

促進することを示してきたが、本研究でもFD6によるヒアルロン酸産生促進作用はプロテインキナーゼA阻害剤であるH89によって抑制されることを確認した。重要な点はSB203580とH89を同時に投与すると単独で投与するより以上の抑制効果がみられた点である。さらにcAMP依存性プロテインキナーゼA刺激薬であるBnz-cAMPによってヒアルロン酸産生は促進されるが、この効果はSB203580によっては抑制されなかった(図6E)。従って、cAMP依存性プロテインキナーゼAとMAPKファミリーであるp38はお互いに独立してヒアルロン酸産生を促進していることを明らかとした。また、p38のリン酸化酵素であるMKK3をアデノウィルスベクターを用いて過剰発現したところ、FD6によるヒアルロン酸産生促進作用はさらに増強したことから、p38のリン酸化がヒアルロン酸産生に重要な役割を果たしていることを確認することが出来た(図6F,G)。

⑥. 次にFD1とFD6の動脈管内膜肥厚に及ぼす影響について、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、FD1とFD6を与えたところ、FD6によって、有意に動脈管内膜肥厚形成が促進した(図7A-C)。一方、FD1には内膜肥厚促進効果は認めなかった。

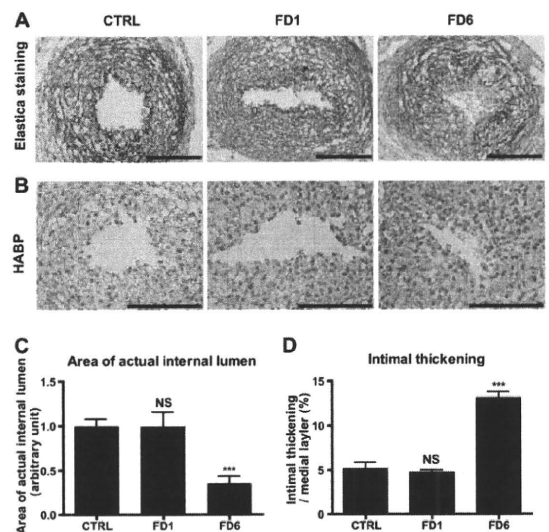


Figure 7. IT in rat DA explants is promoted by FD6, but not FD1. (A) Representative images of Elastic van Gieson staining for DA explants treated with FD1 or FD6. (B) Strong immunoreaction to hyaluronan was found in DA explants cultured with FD6. (C) The area of the internal lumen of the DA treated with FD6 was significantly decreased (n=6-7). (D) The IT was increased in DA treated with FD6, but not with FD1 (n=6-7). ***P<0.001 vs control (CTRL). Data are from three independent experiments. Bars=100 μ m. HABP: hyaluronan binding protein.

⑦. 次に摘出動脈管リングを灌流液に浸しながら、非常に強力な動脈管収縮薬剤であるインドメタシンを投与し、血管張力を測定した。インドメタシンによる血管収縮状態で、FD1、FD6を加えたところ、ともに濃度依存的にインドメタシンによる血管収縮を抑制した(図8A)。

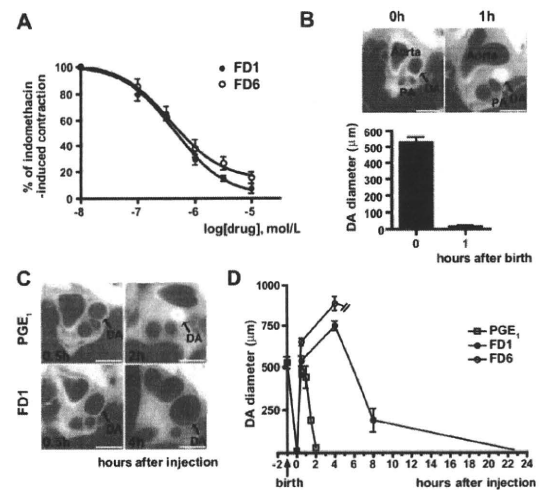


Figure 8. The effects of FD1 and FD6 on vasodilation. (A) FD1 and FD6 similarly attenuated indomethacin-induced contraction in DA explants in a dose-dependent manner (n=4-10). (B) The whole-body freezing method revealed that the rat DA opens widely after birth and closes 1 h after birth (arrow, n=5). (C) Representative images of rat DAs treated with PGE₁ and FD1 using the whole-body freezing method. (D) The vasodilating effects of PGE₁, FD1 or FD6 were compared (n=5-7). FD1 had a longer action of duration than did PGE₁. All rats injected with FD6 died 4h after injection due to apnea. Data are from at least three independent experiments. Bars=1 mm. PA: pulmonary artery

次いで、FD1、FD6の効果を生体ラットで観察した。生後1時間以内にラット動脈管は閉鎖する(図8B)。ところがFD1、FD6を投与することにより、動脈管の閉鎖は有意に遅延した(図8C、D)。特に注目すべ

きは臨床の現場で用いられている動脈管拡張剤のプロスタグランジンE1製剤が約2時間で効果がなくなるのに比べ、FD1においてはその効果が約24時間持続した。一方、FD6も血管拡張作用を認めたが、ほぼ全てのラット新生仔が生後4時間以内に死亡した。死亡前には呼吸状態が非常に悪くなっており、呼吸抑制および肺血管拡張による過度の肺血流量の増加がその死因である可能性が推察された。生体での実験結果からは、アデニル酸シクラーゼ2型および6型には強くかつ持続性のある血管拡張作用があることが明らかとなった。

以上の結果からアデニル酸シクラーゼ2型および6型への刺激効果を併せ持つ薬剤 (FD1) では、動脈管リモデリングへの影響が殆どなく、主に血管拡張作用を有することを明らかにした。これは現在のプロスタグランジンE1製剤がもつ不利な点を除くことが出来る点で新たな動脈管開存維持薬の開発につながる成果であると考えられた。一方、本研究結果を心不全の観点から考えるときには、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤を心不全患者に利用する場合、心筋栄養血管への影響 (血液供給に及ぼす作用) や全身の血管に与える影響についても検討を加える必要性を示唆していると考えられた。

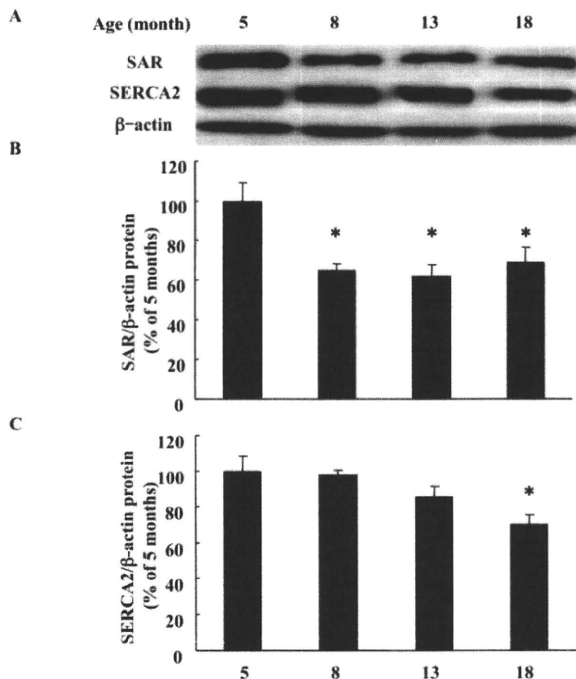
2. 心不全モデルとしてのサルカルメニン

(sarcalumenin)ノックアウトマウスの検討。心筋細胞が電氣的に興奮すると、細胞内Ca²⁺が上昇して、筋原繊維が収縮する過程は、ひと続きの連鎖状の反応から成り立つ。これを総称して、興奮収縮連関という。その連鎖状の反応は、まず心筋細胞膜が興奮し、脱分極により活動電位が生じることから始まる。膜電位の上昇によって、電位依存性Ca²⁺チャネル (Voltage-dependent Ca²⁺channel; VDCC)が開口し、Ca²⁺が細胞外から細胞内に流入する。心筋筋小胞体に存在するCa²⁺放出チャネル—別名リアノジン受容体 (Ryanodine receptor; RyR2)は、VDCCに近接して

