

Table 2

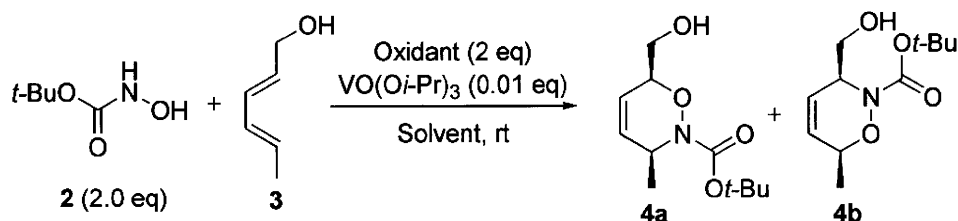
| Entry | 2 (eq) | CHP (eq) | Temp (°C) | Yield (%) | 4a/4b |
|-------|--------|----------|-----------|-----------|-------|
| 1 | 2.0 | 2.0 | -20 | 95 | 77/23 |
| 2 | 2.0 | 2.0 | rt | 99 | 79/21 |
| 3 | 1.0 | 2.0 | rt | 80 | 78/22 |
| 4 | 2.0 | 1.0 | rt | 99 | 77/23 |

Entry 4は本反応における最適条件であり、収率99% (異性体比77 : 33) という結果は過去にCalvetらが報告した過ヨウ素酸を用いた系¹⁰⁾ (収率80% (異性体比67 : 33)) に比べて収率・異性体比が共に向上している。このことからバナジウム触媒による反応の促進と、バナジウムとジエンが錯体を形成することにより位置選択性が向上した可能性が考えられる。

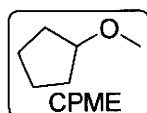
(3) 酸化剤と溶媒の検討

続いて、反応の適用範囲を広げるため酸化剤・溶媒の検討を行った (Table 3)。まず、

Entry 2では酸化剤にTBHPを用いた検討を行ったところ、位置選択性にほとんど変化が見られなかったが、収率91%とCHPを用いたときに比べて若干の収率低下が見られた。次にEntry 3では溶媒に極性の低いトルエンを用いて、よりバナジウムがジエンのアルコール部位に配位し異性体比の向上するのではないかと考えたが、異性体比は変化せず収率99%で環化物を得た。またEntry 4では工業的に利用されているエーテル系溶媒シクロペンチルメチルエーテル (CPME) を溶媒として用いた反応を行い、80%と良好な収率で環化物を得た。

**Table 3**

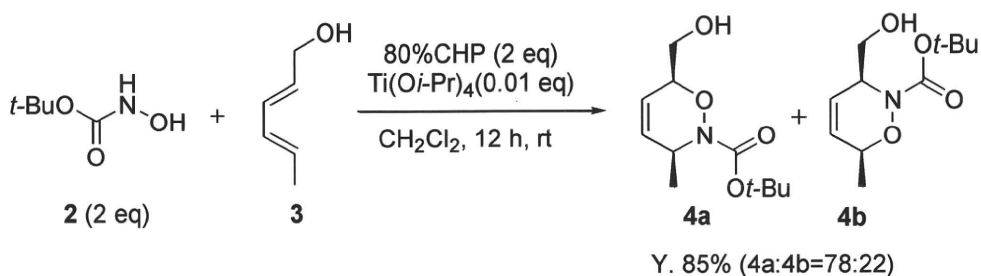
| Entry | Solvent | Oxidant | Time (h) | Yield (%) | 4a/4b |
|-------|---------------------------------|---------|----------|-----------|-------|
| 1 | CH ₂ Cl ₂ | CHP | 1 | 99 | 79:21 |
| 2 | CH ₂ Cl ₂ | TBHP | 1 | 91 | 77:23 |
| 3 | toluene | CHP | 0.5 | 99 | 79:21 |
| 4 | CPME | CHP | 2 | 80 | 79:21 |



(4) チタン触媒を用いたニトロソ Diels-Alder反応の検討

バナジウムと同様の前周期遷移金属であるチタンを触媒として、ジヒドロオキサジン生成物の位置異性体比がどのように変化するか検討を行った (Scheme 2)。

その結果、異性体比は変化せず反応時間がバナジウムを用いたときの1時間から12時間へと、触媒活性が低下した。Sharplessエポキシ化の研究から、チタン触媒の場合はモレキュラーシーブスによる触媒活性の向上が期待される。

