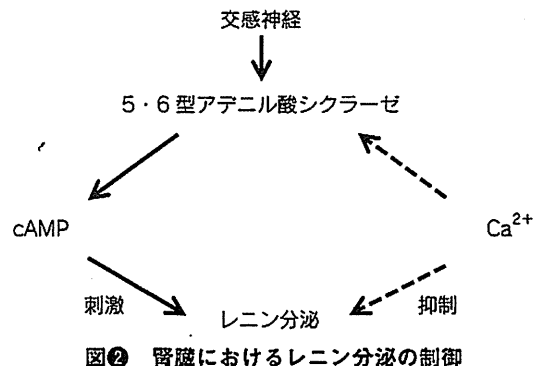


図① cAMP および Ca 濃度の位相差変化のメカニズム

Grünberger ら<sup>4)</sup>は傍糸球体装置細胞を初代培養し、細胞内 Ca を上昇させるような刺激 (アンジオテンシン II、エンドセリン I、タブシガルギン) によってレニン分泌を低下させたが、この低下は細胞内 cAMP 濃度の低下に一致していた。この刺激を、cAMP アナログの存在下でおこなうと、細胞内 cAMP 濃度は保たれる。このため細胞内 Ca がいくら上昇しても、レニン分泌は抑制されなかった。つまり cAMP の変化を伴わなければ、Ca 自体の変化ではレニンは分泌抑制されなかった。さらに 5 型および 6 型のアデニル酸シクラーゼサブタイプを siRNA によって欠損させた細胞では、Ca 依存性のレニン分泌低下は顕著に減弱していた。また灌流腎組織による実験でも、同様の所見がみられた。このことから、細胞内 Ca 濃度の上昇が 5 型および 6 型アデニル酸シクラーゼを抑制し、その結果として細胞内 cAMP 濃度が低下して、レニン分泌が低下するメカニズムが提唱された<sup>4)</sup> (図②)。

さらに 2011 年の報告では、5 型欠損動物、6 型欠損動物を用いて、カテコラミンによるレニン分泌制御が実証された<sup>7)</sup>。カテコラミンやプロスタグランジン E<sub>2</sub> によるレニン分泌刺激が、5 型・6 型のいずれの欠損動物においても、顕著に低下していた。しかしいずれの欠損動物でも分泌抑制は不完全であり、5 型も 6 型も両方がレニン分泌に関与していること、6 型のほうが若干関与は高いこと、ただしそれ以外のサブタイプもレニン分泌に少ないながら関与している可能性が確認された (図③)<sup>4)</sup>。以上の報



図② 腎臓におけるレニン分泌の制御

告から、β 遮断薬による RAS の抑制には、5 型・6 型アデニル酸シクラーゼの抑制が重要であることが推測される。

### β 遮断薬のパラドックス

RAS を抑制するのに、さほど慎重にならずとも ARB や ACE 阻害薬は使用できるが、β 遮断薬には注意が必要である。一般に交感神経活動の慢性的な異常亢進が心不全の増悪をきたすため、β 遮断薬が用いられる。ところが急性増悪としての急性心不全を考えると、β 遮断薬では矛盾が起こる。β 遮断薬を使用すれば、交感神経による心臓の刺激作用が減弱し、心機能が低下するためである。したがって急性増悪時には、本来は抑制したい交感神経を抑制できないことがある。これは交感神経活動の抑制が、心機能低下に結びついてしまっているためである。心機能を亢進させるには、交感神経刺激を活性化

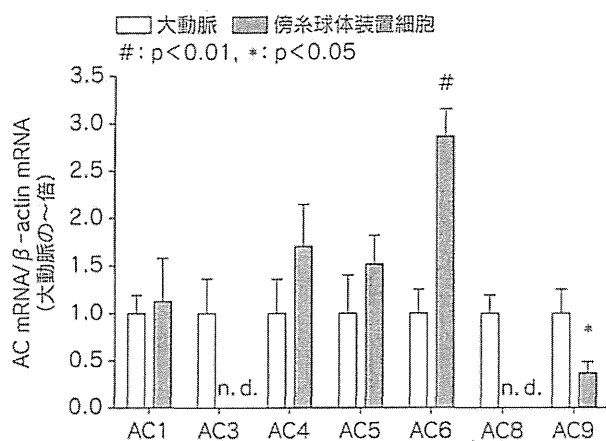


図3 傍糸球体装置細胞におけるアデニル酸シクラーゼサブタイプの発現

AC: アデニル酸シクラーゼ, n. d.: 未検出 (Grünberger C *et al.*, 2006<sup>4)</sup>より引用)

せねばならないというジレンマが生じる。このジレンマを解決できないだろうか。

### アデニル酸シクラーゼと心不全

β遮断薬を使ってRASを抑えたい、しかし心機能を低下させたくない場合にはどうしたらよいか。RASは抑制するが、心機能を低下させないβ遮断薬があればよい。β遮断薬はβ受容体の下流にある、すべてのアデニル酸シクラーゼのサブタイプ活性を低下させてしまうが、そのなかで心機能維持にかかわっていないサブタイプはないか。5型サブタイプを欠損させた動物モデルを使った実験から、5型サブタイプは、心臓の基礎状態の心機能維持には関与していない可能性が示された<sup>5)</sup>。同サブタイプを欠損させたマウスでは、心機能の低下が予測されたにもかかわらず、機能低下はみられなかった。基礎状態では心肥大などの器質変化はなく、慢性カテコラミン刺激あるいは圧負荷をかけると心肥大は起こるものの、心筋細胞死が顕著に低下し、心不全の発症が予防された。つまり心筋ストレスに対して、心筋保護効果を示すことがわかった。そこで5型を選択的に阻害する薬剤を開発すれば、心機能を抑制しないで心筋保護作用を示すことができると考えられる。さらに傍糸球体装置細胞において、レニン分泌の抑制も可能と思われる。

バーチャルフィッティングモデルを用いて、心臓型アデニル酸シクラーゼの立体構造をツールに阻害化合物を

スクリーニングしたところ、抗ウイルス薬として数十年間使用されているビダラビンが同定された。薬理実験によっても、ビダラビンが心臓型サブタイプに対する強い抑制効果を示すことがわかった。さらに動物実験においても、心機能低下を起こさずに心不全の進行を強く阻止する作用があることがわかった<sup>6)</sup>。そこで現在ビダラビンを用いた臨床試験が開始されている。ビダラビンは数十年前にわが国で開発された抗ウイルス薬である。その抗ウイルス薬が、数十年を経て心疾患治療薬としてカムバックするかもしれない。これはかつてアスピリンが鎮痛解熱薬として開発され、その後数十年を経て抗血小板薬として復活したことによく似ている。ビダラビンを用いた薬物療法で、心機能低下をおこさずに交感神経活動を抑制し、レニン分泌を抑えるような治療法が開発されるかもしれない。

### 文献

- 1) Triposkiadis F *et al.*: The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 54: 1747-1762, 2009
- 2) Kim SM *et al.*: Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in β1- and β2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50: 103-109, 2007
- 3) Chen L *et al.*: Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is Gsα-dependent. *J Am Soc Nephrol* 21: 986-992, 2010
- 4) Grünberger C *et al.*: The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99: 1197-1206, 2006
- 5) Iwatsubo K *et al.*: Drug therapy aimed at adenylyl cyclase to regulate cyclic nucleotide signaling. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6: 239-247, 2006
- 6) Rieg T *et al.*: Adenylyl cyclase 6 determines cAMP formation and aquaporin-2 phosphorylation and trafficking in inner medulla. *J Am Soc Nephrol* 21: 2059-2068, 2010
- 7) Aldehni F *et al.*: Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension* 57: 460-468, 2011
- 8) Iwatsubo K *et al.*: Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2012 [Epub ahead of print]

# 科学工業<sup>®</sup>

KAGAKU TO KOGYO (OSAKA)

—Science and Industry—

VOL.86 No.9

【研究論文】

- ・植物ステロールと *Candida rugosa* リパーゼを用いた選択的エステル・加水分解による共役リノール酸異性体の分画・濃縮

【総説】

- ・高分子ナノ薄膜を用いた細胞表面の制御に基づく細胞積層技術

【解説】

- ・細胞積層培養法を用いてヒト膀胱癌間質を模した実験系を構築する
- ・三次元血管モデルを用いた動脈硬化性疾患の機序解明

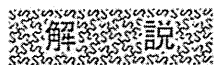
【会員ひろば】

- ・カガワケミカルにおける光硬化機能材料の開発

9

2012

社団法人 大阪工研協会



## 三次元血管モデルを用いた動脈硬化性疾患の機序解明

横山 詩子, 石渡 遼, 大島 登志男, 南沢 享, 石川 義弘

血管壁は多種の細胞と細胞外基質から構成される。血管の機能は、それらが複雑な高次構造をとり、相互作用することにより保たれている。日本人の死因のおよそ3割を占める動脈硬化性疾患は血管構造と機能の恒常性の破綻が原因となって発症するが、既存の実験手法では多種の細胞間の相互作用や、高次構造を保った中での病態生理を観察、解析するには限界があった。我々は細胞積層化技術を用いて構築される三次元血管モデルの生理学的な評価を行った。本稿では、動脈硬化の病態生理の概説と、血管疾患解析のための新たな実験系としての三次元血管モデルの可能性について解説する。

キーワード：動脈硬化, 三次元血管モデル, 平滑筋細胞, 内皮細胞, 弾性線維

### 1 動脈硬化

#### 1.1 動脈壁の構造

血管, 特に動脈は動脈硬化, 動脈瘤等をはじめとした多くの疾患の場となっている。動脈壁は血液が流れている内腔側から順に内膜, 中膜, 外膜の3つの部分から構成されている (図1)。内膜は, 内皮細胞と, 中膜との境界を形成している基底膜と内弾性板からなる。内皮細胞には, 血管張力, 血液凝固, 炎症などを調節する機能がある。たとえば, 内皮細胞から分泌されるエンドセリンは平滑筋細胞にある受容体を介して血管を収縮させ, 一酸化窒素 (NO) は血管を弛緩させる<sup>1)</sup>。また, プロスタサイクリン等の血栓形成を抑制する物質を分泌し, 血液の流動性を維持する機能を有している<sup>2)</sup>。正常な状態では内皮細胞は血液成分に対して選択的透過性を有するが, いったん内皮細胞が障害されると炎症細胞や脂質が浸潤し, 血管全体の炎症が引き起こされる<sup>3)</sup>。浸潤した炎症細胞はマトリックスプロ