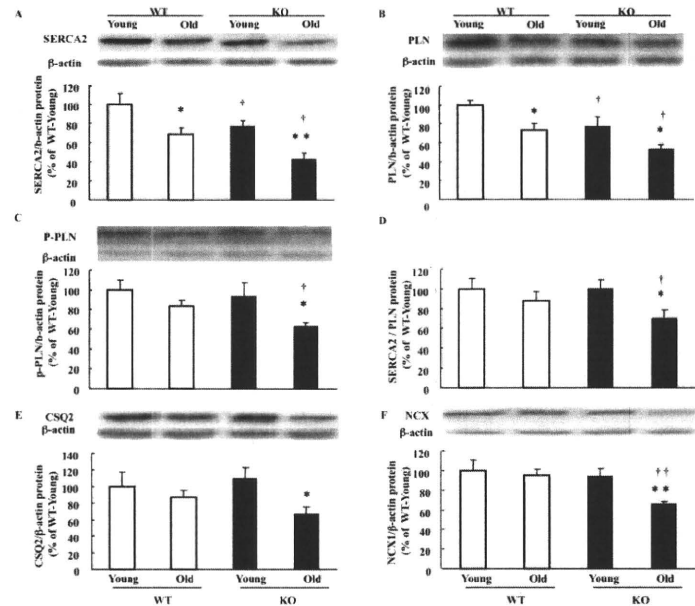
存在し、細胞外から細胞内に流入してきたCa²⁺を感知すると、そのチャネルを開口する。すると筋小胞体内に大量に存在するCa²⁺が筋小胞体内からRyR2を介して細胞内に一斉に放出される。心筋細胞内で増加したCa²⁺は、細い筋原繊維 (アクチンフィラメント) 上にあるカルシウム親和性の高い分子であるトロポニンCと結合する。Ca²⁺が結合すると、トロポニンCの立体構造が変化し、細い筋原繊維は太い筋原繊維 (ミオシンフィラメント) に接近する。これによってミオシンフィラメントは活性化され、心筋の収縮が開始する。弛緩期には、細胞内Ca²⁺の大部分が、心筋筋小胞体に存在するCa²⁺ポンプである筋小胞体Ca²⁺-ATPase 2a (SERCA2a)により、再び筋小胞体内へ取り込まれる。また一部は細胞膜に存在するNa⁺/Ca²⁺交換機構 (Na⁺/Ca²⁺ exchanger; NCX) と細胞膜Ca²⁺-ATPaseを介して、細胞外に排出される。こうして細胞内Ca²⁺濃度が低下するとともに、トロポニンCからCa²⁺が乖離し、筋原繊維は弛緩し、心臓は拡張する。収縮時に利用できる細胞内Ca²⁺濃度が減少すると、心筋の収縮性は濃度依存的に低下することからも、細胞内Ca²⁺濃度と心機能の重要性を伺うことが出来る。逆に言えば、興奮収縮連関に関わる分子に異常が生じると、収縮弛緩時に利用できる細胞内Ca²⁺濃度に異常をきたすため、容易に心機能が低下することになる。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ことが知られている。これまでの検討ではサルカルメニンノックアウトマウスでは、圧負荷や強度の運動負荷をかけると筋小胞体機能低下が進行し、心機能が顕著に悪化することが判明している。加齢は全てのヒトに生じ、心不全の憎悪因子となるために、我々は本研

究において加齢がサルカルメニンノックアウトマウスの心機能に与える影響を検討した。

①. 加齢が心筋でサルカルメニンと心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプのタンパク発現レベルに及ぼす影響について検討をしたところ、サルカルメニン、心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプともに、加齢につれて有意に発現量の低下がみられた(図9)。興味深いことに心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプの発現低下は生後1年を過ぎてから徐々に進行するが、サルカルメニンはそれに先行して、生後8ヶ月から有意に低下することがわかった。サルカルメニンは心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプに結合して、心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプが膜タンパクとして安定して発現するために重要と考えられていることから、サルカルメニンの低下が心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプの発現低下を引き起こすことが推定された。

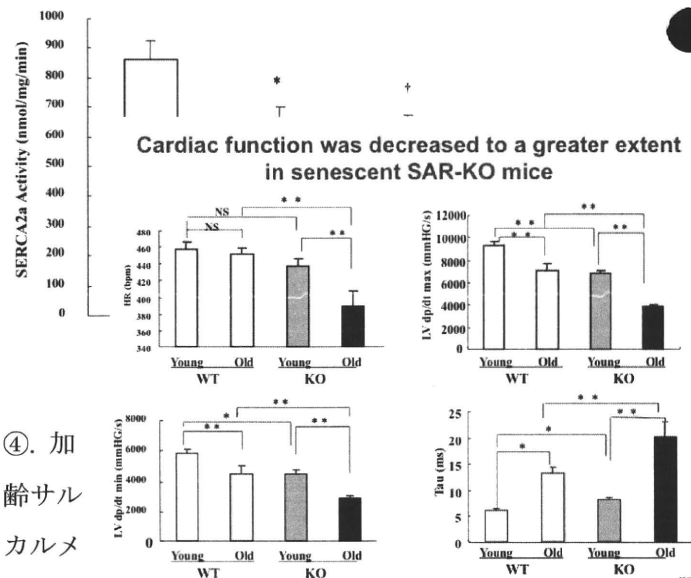


②. 加齢によってサルカルメニンノックアウトマウスでの筋小胞体関連タンパクの発現低下がみられた。



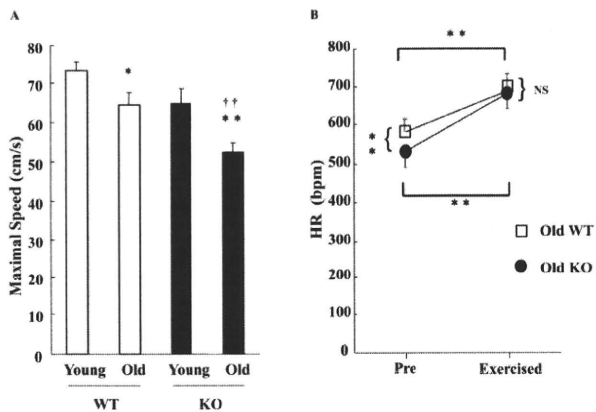
加齢サルカルメニンノックアウトマウス(約18ヶ月)では、野生型加齢マウスに比して、心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプ(図10A)、フォスホランバン(図10B)、リン酸化フォスホランバン(図10C)、心筋カルセクエストリン(図10E)、ナトリウムカルシウム交換体(図10F)の全てにおいてタンパク発現が低下していた。

③. 加齢サルカルメニンノックアウトマウスでは有意に心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプ活性の低下が認められた(図11)。

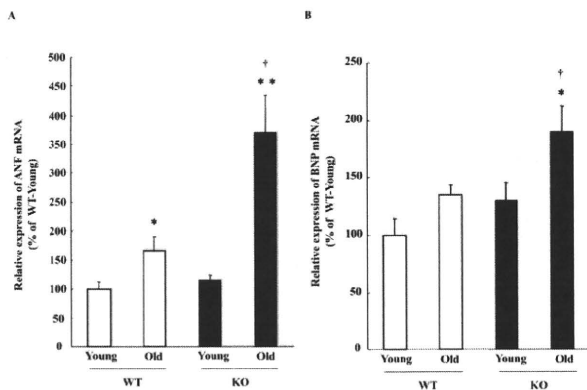


④. 加齢サルカルメ

ニンノックアウトマウスでは有意に運動耐容能の低下が認められた (図12)。



⑤. 心不全時にはバイオマーカーである心房性ナトリウム利尿ホルモン (atrial natriuretic factor: ANF) や脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP) の上昇がみられる。加齢サルカルメニンノックアウトマウスでは有意にANFやBNPの上昇が認められ、心不全状態にあることが示唆された (図13)。

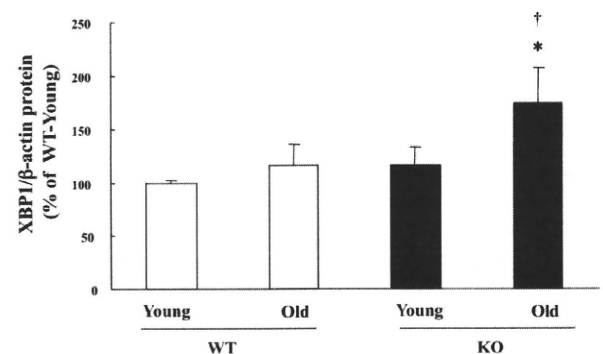
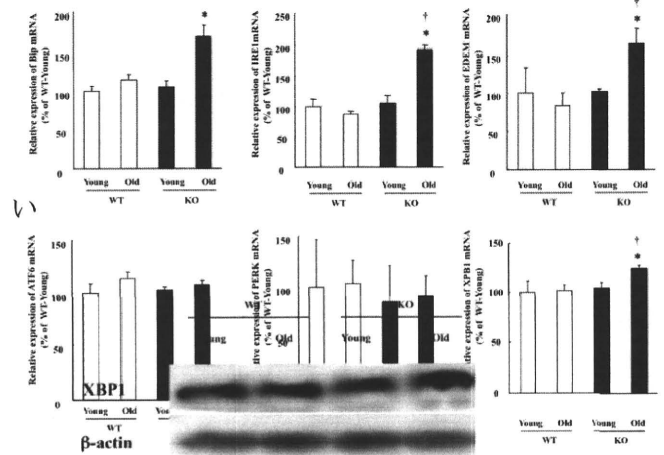


⑥. 加齢サルカルメニンノックアウトマウスでは有意に心機能の低下が認められた (図13)。

⑦. 近年、小胞体ストレスが心機能の維持や心不全の進展にも重要であることが知られるようになってきたため、本研究でも加齢サルカルメニンノックアウトマウスでの小胞体ストレス関連分子のmRNA発現やタンパク発現について検討した。

加齢サルカルメニンノックアウトマウスでは有意に小胞体ストレス関連因子であるBip、IRE1、EDEM、XBP1 mRNAが増加していた (図14)。また、XBP1についてはタンパクレベルもWestern blot法にて検討し、加齢サルカルメニンノックアウトマウスでは有意に増加していることが判明した (図15)。

以上の結果から、加齢サルカルメニンノックアウトマウスの心筋では小胞体ストレスが亢進して



ることが判明した。

①-⑦の結果を総合して考えると、加齢サルカルメニンノックアウトマウスは心不全時における典型的な症状を呈しており、心臓型サブタイプの阻害剤の心不全予防効果を判定するのに適切なモデルであることがわかった。