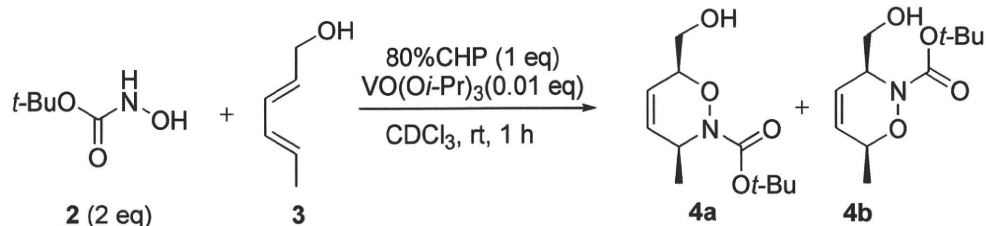


Scheme 2

(5) ¹H NMRによる反応追跡

定量的に反応が進んだバナジウムの系 (Table 2, Entry 4)において、溶媒をCDCl₃

に変えてNMRチューブ内で反応を行い、1時間後にNMR測定をすることで系中での原料、環化物等の様子を観察した (Scheme 3)。



Scheme 3

まず、Figure 1が原料である2, 4-ヘキサ

ジエン-1-オール3のNMRチャートである。

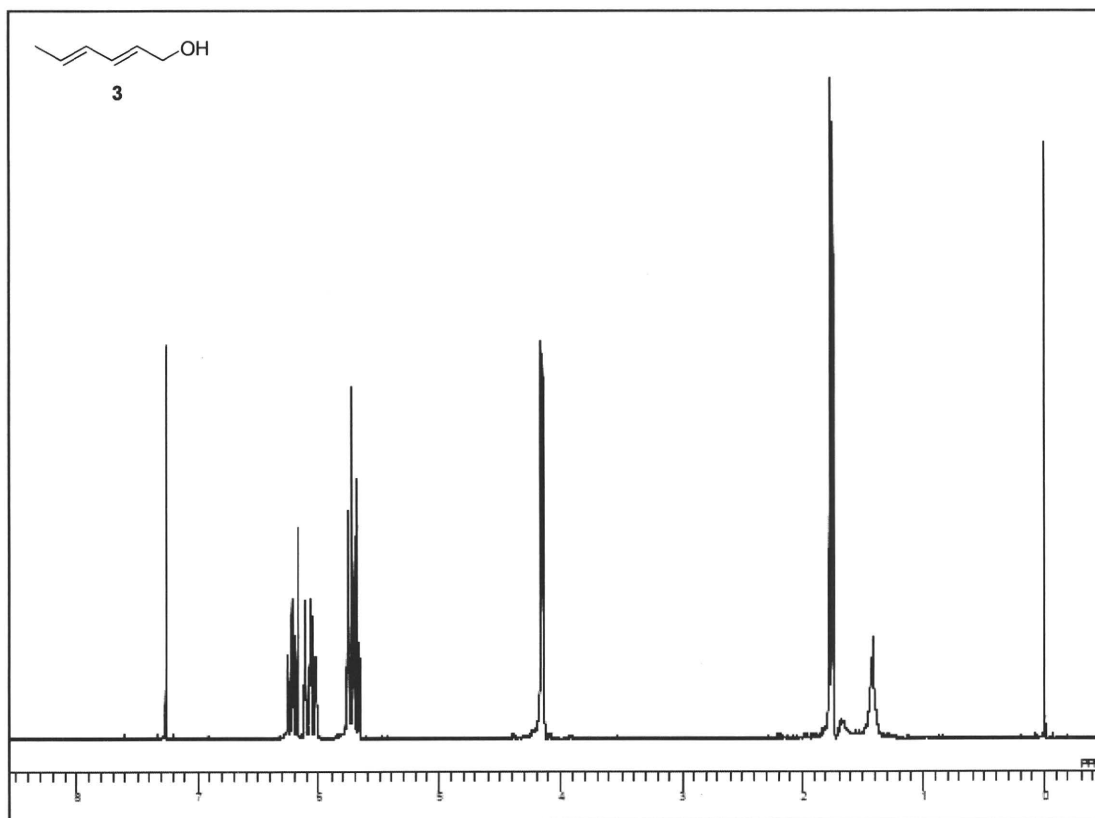


Figure 1

続いてScheme 3において、ジエン3を用い
ずにエポキシ化反応のみが進行する条件で反

応を行い、1時間後にNMR測定をすることで系
中での様子を観察したものがFigure 2である。

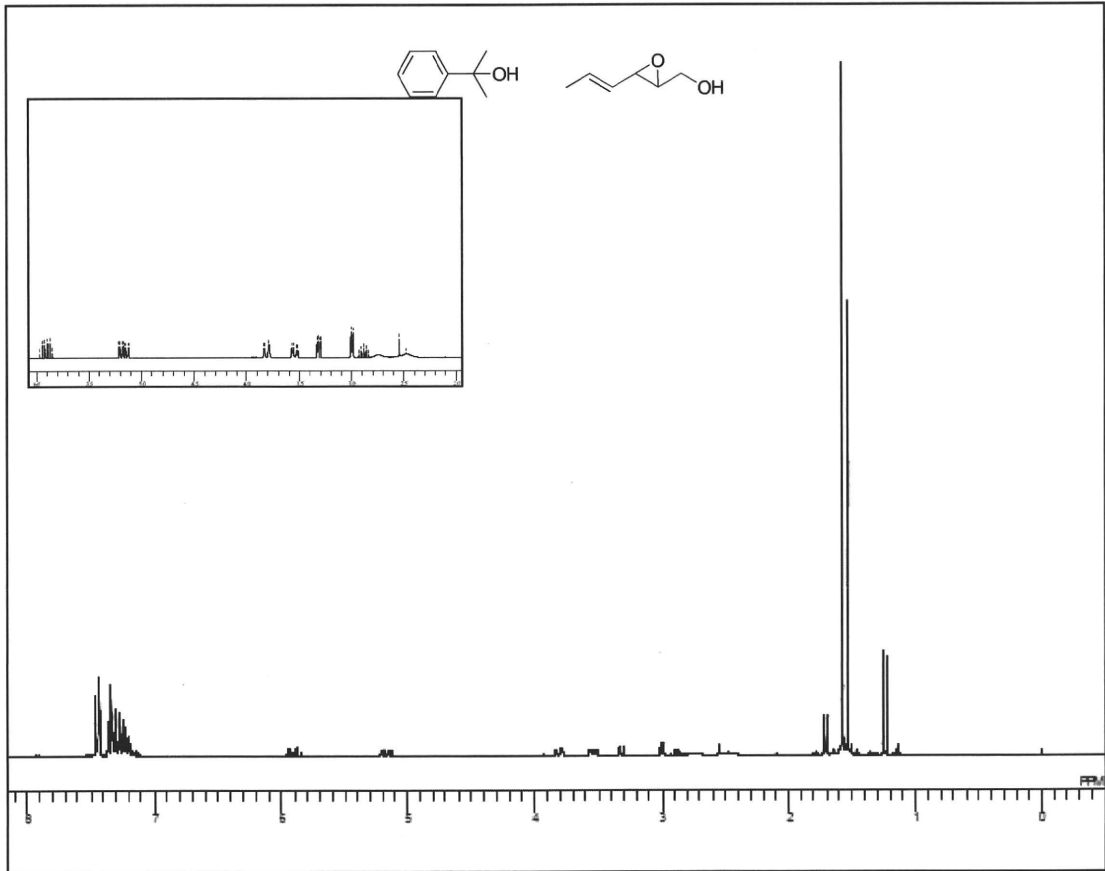
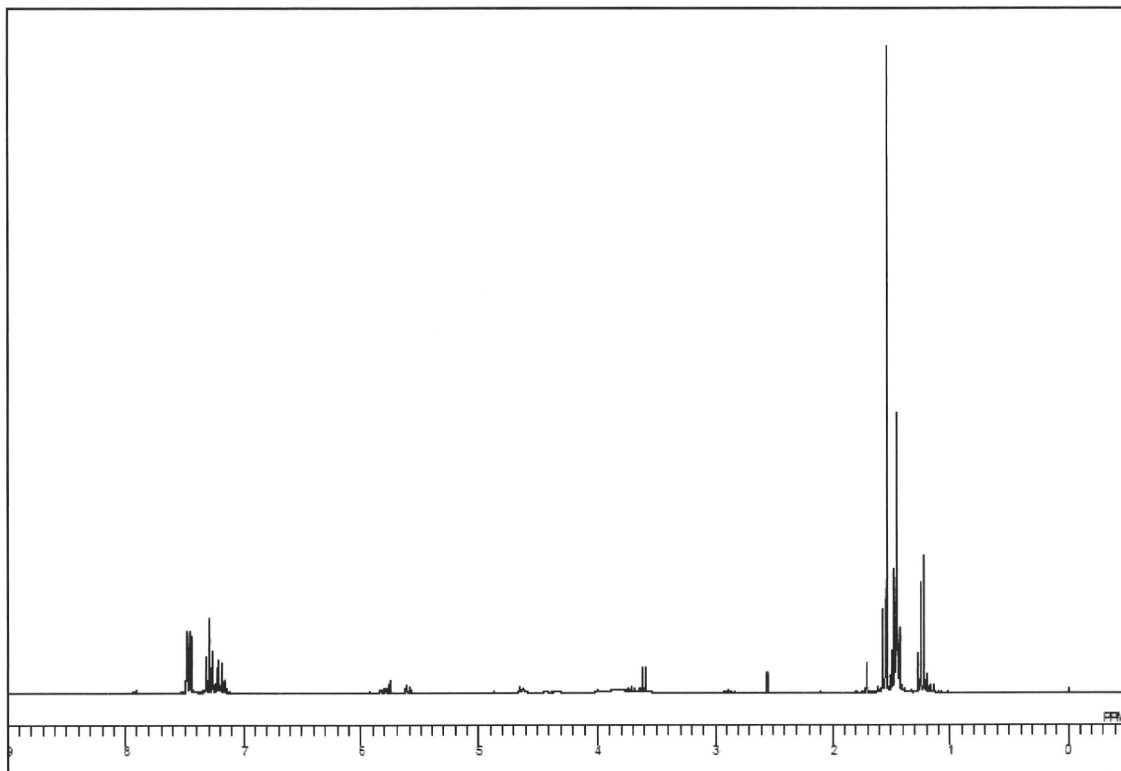


Figure 2



↓ 1時間反応後

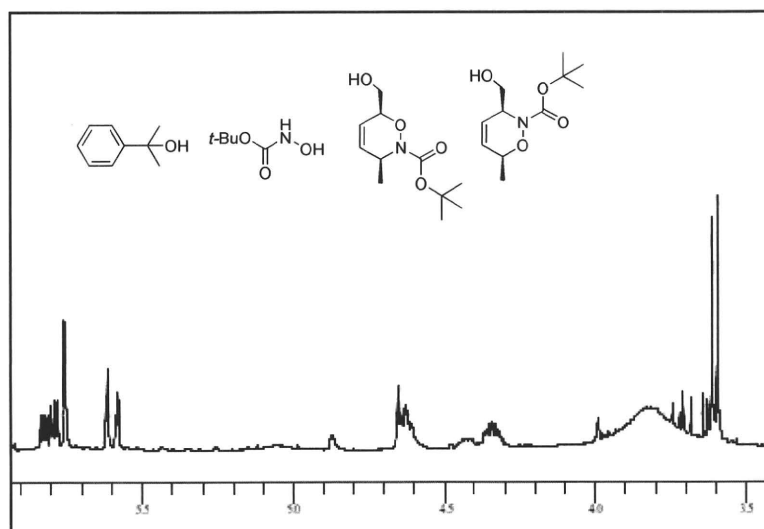


Figure 3

そしてScheme 3の実験を行い、1時間反応させた後のNMRチャートがFigure 3である。ジエノール3のメチレンプロトンのシグナルが消失していることから原料であるジエノール3が全て反応に用いられたことがわかる。また、ジエノール3がエポキシ化されたシグナルは見られず、このことから反応が定量的に進行していることが確認できた。NMRチャートから読み取れる化合物は、BocNHOH 2とCHP由来のアルコールと環化物4aと4bである。

