遺伝子発現誘導のプロトコールの最適化を行った。

## A. 研究目的

わが国では生活習慣の欧米化や高齢化にともなわぬ心不全患者が急増しているが、心不全の予後は依然として不良であり、心不全に対する創薬のニーズは非常に高い。創薬研究には、標的分子の同定や薬効試験、安定性検定のためにモデル動物が必要である。心不全は、心筋障害や心筋細胞死をトリガーとして、残存心筋に過剰な血行力学的負荷がかかることで構築変化が生じ発症すると考えられる。本研究の目的は、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを確立し、創薬に役立てることである。分担研究者は、心筋細胞誘導のプロトコールの検討を担当している。

## B. 研究方法

タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスを用いて、ジフテリア毒素受容体を心筋特異的に任意に発現させた後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、ジフテリア毒素受容体発現心筋細胞を傷害させて、心不全を誘導するモデルマウスの確立を目指している。MerCreMer マウスにおいて、Cre/loxP 系を介した遺伝子発現調節システムを作動させるためのタモキシフェン投与プロトコールについて検討を行った。MerCreMer マウスと Cre/loxP 系のインデ

ケーターマウスである CAG-CAT-LacZ マウスとの交配を行い、種々のプロトコールでタモキシフェンの投与を行い、遺伝子発現誘導の最適条件を検討した。なお、CAG-CAT-LacZ マウスでは、Cre/loxP による遺伝子組換えが生じると LacZ 遺伝子の発現がオンとなる。X-gal 染色を行うことで LacZ 遺伝子の発現が誘導された細胞を同定することができる。

## （倫理面への配慮）

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

## C. 研究結果

コーンオイルに溶解したタモキシフェンを 20 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与することで、全ての心筋細胞において Cre/loxP による遺伝子組換えを誘導することができることが明らかとなった。

さらに、この投与プロトコールを軸に、投与日

数あるいは投与量を変えることで、Cre/loxPによる遺伝子組換えが生じる割合を制御できることを確認した。

#### D. 考察

CAG-CAT-loxP インディケーターマウスを用いた検討により、タモキシフェン投与のプロトコールが確定した。今後、ジフテリア毒素受容体の発現誘導にも適応できると考えられる。

#### E. 結論

MerCreMer マウスにおいて、Cre/loxP 系による遺伝子組換え誘導のための、タモキシフェン投与プロトコールを確立した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, Walsh K, Bernal-Mizrachi E. mTORC1 activation regulates  $\beta$ -cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem.* 284:7832-42, 2009.

・ Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE.* 3:e2407, 2008.

・ Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature.* 454:345-9, 2008.

・ Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, Shiojima I, Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, Nagai R, Komuro I. A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol.* 10:567-74, 2008.

##### 2. 学会発表

・ Basic Cardiovascular Sciences Conference 2008 (Keystone, USA, July 28-31, 2008) "IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signaling required for cardiogenesis."

・ Molecular Cardiovascular Conference (平成 20 年 9 月 5-7 日, 小樽) "IGFBP-4-mediated Wnt inhibition is required for cardiac myogenesis."