3. 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は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、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。ラットと同様の方法でモノクロタリンをマウス腹腔内に注射した場合、ラットでは一回投与のみで確実に肺高血圧症を惹起することが可能であるが、マウスでは一回投与のみでは肺高血圧症を惹起できないことが判明した。そこで現在、週1回から2回にラット一回注射に相当する量を8週間注射し続けるというプロトコールにて、マウスへの肺高血圧症および右心不全モデルの作成が可能かどうか検討を行っているところである。

4. 心不全モデルとしての α B-クリスタリン変異マウスの検討。

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、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ことが知られている。 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ことが知られている。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、特に生命予後に関する効果判定を行うのに適当であると考えられる。そこで我々の研究室では、岩手医大三部教授から本マウスを譲渡していただき、まずその表現型を解析した。その結果、本マウスでは生後6-7ヶ月には全てのマウスが死亡してしまうことを確認できた。

E. 結論

心不全が慢性化すると、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変化をもたらす。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ととなる。「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として血管運動調節は非常に重要である。本研究によって心筋細胞の機能を保つために血管の収縮や内膜肥厚などの血管リモデリングの機序を知ることは大変重要である。本研究では動脈管という胎生期の血管において、アデニル酸シクラーゼアイソフォームの発現とその変化を求めたところ、動脈管では2型、5型、6型のアイソフォームが多く、6型アイソフォームが主に内膜肥厚に関与していることが示された。

本研究によって異なる3種類の心不全モデルマウスの特徴を把握し、今後の心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定をゆくための基礎データを得ることができた。今後はより詳細にマウスモデルに対して、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の予防効果を今後検討していきたい。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, Ishikawa Y. Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298(3):C450-6, 2010.
2. Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Masuda SI, Shigenaga AI, Maeda A, Mogi

- M, Ichihara N, Kobayashi Y, Hirawa N, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Horiuchi M, Minamisawa S, Umemura S. Cardiac-Specific Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Completely Suppresses Cardiac Hypertrophy in Chronic Angiotensin II-Infused Mice. *Hypertension* 55 (5): 1157-64, 2010.
3. Yokoyama U, Minamisawa S (correspondence), Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 106 (12): 1882-92, 2010.
 4. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res.* 46 (2): 77-87, 2010.
 5. 横山詩子、南沢享、中澤誠. 出生に関わる循環アダプテーション③動脈管の分子生物学. *Fetal & Neonatal Medicine* 2 (2): 12-15, 2010.
 6. Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga AI, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(5):F991-F1003, 2010.
 7. Nakano H, Williams E, Hoshijima M, Sasaki M, Minamisawa S, Chien KR, Nakano A. Cardiac origin of smooth muscle cells in the inflow tract. *J Mol Cell Cardiol.* 50(2):337-45, 2011.
2. 学会発表
 2. 南沢 享. プロスタグランジン E の新たな作用—動脈管リモデリングへの多面的関与: 第 8 回京都心血管代謝セミナー. 京都、杉浦ホール、2010 年 6 月 4 日.
 3. Minamisawa S (シンポジスト). A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network (Overview). The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
 4. Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, wasaki S, Ishikawa Y. Oxygenation Promotes Migration of Smooth Muscle Cell in the Rat Ductus Arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV – February 10-13, 2010 at the Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, Monterey, California.
 5. Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y. Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)
 6. Yokota T, Ozawa M, Yokoyama U, Minamisawa S. A Role of Thromboxane A2 Receptor in the Rat Ductus Arteriosus as a Vasoconstrictor. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010.6.20-24, Los Angeles)
 7. Yokoyama U, Shioda A, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 84th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2010.11.13-11.17, Chicago, USA) Circulation. Oct. suppl.II; 2010 (Abstract)
 8. 岩崎志穂、青木理加、西巻滋、横田俊平、南沢 享、横山詩子 「ラット動脈管内膜肥厚におけるアデニル酸シクラーゼアイソフォームの役割の検討」第 46 回日本周産新生児医学会 (2010.7.11-13 神戸)
 9. Shioda A, Yokoyama U, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 33th Annual Meeting of the Molecular Biological Society of Japan (2010.12.7-10, Kobe)
 10. Liu N, Yokota T, Maekawa S, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S. Successful Isolation of Vascular

Endothelial Cells from the Rat Ductus Arteriosus.
The 88th Annual Meeting of the Physiological
Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)

11. Aida T, Yokota T, Yokoyama U, Minamisawa S.
Thromboxane A2 Receptor Stimulation Specifically
Causes Closure of the Rat Ductus Arteriosus. The
88th Annual Meeting of the Physiological Society of
Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
12. Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Minamisawa S,
Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y. Epac1 promotes
vascular remodeling upon vascular injury *in vivo*.
The 88th Annual Meeting of the Physiological
Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
13. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki
M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. Serum
depletion and three-dimensional multilayer
composition induce elastic fiber formation and a
contractile phenotype of rat vascular smooth muscle
cells. The 88th Annual Meeting of the Physiological
Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama)
14. Jiao Q, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y,
Minamisawa S. Sarcalumenin plays a critical role in
age-related cardiac dysfunction due to decreases in
SERCA2a expression and activity. The 88th Annual
Meeting of the Physiological Society of Japan
(2011.3.28-30, Yokohama)
15. Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y.
Regulation of vascular remodeling of the ductus
arteriosus. The 88th Annual Meeting of the
Physiological Society of Japan (2011.3.28-30,
Yokohama)
16. Yokota T, Aida T, Yokoyama U, Minamisawa S.
Thromboxane A2 Receptor Stimulation Induces
Closure of the Rat Ductus Arteriosus. The 5th Global
COE International Symposium on 'Practical
Chemical Wisdom' (2011.1.13-14, Waseda
University, Tokyo)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

検討中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

1) アデニル酸シクラーゼの下流シグナルとしてプロテインキナーゼAとEpacの作用の違いを検討し、以下の結果を得ているため、掲載論文を記載するとともに、掲載時の図を添付する。

Yokoyama U, Minamisawa S (correspondence), Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, Ishikawa Y.

PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. *J Biol Chem.* 1283 (42): 28702-9, 2008. (査読有)