(6) 対称ジエンを用いたニトロソ Diels-Alder反応の検討

Table 5, Entry 1では対称ジエンであるシ

クロペンタジエン5を用いて反応を行ったところ、収率62%で目的物6を得ることができた。このとき、反応条件としてシクロペンタジエンを過剰に使い、低温下で反応を行っている。Entry 2, 3においては、シクロヘキサジエン7、ジフェニルブタジエン9、用いた検討を行い、80%、77%と良好な収率で環化物を得ることができた。Entry 4では9,10-ジメチルアントラセン11を用いて40%と中程度の収率で環化物を得ることができた。これはオキサジン12が比較的温和な温度でレトロ Diels-Alder反応を起こすため、環化物が分解していることが収率の低下に繋がっていると考えられる。

$$t\text{-BuO}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{OH} + \text{Diene} \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2, \text{rt}, 1 \text{ h}]{\text{Oxidant (1 eq)} \atop \text{VO(Oi-Pr)}_3 (0.01 \text{ eq})} \text{Product}$$

2 (2 eq)

Table 5

| Entry | Diene | Oxidant | Product | Yield (%) |
|-------|-------|---------|---------|-----------------|
| 1 | | CHP | | 62 ^a |
| 2 | | CHP | | 80 |
| 3 | | CHP | | 77 |
| 4 | | TBHP | | 40 |

a) stirred at -20°C

(7) 非対称ジエンを用いたニトロソ Diels-Alder反応の検討

続いて、非対称ジエンでの検討を行った。イソプレン13を用いたEntry 1では収率

46%、14aと14bの異性体比1:1で目的物を得た。また、β-ミルセン15を用いたEntry 2では収率20%、16aと16bの異性体比1:1で目的

物を得た。これは原料であるβ-ミルセンは室温で重合するため、それが系中で悪い影響を与えて収率が低下したことが考えられる。

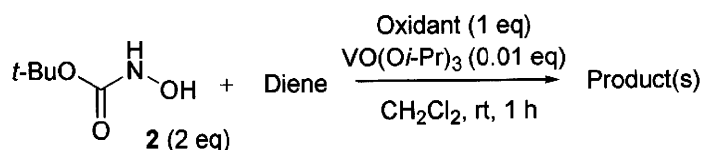
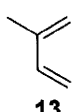
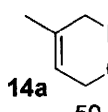
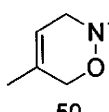
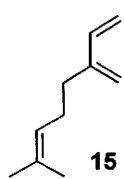
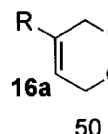
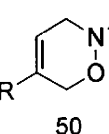
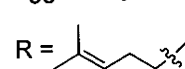


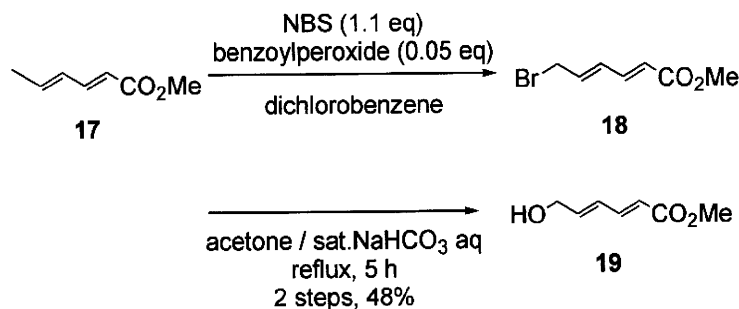
Table 6

| Entry | Diene | Oxidant | Product(s) | Yield (%) |
|-------|--|---------|--|-----------|
| 1 |  | TBHP |  14a 50 :  14b 50 | 46 |
| 2 |  | CHP |  16a 50 :  16b 50 R =  | 20 |

(8) (2*E*, 4*E*)-6-ヒドロキシ-2,4-ヘキサジエン酸メチル、(2*E*, 4*E*)-6-トリイソプロピルシリルオキシ-2,4-ヘキサジエン酸メチルの合成

まず原料となる (2*E*, 4*E*)-6-ヒドロキシ-2,4-ヘキサジエン酸メチル19の合成を行な

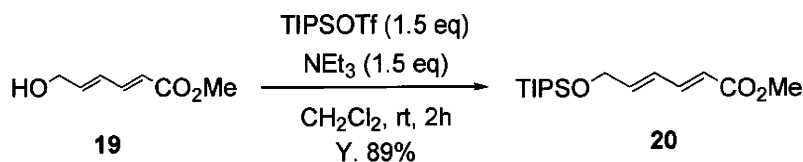
った。ソルビン酸メチル17をジクロロベンゼンに溶解させN-ブロモスクシンイミドと過酸化ベンゾイルを作用させることによってブrom化した後に、加水分解を行い (2*E*, 4*E*)-6-ヒドロキシ-2,4-ヘキサジエン酸メチル19を得た (Scheme 4)²⁾。



Scheme 4

また、得られた19をトリフルオロメタンスルホン酸トリスプロピルシリル(TIPSOTf)とトリエチルアミンを用いてシリル保護をして、ニトロソDiels-Alder反応の原料となる

(2*E*, 4*E*)-6-トリスプロピルシリルオキシ-2,4-ヘキサジエン酸メチル20を得た(Scheme 5)。

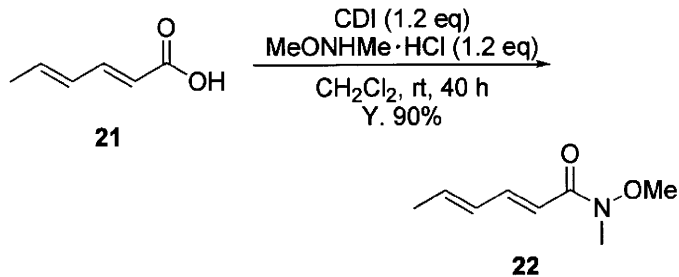


Scheme 5

(9) (2*E*, 4*E*)-*N*-メトキシ-*N*-メチル-2,4-ヘキサジエンアミドの合成

塩化メチレン溶媒中にソルビン酸21を溶かし、1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)をゆっくりと滴下した後に*N*,*O*-ジメチルヒド

ロキシルアミン塩酸塩を加えて40時間攪拌し、原料となる(2*E*, 4*E*)-*N*-メトキシ-*N*-メチル-2,4-ヘキサジエンアミド22を得た(Scheme 6)³⁾。

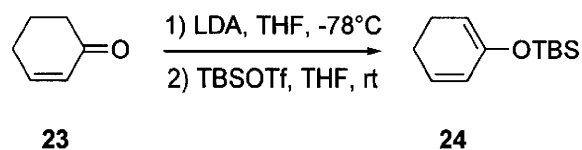


Scheme 6

(10) 1,5-シクロヘキサジエニルオキシ-*t*-ブチルジメチルシランの合成

THF溶媒中にジイソプロピルアミンを溶かし、*n*-ブチルリチウムをゆっくり滴下した後に2-シクロヘキセン-1-オン23とトリフルオ

ロメタンスルホン酸-*t*-ブチルジメチルシリル(TBSOTf)を加えて攪拌したところ、原料となる1,5-シクロヘキサジエニルオキシ-*t*-ブチルジメチルシラン24を得た(Scheme 7)⁵⁾。



Scheme 7

(11) 官能性ジエンを用いたニトロソ Diels-Alder反応の検討

官能基を持つそれぞれのジエンを用いて反応を行い、収率13%~99%で環化物を得た (Table 6)。1,4-二置換ジエンにおいて置換基にエステル基を持つ場合、エステル基から見た proximal 異性体を優先するために Entry

2-5では単一物としてオキサジンを得ることができた。Entry 7においてはTable 7⁶⁾の予想通りの位置選択性でオキサジン $\mathbf{31}$ を得ることができたが生成物が不安定であり、二環式構造からTBS基がはずれた副生成物が得られてしまい、収率の低下に繋がってしまった。