テアーゼの活性を上昇させ, 弾性線維やコラーゲンなどの細胞外基質を分解し, 内弾性板の断裂を促進する。

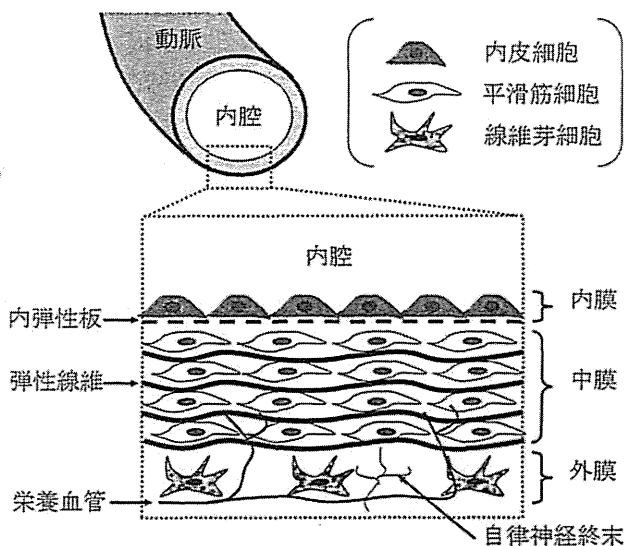


図1 動脈壁の構造

### Elucidation of Molecular Mechanisms of Atherosclerosis by Three-Dimensional (3D)-Layered Blood Vessel Constructs

Utako YOKOYAMA 公立大学法人横浜市立大学 医学部循環制御医学 講師 博士(医学) (〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9)

Ryo ISHIWATA 早稲田大学 先進理工学研究科 生命医科学専攻 (〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2)

Toshio OHSHIMA 同上 教授 博士(医学)

Susumu MINAMISAWA 東京慈恵医科大学 細胞生理学講座 教授 博士(医学) (〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8)

Yoshihiro ISHIKAWA 公立大学法人横浜市立大学 医学部循環制御医学 教授 博士(医学) (〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9)

このことが、中膜への炎症の波及を促し、結果的に血管壁全体への炎症の波及とリモデリングを引き起こす。

中膜は、主に平滑筋細胞と弾性線維やコラーゲンをはじめとする細胞外基質で構成される。平滑筋細胞は自律神経や内皮細胞から分泌される物質の作用により収縮、または弛緩し、血管全体の収縮、拡張を担っている。動脈は主に弾性線維の密度により2つに大別される。大動脈、肺動脈、総頸動脈、鎖骨下動脈など、心臓に近く弾性線維が豊富な動脈は弾性動脈に分類され、それより末梢の比較的弾性線維が少ない血管は筋性動脈に分類される(図2)。弾性線維は動脈の構造を維持するとともに、組織に弾性を与えることで心臓の拍動により変動する血圧を緩衝する。筋性動脈はおもに平滑筋細胞からなり、その収縮・弛緩により血管緊張をダイナミックに調節し、全身の血圧調節を担っている。

外膜の役割は血管の支持組織としての働きと、血管を周囲の臓器に固定することである。外膜は主に線維芽細胞とコラーゲンが主体の線維成分から構成され、自律神経や、血管自体を栄養する小血管である vasa vasorum が存在する。自律神経終末は中膜の外側まで分布し、神経伝達物質を介して平滑筋細胞の緊張を調節する。近年、vasa vasorum からの液性因子が動脈硬化性疾患における血管リモデリングに関与しているという報告がなされている<sup>4)</sup>ことは大変興味深い。

### 1.2 動脈硬化病変形成のメカニズム

高脂血症や高血糖、喫煙、高血圧といったリスク因子は内皮細胞を障害することでそのバリア機能を低下させ、内皮細胞の透過性を亢進させる。つまり血漿成分が内皮細胞下に浸透しやすい状態となる(図3-①)。高脂血症において血中に高濃度に存在する低比重リポ蛋白(LDL)は内膜に侵入すると、酸化され変性し、

より動脈硬化を起こしやすい酸化 LDL となる。さらに障害された内皮細胞は細胞表面に各種接着因子を発現し、単球やTリンパ球等の免疫細胞の壁内への侵入を誘導する。単球は血管壁内で活性化マクロファージとなり、サイトカインや増殖因子を産生する(図3-②)。活性化型マクロファージはマトリックスプロテアーゼを活性化させ、内弾性板を断裂させる。他にも、血漿成分は平滑筋細胞の遊走・増殖を促す成長因子などを多く含む。これらの液性因子が平滑筋細胞の形質転換を引き起こす。正常組織における平滑筋細胞は収縮能の高い高分化型(収縮型)だが、成長因子の刺激を受けた平滑筋細胞は増殖能が高い脱分化型(合成型)となる。脱分化した平滑筋細胞は断裂した内弾性板を超えて内膜側に遊走し、そこでさらに増殖する。脱分化型平滑筋細胞はプロテオグリカンやコラーゲンなどの細胞外基質も多く分泌する。このようにして血管内膜が病的に肥厚し血管内膜肥厚と呼ばれる炎症の場が形成される。マクロファージは酸化 LDL を取りこみ、過剰に取りこむと泡沫細胞となる。また、酸化 LDL は平滑筋細胞によっても取り込まれ、壊死した細胞と共に脂質コアを形成する。さらに、活性化マクロファージは血液凝固反応を引き起こす組織因子を分泌し、障害された内皮細胞に血小板を凝集させ血栓の形成を促す(図3-③)。さらに病態が進むと内膜肥厚部は線維性キャップに覆われ、プラーク(粥腫)を形成する。安定したプラークは血漿成分との直接的な影響から守られている。しかし何らかの刺激でプラークが破裂すると、それを修復しようと血小板凝集が起こり、血栓が形成される。血栓形成とその遊離は、血管内腔を狭窄、または完全に閉塞させ、心筋梗塞や脳梗塞といった虚血性疾患を引き起こす<sup>5)</sup>。

これらのメカニズムに加えて、近年、vasa vasorum の発達によるさらなる血漿成分の浸潤や、幹細胞供給が動脈硬化の悪化に関与している可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。このように、動脈硬化病変の形成には血管壁内における細胞や細胞外基質、血球成分、液性因子による複雑な相互作用が関与している。

腹部大動脈瘤は無症状のうちに経過し、年単位で拡大し続ける。拡大した動脈瘤は破裂しやすく、いったん破裂すれば救命率は30%を下回る、進行性かつ致死性の疾患である。現在は、拡大して破裂のリスクの高い動脈瘤を人工血管で置換したり、ステントグラフトを挿入するといった外科的治療が行われているが、大動脈瘤の進行を抑制する治療法はいまだ開発されていない。腹部大動脈瘤と動脈硬化は互いに合併することが多い。動脈壁に炎症が遷延すると、活性化マクロ

弾性動脈	筋性動脈
大動脈などの大血管	冠動脈などの比較的小さな血管
弾性線維が豊富	平滑筋細胞が密で弾性線維が粗

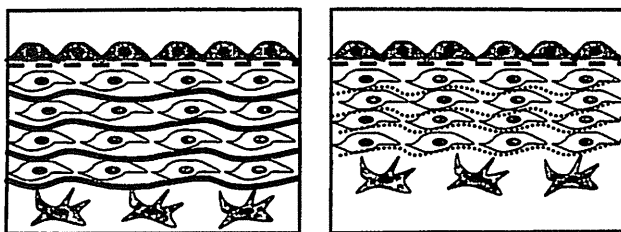


図2 弾性動脈と筋性動脈

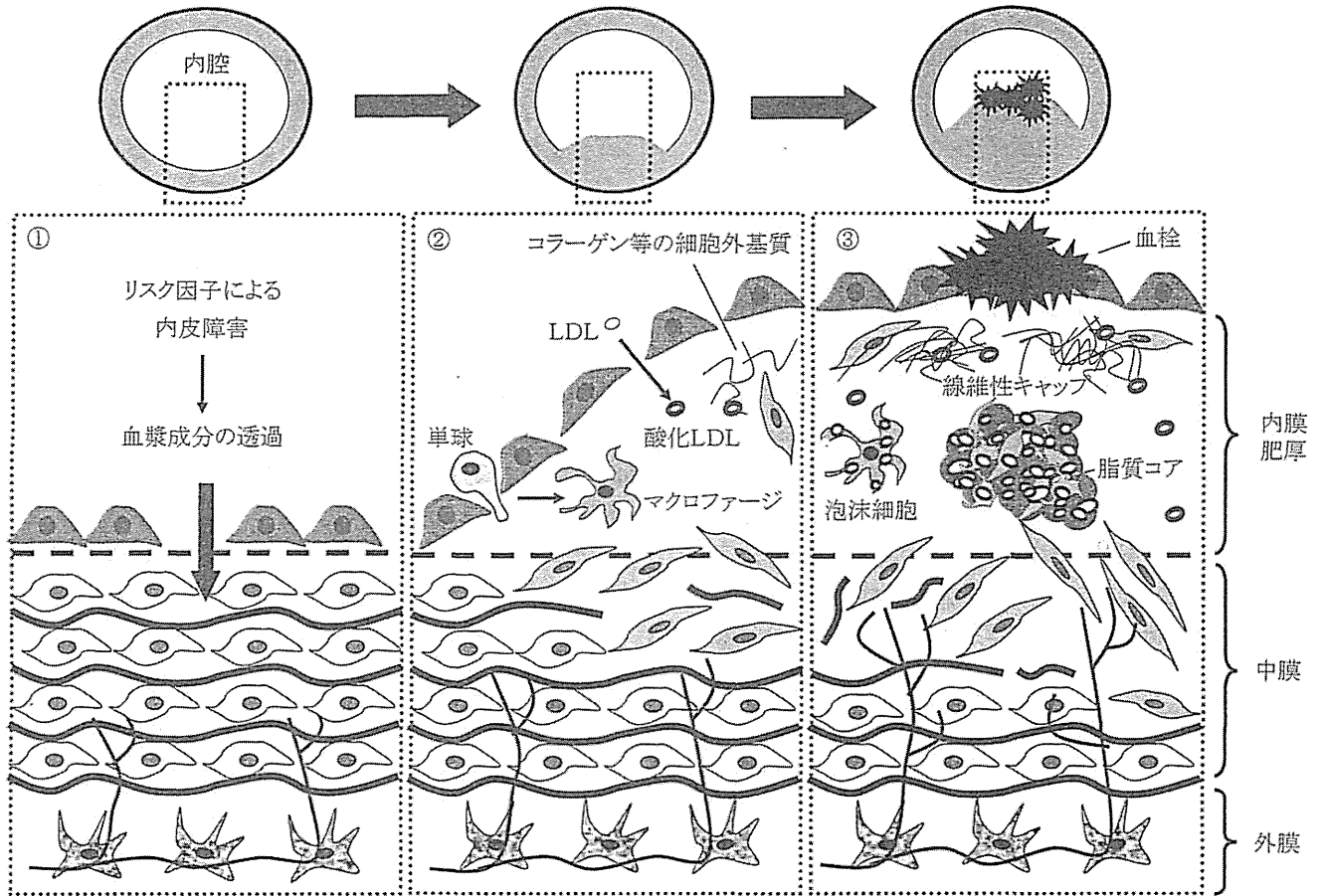


図3 動脈硬化病変形成のメカニズム

ファージや合成型の平滑筋細胞から分泌されるマトリクスプロテアーゼにより内弾性板のみならず、中膜の弾性線維が分解され、血管壁の強度が減少する。このため血管径が拡大し動脈瘤を進行させる (図4)<sup>6~7)</sup>。

