

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	不全心におけるナトリウム利尿ペプチドと酸化ストレスの関連について
Author(s)	庄野, 信
Citation	
Issue date	2007-03-27
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11133">http://hdl.handle.net/2298/11133</a>
Right	

学 位 論 文

Doctor's Thesis

不全心におけるナトリウム利尿ペプチドと  
酸化ストレスの関連について

Predominant Effect of A-type Natriuretic Peptide on Reduction of Oxidative  
Stress during the Treatment of Patients with Heart Failure

庄野 信  
Makoto Shono

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

指導教員

小川 久雄 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

2007 年 3 月

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名：不全心におけるナトリウム利尿ペプチドと  
酸化ストレスの関連について

Predominant Effect of A-type Natriuretic Peptide on Reduction of Oxidative  
Stress during the Treatment of Patients with Heart Failure

著 者： 庄野 信  
Makoto Shono

指導教官：熊本大学大学院医学教育部博士課程循環器病態学  
小川 久雄 教授

審査委員： 腎臓内科学担当教授 富田 公夫 教授  
分子遺伝学担当教授 尾池 雄一 教授  
心臓血管外科学担当教授 川筋 道雄 教授

2007年 3月

## 目次

1. 要旨	3-4
2. 参考論文	5
3. 謝辞	6
4. 略語一覧	7
5. 研究の背景と目的	8-12
5-1. ANP BNP CNP の発見	
5-2. ナトリウム利尿ペプチドの構造	
5-3. 不全心における ANP BNP の著しい分泌亢進	
5-4. 臨床における ANP BNP の濃度測定の有用性	
5-5. 心不全治療薬としての ANP BNP	
5-6. チオレドキシン	
6. 実験方法	13-18
6-1. 臨床研究 (プロトコール 1)	
6-1-1. 採血とアッセイ	
6-1-2. 血清チオレドキシン、アルドステロン、血漿 BNP の測定	
6-2. ラット心筋細胞培養研究 (プロトコール 2)	
6-2-1. 材料	
6-2-2. 培養細胞準備	
6-2-3. 心筋細胞純培養	
6-2-4. 心筋細胞培養実験プロトコール	
6-3. 培養心筋細胞内酸化状態の測定	
6-4. 遺伝子発現の測定	
6-4-1. 全 RNA の抽出、精製	
6-4-2. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法	

6-4-3.	リアルタイム RT-PCR 法による各遺伝子発現の定量分析	
6-5.	統計学的解析	
7.	研究結果	19-27
7-1.	臨床研究	
7-2.	基礎研究	
8.	考察	28-33
9.	結語	34
10.	参考文献	35-40

## 1. 要旨

【目的】 酸化ストレスは心不全の病態において重要な影響を与えていると考えられている。また、A-Type Natriuretic Peptide (ANP), B-Type Natriuretic Peptide (BNP) は、心不全の重症度を反映しかつ治療にも用いられている。外因性の ANP, BNP が心不全治療に対して血行動態改善作用やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制作用、交感神経抑制作用を介して効果的であることはこれまで報告されている。しかし、酸化ストレスに関しては、これまで明らかにされていない。本研究は臨床研究と仔ラット心筋培養系を用いて外因性の ANP が酸化ストレスに与える影響について検討することを目的とする。

【方法】 最初に心不全患者に対しての治療として通常治療に加えてカルペリチド治療群とフロセミド治療群に振り分け、血清チオレドキシンの濃度の変化を検討した。(プロトコール1) 次に外因性 ANP 心筋に対する直接作用を見るために仔ラット心筋細胞培養系を用いてチオレドキシンの遺伝子発現量と Reactive Oxygen Species (ROS) の産生を測定し検討した。(プロトコール2)

【結果】 (プロトコール1)8人の患者に対してフロセミドの静注を用い、11人の患者に対してカルペリチドのみの治療を24時間行った。血清チオレドキシンの濃度は、フロセミド群においては、軽度の低下を認めるものの有意な低下は認められなかったが、カルペリチド群において4時間後、24時間後、共に有意な低下を認めた。(プロトコール2)仔ラット心筋培養細胞系において低用量の ANP は有意にチオレドキシンの遺伝子発現量と ROS の産生を抑制した。

【結論】 心不全治療において ANP(カルペリチド)治療は、血行動態改善だけではなく有力な抗酸化作用を有している。

## Summary

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of heart failure. We investigated the role of the exogenous A-type natriuretic peptide (ANP) in the patients with heart failure and in cultured neonatal rat cardiomyocytes by measuring oxidative stress maker.