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

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
Yasuda N, <u>Akazawa H</u> , Qin Y, Zou Y <u>Komuro I</u>	A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type I receptor activation without the involvement of angiotensin II.	Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol	37	393-399	2008
Ajima R, <u>Akazawa H</u> , Kodama M, Takeshita F, Otsuka A, Kohno T, <u>Komuro I</u> , Ochiya T, Yokota J	Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations.	Genes Cells	13	987-999	2008
Fujita T, Ohtsuka M, Uchida E, Yamaguchi H, Nakajima T, <u>Akazawa H</u> , Takano H, Nakaya H, <u>Komuro I</u>	Takayasu arteritis evaluated by multi-slice computed tomography in an old man.	Int J Cardiol	125	286-287	2008
Utsumi T, Ohtsuka M, Uchida E, Yamaguchi H, Nakajima T, <u>Akazawa H</u> , Takano H, Nakaya H, <u>Komuro I</u>	Abdominal aortic pseudoaneurysm caused by prolonged methicillin-resistant Staphylococcus aureus sepsis.	Int J Cardiol	128	294-295	2008
Minamino T, <u>Komuro I</u>	Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes.	Nat Clin Pract Cardiovasc Med	5	637-648	2008
Toko H, Minamino T, <u>Komuro I</u>	Role of heart shock transcriptional factor 1 and heart shock proteins in cardiac hypertrophy.	Trends Cardiovasc Med	18	88-93	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishi J, Minamino T, Miyachi H, Nojima A, Tateno K, Okada S, Orimo M, Moriya J, Fong GH, Sunagawa K, Shibuya M, <u>Komuro I</u>	Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt.	Circ Res	103	261-268	2008
Kami D, <u>Shiojima I</u> , Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, <u>Komuro I</u> , Umezawa A	Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis.	PLoS ONE	3	e2407	2008
Zhu W, <u>Shiojima I</u> , Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, <u>Komuro I</u>	IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis.	Nature	454	345-349	2008
Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, <u>Shiojima I</u> , Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, Nagai R, <u>Komuro I</u>	A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis.	Nat Cell Biol	10	567-574	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, <u>Shiojima I</u> , Walsh K, Bernal-Mizrachi E	mTORC1 activation regulates $\beta$ -Cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability.	J Biol Chem	284	7832-7842	2009
<u>Akazawa H</u> , <u>Komuro I</u>	"Change Can Happen" by PKA: Proteasomes in in vivo Hearts.	J Mol Cell Cardiol	46	445-447	2009
<u>Akazawa H</u> , Yasuda N, <u>Komuro I</u>	Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor.	Mol Cell Endocrinol	302	140-147	2009
Takano H, <u>Komuro I</u>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma and cardiovascular diseases.	Circ J	73	214-220	2009

## A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1–receptor activation without the involvement of angiotensin II

Noritaka Yasuda · Hiroshi Akazawa · Yingjie Qin · Yunzeng Zou · Issei Komuro

Received: 10 August 2007 / Accepted: 31 October 2007 / Published online: 29 November 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** The angiotensin II (AngII) type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor is a seven transmembrane-spanning G-protein-coupled receptor, and the activation of AT<sub>1</sub> receptor plays an important role in the development of load-induced cardiac hypertrophy. Locally generated AngII was believed to trigger cardiac hypertrophy by an autocrine or paracrine mechanism. However, we found that mechanical stress can activate AT<sub>1</sub> receptor independently of AngII. Without the involvement of AngII, mechanical stress not only activates extracellular signal-regulated kinases *in vitro*, but also induces cardiac hypertrophy *in vivo*. All of these events are inhibited by candesartan as an inverse agonist for AT<sub>1</sub> receptor. It is conceptually novel that AT<sub>1</sub> receptor directly mediates mechanical stress-induced cellular responses, and inverse-agonist activity emerges as an important pharmacological parameter for AT<sub>1</sub>-receptor blockers that determines their efficacy in preventing organ damage in cardiovascular diseases.

**Keywords** Angiotensin II type 1–receptor blocker · Conformational change · Inverse agonist · Mechanical stress

### Introduction

Cardiac hypertrophy is one of the most important organ damages induced by pressure overload such as hypertension. Cardiac hypertrophy is not only an adaptive state that precedes heart failure, but also an independent risk factor for major cardiac events, such as ischemic heart disease, arrhythmia and sudden death (Levy et al. 1990). Therefore, it is important to elucidate the molecular mechanism underlying the development of cardiac hypertrophy. Many experimental studies have shown that various humoral factors such as vasoactive peptides, the sympathetic nervous system, cytokines and growth factors contribute to the development of cardiac hypertrophy. All components of the renin-angiotensin system such as angiotensinogen, renin, angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptors have been identified in the heart (Baker et al. 1992; Lee et al. 1993). Angiotensin II (AngII) evokes hypertrophic responses such as protein synthesis and reprogramming of gene expression via AngII type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor in cardiomyocytes (Lee et al. 1993).