## 2 細胞積層化技術を用いた三次元血管モデル

### 2.1 既存の実験手法の限界

近年の分子生物学の目覚ましい進歩により、遺伝子解析や、遺伝子改変動物の作成が可能となり、各種疾患の病態メカニズムの解明が進んだ。動脈硬化の治療

は、生活習慣の改善や高脂血症に対する薬剤の開発により革新的な進歩をとげた。また、大動脈瘤に対しても従来の人工血管置換術に加えてカテーテルを使用したステントグラフトが開発されたことにより、手術のリスクは低減した。しかしながら、動脈硬化性疾患は依然として日本人の主たる死因となっており、さらなる病態のメカニズムの解明と治療の開発が必要である。筆者らは、動脈硬化の病態は前述のように多様な構成成分が織りなす複雑なものであり、既存の研究手法では新たな治療法につながる十分な病態解明はできない

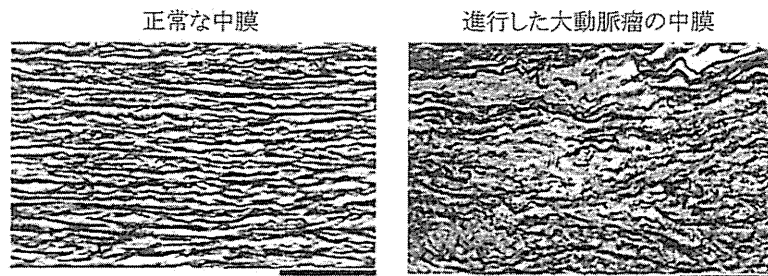


図4 大動脈瘤における弾性線維の断裂  
エラスチカ染色, スケールバーは100 μm

と考えた。医学基礎研究で広く用いられる、マウスなどの動物個体を用いた実験手法 (*in vivo*) や、試験管内での培養細胞を用いた実験 (*in vitro*) にはそれぞれ限界がある。*in vivo* 実験は、生体内の多様な要素のため、それぞれの分子や遺伝子の働きを明確にすることが不可能である。また遺伝子改変動物の作成と維持、解析にかかる費用と時間、倫理的な問題も無視できない。さらには、種差のため実験動物で得られた結果がヒトで発症する病態のメカニズムに必ずしもそぐう訳ではない。たとえば、マウスはヒトとは脂質の代謝が異なり、特殊な環境下でしか動脈硬化を生じない<sup>8)</sup>。

一方 *in vitro* 実験では、組み込む要素が限定されているため、単一の分子や遺伝子の挙動を細胞内で解析することが容易である。生体内では多種の細胞が密接し相互に作用している。しかしながら、血管壁の秩序立った構造 (図1) や、病態時の構造の乱れと変化 (図3) は従来の *in vitro* 実験では再現できない。*in vitro* 実験による結果が生体内での現象を反映しないことがしばしばあるのは、このような理由によるものと考えられる。血管研究において平滑筋細胞の性質の制御は非常に重要である。*in vitro* 実験において、平滑筋細胞は生体内での高分化型の性質を保つことができず、脱分化型となる。また、細胞が高密度で存在するときには互いに接触しあうため増殖を停止する (接触阻害) ので、立体構造をとるまで増殖することはない。つまり従来の *in vitro* 実験では単球の浸潤や、平滑筋細胞の遊走、弾性線維の断裂といったような動脈壁内で起きる現象

を他の構成要素との関連の中で解析することは不可能となっている。

近年、こうした理由から血管組織を生体外で培養する器官培養や、血管組織を体外で再構築するような *ex vivo* 実験系が注目を集めている。器官培養は生体の血管組織を整った実験条件下で解析できる有用な手法であるが、特に血管では遺伝子の導入や欠損といった遺伝工学的手法を用いるのが困難であるという欠点がある。また、細胞の構成要素ごとに異なる条件の刺激を与えることができない。近年の組織工学の発展により、人工血管として使用する目的で様々な組織再構築法が開発されている。しかしながら、動脈硬化性疾患の病態生理を解析する目的で十分に検証されたものはまだ開発されていない。

そこで我々は、細胞積層化技術を用いた三次元血管モデルに着目した (本号総説 “高分子ナノ薄膜を用いた細胞表面の制御に基づく細胞積層技術” 参照)<sup>9)</sup>。

## 2.2 細胞積層化技術

Layer-by-Layer 法 (LbL 法) はカチオンとアニオン等、互いに接着する分子を交互にコーティングすることによってナノスケールの薄膜を形成する技術である<sup>10)</sup>。松崎・明石らはこの手法を応用して細胞表面に接着タンパクからなる薄膜を形成し、細胞を積層化する技術を開発した<sup>9)</sup>。我々はこの技術を用い、ラットの大動脈平滑筋細胞を積層化することによって、7層の平滑筋細胞からなる三次元血管モデルを構築した (図5)。図6には、三次元血管モデルの構築法を示す。

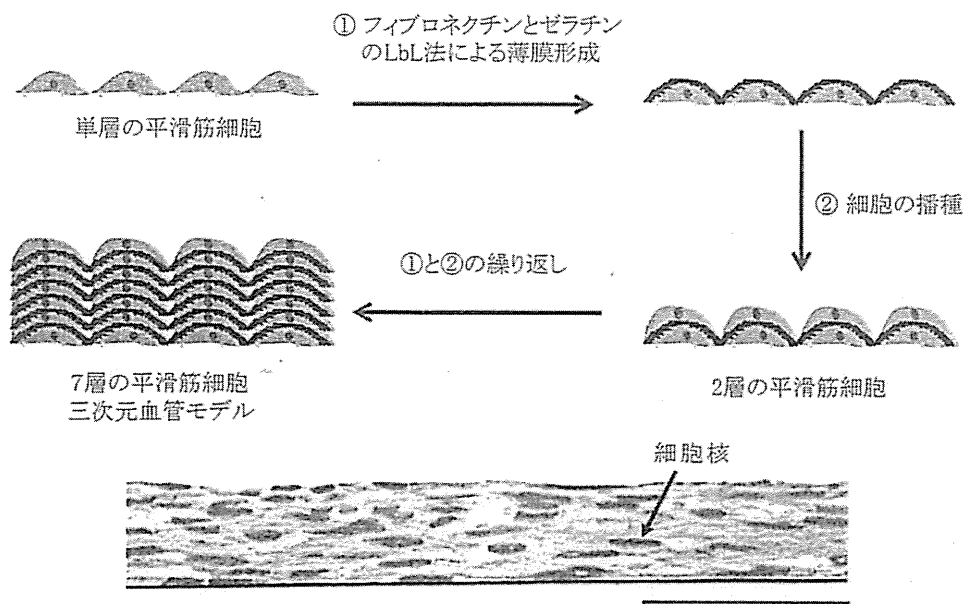


図5 三次元血管モデルの構築  
HE染色, スケールバーは50 μm

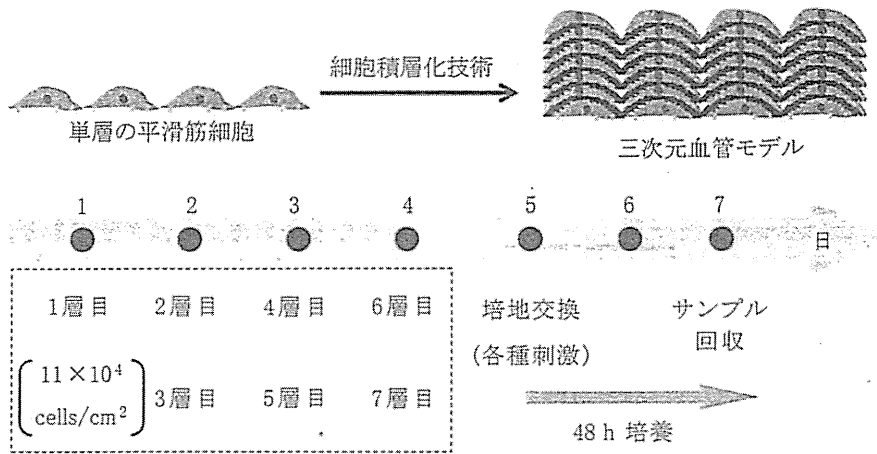


図6 三次元血管モデルの実験条件

### 3 三次元血管モデルの生理学的評価

#### 3.1 平滑筋細胞の形質

動脈硬化の進行には平滑筋細胞の形質転換，つまり高分化型から脱分化型への転換，が関与している。高分化型平滑筋細胞はアクチンやミオシンといった筋線維を豊富に発現し，収縮・弛緩という血管張力を制御する機能を有している。また，高分化型平滑筋細胞は増殖能や遊走能が低い。一方，脱分化型平滑筋細胞は増殖能や遊走能が亢進し，筋線維の発現は少ない。

平滑筋細胞の形質を評価するマーカーとしてミオシン重鎖が広く研究されている<sup>11)</sup>。ミオシン重鎖のうち，SM1，SM2，SMemb という3つのアイソフォームが血管の発達段階や病巣において異なる発現パターンを示すため，平滑筋の形質マーカーとして利用されている。SM1，SM2は高分化型平滑筋細胞，SMembは脱分化型平滑筋細胞のマーカー遺伝子である<sup>12)</sup>。たとえば，*in vitro*では平滑筋細胞のSM1，SM2の発現が減少

し，SMembの発現が増加している<sup>13)</sup>。

そこで，筆者らは三次元血管モデルにおける平滑筋細胞の形質を評価する目的で，ミオシン重鎖の発現量を単層の細胞，ラット三次元血管モデル，大動脈組織に関して比較した(図7)。三次元血管モデルでは，単層の細胞と比較しSM1発現が有意に上昇し，SMemb発現が有意に減少した。つまり，三次元血管モデルにおいて平滑筋細胞はより高分化型に近い形質を示し，より生体内の血管に近い形質を維持していると考えられる。

#### 3.2 弾性線維の形成

弾性線維の形成や分解を解析することは，動脈硬化や大動脈瘤の進行を理解する上で重要である。既存の単層の平滑筋細胞を用いた実験では，層状の弾性線維を観察することは不可能である。三次元血管モデルで弾性線維の形成の観察が可能になれば，血管疾患の病態解明を推進出来ると考えられる。筆者らは，三次元血管モデルの培養条件を調整することによって層状の弾性線維が形成されることを確認した(図8)。さらに，