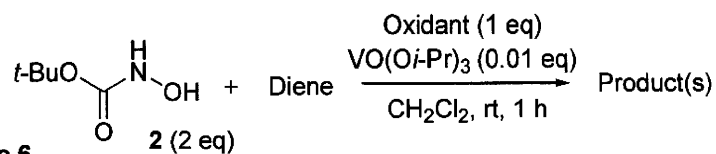
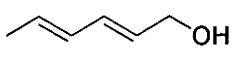
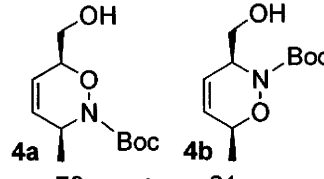
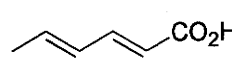
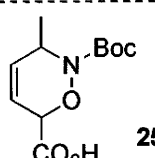
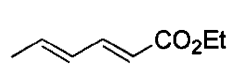
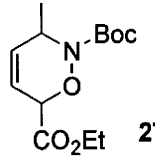
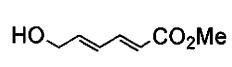
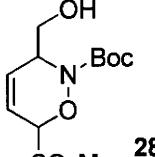
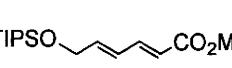
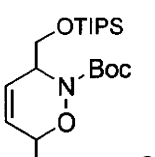
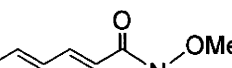
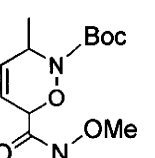
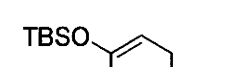
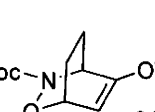
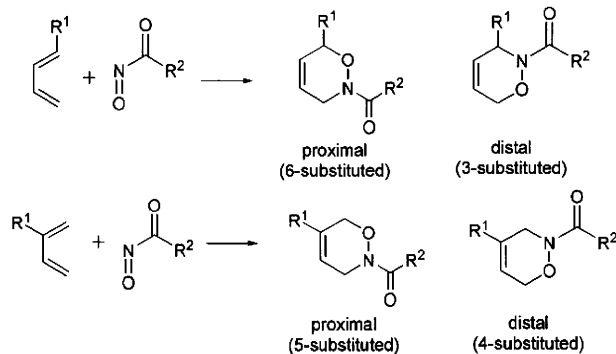


Table 6

| Entry | Diene | Oxidant | Product(s) | Yield (%) |
|---------|--|---------|---|-----------------|
| 1 |  3 | CHP |  4a 4b | 99 |
| 79 : 21 | | | | |
| 2 |  21 | CHP |  25 | 44 |
| 3 |  26 | TBHP |  27 | 70 |
| 4 |  19 | CHP |  28 | 62 ^a |
| 5 |  20 | TBHP |  29 | 20 |
| 6 |  22 | TBHP |  30 | 79 |
| 7 |  24 | CHP |  31 | 13 |

a) time: 24 h

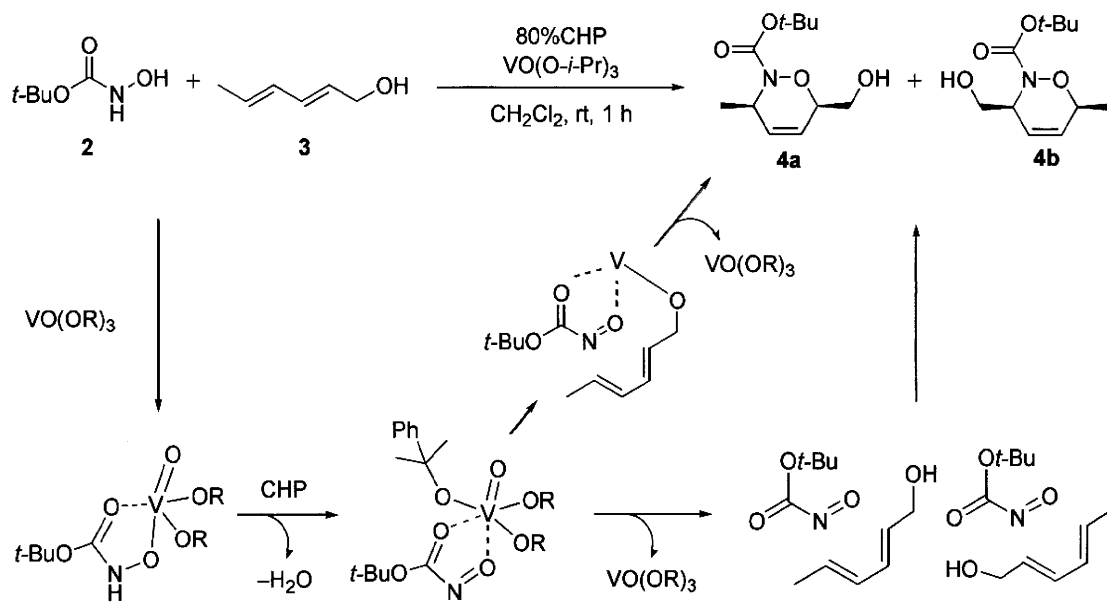


Scheme 7

Table 7
Generalizations Concerning the Regioselectivity of the Hetero Diels-Alder Reactions of Nitroso Compounds with Substituted Dienes

| RCONO | | |
|------------|----------------|----------------------|
| Diene type | Favored isomer | Extent of preference |
| | proximal | Large |
| | proximal | Large |
| | distal | Medium |
| | distal | Small |

D = Electron-donating Substituents
Z = Electron-withdrawing Substituents



Scheme 8

(12) ニトロソDiels-Alder反応の反応機構の考察

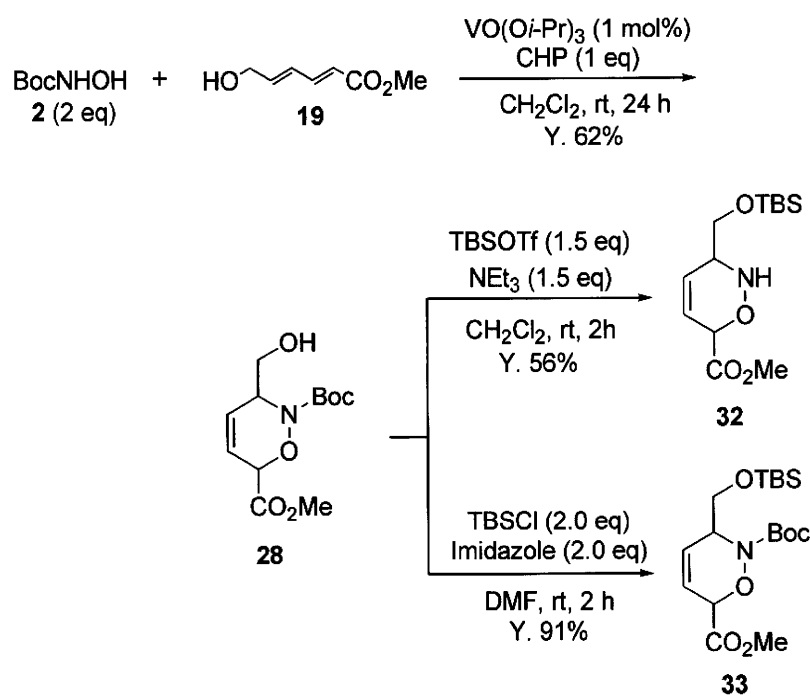
ここで、これまでの検討から反応経路の推定を行った(Scheme 8)。

まずカルバミン酸エステル2に対してバナジウムが配位し錯体を形成し、そしてCHPによりカルバミン酸がニトロソカルボニルへと酸化される。ここから一つの経路としてはバナ

ジウムが配位したままニトロソDiels-Alder反応進行する経路と、バナジウムが外れニトロソカルボニルの反応性だけでニトロソDiels-Alder反応が進行しているという二つの経路を推定した。このとき、副反応としてジエンのエポキシ化が観測されないことから化合物**2**がジエンと比べて優先的にバナジウムと配位しやすいことが推定でき、また、生成物として環化物**4a**だけでなく**4b**も得られていることから、ニトロソDiels-Alder反応の段階ではバナジウムからニトロソカルボニル基は解離して反応している可能性が高い。

(13) ニトロソDiels-Alder反応を利用したHyacinthacine合成中間体の合成研究

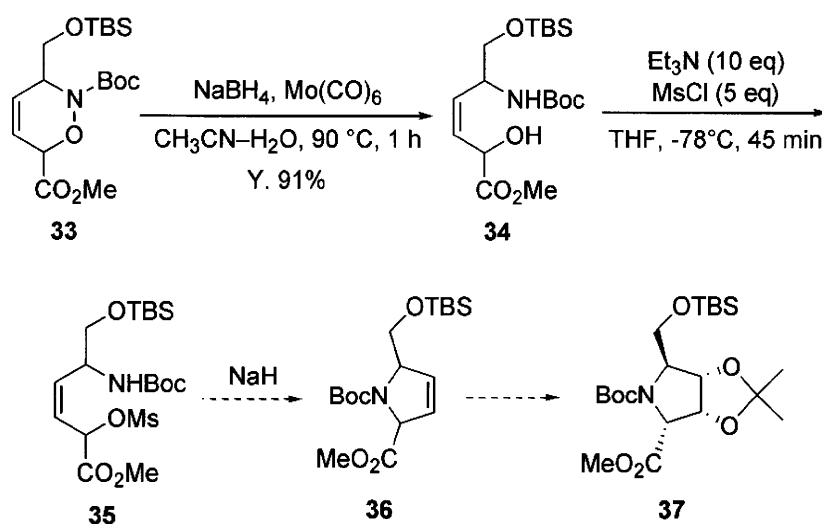
まずScheme 4の反応で合成したジエン**21**を本研究で見出したニトロソDiels-Alder反応で環化して化合物**22**とし、続いてアルコールをTBS保護した。このとき、TBSOTfとトリエチルアミンを用いてTBS基の導入を試みたところ、Boc基が脱離した化合物**32**が得られた。そこで、より酸性度の低い条件である*t*-ブチルジメチルクロロシラン (TBSCl) とイミダゾールを用いたところ、Boc基を脱離させることなくTBS保護体**33**を得た(Scheme 9)。