However, mechanical stress is by far the most important stimulus for the development of cardiac hypertrophy. Actually, mechanical stress induces a variety of hypertrophic responses in cardiomyocytes (Komuro and Yazaki 1993). Furthermore, pretreatment of cardiomyocytes with AT<sub>1</sub>-receptor blockers (ARBs) significantly attenuates all of these mechanical stretch-induced hypertrophic responses (Sadoshima et al. 1993; Yamazaki et al. 1995). These results indicate that mechanical stress induces cardiac hypertrophy through the AT<sub>1</sub> receptor. It has been proposed

N. Yasuda · H. Akazawa · Y. Qin · I. Komuro (✉)  
Department of Cardiovascular Science and Medicine,  
Chiba University Graduate School of Medicine,  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku,  
Chiba 260-8670, Japan  
e-mail: komuro-iky@umin.ac.jp

H. Akazawa  
Division of Cardiovascular Pathophysiology,  
Chiba University Graduate School of Medicine,  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku,  
Chiba 260-8670, Japan

Y. Zou  
Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases,  
Zhongshan Hospital, Fudan University,  
180 Feng Lin Road,  
Shanghai 200032, China



that AngII is stored in cardiomyocytes and that mechanical stretch induces the secretion of stored AngII into the culture medium, resulting in the induction of cardiomyocyte hypertrophy by the autocrine mechanism (Fig. 1a) (Sadoshima et al. 1993). However, we found a novel mechanism for mechanical stress-induced AT<sub>1</sub>-receptor activation without the involvement of AngII, and discovered that this activation is inhibited by the inverse agonist candesartan (Fig. 1b) (Zou et al. 2004).

### Mechanical stress-induced AT<sub>1</sub>-receptor activation without the involvement of AngII

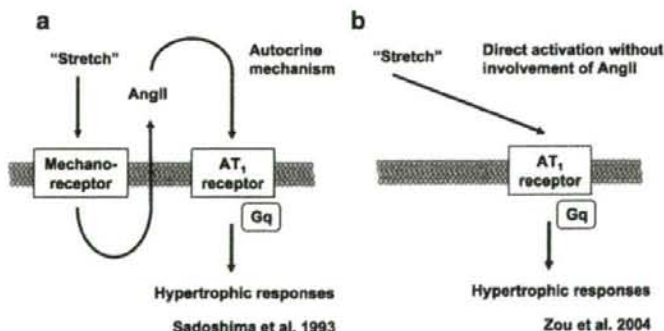
To examine whether AngII is secreted from cardiomyocytes into the culture medium by stretch, we first measured AngII concentration in the medium conditioned by stretching cardiomyocytes. We did not detect a significant increase in AngII concentration after stretch (AngII concentration without stretch,  $0.7 \pm 1.6 \times 10^{-12}$  M; AngII concentration with stretch,  $2.0 \pm 3.5 \times 10^{-12}$  M) (Zou et al. 2004). The concentration of AngII in the conditioned medium was not sufficient to evoke extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) activation in cardiomyocytes, because the magnitude of ERK activation by stretch was equivalent to that observed when the cardiomyocytes were stimulated by  $10^{-8}$  to  $10^{-7}$  M of AngII (Zou et al. 2004). Furthermore, a neutralizing antibody to AngII did not suppress the stretch-induced ERK activation in cardiomyocytes, although the antibody abolished AngII ( $10^{-7}$  M)-induced ERK activation (Zou et al. 2004). These results suggest that stretch-induced ERK activation is largely dependent on AT<sub>1</sub> receptor, and that AngII, even if secreted from cardiomyocytes, plays a marginal role in stretch-induced ERK activation.