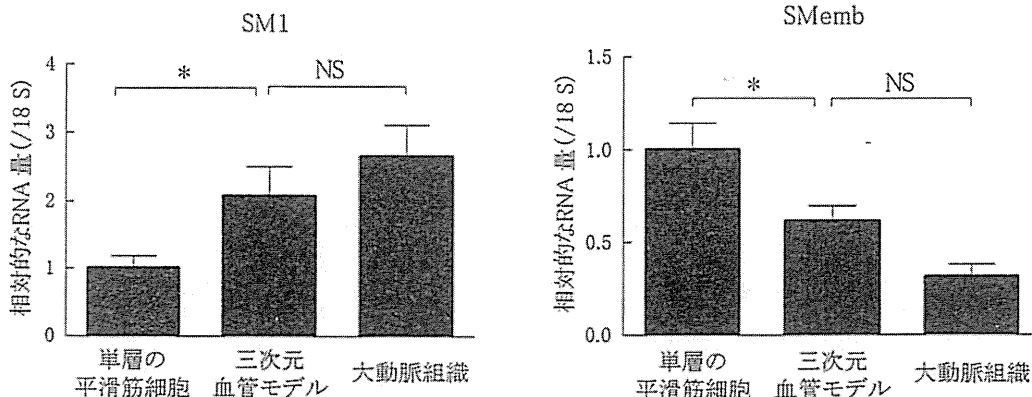


図7 三次元血管モデル内における平滑筋細胞の形質の評価



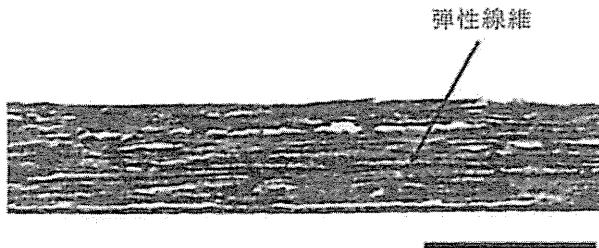


図8 三次元血管モデル内の弾性線維  
エラスチカ染色, スケールバーは50 μm

弾性線維形成に必要なリジロキシダーゼを阻害する薬剤である beta-aminopropionitrile (BAPN) を作用させると、三次元血管モデルの弾性線維の形成が阻害されることが確認された (図9)。

#### 4 三次元血管モデルの応用の可能性

##### 4.1 動脈硬化メカニズムの解明

動脈硬化に関する多くの研究が主にマクロファージをはじめとする免疫細胞とそれによる内皮細胞の障害という観点からなされてきた。筆者らの結果より、三次元血管モデルが比較的体内の血管に近い性質を維持している可能性が示唆されたことより、これをさらに発展させ、平滑筋細胞に内皮細胞を積層培養してそれぞれの細胞層との相互作用を検討できると考えている。また、近年注目されている外膜側からの中膜のリモデリングを解析することも積層培養技術を用いて可能であると考えられる。

血管は、部位によって壁の細胞や細胞外基質の構成が異なり、その違いによって動脈硬化の進行や病態に

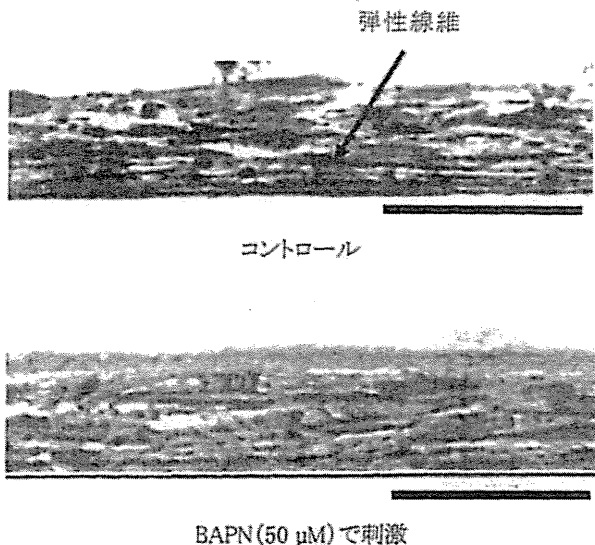


図9 BAPN による弾性線維形成の阻害  
エラスチカ染色, スケールバーは50 μm

は差異が生じると考えられる。たとえば、腹部大動脈や冠動脈など動脈硬化が発生しやすい部位と、そうでない部位がある。また、人種や生活様式の違いによっても疾患の発生部位や頻度には違いが見られる。三次元血管モデルでは、細胞の層数や種類を制御することができる。よって、生体内の多様な血管を模したモデルを作り分けることが可能であり、発生頻度の差異を生み出す根本的な要因を探ることができる可能性がある。また、弾性線維の形成とその阻害がモデル内で観察できたことから、弾性血管と筋性血管の異なるモデルも構築できる可能性が示唆された。

さらに、三次元血管モデルでは、細胞に対する薬剤での刺激や遺伝子工学的な操作を多様に組み合わせて検討を行うことができるというメリットがある。特定の細胞に発現している特定のタンパクが、異種細胞間の相互作用を通じて波及効果を生み出し、血管壁という系全体にどのような影響を与えるかを知ることができると期待される。

##### 4.2 動脈硬化治療薬の評価への応用

三次元血管モデルは動脈硬化の治療薬の評価系としても利用できる可能性がある。新規の治療薬は基礎研究の結果に基づき、段階的な治験において審査される。マウスとヒトでは血中の脂質の濃度やリポ蛋白の比率が異なるなど相違点が多く、実験動物における前臨床試験には限界がある。細胞積層法では、ヒト由来細胞を用いて三次元血管モデルを構築することが可能である。ヒトの動脈壁における動脈硬化を再現できれば、より精度の高い新規治療薬の評価法としての応用が期待される。

##### 4.3 血管発生メカニズムの解明

再生医学の研究が広く行われており、血管発生の機

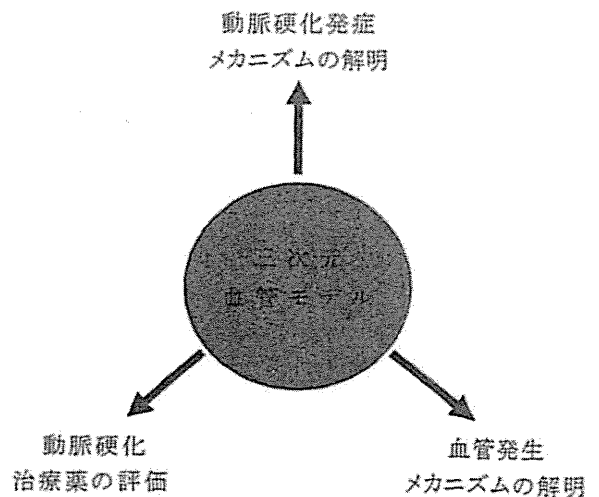


図10 三次元血管モデルの応用の可能性

序も徐々に明らかになってきている。しかしながら現在は内皮細胞の研究が中心となっており、血管を構成する中膜、外膜の発達や分化、層状の弾性線維が形成されるメカニズムなどはほとんど解明されていない。血管発生メカニズムの解明は、先天的な動脈疾患の原因解明や人工血管への応用に有用であり、三次元積層技術で3層構造を有する血管の形成を再現することによって、それらの解明ができることが期待される。

## 5 おわりに

近年開発された細胞積層技術を用いた三次元血管モデルの生理学的解析を行った。筆者らは、三次元血管モデルでは、従来の平面培養法に比べて平滑筋細胞が生体内に近い性質を有している可能性を示し、また、弾性線維の形成といった従来の平面培養法では不可能であった構造を解析できる可能性を示した。今後はさらに研究を進展させ、動脈硬化病変のメカニズムの解明を目指したい。

## 謝 辞

なお、三次元血管モデル作成に際し、多大なご協力をいただきました大阪大学工学部 明石満教授、松崎典弥先生、門脇功治氏、西口昭広氏に深く感謝いたします。

(平成 24 年 6 月 13 日受理)

## 文 献

- 1) C. R. Triggle, S. M. Samuel, S. Ravishankar, I. Marei, G. Arunachalam, H. Ding, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **90**, 713 (2012).
- 2) Y. Kanemaru, T. Noguchi, Y. Kazama, M. Wakasugi, T. Onaya, Y. Yoshida, *Prostaglandins*, **36**, 881 (1988).
- 3) M. Piro, G. Giubilato, M. Pinnelli, P. Giordano Sciacca, L. M. Biasucci, *Panminerva. Med.*, **47**, 75 (2005).
- 4) A. C. Langheinrich, M. Kampschulte, T. Buch, R. M. Bohle, *Thromb. Haemostasis*, **97**, 873 (2007).
- 5) S. Moore, *Circulation*, **53**, 166 (1976).
- 6) U. Yokoyama, R. Ishiwata, M. H. Jin, Y. Kato, O. Suzuki, H. Jin, Y. Ichikawa, S. Kumagaya, Y. Katayama, T. Fujita, S. Okumura, M. Sato, Y. Sugimoto, H. Aoki, S. Suzuki, M. Masuda, S. Minamisawa, Y. Ishikawa, *PLoS one*, **7**, e36724 (2012).
- 7) D. Palombo, M. Maione, B. I. Cifello, M. Udini, D. Maggio, M. Lupo, *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, **40**, 257 (1999).
- 8) L. Xiangdong, L. Yuanwu, Z. Hua, R. Liming, L. Qiuyan, L. Ning, *Protein Cell*, **2**, 189 (2011).
- 9) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 4689 (2007).
- 10) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997).
- 11) G. K. Owens, M. S. Kumar, B. R. Wamhoff, *Physiol. Rev.*, **84**, 767 (2004).
- 12) M. Aikawa, P. N. Sivam, M. Kuro-o, K. Kimura, K. Nakahara, S. Takewaki, M. Ueda, H. Yamaguchi, Y. Yazaki, M. Periasamy, *Circ. Res.*, **73**, 1000 (1993).
- 13) P. Babij, S. Kawamoto, S. White, R. S. Adelstein, M. Periasamy, *Am. J. Physiol.*, **262**, C607 (1992).

# 化学工業

CHEMICAL  
INDUSTRY

2013

VOL.64 NO.1

1

■特集 / 次世代健康・医療・福祉の科学

Omega Simulation Co., Ltd.