Scheme 9

続いてモリブデンヘキサカルボニルとNaBH₄を用いてN-O結合を開裂して化合物**34**を得た。メシル化を行った後にNaHを用いて環化

を行い、ジオール化を経て合成中間体**36**の合成が可能であり、今後詳細に検討をする予定である(Scheme 10)。



Scheme 10

(13) 結論

N-ヒドロキシカルバミン酸 *t*-ブチルと *trans, trans*-2,4-ヘキサジエン-1-オールを基質とし、バナジウム触媒を用いたニトロソDiels-Alder反応を収率99%、異性体比79 : 21で達成した。このとき、エポキシ化による副反応生成物なしでニトロソDiels-Alder反応が進行することを確認した。そして様々なジエンを用いた反応では単純ジエンにおける反応の進行のみならず、これまでに金属触媒を用いたニトロソDiels-Alder反応において検討されることのなかった官能基を持ったジエンにおいても反応が進行することを明らかにした。このことから、バナジウム触媒を用いた本反応が非常に汎用性の高い反応であることがわかる。

そして本研究で開発したバナジウムを用いたニトロソDiels-Alder反応を利用して、含窒素複素環化合物であるHyacinthacineA₁の合成中間体構築のために、(2*E*, 4*E*)-6-ヒドロキシ-2,4-ヘキサジエン酸メチル **19**をニトロソDiels-Alder反応によって環化し、N-O結合を開裂した。続いて、メシル化を行った後にNaH

を用いて環化を達成した。

(参考文献)

- 1) D. Zhang, A. Ghosh, C. Suling and M. J. Miller, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 3799.
- 2) G. Calvet, N. Blanchard and C. Kouklovsky, *Synthesis*, **2005**, 3346.
- 3) G. Durrant, R. H. Green and P. F. Lambeth, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1983**, 2211.
- 4) S. V. Ley, L. R. Cox and G. Meek, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 3299.
- 5) Yuan Mi, J. V. Schreiber and E. U. Corey, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 11290.
- 6) A. G. Leach and K. N. Houk, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 5192.

D. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

南沢享（研究分担者）

A. 研究目的

心臓がポンプとしての役割を十分に果たせなくなると、生体が恒常性を保てなくなり、全身の器官・組織の機能に異常が生じる。これが慢性化すると、それぞれの器官の機能異常が相互に作用し、さらなる機能異常や器質的变化をもたらす。それは心臓自体にも悪影響を及ぼし、心機能はさらに低下する。その結果、全身の器官が機能異常をおこす悪循環は一層加速し、全身に様々な症状が現れる。「心不全」とは単一の病名ではなく、心臓がポンプとしての役割を果たせなくなったために、上述のような複合的な病態を呈する症候群としてとらえられる。心臓のポンプ機能を決定する重要な因子が、交感神経活性調節であることから、心筋での交感神経活性が如何に心不全の病態へ関与しているのかが検討されてきた。これまでの研究では、心不全をきたす原因の違いにかかわらず、心不全時には心筋での交感神経受容体のダウンレギュレーションや活性低下がほぼ共通に認められることから、心不全の発症機転及び進行に極めて重要であることがわかってきている。

心不全の病態には、自律神経系の調節障害のみならず、神経体液性因子の乱れ、カルシウム制御の異常、局所血流不足など多彩な要因が複合的に絡み合うため、病態が進行すればするほど、その治療が困難になる。従って、心不全の治療は、病初期にその進行を防ぐことが非常に重要となる。心臓のポンプ機能が低下すると、生体ではそれに適応するために交感神経系の活性化が生じる。しかし、交感神経系の活性化は一時的なポンプ機能の改善には役立つが、長期的にはむしろ心不全の病態を悪化させることが知られるようになった。故に、交感神経刺激薬を含む、いわゆる「強心剤」は慢性心不全の治療に用いられなくなった。しかしもう一度、病態の発端＝心機能の低下、を改めて考えてみると、心臓のポンプ

機能を改善させること自体が、本当に有害なのだろうか？ これは心不全の治療を考える上で非常に重要であり、交感神経系の多様な側面から、心機能自体を良好にする経路やアポトーシスや線維化など心不全をむしろ悪化させてしまう経路などに分岐してゆく可能性がある。その経路の分岐点となる可能性のなかでは、交感神経系刺激を受け、ベータアドレナリン受容体が活性化された下流にあるアデニル酸シクラーゼが注目される。なぜなら、交感神経刺激効果酵素であるアデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、これが多様な刺激経路の分岐点の役割を果たしている可能性があるためである。研究代表者の石川らはアデニル酸シクラーゼ5型あるいは心臓型とよばれるものは心臓に特異的に発現し、その遺伝子的な心臓型の欠損は心機能低下を定常状態において引き起こさないが、各種のストレスに対する抵抗性を高め心筋保護作用があることが報告されている。このことから、心臓型サブタイプの選択阻害剤は、心不全治療薬として臨床応用が可能となると思われる。さらにアデニル酸シクラーゼはその下流シグナルでcAMP産生を促すことによって、cAMP依存的な2つの異なる経路を活性化する。ひとつは従来より非常によく研究されていたcAMP依存性プロテインキナーゼA(PKA)であり、もうひとつが最近その存在が知られて、急速に理解が進みつつあるEpacの経路である。アデニル酸シクラーゼのアイソフォーム同様にこれらのシグナル伝達系の分岐によって、心不全の多彩な症状が制御されていることが想定されるため、それぞれの経路が担う役割を詳細に検討することは極めて重要な課題となる。

心不全の病態進行には局所での血流不足が大きく関わっている。心機能が悪化した心臓では、機能低下を代償するためにしばしば心筋肥大を生じる。心肥大が持続進行すると、心筋が必要とする血流需要

に対して、血管からの供給が十分でなく、局所の血流不足が生じる。さらに病態が進行すればするほど、局所の血流不足が病態をさらに悪化させ、その治療が困難になる。従って、心不全の治療は、病初期に血流不足を防ぐことも非常に重要な課題である。血流は血管径により主に規定され、自律神経系、特に交感神経活性はここでも極めて重要な役割を演じる。従って、本研究では生理的に血管内膜肥厚をきたす非常に特徴ある血管＝動脈管をモデル血管として、血管に及ぼすアデニル酸シクラーゼとその下流シグナルの働きについて詳細に検討を試みた。

将来的にヒトにむけた臨床試験を開始するに当たり、動物を用いた前臨床試験においてPOCを確立する必要がある。とりわけマウスモデルにおいては、遺伝子工学的な方法等を駆使して、様々な心不全モデルが作製可能であり、さらに心エコーや心臓カテーテル検査による心機能測定など、ヒトにおいて行われている検査のほとんどが再現可能である。そこで、様々なマウスモデルの作製と共に、どのような心不全モデルにおいて心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果がもっとも顕著となるかの検討が必要である。我々はとりわけ筋小胞体でのカルシウム調節を中心とした心機能制御メカニズムの検討を進めきた。心筋の中でカルシウムの調節を行う最も中心的な働きをしているのが、細胞内Ca²⁺貯蔵庫として発達した細胞内小器官である心筋筋小胞体である。心筋の収縮弛緩時における細胞内Ca²⁺濃度の変化は、主に筋小胞体でのCa²⁺の出入りによって制御されている。その制御に主役を演じる分子は、筋小胞体からCa²⁺を放出する心筋ライアノジン (ryanodine) 受容体と、筋小胞体へCa²⁺を取り入れる心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプ (筋小胞体Ca²⁺ATPase)である。さらに筋小胞体には、ライアノジン受容体や筋小胞体Ca²⁺ATPaseに相互作用する分子が多く存在し、それぞれの機能を巧妙に調節している。心筋筋小胞体の