Figure 1

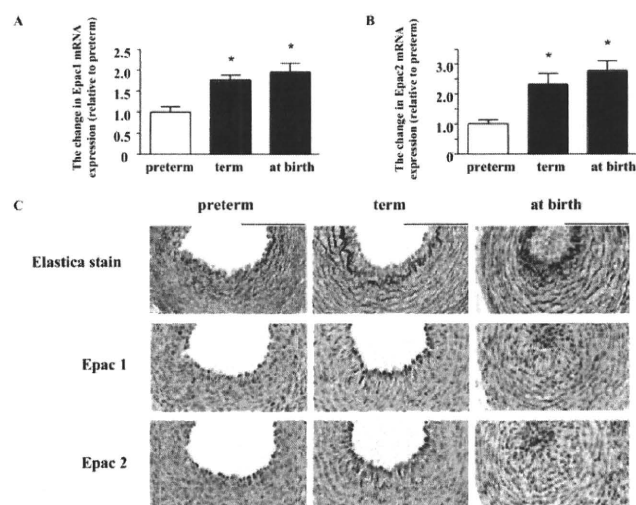


Figure 2

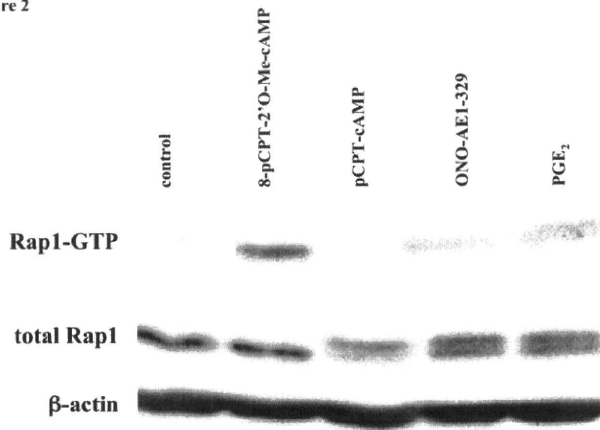


Figure 4

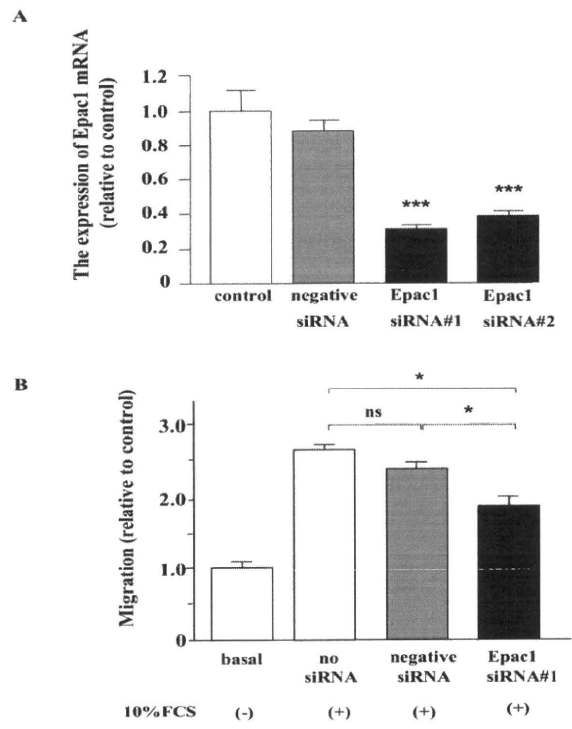


Figure 3

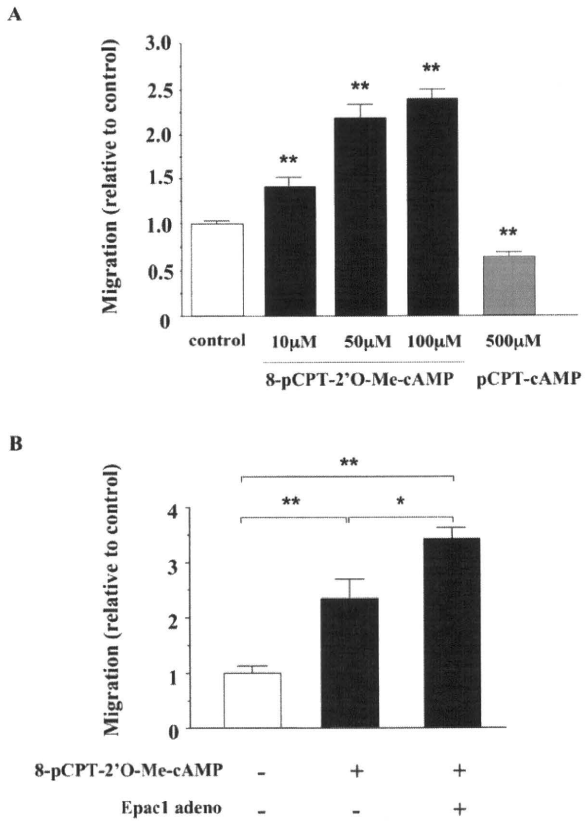


Figure 5

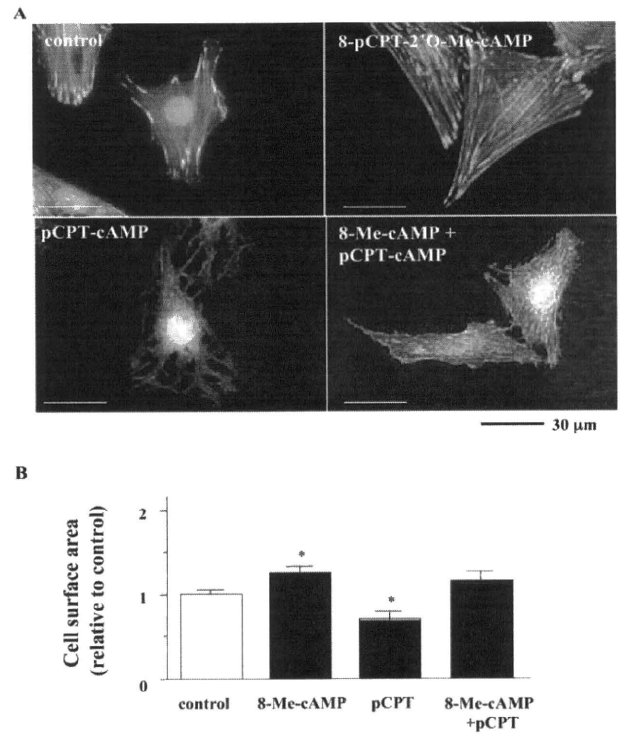


Figure 6

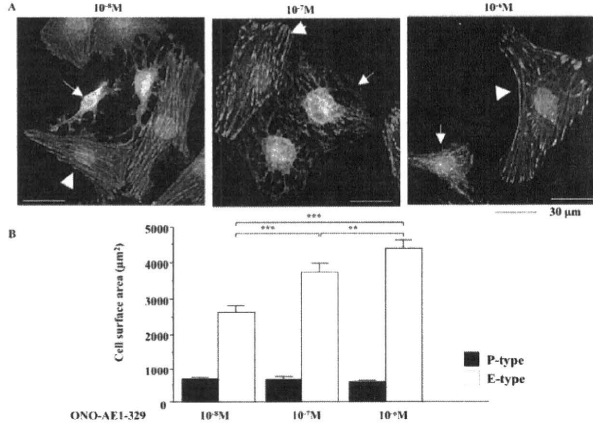


Figure 7

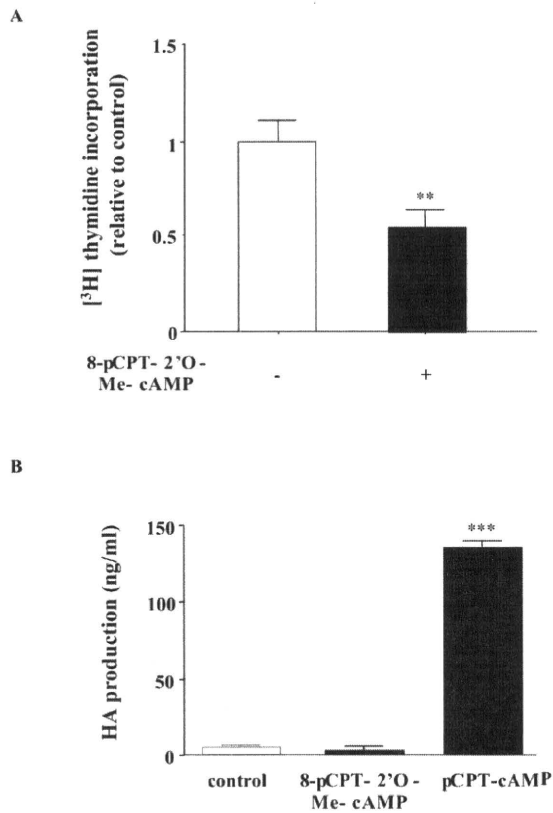


Figure 8

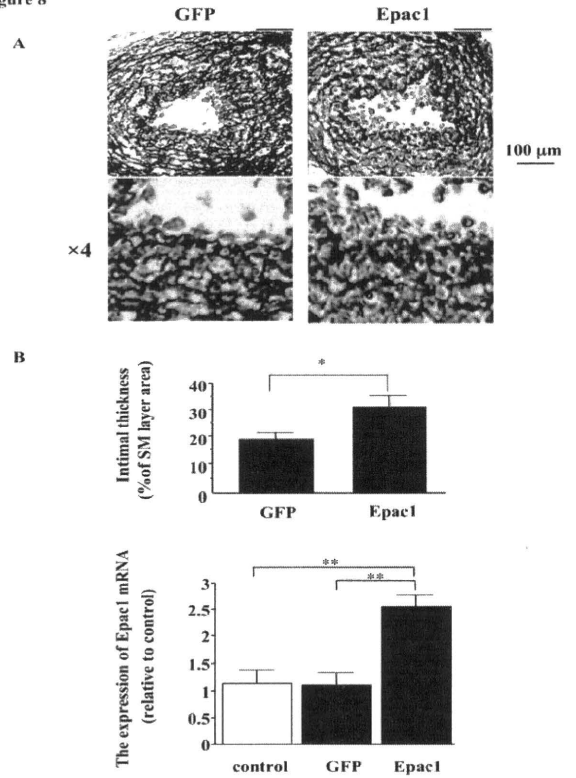
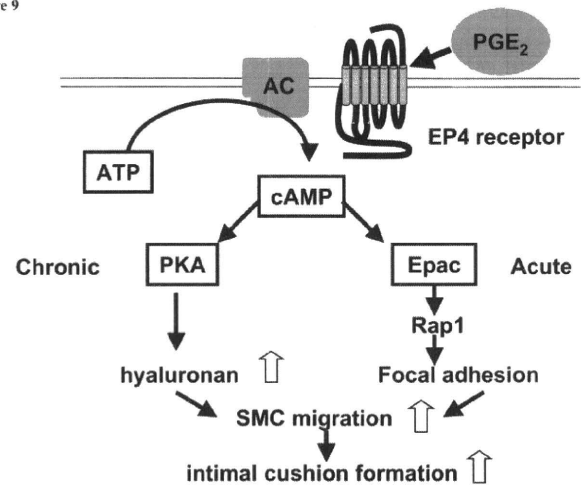


Figure 9



2) 本研究課題である心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤による心不全の治療とは直接には関係しないが、我々の研究室は横浜市立大学循環器内科の田村医師と共同研究を行い、心不全の発症進展に重要な鍵を握っているアンギオテンシン受容体に接合する

新規のタンパクATRAPを発見した。ATRAPと心臓肥大との関連について検討し、以下の論文を発表した。本研究は心不全発症の機序とも関連し、本研究の進展に寄与するものである。

Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Masuda SI, Shigenaga AI, Maeda A, Mogi M, Ichihara N, Kobayashi Y, Hirawa N, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Horiuchi M, Minamisawa S, Umemura S. Cardiac-Specific Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Completely Suppresses Cardiac Hypertrophy in Chronic Angiotensin II-Infused Mice. *Hypertension* 55 (5): 1157-64, 2010.