## Visual Modeller

for Plant Simulation

プラントの動きをいかに忠実に表現できるか  
それがプラントシミュレータの真価です。

株式会社オメガシミュレーション

<http://www.omegasim.co.jp>

化学工業社

# 切らずに治すがん治療薬の開発

石川 義弘\*1・江口 晴樹\*2

## 1. はじめに

悪性新生物、いわゆる「がん」は、心疾患、脳血管疾患と並び、現在のわが国における3大死亡原因である。悪性新生物による死亡は、平成21年には34万4105人となっている<sup>1)</sup>。この数字は前年度に比べて1000人以上の増加であり、人口の高齢化とともに、がんの国民疾患に占める重要性は、ますます増加すると考えられる。がんの種類でいうと、かつて首位を占めていた胃がんが減少傾向にあり、大腸がんや肺がんにとってかわられつつある。特筆すべきは、乳がんや膵がんなど、かつてはさほど多くなかったがんが次第に順位をあげていることである。これも戦後数十年以来の国民の食生活の変化を物語っているのかもしれない。胃がんの死亡者数の減少には、刺激性食物など食生活の変化はもちろんだが、世界でも先駆的なさまざまな診断および治療技術の進歩があったと思われる。胃がんをいかに早期発見するかは消化器内科医の悲願であり、いわゆる二重造影法をはじめとして、その後は胃内視鏡技術がわが国で開発され、世界に誇る技術となっている。内視鏡の製造会社としては、現在でもオリンパスなどの国内メーカーが、世界シェアの大半を占めている。消化管のがんに対しては内視鏡的手術の進歩とともに、胃がん撲滅への挑戦が続けられている。近年では放射線療法においても、がん治療技術の革

新が目覚ましく、重粒子線や陽子線治療などが成果を上げている。しかるに内視鏡などの簡便な装置に比べると、放射能設備を備えた大型治療装置が必要であり、建設費用も数十億円以上かかるなど、必ずしも簡便な治療法ではない。

そこで本原稿では、内視鏡ほど簡便ではないが、重粒子線ほど複雑ではない、がんの治療法として温熱療法をまとめてみたい。とりわけ近年EU諸国で実用化された、マグフォース社による超局所選択的な温熱療法について紹介するが、さらにこの治療法を凌駕するわが国のがん治療についても知見をまとめる。現在われわれが開発を進めているのが、IHIの持つ造船技術を医薬品開発に応用したものである。いわゆる一般医薬品中から、これまで解析の対象となっていない物理的な特性を検討する手法である。創薬のツールとして、あるいは磁性を有する化合物を選んだり設計する手法であり、有機磁性体開発の新技術である。造船技術における材料開発手法の医療転用であり、今後の新薬のスクリーニングや抗がん剤など新規医薬品化合物の開発に強力な武器となると考えられる。

## 2. 最近の抗がん治療技術の進歩

### 2.1 温熱療法について

がん細胞では代謝が亢進しており、いわゆる代謝に伴う活性酸素などの産生も多いことが知られている。これはがん細胞の盛んな分裂能を示していると思われる。一般に細胞は温度の上昇に伴って、酵素活性の上昇とともに代謝活性が上がるということが知られている。よく知られている体温の36.5度で、われわれの体の酵素活性が最大となるので

\*1 Yoshihiro Ishikawa 横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学 教授 医学博士

\*2 Haruki Eguchi (株)IHI 技術開発本部基盤技術研究所応用理学研究部 主幹研究員 工学博士  
How to treat cancer without surgery?

はなく、更に高い温度まで酵素活性が上昇する。例えば細胞内セカンドメッセンジャーを産生するアデニル酸シクラーゼは、すべての細胞に発現する基本的な細胞酵素であるが、その酵素活性は37度で最大を示すのではなく、42度まで温度依存性に上昇していく。一見すると温度が上がって酵素活性が上がることはよさそうだが、アデニル酸シクラーゼの場合でも高温化で長時間さらされると、やがて酵素活性が低下し、失活することが知られている。いったん高温にさらされて失活した酵素が、再び酵素活性を取り戻すことはない。おそらく酵素蛋白の立体構造の変化を伴って不可逆的な失活を起こしていると考えられる。

そこで、もともと代謝活性の高いがん細胞が、高温にさらされれば代謝活性はさらに上昇し、これが長く続けばがん細胞に対して殺傷効果を持つのではないかということが容易に推測できる。歴史的にも、高熱疾患にかかった患者の腫瘍が縮小したことが報告されており、がんの自然治癒症例においては発熱が何らかの原因であったという報告もある。さらに温熱によって免疫能力が高まることがさまざまな実験からも明らかとなっており、がんに対する免疫能力の亢進から、がん細胞に対する治療効果が表れるとも考えられている。このような事実から、がん組織を高熱にさらすことによって、抗がん治療を行おうという発想が生まれた。本格的な研究が始まったのは60年代以降であるが、さまざまな治療温熱装置が考案されており、治療成果を上げている。一般にはがん組織の温度が41度以上になるとがん細胞に対して殺傷効果が見られ、42.5度で理想的な殺傷効果を来すとされているが、がん細胞種にもより、温熱に対して感受性の高いがんもあれば、さほど高い感受性を示さないものもある。

## 2.2 全身と局所温熱について

がん細胞のみを標的にした温熱療法であるならば、がん組織の温度だけを選択的にあげればよい。周りの健常細胞も、温熱によってダメージが皆無というわけではないから、がん組織選択的な温熱療法が理想である。しかしながら、局所的な温熱療法は、物理的な手法の制限から困難である。皮膚などの体表にある病変組織であれば、局所に対

して物理的なプローベを用いて温熱を付加することが容易である。しかるに深部臓器に対して臓器選択的に温熱を付加することが難しい。そこでわが国で開発されたのが、サーモトロンをはじめとする温熱治療器である。これは相対向する2枚の電極で体をはさみ、高周波エネルギーを利用してがん組織に対して加温を行い、がん殺傷効果を引き起こすものである。対抗する電極の大小の組合せや、出力の調節により、浅部から深部がんに及ぶまで温熱作用を示すことができるため、全国の施設で使用されている。しかしながら、治療効果としては必ずしも他の方法に勝っているともいえず、単独療法として行われるのではなく、他の治療法の補助療法として、あるいは緩和を目的として施行されることも多い。加温だけであるために副作用がほとんどなく、この点においては末期がんや治療困難な症例に対しても有意義と考えられる。

## 2.3 選択的局所温熱について

磁性鉄粒子を利用して、交流磁場印加によってそのヒステリシス特性を利用して発熱させる手法が、わが国でも盛んに研究されてきた。かつての磁性鉄粒子を直接使用した手法から、近年ではリポソームに包埋したり、表面にナノコーティングを施し、組織親和性を高めたさまざまな磁性粒子が使用されている。しかるに本邦では実用化に至るまでにさまざまな困難があり、実際の治療で汎用されるに至っていない。これに対して近年欧州で開発されたのが、磁性鉄粒子を用いた超選択的な温熱療法である。マグフォース社によって開発されたNanoActivatorという交流磁場印加装置と、NanoTermという名で販売されている酸化鉄粒子の組合せによりEUにおける認可を受けている。現在のところ適応疾患としては、神経膠芽腫のみであるが、すでにEU27カ国で承認を受けており、現在EU域内では画期的な局所温熱療法として注目を集めている。治療の原理はいたって簡単で、頭蓋内の神経膠芽腫の部分に特殊コーティングを施された酸化鉄粒子を局所注入し、頭蓋を覆うように配置した交流磁場印加装置で腫瘍組織を選択的に加温するものである。発熱体として磁性鉄を使用しているために、局所が極めて高熱化し、

そのために効率的ながん細胞の殺傷効果が得られるとされる。この点において、いわゆる 42.5 度を目標温度としたマイルドな温熱療法に対して、高温を発生させる強力な温熱療法と呼ぶことができるだろう。

神経膠芽腫は年間の発生件数は日欧米でも数万人程度で、わが国では中年以降に発症が多く、男性に多いとされる。脳原発性腫瘍の約 1 割であり、前頭葉および側頭葉に好発する。手術による根治が困難であり、一般には放射線療法と化学療法の併用が主体であり、抗がん剤としてはテモゾロミドが使用されている。遠隔転移は稀であるが、予後は極めて不良であり、5 年生存率は 10% に満たない。このような予後不良のがんに対して、マグフォース社の磁性粒子温熱療法が EU で認可されたのは納得がいく。しかるにその適応疾患を拡大しつつあり、現在米国のメイヨークリニックなどで、肝臓がん、前立腺がん、すい臓がんなどを対象として臨床試験が進行中である。患者数からすれば圧倒的に多いので、今後マグフォース社の超選択的温熱療法が拡大普及する可能性がある。

さらに最近のヒト肝がんに対する研究成果が報告されている。13 名の肝細胞がん患者において、経動脈的に塞栓術を行った例が示されている。いわゆるがん組織の栄養動脈から、6 例はリゾピストあるいはマグフォース社の鉄粒子を注入した。鉄注入量としてはいずれも数ミリグラムである。MRI によって治療前および治療後のがん細胞の状態を評価しているが、いずれもがん組織に選択的に注入され、健常組織への漏れは検出できなかったとされている<sup>2)</sup>。本報告では NanoActivator による交流磁場印加は行われていないが、本年 6 月のマスコミ発表で、米国のメイヨークリニックにおいて、NanoActivator と NanoTherm を用いた臨床試験が開始されたという報告が出された。本試験では肝がんのみならず、すい臓がんを対象としており、既にパイロット試験ではすい臓がんに対する有効性が示されており、これまでは難治性がんの代表であったすい臓がんに対して、画期的な治療法の開発になると考えられている。

### 2. 3 化学療法と選択的局所温熱の併用について

上記の神経膠芽腫に対して、腫瘍局所に磁性鉄粒子を注入して、化学療法や放射線療法を併用することによって治療効果がさらに向上することが想像される。EU で行われている治療法においても、放射線療法との併用がおこなわれている。しかるに化学療法との併用は考えられていない。一見すると矛盾する概念だが、局所温熱療法では、がん組織内部に注入した酸化鉄粒子が高温化してしまい、このために抗がん剤自体が熱変性を起こしてしまう。したがって抗がん剤が局所に届いても、熱のために変性してしまうので無意味となる。そこで考えられるのが、熱によって変性しない抗がん剤である。あるいは抗がん剤自体に発熱作用、つまり磁性特性があるものである。このような薬剤化合物を選び出す、あるいは設計するには、旧来的な医薬品評価手法では困難である。