機能低下や異常は、心不全の発症・進行に極めて深刻な影響を及ぼす。また、心筋筋小胞体分子の遺伝子変異は、心筋症や致死性不整脈の原因となることが分かってきている。従って、心不全や不整脈に対する本質的な治療法の開発を考えると、心筋筋小胞体蛋白は新たな標的として非常に重要である。本研究で我々はその中でも特に交感神経活性ならびにアデニル酸シクラーゼ活性、加齢や強度の運動負荷などの生理現象が筋小胞体Ca²⁺ATPaseを制御する分子機構について検討を行った。

B. 研究方法

ヒトの血管では動脈硬化等の病態が進行すると、血管の弾性低下、血管内膜肥厚等により、血流不足を生じる。我々の研究室ではこれまでに胎児期に特有の血管で、大動脈と大動脈弓との繋いでいる動脈管が生理的な内膜肥厚をきたす機序に関して詳細に研究してきた。そこでこの動脈管をモデル血管とみなして、血管リモデリングの機序の検討を行った。我々の研究室では胎生21日目のラット動脈管から組織を採取し、分離培養した平滑筋細胞を増殖させ、継代培養をすることによって、非常に小さい組織からでも*in vitro*の実験を行うことが出来る実験技術を世界に先駆けて開発し、この分野の研究を推進してきた。本研究においても、胎生21日目のウイスターラット動脈管平滑筋培養細胞を用いて、平滑筋におけるアデニル酸シクラーゼとその下流シグナルの働きについて詳細に検討を試みた。以下にその方法を記す。

動脈管での血管作働薬としては、プロスタグランジンE(PGE)が最も強力な血管拡張薬である。PGE受容体EPにはEP1-EP4までの4種類が知られているが、そのうちEP4が動脈管に主に発現している受容体である。EP4はG蛋白受容体として、G α の活性、アデニル酸シクラーゼの活性、cAMPの増加をきたし、PKAを活性化する。また、近年EPACと呼ばれるcAMP

の下流シグナル分子が活性化され、PKAとは異なる生物活性を有していることが判明している (Bos BL. *Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. Trends Biochem Sci* 2006)。アデニル酸シクラーゼでは9種類、EPACでは2種類のアイソフォームが存在することが知られているが、動脈管における役割に関しては殆ど分かっていなかった。そこで本研究室では先行研究において、ラット動脈管におけるEPACアイソフォームの同定と機能解析を行った。その結果についての概略を以下に示す。

①. 胎生19日 (未熟段階)、胎生21日 (成熟段階)、生直後ラット動脈管組織において、*Epac1*・*Epac2* mRNAs 発現は出生にむけて大動脈に比して有意に増加していた。

②. ラット動脈管平滑筋培養細胞を用いた実験で *Epac1* が平滑筋細胞遊走を促進することを見出した。*Epac2* には平滑筋細胞遊走を促進する効果が乏しかった。

③. ラット動脈管器官培養法を用いて、*Epac1*が内膜肥厚を促進することを見出した。

以上の結果からプロスタグランジンE2シグナルの下流ではcAMP依存性プロテインキナーゼAが慢性的作用として内膜肥厚を形成するのに対し、*Epac1*は急性的効果として動脈管内膜肥厚形成に働いていることが示唆された。本研究の結果のデータはその他に掲載をした。以上の研究成果を踏まえて、本研究ではラット動脈管におけるアデニル酸シクラーゼアイソフォームの同定と機能解析を次の方法を用いて行った。

①. ラット動脈管での経時的発現様式の解析 (定量的RT-PCR法、Western blot法、免疫組織染色など)を行った。

②. ラット動脈管平滑筋培養細胞を用いて、各アイソフォームが平滑筋遊走能 (Boyden chamber法)、増殖能 (3H-チミジン取り込み試験)、分化マーカーの発現に及ぼす影響を調べた。

③. ラット動脈管器官培養法を用いて、各アイソフォームが内膜肥厚に及ぼす影響を検討した。

②、③の実験の際には、特異的な刺激薬や阻害薬、遺伝子発現調節のための遺伝子導入やsiRNA法など利用できる手段を駆使して、各アイソフォームの違いを検討した。

一方、これまでに研究開発した様々なマウス心不全モデルにおいて、心機能変化の特性を比較検討し、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果をみるのに適切なモデルを考案した。

これまでの先行研究によって、重度の高血圧症患者と類似した圧負荷モデルとして、胸部大動脈レベルで動脈を結索し、そのため動脈圧が上昇するTACモデルと慢性的に交感神経が亢進し、ヒト心不全患者者に類似する慢性カテコラミン負荷モデルにおいて、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果を検討してきた。そこで本研究では新たな心不全のモデル動物として、次の3種類のモデル動物を作成し、その病態の詳細を検討した。

α B-クリスタリンはスモール熱ショックタンパクファミリーのひとつで、水晶体、心臓、骨格筋で強い発現が見られる。 α B-クリスタリンは、ストレスによって誘導される分子シャペロンとして機能し、細胞の生存を増進させる。 α Bクリスタリンが異所性に発現すると、多岐にわたるアポトーシス刺激から細胞が保護されるが、RNA 干渉(RNAi)法によってその発現を静めると、細胞はアポトーシスを起こしやすくなる。 α B-クリスタリンのR120G変異マウスはヒトにおけるデスミン関連心疾患様の症状を呈し、ほぼ6-7ヶ月で全て死亡してしまう。従って、本マウスはヒト疾患に類似し、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定、特に生命予後に関しての効果判定を行うのに適当であると考えられた。

心臓がポンプとしての役割を十分に果たせなくなると、生体が恒常性を保てなくなり、全身の器官・

組織の機能に異常が生じる。これが慢性化すると、それぞれの器官の機能異常が相互に作用し、さらなる機能異常や器質的变化をもたらす。それは心臓自体にも悪影響を及ぼし、心機能はさらに低下する。その結果、全身の器官が機能異常をおこす悪循環は一層加速し、全身に様々な症状が現れる。この状態を心不全と呼ぶ。従って、「心不全」は単一の病名ではなく、心臓がポンプとしての役割を果たせなくなったために生じた症候群としてとらえられる。これまでの研究では、心不全をきたす原因の違いにかかわらず、心不全時には心筋筋小胞体の機能低下がほぼ共通に認められることから、心不全の発症機転及び進行に極めて重要であることがわかってきている。そこで本研究では遺伝子操作技術によって、心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプ (筋小胞体Ca²⁺ATPase)の活性を調節するサルカルメニン(sarcalumenin)と呼ばれるカルシウム結合蛋白を欠損させたサルカルメニンノックアウトマウスを作成した。このマウスでは筋小胞体機能が低下しており、負荷をかけることで心機能がさらに悪化することから、ヒト心不全患者に類似する。

心不全の中でも特殊な病態として、右心室不全がある。本病態に対して、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うために、右心室不全モデルマウスの作成を試みた。マメ科の西洋クローバの一種に、モノクロタリンというアルカロイドが含まれており、モノクロタリンの試薬をラットに注射すると、肝臓を通る間に活性物質に変わり、肺循環に入って内皮細胞に炎症を起こし、約8週間で肺高血圧症を呈し、右心不全を生じることが知られている。我々は遺伝子改変マウスへの応用を考え、モノクロタリンをマウスに投与し、ラット同様、右心不全にモデルマウスの作成が可能かどうかを検討した。

以上、それぞれに病態の異なる3種類の心不全モデルマウス— α B-クリスタリンR120G変異マウス、サ

ルカルメニンノックアウトマウス、モノクロタリン負荷マウスにおいて、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うことを計画した。

C. 研究結果

1. 血管内膜肥厚におけるアデニル酸シクラーゼの役割

①.胎生19日(未熟段階)、胎生21日(成熟段階)、生直後ラット動脈管組織において、まず半定量的PCR解析を行った(左図A)。その結果、アデニル酸シクラーゼ1型、アデニル酸シクラーゼ8型以外のアデニル酸シクラーゼアイソフォームが動脈管に発現していることがわかった。次にアデニル酸シクラーゼアイソフォームのうち、2型-7型までの定量的PCR解析を行ったところ、動脈管ではアデニル酸シクラーゼ2型・6型では全発達段階で大動脈に比べて発現が高かったが、特にアデニル酸シクラーゼ2型では胎生21日において有意に大動脈に比べて高かった。一方、アデニル酸シクラーゼ6型 mRNAs 発現は出生後に有意に大動脈に比べて高かった。心臓に多いアデニル酸シクラーゼ5型は血管でも多く発現していたが、大動脈と動脈管では有意な差は認めなかった。