Next, to examine the possibility that mechanical stress can directly activate the AT<sub>1</sub> receptor without the involve-

ment of AngII, we used human embryonic kidney (HEK) 293 cells and COS7 cells, neither of which showed a detectable expression of AT<sub>1</sub> receptor and angiotensinogen. Neither mechanical stretch nor AngII ( $10^{-7}$  M) activated ERKs in HEK293 cells (Fig. 2a), but forced expression of AT<sub>1</sub> receptor conferred the ability to activate ERKs in response to both mechanical stretch and AngII (Fig. 2b). Pretreatment with candesartan inhibited the ERK activation induced not only by AngII but also by mechanical stretch in HEK293 cells expressing AT<sub>1</sub> receptor (Fig. 2b). In addition, basal ERK activity was decreased by candesartan in HEK293 cells expressing AT<sub>1</sub> receptor (Fig. 2a,b) (Zou et al. 2004). Similar results were obtained in experiments using COS7 cells.

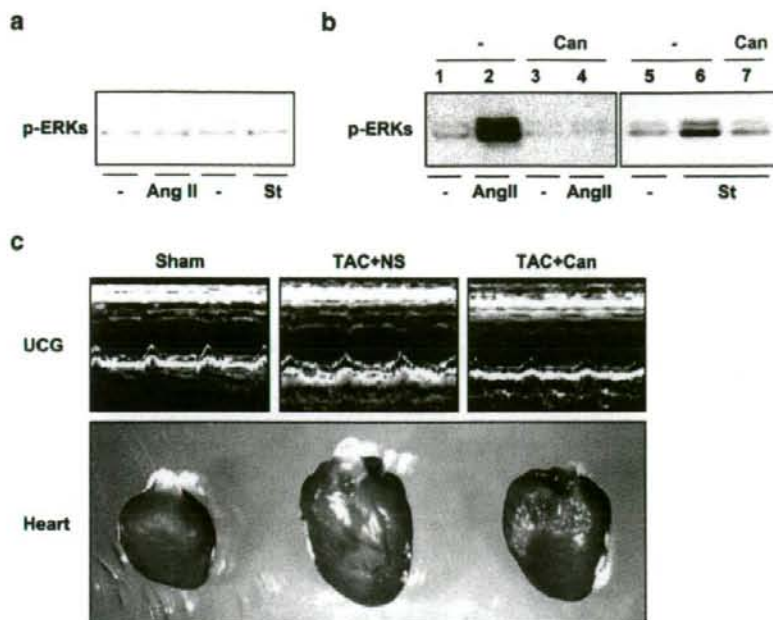
We also stretched HEK293 cells expressing AT<sub>1</sub>-mutant receptor with impaired AngII binding (Yamano et al. 1992). AngII did not activate ERKs in these cells, as expected. However, ERKs were strongly activated by mechanical stretch, and this activation was inhibited by candesartan (Zou et al. 2004). To confirm whether mechanical stretch activates AT<sub>1</sub> receptor independently of AngII in cardiomyocytes, we stretched cardiomyocytes prepared from *angiotensinogen*-deficient mice, in which AngII is not produced (Tanimoto et al. 1994). Mechanical stretch activated ERKs in the cardiomyocytes prepared from both neonatal and adult *angiotensinogen*-deficient mice. Pretreatment with candesartan markedly suppressed stretch-induced ERK activation in these cells (Zou et al. 2004).

Finally, we examined whether mechanical stress could induce cardiac hypertrophy *in vivo* through the AT<sub>1</sub> receptor in the absence of AngII. We imposed a pressure overload on the heart by constricting the transverse aorta of adult male *angiotensinogen*-deficient mice. Pressure overload induced cardiac hypertrophy even in *angiotensinogen*-deficient mice (Fig. 2c). Furthermore, although treatment with candesartan did not reduce blood pressure in the right carotid artery, the



**Fig. 1** A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II (AngII) type 1 (AT<sub>1</sub>)-receptor activation without the involvement of AngII. **a** Mechanical stretch induces the secretion of stored AngII, and AngII subsequently evokes hypertrophic responses via AT<sub>1</sub> receptor

by an autocrine mechanism (Sadoshima et al. 1993). **b** AT<sub>1</sub> receptor can be activated directly by mechanical stress through an AngII-independent mechanism (Zou et al. 2004)