### 2. 4 金属材料評価技術の医学転用

IHI では古くから船舶やジェットエンジンの設計と製造を手掛けている。材料はいずれも金属であり、場合によってはさまざまな合金が合成される。このような金属材料の物理特性は、製造の工程や条件によって変化するため、何らかの手法で最終産物である金属材料の物理特性を予測する技術が進歩した。その一つが第一原理計算であり、物理化学では標準的に使用されている手法である。この手法を有機機能材料の評価に使えないかの検討が行われた。この初期対象として選ばれたのが、細胞内酵素であるアデニル酸シクラーゼを賦活するフォルスコリンである。フォルスコリンはインド産紫蘇植物であるコレウス・フォルスコリーの抽出物であり、今から 30 年前にアメリカで開発された。わが国ではやせ薬として販売されているので、ご存知の方も多いと思う。アデニル酸シクラーゼには、実は 9 種類のサブタイプがあり、それぞれのサブタイプが組織選択的に発現する。アデニル酸シクラーゼ自身は、カテコラミン、つまり交感神経受容体刺激によって活性化されるから、アデニル酸シクラーゼの活性化は交感神経活性化と同じ作用を示す。心不全などの心機能が落ちた時には、交感神経の活性化によって心機能を亢進させることが必要であるが、いわゆるカテコラミンで刺激すると全身の交感神経受容体が活性

化されてしまい、さまざまな副作用を起こす。そこで心臓にだけ発現するアデニル酸シクラーゼサブタイプを、選択的に刺激する薬剤が開発された。この元となったのがフォルスコリンである。

200種類にもおよぶフォルスコリン誘導体に対して、薬理的なスクリーニングを行い、アデニル酸シクラーゼのそれぞれのサブタイプを選択的に刺激する誘導体群を選び出した<sup>3)</sup>。この検索に必要とされたのは、アデニル酸シクラーゼ酵素の蛋白質立体構造であり、いわゆる活性中心に対してフィッティングモデルを利用して、各サブタイプに選択的な誘導体をスクリーニングした。それぞれのサブタイプに選択性を示す複数の誘導体選ばれたが、いずれも薬理学的実験によって選ばれたものであり、選ばれた化合物の共通性質を推測することは、これまでの医学技術では困難であった。

そこでこれらの誘導体化合物の、化合物自体の物理特性に共通する性質を選び出すのに、第一原理計算が使われた。いずれも密度汎関数法を用いて、電子とイオンの相互作用については、全電子法によりすべての電子を考慮した。波動関数はスピン分極型の線形結合型の原子軌道で分極関数を追加した2重数値規定関数を使用した。静電ポテンシャルの分布、波動関数分布(HOMO, LUMO)、福井関数の分布を調べた結果、静電ポテンシャル

の分布によって、アデニル酸シクラーゼサブタイプの選択性が予測できることが解った(図1)<sup>4)</sup>。

この解析は二点において重要と考えた。第一は、これまでの医学的な化合物評価技術では、標的蛋白質の立体構造が必須であった。立体構造とともに、化合物がどのように標的蛋白質と結合するのかのメカニズムの検討が不可欠であった。そのため蛋白質構造が明らかになっていない標的に対して、この手法を用いることができなかった。さらに蛋白質の結晶構造にサブタイプごとの変異があると、更に予想が困難なものになってしまう。二点目は、蛋白質構造を明らかにして、選択的な化合物を多数選び出したとしても、さらに選び出したい場合には再び蛋白質の結晶構造を用いねばならない。これは同じような方法を繰り返し使用して、新規化合物を選び出さねばならないことを意味する。もしも既に選び出された化合物の共通特性を特定因子として、そのような共通特性を持つ化合物を選ぶことができれば、創薬のスクリーニングプロセスは圧倒的に加速する。

## 2.5 第一原理計算と創薬

第一原理計算の医薬品スクリーニングへの応用は、上記の2点を可能とした。第一原理計算は蛋白質の情報は不要で、化合物のみで解析が可能である。ある共通の薬理学的特性を持つ化合物群を網

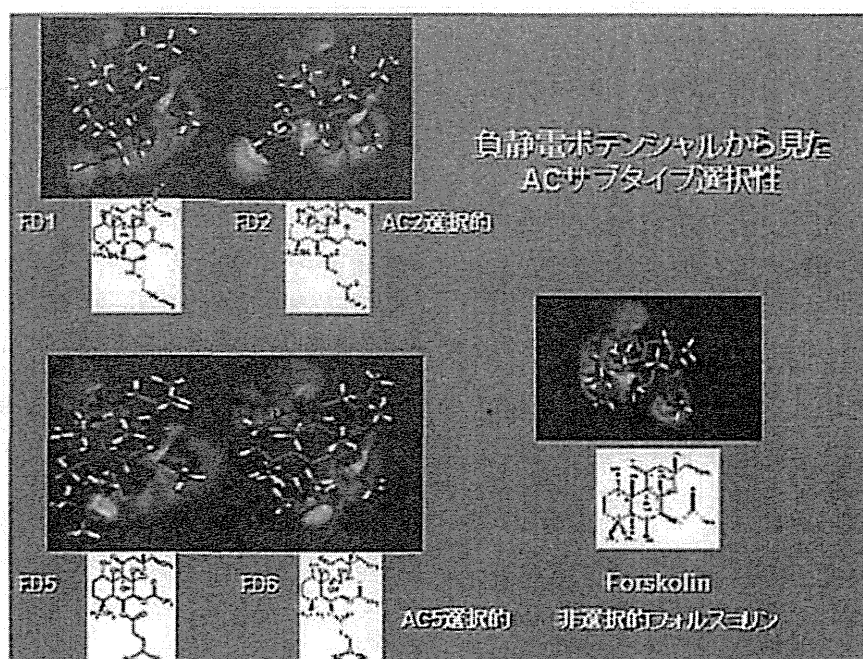


図1 フォルスコリン誘導体と負静電ポテンシャル<sup>4)</sup>

羅的に解析し、そこから第一原理計算的に得られた共通特性を割り出す。そしてその共通特性をもつ新しい化合物に、共通の薬理学特性の存在を推測する手法である。したがって、ある数以上の共通の薬理的性質を持つ化合物が既に存在する場合、第一原理計算を用いることによりはるかに容易に、類縁の新規化合物を選ぶことができる。一般に新薬の開発では数百あるいは数千種類の似たような化合物を用いてスクリーニングをかけることが多い。この際に本手法を導入することで相当の省力が可能となる。

第一原理計算には思わぬ副産物がついてくる。本手法は、もともと IHI において金属材料の評価に使用されていた方法である。従って、医薬品に対しては要求されていないさまざまな物理学的なパラメータを解析してしまう。その一つが磁性特性である。われわれの持つフォルスコリン誘導体は有機化合物であり、医学研究者は磁性の存在を想定していない。しかるに金属材料評価の専門家にとって、磁性評価は必須項目に数えられる。われわれの磁性医薬品化合物の評価技術は、フォルスコリン誘導体の一部に磁性が同定されたことから始まった。

フォルスコリン誘導体に予測された磁性特性は、ESR によっても確認された。これによって有機化合物の一部に磁性が存在しうることが予測された。同様の方法でいわゆる一般医薬品化合物をスクリーニングした結果、複数の磁性体化合物の存在が明らかとなった。それらの化合物は SQUID による磁場磁化曲線解析によって、ヒステリシスループの存在が明らかとなり、いわゆる強磁性体の性質を持つことが判明した。化合物の中には、強い細胞殺傷効果を示す化合物が見つかり、細胞殺傷効果と強磁性特性を併せ持つことから、いわゆる磁性抗がん剤の可能性が示された。さまざまな検証実験から、このような化合物に対して交流磁場印加によって強い温熱効果を発揮させることも判明した。既存の抗がん剤との最大の違いは、

抗がん剤自体が磁性体であるため、抗がん作用は発熱によって失われないことである。このことは、EU で実用化された磁性鉄の代わりに、磁性抗がん剤を使用することによってはるかに強い抗がん温熱療法が可能となることを意味しており、現在盛んに研究開発が行われている。

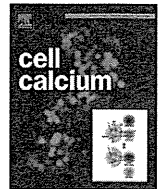
### 3. おわりに

わが国の高度成長期以来の蓄積で、重厚長大産業をはじめとしてさまざまな企業に膨大な技術の蓄積が行われている。しかるにそのような技術は、現在では当該産業分野では飽和的な技術となり、それ以上の新しい価値を生み出すことが少なくなっている。われわれはこれが日本の経済成長の停滞の原因の一つであると考えている。第一原理解析も、造船業や金属業においては、一般的な技術であるが、世界水準的に考えてもわが国は先端を行っている。それゆえに造船業や金属業以外に応用されることがなかった。膨大な技術と研究者の蓄積がありながら、他方面への応用が行われてこなかったことは、その必要が無かった、あるいは考えられなかったためでもある。第一原理計算の医薬品化合物への応用はその一例に過ぎないと考えている。おそらくわが国の化学工業技術には、まだまだ無数の技術と研究者が存在し、限られた分野にしか応用されていない技術が多数あると考える。医学応用はその一例であり、われわれのような医学部と造船業といった、通常なら考えられない異業種交流によって、新しい技術の転用が盛んとなり、日本の経済技術の成長の引き金となることを願っている。

#### 参考文献

- 1) 国民衛生の動向, 2011/2012, 第58巻9号
- 2) Dudeck, O. et al., *Investigative Radiology*, 41, 527-535, 2006
- 3) Onda, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 276, 47785-47793, 2001
- 4) Eguchi, H. and Ishikawa, Y. *Letters in Drug Design & Discovery*, 4, 434-441, 2007





# Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity

Qibin Jiao<sup>a</sup>, Hiroshi Takeshima<sup>b</sup>, Yoshihiro Ishikawa<sup>c</sup>, Susumu Minamisawa<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

<sup>b</sup> Department of Medical Chemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Science, 46-29 Yoshida-Shimo-Adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

<sup>c</sup> Cardiovascular Research Institute, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 August 2011

Received in revised form 13 October 2011

Accepted 17 October 2011

Available online 25 November 2011

### Keywords:

Sarcoplasmic reticulum

SERCA2

ER stress

Diastolic function

Heart failure

Heart rate variability

## ABSTRACT

Impaired  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake into the sarcoplasmic reticulum (SR) underlies a primary pathogenesis of heart failure in the aging heart. Sarcalumenin (SAR), a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding glycoprotein located in the longitudinal SR, regulates  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake by interacting with SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA). Here we found that the expression levels of both SAR and SERCA2 proteins were significantly downregulated in senescent wild-type mice (18-month old) and that downregulation of SAR protein preceded downregulation of SERCA2 protein. The downregulation of SERCA2 protein was greater in senescent SARKO mice than in age-matched senescent wild-type mice, which was at least in part due to progressive degradation of SERCA2 protein in SARKO mice. Senescent SARKO mice exhibited typical findings of heart failure such as increased sympathetic activity, impaired exercise tolerance, and upregulation of biomarkers of cardiac stress. Consequently, cardiac function was progressively decreased in senescent SARKO. We also found that the expression levels of endoplasmic reticulum (ER) stress-related genes such as x-box binding protein 1 (XBP1) were significantly increased in senescent SARKO mice, indicating that senescent SARKO mice exhibited ER stress. Thus we uncovered the important role of SAR in maintaining  $\text{Ca}^{2+}$  transport activity of SERCA2a and cardiac function in the senescent population.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Heart failure due to cardiac dysfunction represents one of the major causes of morbidity and mortality in the senescent population [1,2]. Diastolic dysfunction in particular is a hallmark of the aging heart [3,4]. A growing body of evidence has demonstrated that impaired  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake into the sarcoplasmic reticulum (SR) underlies the pathogenesis of diastolic dysfunction in the aging heart [5–8]. Since the SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase type 2a (SERCA2a) plays a primary role in  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration into the cardiac SR, a decrease in the expression and/or activity of SERCA2a directly relates to diastolic dysfunction. Therefore, exploring the molecular mechanism for the regulation of SERCA2a expression and activity is extremely important to understand the pathogenesis of diastolic dysfunction in the aging heart.