Fig. 1

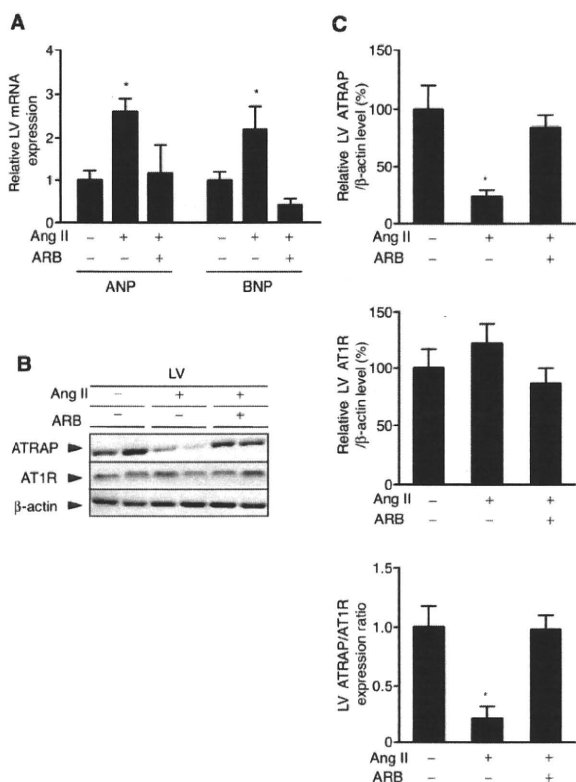


Fig. 2

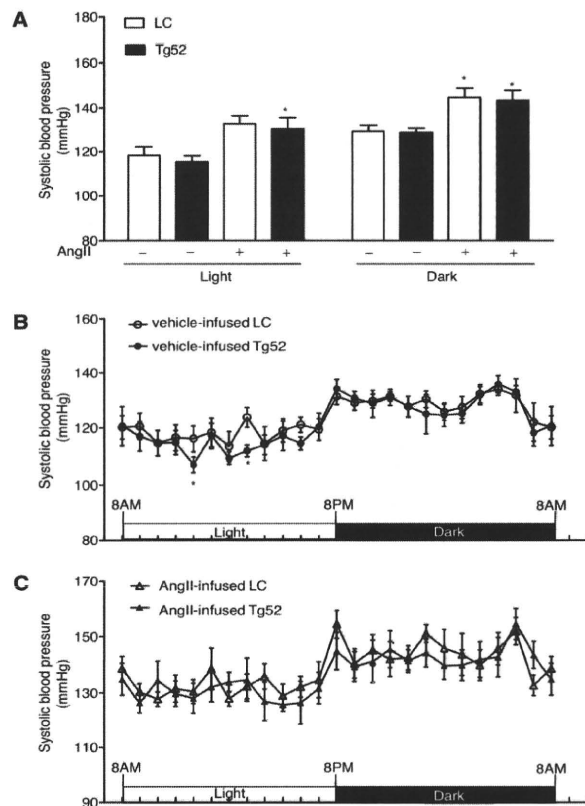


Fig. 3

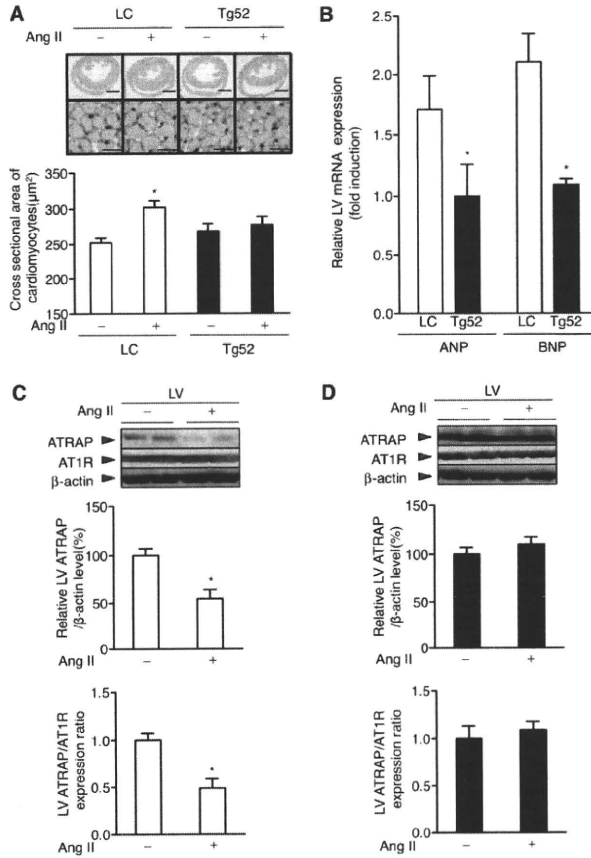
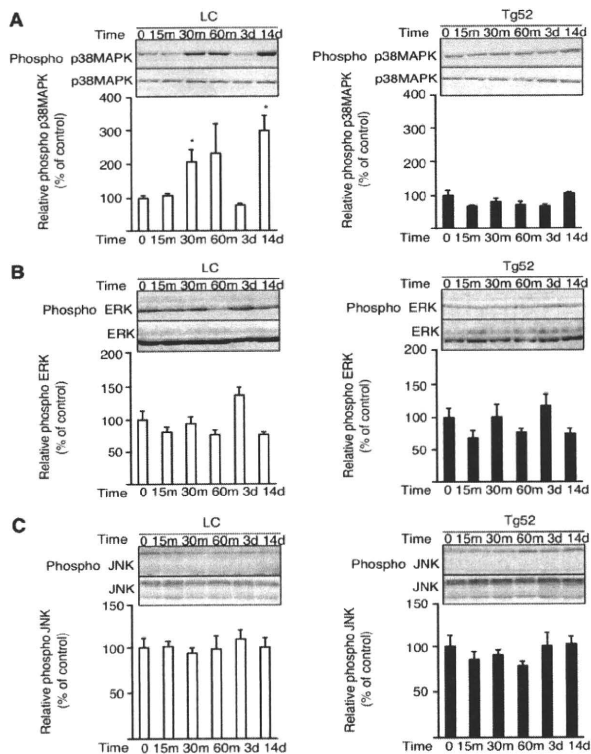


Fig. 4



Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga AI, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(5):F991-F1003, 2010.

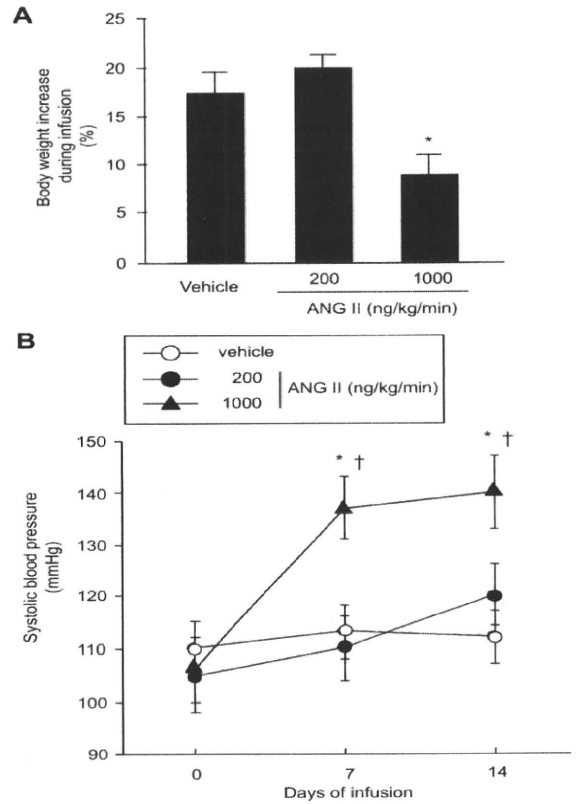


Fig. 1. Effects of continuous ANG II infusion on body weight (A) and systolic blood pressure (B) during the treatment period. Adult male C57BL/6 mice were divided into 3 groups ($n = 6-8$ mice/group) for the subcutaneous infusion of vehicle or ANG II (either 200 or 1,000 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) via an osmotic minipump for 14 days. The values of the percent body weight increase and systolic blood pressure are expressed as means \pm SE ($n = 6-8$ /group). * $P < 0.05$ vs. vehicle. † $P < 0.05$ vs. day 0.

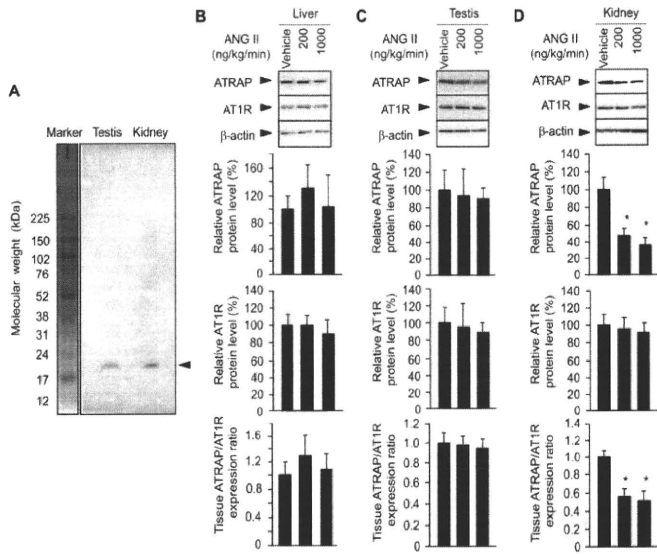


Fig. 2. Western blot showing the signal specificity of the ANG II type 1 receptor (AT1R)-associated protein (ATRAP) protein detected by the polyclonal anti-ATRAP antibody through visualization of the entire size range (A) and representative Western blots showing the effects of continuous ANG II infusion on the total protein expression of ATRAP and AT1R in the tissues of mice infused with vehicle or ANG II (200 or 1000 ng kg⁻¹ min⁻¹) for 14 days [Liver (B), testis (C), kidney (D)]. Measurement of the ATRAP-to-AT1R ratio was performed as described in METHODS. The values were calculated relative to those obtained with extracts from mice infused with vehicle and are expressed as means \pm SE ($n = 6$ /group). * $P < 0.05$ vs. vehicle.