**Fig. 2** Angiotensin II (AngII)-independent activation of ERKs via angiotensin II type 1 ( $AT_1$ ) receptor by mechanical stretch. Modified from Zou et al. (2004). **a** Neither mechanical stretch nor AngII activated ERKs in HEK293 cells. HEK293 cells were stretched by 20% (St) or exposed to  $10^{-7}$  M AngII for 8 min. **b** In HEK293 cells expressing  $AT_1$  receptor, both mechanical stretch and AngII activated ERKs (lanes 2 and 6). Pretreatment with  $10^{-7}$  M candesartan inhibited the activation of ERKs induced not only by AngII (lane 4) but also by mechanical stretch

(lane 7). **c** Cardiac hypertrophy in *angiotensinogen*-deficient mice induced by pressure overload. Ten-week-old male *angiotensinogen*-deficient mice, treated with saline (NS) or candesartan (Can), were subjected to a sham or transverse aorta-constricting (TAC) operation. Echocardiography was done 2 weeks later. Pressure overload induced cardiac hypertrophy even in *angiotensinogen*-deficient mice. Pretreatment with candesartan attenuated this development. *Top* M-mode echocardiograms, *bottom* gross appearance of the heart

development of cardiac hypertrophy was significantly attenuated by candesartan (Fig. 2c) (Zou et al. 2004).

Based on these results, we proposed that mechanical stress activates the  $AT_1$  receptor independently of AngII, which is inhibited by candesartan as an inverse agonist.

### Mechanoreceptors and cardiac hypertrophy

Mechanical stress to cardiomyocytes is the most important stimulus that triggers hypertrophic responses (Komuro and Yazaki 1993), and we propose that the  $AT_1$  receptor may be a receptor for mechanical stress. We previously reported that  $AT_1$  receptor is not indispensable for load-induced cardiac hypertrophy, because pressure overload induced cardiac hypertrophy in  $AT_{1a}$ -receptor-knockout mice (Harada et al. 1998a, b). Interestingly, in  $AT_{1a}$ -receptor-deficient cardiomyocytes, basal activities of tyrosine kinase were upregulated and mechanical stretch induced stronger activation of tyrosine kinases than in wild-type cells, through epidermal growth factor (EGF)-receptor tyrosine kinases (Kudoh et al. 1998). These results suggest that

some mechanisms compensate for the lack of  $AT_1$  receptor and that pressure overload induces cardiac hypertrophy even in the absence of the  $AT_1$  receptor.

AngII type 2 ( $AT_2$ ) receptor is also a high-affinity receptor for AngII. We have not examined whether  $AT_2$  receptor, like  $AT_1$  receptor, is activated by mechanical stress because most of the known AngII functions in the cardiovascular system are mainly mediated through  $AT_1$  receptor (Timmermans et al. 1993). Above all, the role of  $AT_2$  receptor in cardiac hypertrophy remains enigmatic. In one study, aortic constriction caused cardiac hypertrophy to a similar degree in  $AT_2$ -receptor-deficient mice and wild-type mice (Wu et al. 2002). In contrast, in another study, cardiac hypertrophy was prevented after aortic constriction in  $AT_2$ -receptor-deficient mice compared with wild-type mice (Senbonmatsu et al. 2000).

Cardiac hypertrophy is induced by activation of other G-protein-coupled receptors (GPCRs) than  $AT_1$  receptor, such as the receptors for endothelin 1 (ET-1) and catecholamines (Yamazaki et al. 1996; Zou et al. 1999). However, we found that mechanical stretch did not induce significant activation of ERKs in COS7 cells overexpressing either ET-1 type A

receptor or  $\beta 2$  adrenoceptor (Zou et al. 2004). Therefore, the activation of GPCRs by mechanical stretch without the involvement of their agonists is not a general phenomenon but specific to some GPCRs including  $AT_1$  receptor.