Sarcalumenin (SAR) is an SR luminal glycoprotein responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  buffering in skeletal and cardiac muscles [9,10]. SAR is predominantly found in the longitudinal SR, where SERCA and

phospholamban (PLN) are also located [11]. We have recently demonstrated that the gene disruption of SAR resulted in mild cardiac dysfunction in young mice at the age of 2–4-month old [12]. This impairment is likely due to a decrease in the expression of SERCA2 protein [12]. In addition, cardiac dysfunction was further progressed under a pressure-overloaded stress induced by transverse aortic constriction [13] and endurance exercise training [14]. However, it is not yet widely known that SAR plays a role in the impairment of SR function and in cardiac dysfunction in the aging hearts. In this study, therefore, we investigated the impact of SAR deficiency on the expression and activity of SERCA2a and cardiac function in the aging heart.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal preparation

All animal care and study protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Yokohama City University School of Medicine, and the investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). SAR knockout (SARKO) mice and C57BL/6J wild-type controls from the same genetic backgrounds were bred in an animal facility of the

\* Corresponding author at: Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan. Tel.: +81 03 5369 7322; fax: +81 03 5369 7022.

E-mail address: [sminamis@waseda.jp](mailto:sminamis@waseda.jp) (S. Minamisawa).

University of Waseda. All animals were housed under standard day–night rhythm and ad libitum conditions until beginning of the experiments (4 and 18 months of age).

## 2.2. Immunoblot analysis

We prepared protein samples from the left ventricular tissues of the young and senescent mice. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of Avertin (250  $\mu\text{g/g}$ ) to avoid adding extra stresses to the animals. Heart muscles were immediately placed in chilled phosphate-buffered saline to remove all residual blood. Hearts were then weighed, and left ventricles were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Immunoblot analyses were performed as described previously [13,14]. Briefly, tissues were defrosted to  $0^\circ\text{C}$  and homogenized in a chilled homogenization buffer [in mM: 50 Tris (pH 8.0), 1 EDTA, 1 EGTA, 1 dithiothreitol, and 200 sucrose] with protease inhibitors (Complete Mini, Roche, Basel, Switzerland). Protein content was determined using the Coomassie Plus protein assay (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) and ovalbumin was used as a standard. The protein samples (16  $\mu\text{g}$ ) were warmed to  $95^\circ\text{C}$  for 5 min and separated in the same gel by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). When the molecular size of target proteins was different, PVDF membranes were cut in accordance with their size. When the molecular size of target proteins was similar, we reused the same membrane for a different antibody after washing the membrane with a stripping buffer [in mM: 62.5 Tris (pH 8.0), 100 2-mercaptoethanol, and 2% SDS]. Primary antibodies used in the present study were: anti-SAR (Sigma, Japan), anti-SERCA2a (Sigma, Japan), anti-PLN (Badrilla, United Kingdom), anti-phosphorylated PLN (serine 16 or threonine 17) (Badrilla, United Kingdom), anti-RyR2 (kindly provided by Dr. Andrew Marks at Columbia University, America), anti-CSQ2 (Affinity BioReagents, USA), anti-NCX1 (kindly provided by Dr. Takahiro Iwamoto at Fukuoka University, Japan), and anti- $\beta$ -actin (Sigma, Japan). After application of a secondary antibody, quantification of the target signals was performed using the LAS-3000 imaging system (FUJIFILM, Tokyo, Japan). The protein levels of interest were normalized to rat  $\beta$ -actin. For reuse, a membrane was washed with a stripping buffer at  $55^\circ\text{C}$  for 10 min, and was washed 3 times with 0.1%TBS-Tween 20 buffer.

## 2.3. Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from various tissues using TRIzol reagent (Invitrogen, La Jolla, CA) as recommended by the manufacturer. Generation of cDNA and RT-PCR analysis were performed as described previously [15,16]. The primers for PCR amplification were designed based on the mouse nucleotide sequences of atrial natriuretic factor (ANF) and brain natriuretic peptide (BNP). The mRNA levels of interest were normalized to mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

## 2.4. Analysis of SERCA2 protein stability in *in vivo* mice

Protein stability was analyzed as described previously with some modification [17]. WT or SARKO mice were intraperitoneally injected with cycloheximide (0.1 mg/kg body weight). Animals were sacrificed 48 h after injection. The hearts were immediately removed and frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Homogenized tissue lysates were subjected to SDS–PAGE and immunoblot analysis. Assays were performed in triplicate.

## 2.5. SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase assay

SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was measured in triplicate spectrophotometrically at  $37^\circ\text{C}$  as described previously with some modifications [18]. Briefly, using 4  $\mu\text{g}$  of SR protein from mice heart tissues, the reaction was carried out at  $37^\circ\text{C}$  in a reaction medium [in mM: 30 TES, 100 KCl, 5  $\text{NaN}_3$ , 5  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 EGTA, and 4 ATP (pH 7.2) with or without 0.5  $\text{CaCl}_2$ ]. The reaction medium was pre-incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 5 min. The reaction was started at  $37^\circ\text{C}$  by adding SR protein to the medium. After 5 min the reaction was stopped by adding 0.5 ml of ice cold 10% trichloroacetic acid solution and the mixture was placed on ice. Inorganic phosphate was measured by using U2001 (HITACHI, Japan) as described previously [19].  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was calculated by subtracting the ATPase activity in the presence of 0.5 mM EGTA (no added  $\text{Ca}^{2+}$ ) from the activity in the presence of 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ . In-house tests showed that the calculated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was assumed to be the SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity at the approximately  $V_{\text{max}}$  levels from in-house tests.

## 2.6. *In vivo* hemodynamic study

Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of Avertin (250  $\mu\text{g/g}$ ) and subjected to *in vivo* hemodynamic study as described in our previous publication [12]. After the hemodynamic study, mice were weighed and killed. Hearts were placed in phosphate-buffered saline to remove all residual blood. Hearts were then weighed, and left ventricles were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

## 2.7. Treadmill exercise test

SARKO and WT mice were subjected to a graded exercise stress test [14]. Mice were placed on a rodent treadmill equipped with an electric grid at the rear. The test consisted of an incremental protocol with increasing workloads and is commonly used to screen for cardiovascular disease and evaluate cardiovascular fitness. This test began with a  $7^\circ$  incline and 20 m/min belt speed. Belt speed was then increased linearly by 1.5 m/min every 2 min. "Failure" was defined as the inability to continue regular treadmill running. Each mouse's maximal exercise speed was used as the measure of its exercise capacity.

## 2.8. Heart rate variability

Senescent WT and SARKO mice were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (1.25%) and then the 3.5-g wireless radio frequency transmitter was placed on each mouse's back. Mice were allowed to recover for 72 h after surgery. ECG recordings (24 h) were obtained in an unrestrained, temperature-controlled environment with the mice housed in separate, isolated cages far away from the stimulation of other animals and with normal light–dark cycles. Mice were free to eat and drink during the recording. ECG signals were recorded from the telemetric unit with the use of an under-cage receiver (Data Sciences International), digitized at a sampling rate of 2 kHz, and fed into a microcomputer-based data acquisition system (Power Lab System, AD Instruments, Milford, MA). ECG signal processing was performed with the software program Chart v5.0 and heart rate variability (HRV) analysis with the HRV plug-in for Chart v5.0 (AD Instruments). HRV was quantified with the use of frequency-domain techniques as described previously with some modifications [20]. In the frequency domain, power spectral density of the beat interval time series was computed by use of a modified averaged periodogram method. The squared magnitudes of the discrete Fourier transform of the segments were averaged

to form the power spectral density. Three different frequency-domain measures of HRV were computed. Standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN) was calculated directly from the sequence of interevent times. Cut-off frequencies for power in the low-frequency range (LF) and high-frequency range (HF) were defined as 0.4–1.5 Hz and 1.5–4 Hz, respectively; total power (TP) was defined as 0.00–4 Hz. LF and HF were also measured in normalized units, which represent the relative value of each power component in proportion to the sum of the HF and LF components.

### 2.9. Proteasome activity assay

We examined proteasome activity of the left ventricular tissues by using Cyclex Proteasome activity assay kit (Cyclex, Japan) at 37°C as described previously [21,22]. Fluorescence intensity was measured using a 380/460 nm filter set in a fluorometer for 1–2 h at every 5 min.

### 2.10. Statistical analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. The group data were compared using one-way or two-way ANOVA followed by multiple comparisons testing by Turkey–Kramer's post hoc test. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Downregulation of SAR and SERCA2 in senescent mice

The young and senescent SAR knockout (SARKO) mice and C57BL/6J wild-type controls with the same genetic backgrounds were obtained from an animal facility of Waseda University. They were housed until beginning of the experiment (5, 8, 13 and 18 months of age). We attempted to survey the relationship between age and expression levels of SAR and SERCA2 proteins in normal ventricular muscles. Western blotting analyses demonstrated that both SAR and SERCA2 protein levels were significantly downregulated in senescent ventricular muscles at the age of 18-month old (Fig. 1). It should be noted that downregulation of SAR protein preceded downregulation of SERCA2 protein and was already found in ventricular muscles at the age of 8-month old.