We first examined if an infusion of human ANP (carperitide) changed serum levels of thioredoxin (TRX) during the treatment of patients with heart failure compared to conventional therapy with furosemide (Protocol 1). We next studied whether ANP had a direct antioxidant action on the failing heart by measuring TRX gene expression and reactive oxygen species (ROS) production in cultured neonatal rat cardiomyocytes (Protocol 2). In Protocol 1, 8 patients were treated with only an intravenous bolus of furosemide and 11 patients with only an intravenous infusion of carperitide for 24 hours. Serum TRX levels significantly decreased at 4 hours ( $p < 0.03$ ) and at 24 hours ( $p < 0.05$ ) in the carperitide group, whereas they decreased slightly but were not significantly different in the furosemide group. In Protocol 2, we found that a low dose of exogenous ANP of  $10^{-9}$  mol/L significantly suppressed TRX gene expression and ROS production in cardiomyocytes.

Carperitide infusion has predominantly an antioxidative action in addition to improving hemodynamics in patients with acute heart failure. Furthermore, carperitide infusion should have a direct antioxidant effect on the failing heart.

## 参考論文

### ① 関連論文

1. Makoto Shono, Michihiro Yoshimura, Masafumi Nakayama, Megumi Yamamuro, Koji Abe, Satoru Suzuki, Yuji Mizuno, Seigo Sugiyama, Yoshihiko Saito, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa.  
Predominant Effect of A-type Natriuretic Peptide on Reduction of Oxidative Stress during the Treatment of Patients with Heart Failure *Circulation Journal*. 2007 ;71(7):1040-6.

### ② その他の論文

1. Megumi Yamamuro, Michihiro Yoshimura, Masafumi Nakayama, Koji Abe, Makoto Shono, Satoru Suzuki, Tomohiro Sakamoto, Yoshihiko Saito, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa.  
Direct Effects of Aldosterone on Cardiomyocytes in the Presence of Normal and Elevated Extracellular Sodium. *Endocrinology*. 2006;147(3):1314-1321.
2. Tsunenori Nishijima , Masafumi Nakayama, Michihiro Yoshimura, Koji Abe, Megumi Yamamuro, Satoru Suzuki, Makoto Shono, Seigo Sugiyama, Yoshihiko Saito, Yoshihiro Miyamoto, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, and Hisao Ogawa.  
The Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene -786T/C Polymorphism is a Predictive Factor for Reattacks of Coronary Spasm. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2007 17:581-587.
3. Masafumi Nakayama, Michihiro Yoshimura, Tomohiro Sakamoto, Koji Abe, Megumi Yamamuro, Makoto Shono, Satoru Suzuki, Tsunenori Nishijima, Yoshihiro Miyamoto, Yoshihiro Saito, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa  
A-786T>C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene reduces serum nitrite/nitrate levels from the heart due to an intracoronary injection of acetylcholine. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2006;16(5):339-345.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学研究科循環器病態学 小川久雄教授、泰江弘文前教授(現熊本加齢医学研究所所長)、京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科学 中尾一和教授、奈良県立医科大学第一内科学 斎藤能彦教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究において、直接御指導をいただきました吉村道博先生、中山雅文先生、山室恵先生、鈴木達先生をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

#### 4. 略語一覽

- ANP: A-type (atrial) natriuretic peptide
- BNP: B-type (brain) natriuretic peptide
- TRX: thioredoxin
- ROS: reactive oxygen species
- RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