At present, it remains unclear how the  $AT_1$  receptor senses mechanical stress and translates it into biochemical signals inside the cells. There are a few hypothetical mechanisms by which mechanical stress could activate  $AT_1$  receptor without the involvement of AngII. First, membrane tension may directly induce the conformational change in the  $AT_1$  receptor. Second, mechanical stretch may activate specific mechanosensors, which subsequently activate the  $AT_1$  receptor. Potential candidates for mechanosensors, such as muscle LIM protein within the Z-disc (Knoll et al. 2002), integrin-linked kinase (Bendig et al. 2006; White et al. 2006) and melusin (Brancaccio et al. 2003) within the costameres (band-like structures linking sarcolemmal membrane to Z-discs) and stretch-sensitive ion channels (Kung 2005; Orr et al. 2006), might activate the  $AT_1$  receptor, although the underlying mechanism remains to be determined.

### Inverse agonism of ARB

ARBs specifically inhibit the diverse physiological effects mediated by  $AT_1$  receptor. ARBs not only have strong blood pressure-lowering effects in hypertensive patients, but also induce regression of left ventricular hypertrophy and decrease cardiovascular morbidity and mortality in patients with heart failure (Cohn and Tognoni 2001; Lindholm et al. 2002; Pfeffer et al. 2003). Many ARBs are available for clinical use, and they show unique pharmacological characters. The inverse-agonist activities of ARBs could be a novel and important pharmacological parameter defining the beneficial effects on organ protection.

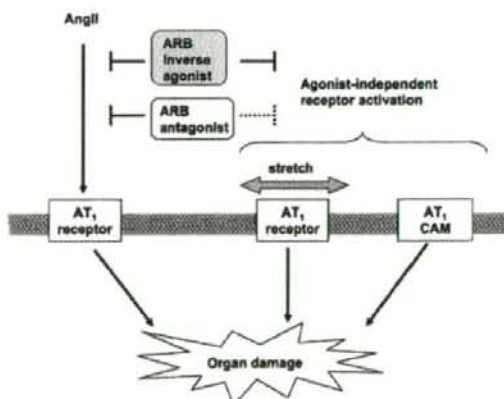
Before the early 1990s, GPCR ligands were simply classified as agonists or antagonists (Bond and Ijzerman 2006). Both agonists and antagonists bind to GPCRs with high affinity; however, only agonists are able to activate the receptor. Therefore, agonists possess both high affinity and intrinsic activity, whereas antagonists possess high affinity without intrinsic activity. However, compounds that were originally described as antagonists were demonstrated to produce effects opposite to those observed with agonists (Costa and Herz 1989). Such ligands are classified as "inverse agonists." Inverse agonists, by definition, stabilize the inactive conformation of receptors and reduce the constitutive activity of the receptor or the agonist-independent receptor activity (Bond and Ijzerman 2006). In contrast, antagonists inhibit responses in competition with agonists, but they are not able to reduce the constitutive activity of the receptor or the agonist-independent receptor activity (Bond and Ijzerman 2006).

With regard to ARBs, it was reported that olmesartan and EXP3174 (active metabolite of losartan) reduce the constitutive activity of  $AT_1$  mutant receptor ( $AT_1$ -N111G mutant), but losartan does not reduce them (Miura et al. 2003a; Miura et al. 2006). According to a recent paper, knockin mice with a constitutively activating mutation ( $AT_1$ -N111S with a C-terminal deletion) ( $AT_1$ -MUT mice) showed low-renin hypertension with relative hyperaldosteronism together with progressive renal and cardiac fibrosis (Billet et al. 2007). Interestingly, administration of candesartan, but not losartan, normalized blood pressure in  $AT_1$ -MUT mice. And, in mechanical stress-induced  $AT_1$ -receptor activation, candesartan inhibited mechanical stress-induced ERK activation (Zou et al. 2004), but losartan did not (unpublished data).