Fig. 3. Effects of continuous ANG II infusion on ATRAP (A), angiotensinogen (Agt; B), NADPH oxidase 4 (NOX4; C), and the α -subunit of the epithelial sodium channel (α -ENaC; D) mRNA expression in the mouse kidney. Real-time quantitative RT-PCR analysis shows the relative ATRAP, Agt, NOX4, and α -ENaC mRNA levels in the kidney of mice infused with vehicle or ANG II (200, 1,000, or 2,500 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) for 14 days. The values were calculated relative to those obtained with extracts from mice infused with vehicle and are expressed as means \pm SE ($n = 6/\text{group}$). * $P < 0.05$ vs. vehicle.

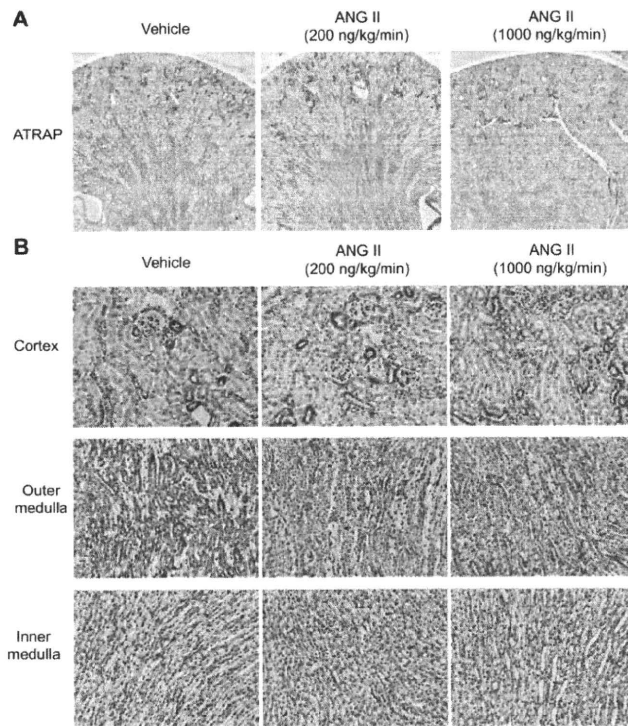
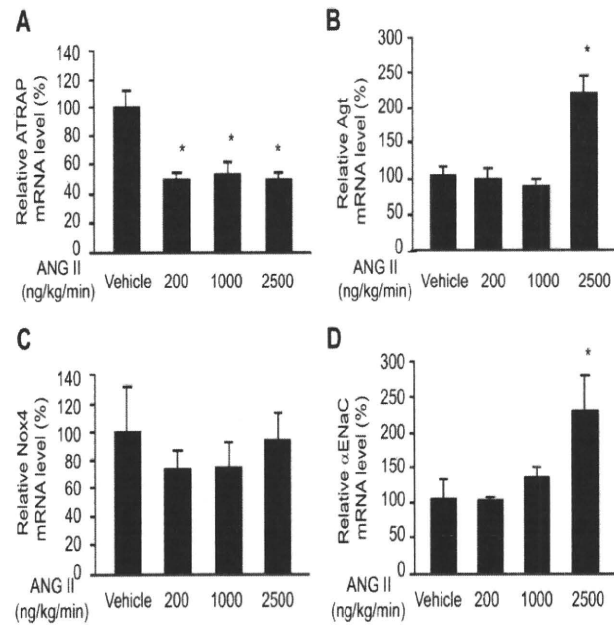


Fig. 4. Representative kidney sections showing the expression of total ATRAP protein in the kidney of mice infused with vehicle or ANG II (200 or 1,000 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) for 14 days (A). Positive areas for ATRAP are evident as the brown dots in the sections. Higher magnification of the kidney sections show effects of continuous ANG II infusion on the immunohistochemical localization of ATRAP expression in the renal cortex, outer medulla, and inner medulla in mice treated with vehicle or ANG II (B). Original magnification: $\times 20$ (A); $\times 200$ (B).

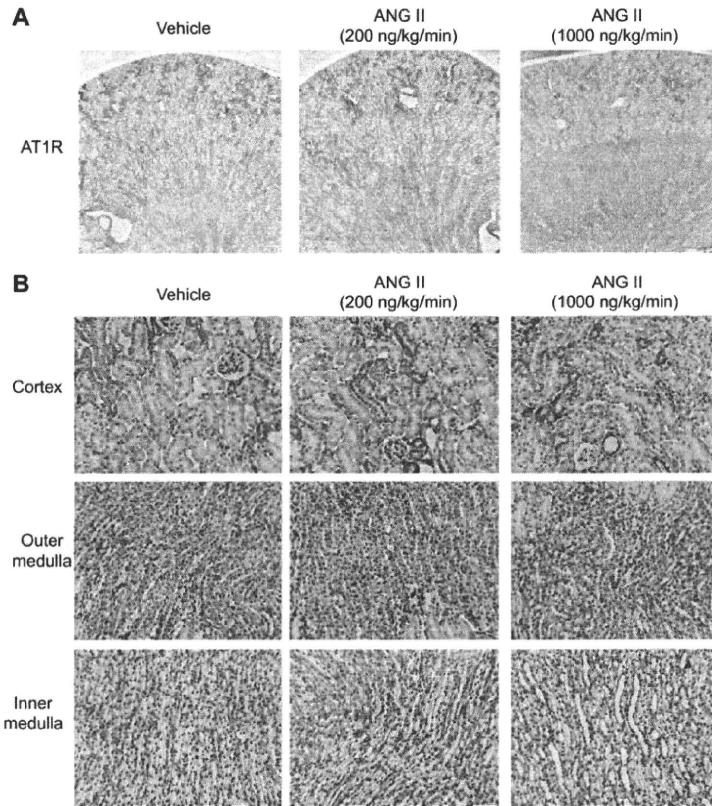


Fig. 5. Representative kidney sections showing the expression of the total AT1R protein in the kidney of mice infused with vehicle or ANG II (200 or 1,000 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) for 14 days (A). Positive areas for the AT1R appear as the brown dots in the sections. Higher magnification of kidney sections showing the effects of continuous ANG II infusion on immunohistochemical localization of AT1R expression in the renal cortex, outer medulla, and inner medulla in mice treated with vehicle or ANG II (B). Original magnification: $\times 20$ (A); $\times 200$ (B).

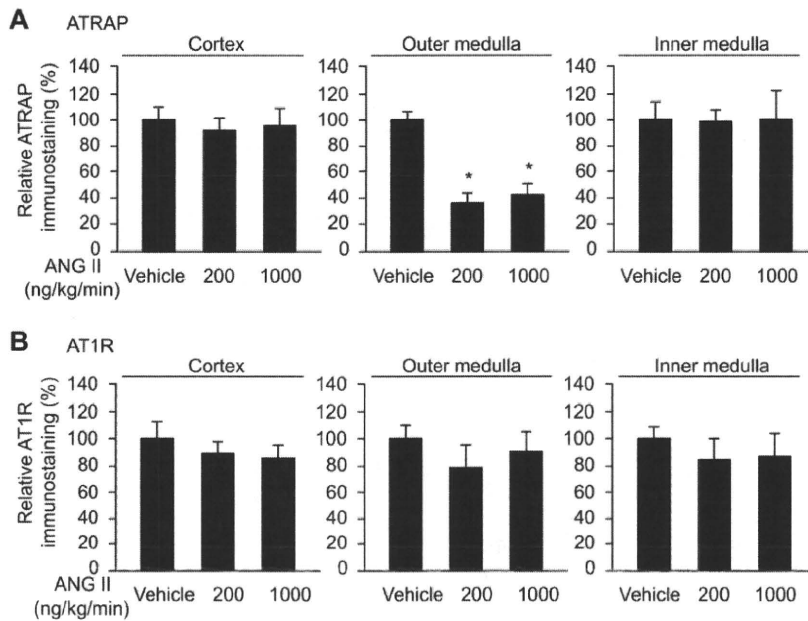
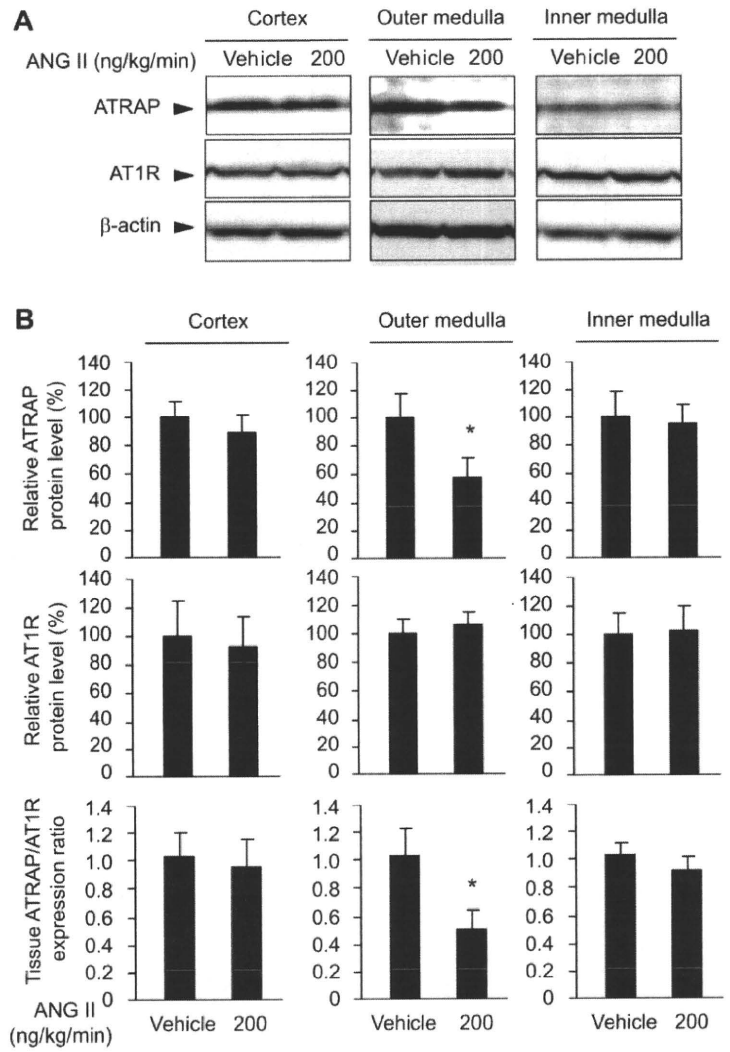


Fig. 6. Semiquantitative evaluation of the immunohistochemical analysis of ANG II-mediated effects on total ATRAP (A) and AT1R (B) protein expression in the renal cortex, outer medulla, and inner medulla in mice treated with vehicle or ANG II. The values were calculated relative to those obtained with extracts from mice infused with vehicle and are expressed as means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. vehicle.