## 5. 研究の背景と目的

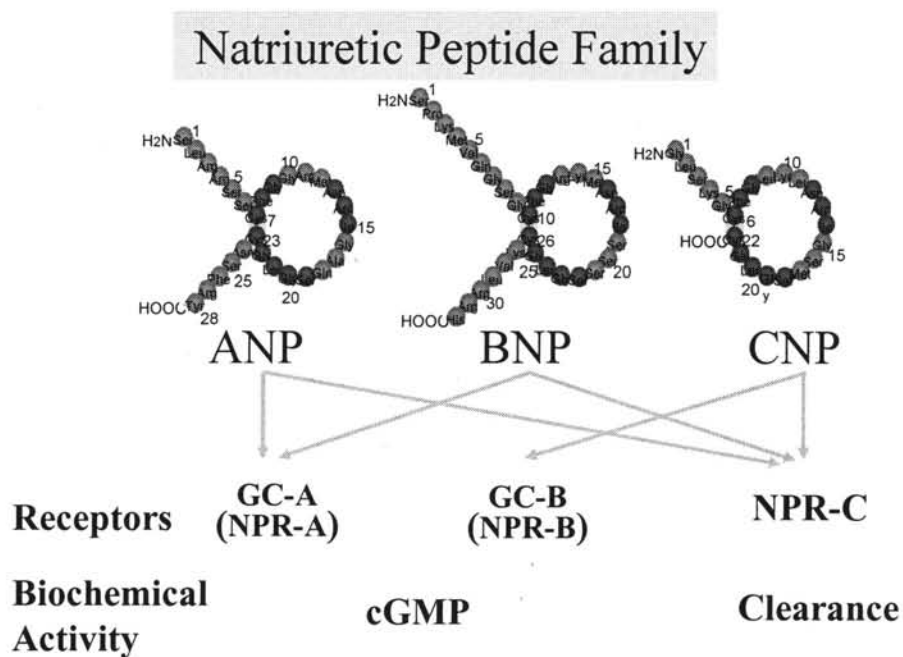
### 5-1. ANP BNP CNP の発見

1983-84 年に、人やラットの心房組織からの ANP (atrial natriuretic peptide: 心房性ナトリウム利尿ペプチド) が単離・構造決定されたことを契機として、それまで主にメカニズムなポンプとしてのみ心臓が、利尿・降圧ホルモンを分泌し、循環調節にかかわる内分泌器官であることが明らかになった。心臓からの ANP の発見に続き、脳より BNP (brain natriuretic peptide: 脳性ナトリウム利尿ペプチド) (1988 年)、更に CNP (C-type natriuretic peptide: C 型ナトリウム利尿ペプチド) (1990 年) が発見された。その結果、ナトリウム利尿ペプチドが ANP, BNP, CNP の 3 種の類似下ペプチドファミリーを形成して、循環調節をはじめ心・血管系で重要な役割を果たしていることが次第に解明され、心・血管内分泌学という新しい研究領域への扉を開く端緒になった。更に、ANP BNP は心不全の新しい治療薬および診断薬として開発され、CNP については循環器系のみならず軟骨形成における臨床応用も研究されている。

### 5-2. ナトリウム利尿ペプチドの構造

ヒト ANP, BNP, CNP の構造を下記に示した。これら 3 種類のナトリウム利尿ペプチドは、Cys 残基の S-S 結合により形成される 17 残基のアミノ酸よりなる環状構造部をもち、環状構造部では相同性が高い。還元して環状構造をなくすると活性が消失することから、環状構造がナトリウム利尿ペプチド受容体への結合、あるいは利尿、平滑筋弛緩などの活性発現に必須であることとよく一致している。一方、環状構造よりより伸びる N 末端および C 末端ペプチドには大きな相違が認められる。ナトリウム利尿ペプチド類では、N 末端ペプチドは活性にあまり影響しないが、C 末端ペプチドの構造は活性に大きな変化を与える。その

C末端ペプチドは、ANPで5残基、BNPで6残基であるのに対して、CNPでは、完全に欠失しており特徴的な構造である。哺乳類におけるCNPの活性部のアミノ酸配列は同一であり、ANPでも1残基の置換が認められるにすぎない。ところが、BNPでは動物種間で多数のアミノ酸置換が存在し、活性強度も大きく変化する。このように哺乳類ANP, BNP, CNPの活性構造には、各タイプに特徴的な違いが存在する。



### 5-3. 不全心におけるANP BNPの著しい分泌亢進

心不全はいわゆる症候群であるが、その病態生理学上、心拍出量の低下に引き続き生じる各種代謝機構の働きが最近注目されている。特にその中で交感神

経系やレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAA 系)、抗利尿ホルモン (ADH) の研究が進められている。これらの因子は心不全が生じると水とナトリウムを貯留する方向に働き血圧を維持しようとする。しかしながらこれらの代償機構は、慢性心不全では過剰に働き、かえって心臓の前負荷、後負荷を増大させて心機能を低下させる。これに対して種々の counter-regulation が働いているが、そのひとつとして心臓自体からは、ANP BNP が分泌される。ANP BNP は、強力なナトリウム利尿作用、血管拡張作用、RAA 系、ADH、交感神経系を抑制する作用を持ち、種々の血管収縮因子に対して拮抗的に働く。ANP は、主に心房にて合成され顆粒として蓄えられており、心房負荷がかかると心房筋が伸展され、顆粒中の ANP は直ちに血中に放出される。これはいわゆる regulated pathway である。また心房負荷が続けば ANP 合成は更に進み血中濃度は増加する。BNP は ANP と異なり心房での顆粒としての貯留はほとんどなく、合成されたものは常に血中に放出されており (constitutive pathway)、しかもこの分泌は、主に心室にて起こる (心房でも合成は亢進しているが心室の容積としての量が多いため結果的に心室からの分泌が優位となる)。心室筋の伸展負荷により BNP mRNA の発現量は増加し、蛋白合成・分泌が亢進する。心不全症例において BNP 値は健常者の数十倍に増加し、時に重症例では、数百倍から数千倍に増加することもある。このように心不全における BNP の変動は、心不全の重症度と共に指数関数的に上昇する。この分泌亢進の度合いは他のホルモンと比較しても類を見ないほど顕著である。