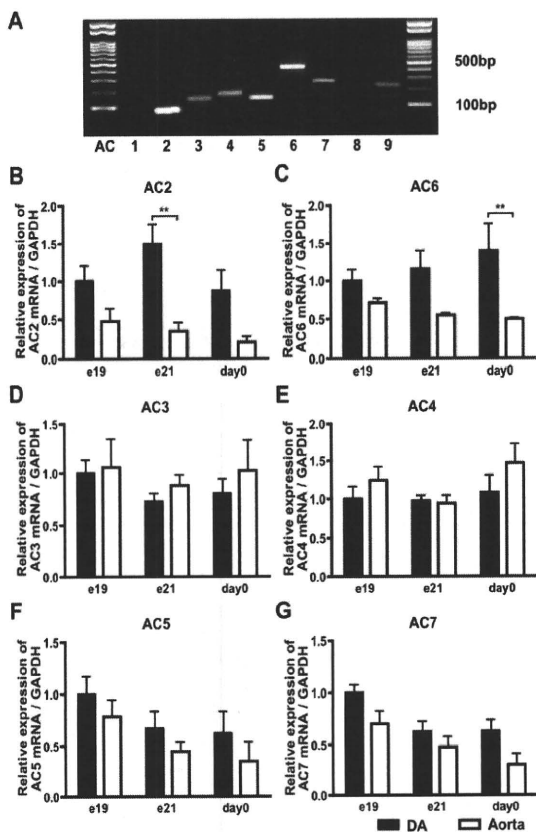


Figure 1. Multiple transcripts of AC isoforms in rat DA. (A) mRNA expression of AC isoforms using semi-quantitative RT-PCR in the rat e21 DA. AC1 and 8 mRNAs were not expressed in the DA. (B) Quantitative RT-PCR analyses of AC2, 3, 4, 5, 6 and 7. **P<0.01. Data are from six independent experiments.

②. 平滑筋培養細胞を用いた実験において、アデニル酸シクラーゼ6型には血管においてヒアルロン酸産生亢進作用があることを見出した。

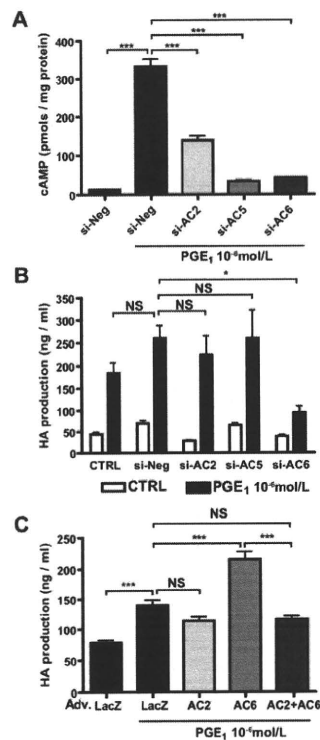


Figure 2. AC6, but not AC2, is responsible for hyaluronan (HA) production in DASCs. (A) PGE₁ induced cAMP accumulation in DASCs in the cells treated with negative siRNA (si-Neg). AC2-, AC5- and AC6-targeted siRNA decreased PGE₁-induced cAMP production (n=4). (B) AC6-targeted siRNA attenuated PGE₁-induced hyaluronan production, whereas AC2- and AC5-targeted siRNA did not (n=7-11). (C) Adv.AC6, but not Adv.AC2, enhanced PGE₁-induced hyaluronan production. Adv.AC2 abolished the Adv.AC6-induced enhancement of hyaluronan production (n=4). *P<0.05 and ***P<0.001. Data are from three independent experiments. NS: not significant.

プロスタグランジンE刺激によって動脈管平滑筋細胞でのcAMP濃度は増加したが、siRNA法を用いてアデニル酸シクラーゼ2型、5型、6型のmRNA発現を低下させたところ、有意にcAMP濃度が低下した(図2A)。以前よりプロスタグランジンE刺激は動脈管平滑筋細胞において、ヒアルロン酸産生を有意に増加させることが知られているが、アデニル酸シクラーゼ6型mRNA発現を低下させた時のみ、有意にヒアルロン酸産生が低下した(図2B)。さらにアデノウィルスベクターを利用して、アデニル酸シクラーゼ6型mRNA発現を増加させると、有意にヒアルロン酸産生が増加した(図2C)。アデニル酸シクラーゼ2型mRNA発現を増加させてもヒアルロン酸産生を増加させず、アデニル酸シクラーゼ2型と6型を同時に増加させると6型のみでは増加していたヒアルロン酸産生が有意に低下した。以上のことから、プロスタグランジンE刺激による動脈管平滑筋細

胞でのヒアルロン酸産生増加にはアデニル酸シクラーゼ6型が主要な役割を果たしており、アデニル酸シクラーゼ2型はむしろヒアルロン酸産生を抑制することが判明した。

③. 本研究ではさらにアデニル酸シクラーゼ6型に内膜肥厚促進作用があることを見出した。

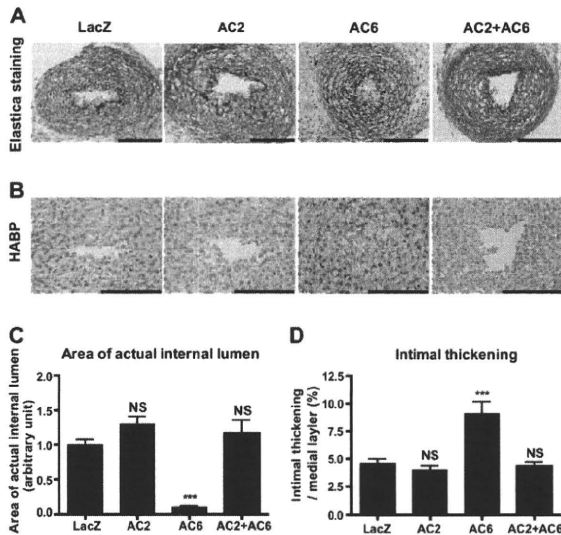


Figure 3. Overexpression of AC6, but not AC2, promoted IT in rat DA explants. (A) Elasticin van Gieson staining for cultured DA explants. Representative images of organ culture of immature rat DA overexpressed with Adv.LacZ, Adv.AC2, Adv.AC6 or Adv.AC2+Adv.AC6. (B) Strong immunoreaction to hyaluronan was found in the DA explants cultured with Adv.AC6. Bars=100 μ m. (C) The area of the internal lumen of the DA treated with Adv.AC6 was significantly decreased (n=8-9). (D) The ratio of IT to the thickness of the medial layer was increased in the DA treated with Adv.AC6, but not with Adv.AC2 (n=8-9). ***P<0.001. Data are from three independent experiments. HABP: hyaluronan binding protein.

ラット胎生19日目の動脈管を含む胸部大動脈を器官培養し、アデノウイルスベクターを利用して、アデニル酸シクラーゼ2型及び6型、また2型と6型同時に動脈管での発現を増やしたところ、アデニル酸シクラーゼ6型の増加によって、有意に動脈管内膜肥厚形成が促進した(図3A-C)。アデニル酸シクラーゼ2型mRNA発現を増加させても動脈管内膜肥厚形成促進せず、アデニル酸シクラーゼ2型と6型を同時に増加させると6型のみでは促進していた内膜肥厚が有意に低下した。さらに選択的にアデニル酸シクラーゼ5型または6型遺伝子を体中から除いてしまった遺伝子欠損マウスを使った実験を行い、アデニル酸シクラーゼ5型欠損しても正常と同様に内膜肥厚が形成されるが、アデニル酸シクラーゼ6型を欠損されたマウス動脈管では内膜肥厚形成が有

意に低下していた(図4)。

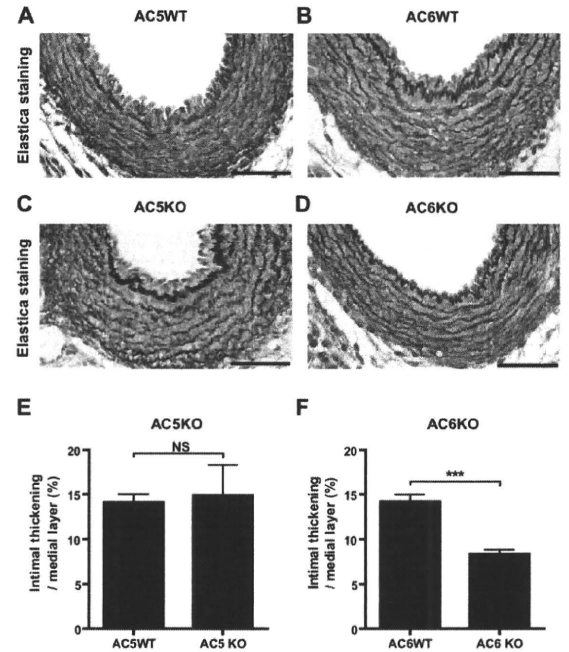


Figure 4. Impaired IT in mouse DA due to AC6, but not AC5, deficiency. (A and C) DAs from AC5KO mice at e18.5 were stained with Elasticin van Gieson stain to visualize IT. Both AC5KO and WT mice showed IT in the DA (n=4-5). (B and D) DAs from AC6KO mice at e18.5 had less IT compared to WT mice (n=8). Bars=50 μ m. ***P<0.001.