### 3.2. Significant reductions in the expression of $Ca^{2+}$ handling proteins in senescent SARKO mice

Our previous study demonstrated that the expression of SERCA protein, although not that of mRNA, was downregulated in the ventricles of young SARKO mice [12]. As we reported in that study, SERCA2a protein was significantly downregulated in the ventricular muscles of young SARKO mice than in those of young WT mice (Fig. 2A). In the present study, we investigated the effect of the disruption of SAR on age-related downregulation of SERCA2a protein. Remarkably, the expression level of SERCA2 protein in senescent SARKO mice was further decreased to 44% and 37% of that found in young SARKO and senescent WT mice, respectively. This data indicated that SAR deficiency resulted in a significant decline in SERCA2a protein during aging. Furthermore, the SERCA2a/PLN protein ratio was significantly decreased in ventricular muscles of senescent SARKO mice than those of young SARKO and senescent WT mice, although the expression level of PLN protein was also lower in ventricular muscles of senescent SARKO mice than in those of young SARKO and senescent WT (Fig. 2B). Importantly, the lowest expression level of phosphorylated PLN protein (serine 16 and threonine 17) among the groups was in ventricular muscles of senescent SARKO (Fig. 2C and D). It should be noted that intraperitoneal

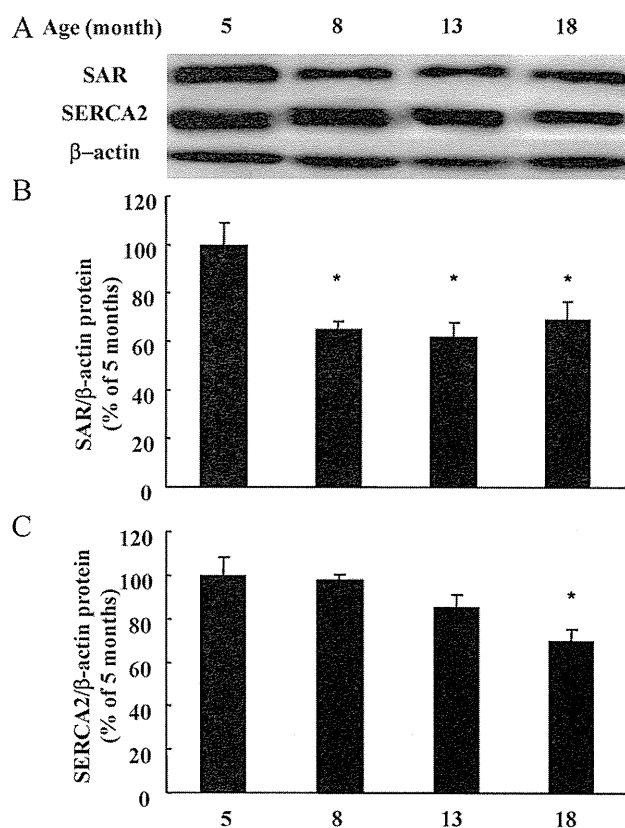


Fig. 1. Expression of SAR and SERCA2 protein in aging mouse cardiac muscle. The upper panel shows a representative western blot analysis (A). The relationship between aging and the expression levels of SERCA2 (B) and SAR (C) proteins were surveyed in cardiac muscles of wild-type mice.  $n = 4$  for each group. The expression level at 5 months of age was set to 100% as a control. Protein expression was normalized by  $\beta$ -actin. \* $p < 0.05$ .

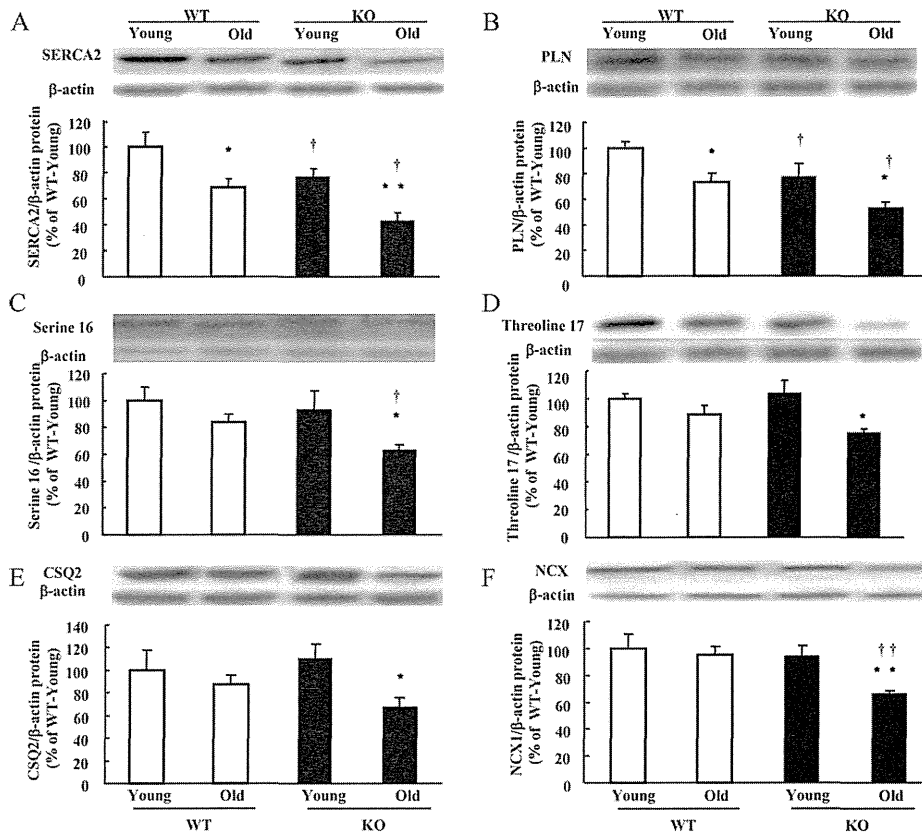
injection of avertin did not affect the phosphorylation status of serine 16 and threonine 17 in PLN as described previously [14].

We also examined other proteins related to  $Ca^{2+}$  cycling in the heart. The expression levels of calsequestrin 2 (Fig. 2E), sodium- $Ca^{2+}$  exchanger 1 (NCX1) (Fig. 2F), and RyR2 (data not shown) proteins were significantly downregulated in senescent SARKO mice. Overall, all  $Ca^{2+}$  handling proteins we examined were downregulated in senescent SARKO mice.

### 3.3. Senescent SARKO mice exhibited significant reduction in SERCA2a activity and cardiac dysfunction

We also examined SERCA2a activity in SR vesicles prepared from WT and SARKO hearts (Table 1). The result in Table 1 indicated that SERCA2 activity at pH 7.2 was the lowest in senescent SARKO mice; this finding is consistent with the decrease in SERCA2a protein, SERCA2a/PLN protein ratio, and the levels of phosphorylated status of PLN protein.

Since we found that the expression and activity of SERCA2 were significantly decreased in senescent SARKO mice, we investigated the impact of the SERCA2 impairment on *in vivo* phenotypes of senescent SARKO mice. First, we examined the effects of aging on cardiac function in WT and SARKO mice (Table 1). Both systolic and diastolic functions were impaired in senescent WT and SARKO mice when compared with those in young WT mice. Both systolic and diastolic functions were decreased to a greater degree in senescent SARKO mice than in senescent WT mice. Heart rate was also the lowest in senescent SARKO mice.



**Fig. 2.** Dramatic declines in SERCA2a and other  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins in senescent SARKO mice. Quantification of SERCA2 (A), PLN (B), and serine 16 phosphorylated PLN (C) threonine 17 phosphorylated PLN (D) levels in hearts isolated from young and senescent mice ( $n = 10, 10, \text{ and } 5$ , respectively). (D) The SERCA2/PLN ratios in young and senescent mice. Quantification of the expression levels of CSQ2 (E) and NCX1 (F) proteins.  $n = 5$  for each group. The expression level in young WT mice was set to 100% as a control. Protein expression was normalized by  $\beta$ -actin. \* vs. young;  $\dagger$  vs. WT; \*,  $\dagger p < 0.05$ ; \*\*,  $\dagger p < 0.01$ .

### 3.4. Senescent SARKO mice exhibited higher sympathetic activity

Since abnormality of autonomic nervous tone is often associated with heart failure [23], and since we found that heart rate was lower in sedated senescent SARKO mice, we examined heart rate variability to determine the status of the autonomic nervous tone in non-sedated senescent SARKO and WT mice, using telemetric electrocardiography. Non-sedated mice exhibited a heart

rate approximately 1.3 times that of sedated mice. Heart rate was lower in sedated senescent SARKO mice than in sedated senescent WT mice; likewise, heart rate was lower in non-sedated senescent SARKO mice than in non-sedated senescent WT mice (Fig. 3). Interestingly, normalized low frequency (nLF), an indicator of both sympathetic and parasympathetic tone, was higher in senescent SARKO mice than in senescent WT mice. Normalized high frequency (nHF), an indicator of parasympathetic tone, was lower

**Table 1**  
Effects of aging on cardiac function.

	WT		SARKO	
	Young	Senescent	Young	Senescent
Number	11	12	12	13
Age, months	5.1 $\pm$ 0.1	21.2 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.6	19.3 $\pm$ 0.3
HR, bpm	458 $\pm$ 8	452 $\pm$ 7	438 $\pm$ 8	390 $\pm$ 18**, $\dagger$
LVP, mmHg	98 $\pm$ 5	85 $\pm$ 4**	89 $\pm$ 2	67 $\pm$ 2**, $\dagger$
LV dp/dt max, mmHg/s	9314 $\pm$ 364	7091 $\pm$ 657**	6836 $\pm$ 298 $\dagger$	3897 $\pm$ 134**, $\dagger$
LV dp/dt min, mmHg/s	-5839 $\pm$ 282	-4527 $\pm$ 478**	-4504 $\pm$ 282 $\dagger$	-2860 $\pm$ 239**, $\dagger$
EDP, mmHg	2.3 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.7
Tau, ms	6.2 $\pm$ 0.4	13.4 $\pm$ 1.1*	8.3 $\pm$ 0.4 $\dagger$	20.3 $\pm$ 2.8**, $\dagger$
BW, g	31.7 $\pm$ 1.5	35.1 $\pm$ 1.6	27.7 $\pm$ 0.9 $\dagger$	26.3 $\pm$ 1.0 $\dagger$
atria, mg	9.3 $\pm$ 0.8	11.1 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.6	9.5 $\pm$ 0.5
RV, mg	24.7 $\pm$ 1.3	29.5 $\pm$ 1.2*	22.3 $\pm$ 1.3	25.9 $\pm$ 1.3 $\dagger$
LV, mg	107.3 $\pm$ 6.6	116.2 $\pm$ 4.1	92.0 $\pm$ 4.7	99.6 $\pm$ 4.0 $\dagger$
SERCA2a activity, nmol/mg/min	1133 $\pm$ 84	863 $\pm$ 69*	835 $\pm$ 63 $\dagger$	628 $\pm$ 50*, $\dagger$

All data are presented as means  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. young,  $\dagger p < 0.05$ ,  $\dagger\dagger p < 0.01$  vs. WT.

WT: wild-type mice; SARKO: sarcocalcine-knockout mice; HR: heart rate; bpm: beats/min; LVP: maximal left ventricular systolic pressure; LV dp/dt max or min: maximal or minimal first derivative of left ventricular pressure; EDP: end-diastolic pressure; Tau: the time course of pressure decline; RV: right ventricular; LV: left ventricular; SERCA2a: sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase type 2a.