#### 5-4. 臨床における ANP BNP の濃度測定の有用性

ANP, BNP 分泌は一般的に心負荷で増大する。心不全の状態把握のために、ANP, BNP 濃度測定は極めて有用であり従来になかった生化学的手法を用いた心機能

評価といってよいであろう。ANP と BNP を比較するならば、各々の分泌様式や分泌組織、また、分泌量を考えれば、心室を主とした心機能の評価には ANP より BNP のほうがより有効である。現在でも数多くの臨床研究が進められているが、すでに報告されているものでは、心不全、心筋梗塞後において BNP 濃度でその予後を推定できることが示されている。今日の一般診療において経時的な心不全の程度評価のため血漿 BNP 測定は、日常化している。さらに、循環器専門医でなくても心不全を評価・スクリーニングできるようになった点も BNP 測定の大きな功績であろう。

#### 5-5. 心不全治療薬としての ANP BNP

心不全において ANP, BNP は著しく分泌されるが、それを凌駕する交感神経系や RAA 系の亢進が不全心では認められるため、現在の心不全治療の根幹に交感神経抑制薬 ( $\beta$  遮断剤) や RAA 阻害薬 (アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬) が用いられている。しかし、ANP, BNP は交感神経系抑制作用・RAA 系抑制作用を有しており内因性の交感神経抑制薬、RAA 阻害薬といえる。この ANP, BNP を補充することは安全に交感神経抑制、RAA 阻害が行われるのではないかと (内因性の ANP, BNP は不足しているのではないかと) の考えから合成 ANP、あるいは、合成 BNP の静注が新しい心不全治療薬として考案された。ANP については、すでに市販されておりその臨床応用が始まっている。ANP :  $0.025\sim 0.1\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  を投与すると血行動態上、PCWP の低下と SVR の低下をもたらし、SVI を増加させる。つまり、前負荷、後負荷を軽減し、左心機能を改善させる。神経液性因子では交感神経系、RAA 系を抑制し、腎機能においては、ナトリウム利尿を示す。

## 5-6. チオレドキシシン

チオレドキシシンは、大腸菌の DNA 合成に必須な酵素である ribonucleotide reductase に水素イオンを供与する補酵素として発見された。ヒトのチオレドキシシンについては、成人 T 細胞白血病由来因子 (ATL-derived factor ; ADF) として 1989 年に淀井によりクローニングされた。

チオレドキシシンは-Cys-Gly-Pro-Cys-という大腸菌から哺乳類までよく保存された活性部位を持ち、この活性部位の 2 つのシステイン基の間でジスルフィド (S-S) 結合を作る酸化型とジチオール (-SH-SH) を作る還元型が存在する。

チオレドキシシンは紫外線、放射線、酸化剤、ウイルス感染、虚血再灌流傷害、及び抗ガン剤投与などにより誘導されることが明らかになっている。その誘導されたチオレドキシシンの役割として、チオレドキシシン単独で一重項酸素やヒドロキシルラジカルを消去する他、ペルオキシレドキシシンとの協調作用により、ROS を消去する抗酸化物質として生体内で働くことが報告されて、種々の遺伝子発現を調節する転写因子や細胞内のシグナル伝達分子の活性を制御している。また、ヒトの血液中にあるチオレドキシシン濃度は様々な身体的、精神的ストレスにより上昇する。この上昇は酸化ストレスに起因していると考えられている。ヒトの血液中のチオレドキシシン値を測定することで、酸化ストレスに起因する身体的・精神的ストレスをモニターすることができる。