Fig. 7. Representative Western blots showing the effects of continuous ANG II infusion on the total protein expression of ATRAP and AT1R in the renal cortex, outer medulla, and inner medulla in mice infused with vehicle or ANG II (200 ng·kg⁻¹·min⁻¹) for 14 days (A). Measurement of the ATRAP-to-AT1R ratio was performed as described in METHODS (B). The values were calculated relative to those obtained with extracts from mice infused with vehicle and are expressed as means ± SE (n = 6/group). *P < 0.05 vs. vehicle.



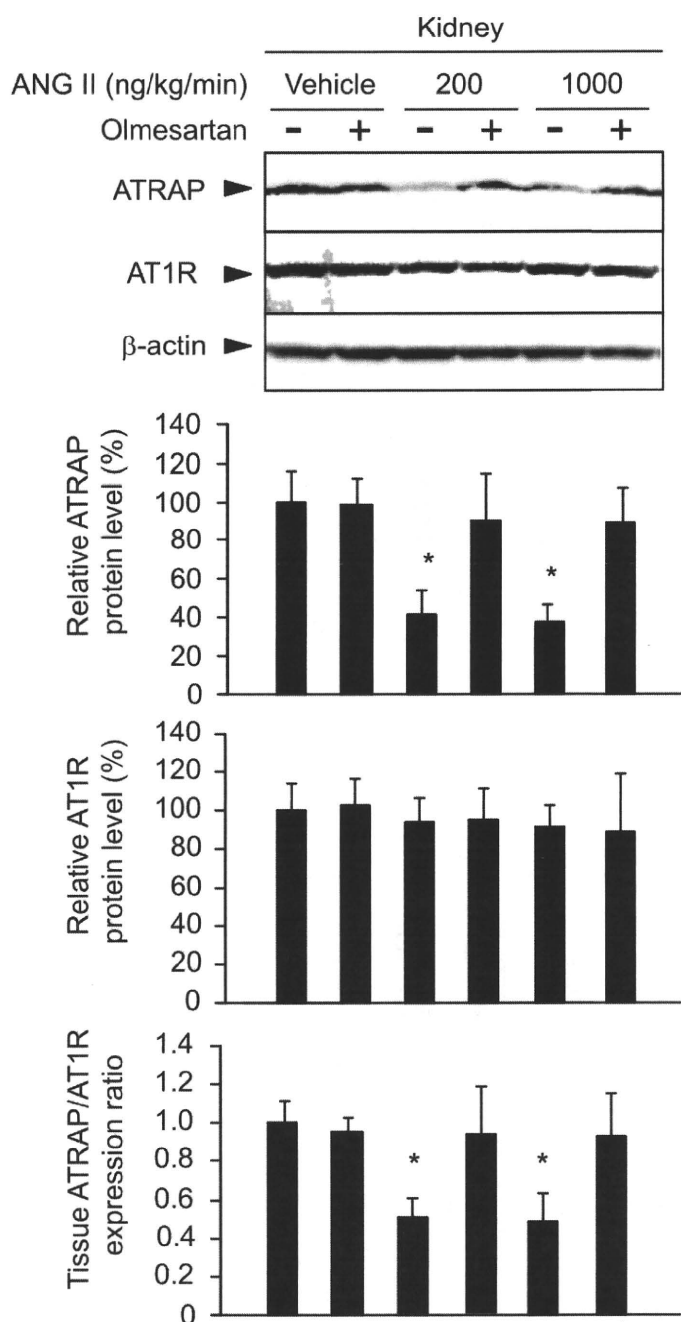


Fig. 8. Representative Western blots showing the effects of continuous ANG II infusion on the total protein expression of ATRAP and AT1R in the kidney of mice infused with vehicle or ANG II (200 or 1,000 ng·kg⁻¹·min⁻¹) with or without olmesartan treatment (10 mg·kg⁻¹·day⁻¹ in the drinking water) for 14 days. Measurement of the ATRAP-to-AT1R ratio was performed as described in METHODS. The values were calculated relative to those obtained with extracts from mice infused with vehicle without olmesartan and are expressed as means ± SE (*n* = 6/group). **P* < 0.05 vs. vehicle without olmesartan.

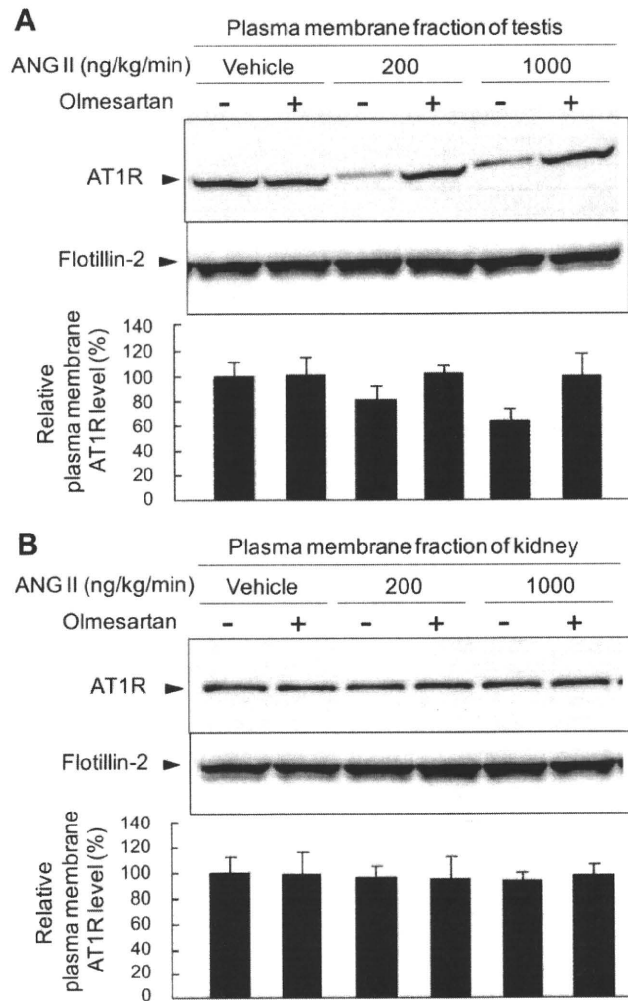
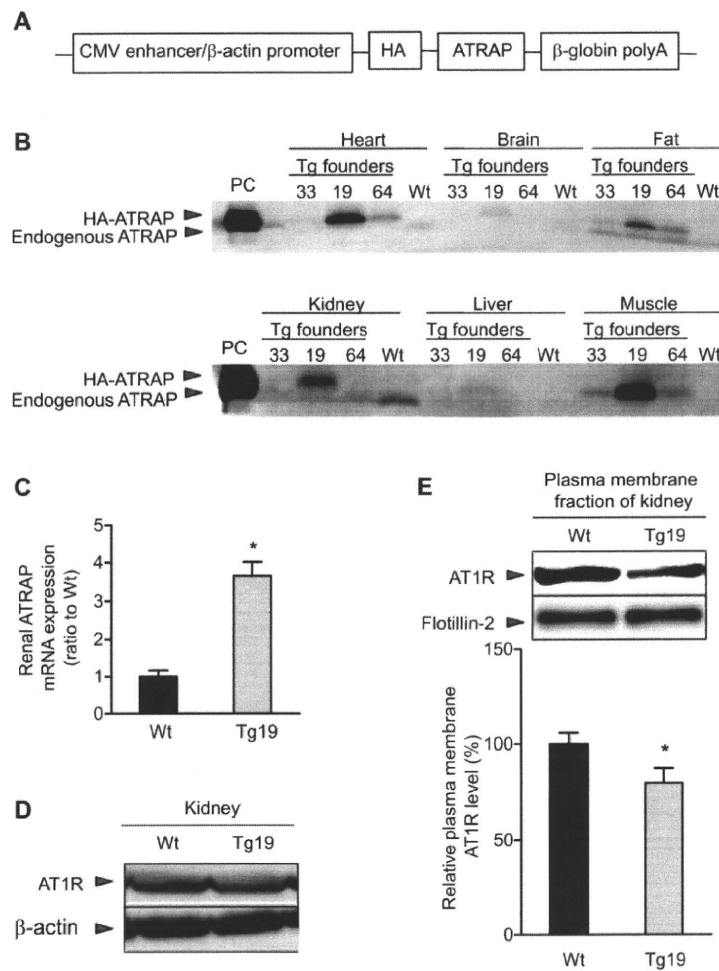


Fig. 9. Representative Western blots showing the effects of continuous ANG II infusion on the plasma membrane AT1R protein level in the tissues of mice infused with vehicle or ANG II (200 or 1,000 ng·kg⁻¹·min⁻¹) with or without olmesartan treatment (10 mg·kg⁻¹·day⁻¹ in the drinking water) for 14 days [testis (A); kidney (B)]. Flotillin-2 is constitutively localized to the plasma membrane and is an internal control protein. The values were calculated relative to those using plasma membrane fractions from mice infused with vehicle without olmesartan and are expressed as means ± SE (*n* = 6/group). **P* < 0.05 vs. vehicle without olmesartan.