以上のことから、プロスタグランジンE刺激による動脈管内膜肥厚にはアデニル酸シクラーゼ6型が主要な役割を果たしていること、アデニル酸シクラーゼ5型には殆ど役割がないこと、アデニル酸シクラーゼ2型はむしろ内膜肥厚を抑制することが判明した。

④. 既に研究代表者石川らが開発していたアデニル酸シクラーゼ6型刺激薬(6-[3-(dimethylamino)propionyl]-14,15-dihydroforskolin:FD6)及び2型・6型刺激薬(6-[N-(2-isothiocyanatoethyl)aminocarbonyl]forskolin:FD1)が血管に及ぼす効果を検討した。FD1, FD6ともに濃度依存的に細胞内cAMP濃度を増加させたが、その効果はFD1の方がFD6よりも強い傾向がみられた(図5B)。FD6は有意にヒアルロン酸産生やヒアルロン酸合成酵素mRNAを増加させたが、FD1では変化がみられなかった(図5C,D)。

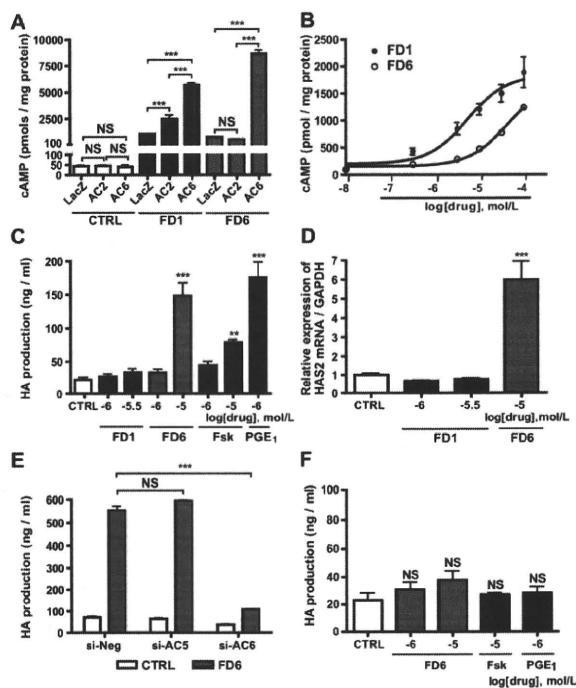


Figure 5. The effects of FD1 and FD6 on cAMP and hyaluronan (HA) production in DASCs. (A) Adv.AC2 or Adv.AC6 enhanced FD1-induced cAMP accumulation. Adv.AC6 increased FD6-induced cAMP production, whereas Adv.AC2 did not (n=6). (B) FD1 and FD6 increased cAMP accumulation in DASCs in a dose-dependent manner (n=4). (C) FD6 increased hyaluronan production as did PGE₁ and forskolin, whereas FD1 did not induce hyaluronan production (n=8-11). (D) FD6, but not FD1, significantly increased HAS2 mRNA (n=6). (E) AC6-, but not AC5-, targeted siRNA negated FD6-induced hyaluronan production (n=4). (F) FD6, PGE₁ and forskolin did not induce hyaluronan production in ASMCs. (n=6) **P<0.01 and ***P<0.001 vs CTRL. Data are from at least three independent experiments. Fsk: forskolin.

FD6によるヒアルロン酸産生はアデニル酸シクラーゼ6型に対するsiRNAを使用したときに有意に低下したが、アデニル酸シクラーゼ5型に対するsiRNAを使用したときには有意な変化を認めなかった(図5E)。さらにこれらの結果は大動脈平滑筋培養細胞では認められない結果であった。以上のことから、FD6はアデニル酸シクラーゼ6型を刺激してヒアルロン酸合成酵素の発現を増加し、ヒアルロン酸産生を促すと考えられた。

⑤. 次にFD6によりアデニル酸シクラーゼ6型を介してヒアルロン酸産生が促進される機序を調べるため、その下流シグナルについて検討を行った。FD6は刺激後5分で有意に動脈管平滑筋細胞でのp38のリン酸化を促進した(図6A, B)。FD6によるp38リン酸化はアデニル酸シクラーゼ6型に対するsiRNAによって相殺された。一方、通常ではp38リン酸化をきたさないFD1に対して、アデニル酸シクラーゼ2型に対する

siRNAを使用して、アデニル酸シクラーゼ2型の発現を抑制したところ、p38のリン酸化が促進された(図6C)。FD6によるヒアルロン酸産生促進作用はp38阻害剤であるSB203580を投与することによって有意に抑制された(図6D)。

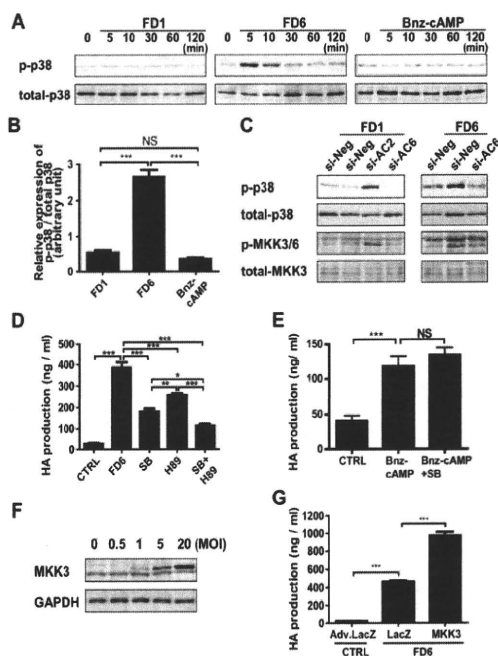


Figure 6. The signaling pathway of AC6-induced hyaluronan (HA) production in DASCs. (A) Representative images of phosphorylation of p38 protein (p-p38) by FD1 (10⁻¹⁰mol/L), FD6 (10⁻¹⁰mol/L) or Bnz-cAMP (10⁻¹⁰mol/L) from four independent experiments. (B) Quantification of the ratio of p-p38 to total p38 after 5 min stimulation by FD1, FD6 or Bnz-cAMP (n=4). (C) Phosphorylation of p38 and MKK3/6 induced by 5 min treatment of FD1 (10⁻¹⁰mol/L) or FD6 (10⁻¹⁰mol/L) in DASCs treated with si-negative, si-AC2 or si-AC6 RNA. Representative images from four independent experiments are shown. (D) FD6-induced hyaluronan (HA) production was attenuated by SB203580 (SB, 2X10⁻⁶mol/L) and H89 (10⁻⁶mol/L) (n=6). (E) SB203580 (2X10⁻⁶mol/L) did not affect Bnz-cAMP-induced hyaluronan production (n=6). (F) MKK3 protein expression was increased by Adv.MKK3 in a dose dependent manner. (G) Adv.MKK3 enhanced FD6-induced hyaluronan production (n=6). *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001. Data are from at least three independent experiments.

FD6は刺激後5分で有意に動脈管平滑筋細胞でのp38のリン酸化を促進した(図6A, B)。FD6によるp38リン酸化はアデニル酸シクラーゼ6型に対するsiRNAによって相殺された。一方、通常ではp38リン酸化をきたさないFD1に対して、アデニル酸シクラーゼ2型に対するsiRNAを使用して、アデニル酸シクラーゼ2型の発現を抑制したところ、p38のリン酸化が促進された(図6C)。FD6によるヒアルロン酸産生促進作用はp38阻害剤であるSB203580を投与することによって有意に抑制された(図6D)。我々は以前の研究において、プロスタグランジンE刺激はcAMP依存性プロテインキナーゼAを介してヒアルロン酸産生が