Some ARBs work as inverse agonists because they reduce the constitutive activity of  $AT_1$  receptor or inhibit the agonist-independent mechanical-stress-induced  $AT_1$ -receptor activation. Recently, many clinical studies have shown that ARBs have excellent preventive effects on organ damage. ARBs with potent inverse-agonist activity may provide therapeutic benefits in the prevention of organ damage (Fig. 3).

### Conformational change of GPCR

The  $AT_1$  receptor, as well as other GPCRs, undergoes spontaneous isomerization among its inactive states (favored in the absence of agonist) and its active states (induced or stabilized by the agonist) (Gether 2000; Perez and Karnik 2005). In general, activation of GPCRs by agonists involves specific movements of the transmembrane (TM) helices following agonist binding (Gether 2000; Karnik et al. 2003).



**Fig. 3** Inverse-agonist activity of angiotensin II type 1 ( $AT_1$ )-receptor blockers (ARB). ARBs with potent inverse-agonist activities have therapeutic benefits in the prevention of organ damage because inverse agonists can inhibit agonist-independent-receptor activation by mechanical stress. CAM Constitutively active mutant

Structure–function analyses have demonstrated that the separation of TM3 and TM6 is a common structural change in GPCR activation (Gether 2000; Karnik et al. 2003). Agonist-induced activation of the  $\beta 2$  adrenoceptor involves disruption of an ionic lock between TM3 and TM6 (Yao et al. 2006). With regard to  $AT_1$  receptor, the bindings of AngII to Asn<sup>111</sup> in TM3 and to His<sup>256</sup> in TM6 are crucial for receptor activation (Miura et al. 1999), and the mutations in Asn<sup>111</sup> confer constitutive activity of the receptor (Feng et al. 1998; Groblewski et al. 1997) by releasing helical constraints involving TM2 (Miura and Karnik 2002; Miura et al. 2003b), TM6 (Martin et al. 2007) and TM7 (Boucard et al. 2003; Miura et al. 2003b).

Binding of an inverse agonist causes a transition of GPCR from a native, or partially active, state to an inactive state (Gether 2000; Perez and Karnik 2005) (Fig. 4). A recent study using a fluorescence resonance energy transfer (FRET) approach demonstrated that, in  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor, the conformational changes induced by an inverse agonist are different from those induced by an agonist (Vilardaga et al. 2005).

Our finding of mechanical stress-induced  $AT_1$ -receptor activation still leaves many issues to be solved, especially regarding mechanical stress-induced conformational change

of  $AT_1$  receptor. It would be a great challenge to determine the structural basis of how mechanical stress activates the  $AT_1$  receptor and how candesartan exerts an inverse agonism.

## Conclusions

We demonstrated that mechanical stress can induce cardiomyocyte hypertrophy both in vitro and in vivo through the  $AT_1$  receptor without the involvement of AngII, and that these hypertrophic responses can be inhibited by candesartan, an ARB with potent inverse-agonist activity. A growing body of evidence has suggested that the local renin-angiotensin system plays an important role in injury to various organs (Bader et al. 2001; Baker et al. 1992; Lee et al. 1993). It remains to be determined whether activation of the  $AT_1$  receptor without AngII occurs in other organs, and whether inverse agonists prevent organ damage more effectively than competitive antagonists. Further studies will be required to elucidate the exact molecular mechanisms of mechanical stress-induced  $AT_1$ -receptor activation and to clarify the clinical relevance of inverse-agonist activity of ARBs.

**Fig. 4** Sequential binding and conformational stabilization model for the molecular mechanism of ligand action on G-protein-coupled receptors (GPCRs). Modified from Gether (2000). The hypothetical GPCR is represented by seven helices in gray, viewed from the extracellular side. The unaligned receptor exists in a unique state, [R], that can undergo transitions to at least two other stabilized states, [R<sub>0</sub>] and [R\*]. [R<sub>0</sub>] is an inactive state stabilized by an inverse agonist, and [R\*] is an active state stabilized by an agonist. Receptor activation occurs sequentially through a series of conformational changes. [R'] and [R''] are intermediate (partially active) states between [R] and [R\*]