Fig. 10. Generation of ATRAP transgenic mice and decrease in the plasma membrane AT1R expression in the kidney. **A:** transgenic mice expressing ATRAP were generated on a C57BL/6J background with standard techniques. Briefly, the hemagglutinin (HA)-tagged mouse ATRAP cDNA was subcloned into the pCAGGS expression vector, which contained the cytomegalovirus (CMV) enhancer and chicken β -actin (CAG) promoter, and the resultant transgene construct was microinjected into the pronuclei of fertilized mouse embryos at the single-cell stage to generate transgenic mice (C57BL/6 strain). **B:** Western blot analysis of ATRAP expression at the protein level revealed the highest renal expression level (= 3-fold) of ATRAP (HA-ATRAP) in line 19 (Tg19), among the 3 lines of ATRAP transgene positive (+) mice obtained. Tg19 was used for further analysis in the present study. **C:** results of real-time quantitative RT-PCR analysis showed a 3.7-fold increase in the baseline renal ATRAP mRNA expression over littermate control mice (Wt) in ATRAP transgenic mice (Tg19). The values were calculated relative to those in kidneys from Wt and are expressed as means \pm SE ($n = 7$ /group). * $P < 0.05$ vs. Wt. **D:** results of Western blot analysis showed that the total kidney AT1R protein expression of Tg19 did not differ from that in Wt. **E:** results of Western blot analysis showed that the plasma membrane AT1R protein expression in the kidney of Tg19 was significantly decreased compared with Wt at baseline. The values were calculated relative to those from the plasma membrane fractions of Wt and are expressed as means \pm SE ($n = 9$ /group). * $P < 0.05$ vs. Wt.



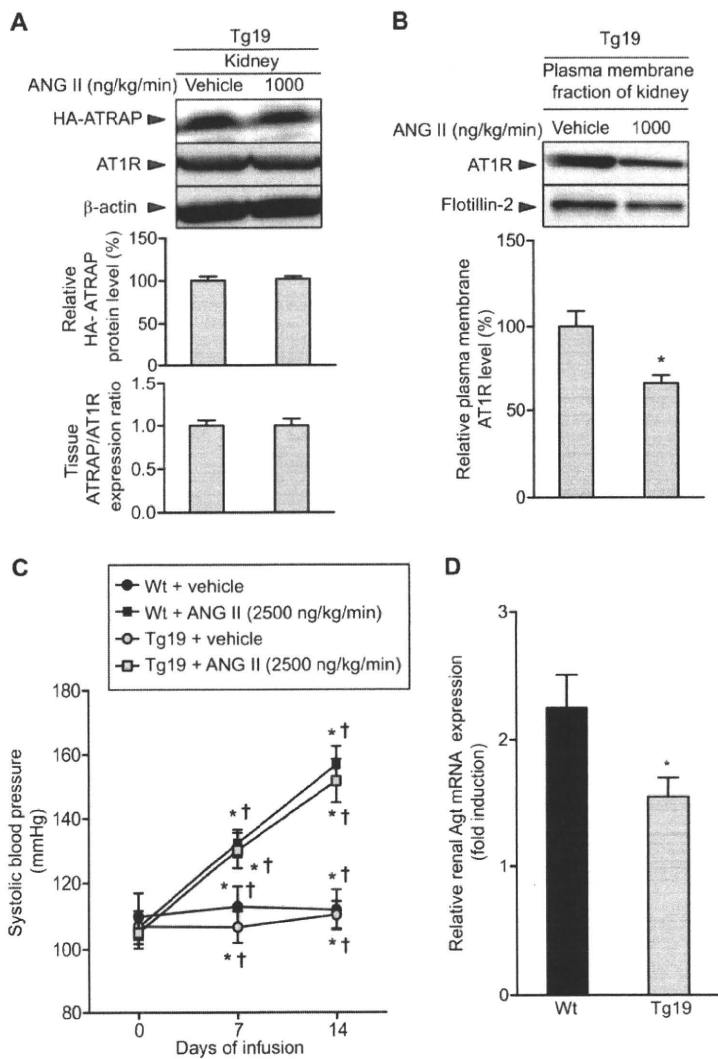


Fig. 11. Promotion of AT1R internalization and inhibition of induced expression of angiotensinogen gene in response to ANG II in the kidney of ATRAP transgenic mice. **A**: representative Western blots showing the effects of continuous ANG II infusion on the total protein expression of HA-ATRAP and AT1R in the kidney of ATRAP transgenic mice (Tg19) infused with vehicle or ANG II ($1,000 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) for 14 days. Measurement of the ATRAP-to-AT1R ratio was performed as described in METHODS, and the values were calculated relative to those in extracts from Tg19 infused with vehicle and are expressed as means \pm SE ($n = 6/\text{group}$). **B**: representative Western blots showing the effects of ANG II infusion on the plasma membrane AT1R protein level in the kidney of Tg19 infused with vehicle or ANG II ($1,000 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) for 14 days. The values were calculated relative to those obtained with extracts from Tg19 infused with vehicle and are expressed as means \pm SE ($n = 6/\text{group}$). **C**: effects of ANG II infusion on systolic blood pressure during the treatment period. Tg19 and littermate control mice (Wt) were infused with either vehicle or ANG II ($2,500 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) for 14 days. The values of systolic blood pressure are expressed as means \pm SE ($n = 6/\text{group}$). * $P < 0.05$ vs. vehicle. † $P < 0.05$ vs. day 0. **D**: effects of ANG II infusion on renal Agt mRNA expression in Wt and Tg19. Values are calculated as the fold-induction of those from extracts in the vehicle-infused mice and are expressed as means \pm SE ($n = 6/\text{group}$). * $P < 0.05$ vs. Wt.

田中光 (分担研究者)

A. 研究目的

近年、副交感神経興奮により誘発される心房細動や心室性不整脈による突然死など従来にはないタイプの循環器系の障害が増加している。これらの循環器系疾患は働き盛りの成人のQOLを著しく損なうことから、有効な予防法・治療法の確立が社会的急務である。これらの疾患が多発する機序として、社会環境の変化によるストレスが神経系を介してイオンチャンネル

やトランスポーターなどに悪影響をおよぼし、心臓の興奮収縮機構に異常を生じさせていると考えられる。このような現状をふまえ、本研究では心臓の興奮収縮機構を脱分極、再分極、細胞内Ca²⁺制御の3つの観点から詳細に検討し、心房細動や心不全に対する新たな治療戦略開発への基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

1. 心室筋の収縮力の測定

マウスを頸椎脱臼させ、直ちに開胸、心臓を摘出した後、右心室遊離壁を短冊状に切り離して実験に用いた。またモルモットを頸部より放血致死後、開胸して直ちに心臓を摘出し、右心室乳頭筋を標本として測定を行った。標本的一端を、20 mlの栄養液 (NaCl 113.1, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 22, glucose 10 mM, pH 7.4, 36-37 °C) を満たしたorgan bathの底のシリコンブロックに、電気刺激用の

白金双極電極で固定し、他端を歪みトランスデューサー (TB-611T、日本光電) の先端に固定したステンレス製ピンで刺した。標本を水平に保持して、刺激装置 (DPS-07、ダイヤモンドカル) からのfield刺激 (持続時間3ms、閾値の約1.5倍の電圧) により1 Hzで駆動し、等尺性に収縮力を測定した。発生張力はトランスデューサーを介して歪応力用アンプ (AP-621G、日本光電) で増幅し、インク書きレコーダー (CP-600G、日本光電) に記録した。静止時張力は各標本で最大の張力を発生するように設定した。即ち、静止時張力の状態から徐々に標本を伸張してゆき、刺激によって発生する収縮の張力変化がそれ以上大きくならない状態に達するまで伸張を続けた。

2. 微小電極法による活動電位の測定

モルモットおよびマウス右心室筋標本、およびモルモットおよびラット肺静脈標本の活動電位の記録を行った。標本を20 mlの栄養液に満たしたorgan bath底のシリコンブロック上にステンレス製ピンで水平に固定し、刺激装置 (SEN-3201、日本光電)、アイソレーター (S S-302J、日本光電) から白金双極電極を用いて、1 または2 Hz、幅3 msの短波長 (閾値の1.2倍の電圧) で駆動した。Organ bath中の栄養液の温度は36±0.5 °Cに保った。細胞内活動電位は定法に従い3 M KClで満たして細胞内に刺入したガラス微小電極 (GD-2、成茂科学) から導出し、高インピーダンス型アンプ (MEZ-8201、日本光電) で増幅後、陰極線オシロスコープ (VC