## 6. 実験方法

### 6-1. 臨床研究 (プロトコール 1)

#### 対象

連続 26 症例の当科に入院した心不全患者を登録した。入院時、急性冠症候群、重症弁膜症、ショック、機械的サポートや循環作動薬のサポートの必要な症例は除外した。それぞれ 13 例の患者に ANP (カルペリチド) ( $0.025 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) とフロセミド (20mg) のみ使用した治療を 24 時間施行した。このプロトコールにてカルペリチド群に 2 名フロセミド群に 5 名の追加治療が必要であり、結果的にカルペリチド群 11 名、フロセミド群 8 名となった。これらの症例にて主解析を行った。追加治療は、カルペリチド群に対しては、フロセミド (20mg) を追加投与し、フロセミド群に対しては ANP (カルペリチド) ( $0.025 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) を追加投与した。これら全ての症例の解析を副解析として行った。

本研究にあたっては、熊本大学倫理委員会からの承諾を受け、すべての患者からインフォームド・コンセントを得た。

#### 6-1-1. 採血とアッセイ

採血は入院後、治療開始前に静脈採血を行った。採血は、すぐに遠心機にて 10 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  3000 回転/分にて行い、その上清を  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

#### 6-1-2. 血清チオレドキシン、アルドステロン、血漿 BNP の測定

血清チオレドキシンは、Sandwich ELISA kit (FujiRebio, 東京, 日本)、血清アルドステロンと血漿 BNP は免疫放射線測定法にて測定した。



## 6-2. ラット心筋細胞培養研究 (プロトコール 2)

### 6-2-1. 材料

- RNeasy mini kit、RNase free DNase kit (キアゲン、GmbH Hirden、Germany)
- パーコール (シグマ、St. Louis, MO、USA)
- コラゲナーゼ II (シグマ、St. Louis, MO、USA)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ギブコ、東京、日本)
- ウシ胎仔血清 (Moregate Bio Tech、Bulimba、Australia)
- Bovine serum albumin (シグマ、St. Louis, MO、USA)
- 100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン (ギブコ、東京、日本)
- FBS を含む DMEM [10% FBS, 抗生剤(100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン)]
- FBS を含まない DMEM [1 mg/mL Bovine serum albumin, 抗生剤(100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン)]
  
- 生理バッファー [116mM NaCl、20mM HEPES、12.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5.6mM glucose、5.4mM KCl、and 0.8mM MgSO<sub>4</sub> (pH 7.35)]
- Sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl ester (SBFI AM、シグマ、St. Louis, MO、USA)<sup>39)</sup>
- LysoSensor Green DND-153 (モレキュラープローブ、Eugene、USA)<sup>40)</sup>

### 6-2-2. 培養細胞準備

“The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (the US National Institutes of Health)” および 「熊本大学動物実験指針」に準拠し施行した。生後1、2日の新生Wistarラット（九動、熊本、日本）を用いた。ラット心摘出後、心室部分を氷冷した生理バッファー中で4~8分割した。これらの心室部分の組織片を0.04% コラゲナーゼIIと0.06% パンクレアチンを含んだ生理バッファー中に遊離させ、37°C × 20分間震盪を加えた。この酵素を含んだ溶液による細胞レベルへの単離を6回繰り返す、その度に上清中に含まれる単離された心室細胞（心筋細胞および非心筋細胞）を集め、1/5容量のウシ胎仔血清（FBS）を加えることにより酵素反応を停止させた。さらに、これらの心室細胞を遠心分離（300G × 5分間、15° C）し、1mLのFBSにて懸濁後、氷上に静置した。

### 6-2-3. 心筋細胞純培養

純培養を行うにあたり、パーコール法による選択的な心筋細胞収集を施行した。40.5%含パーコールおよび58.5%含パーコールを生理バッファーにて調製後、上記のごとく単離した心室細胞群を58.5%含パーコールに遊離させた。これらを遠心分離（1,200G × 30分間、15° C）することにより、心筋細胞は40.5%含パーコールと58.5%含パーコールの境界面部分に、非心筋細胞（主として線維芽細胞）は40.5%含パーコール表層に集積した。40.5%含パーコールと58.5%含パーコールの境界面部分から回収した心筋細胞の細胞数は、遊離させた心室細胞数全体の $51.6 \pm 1.7\%$  (n=3)を占めていた。純化した心筋細胞10%FBSを含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を培養液とし、 $0.75 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播き、37° C、5%CO<sub>2</sub>大気圧下にてインキュベートした。この方法により、全体の少なくとも95%が心筋細胞で占められることが報告されている。30時間の

FBS(+)DMEMにて培養後、前処理としてFBS(-)DMEMにて培養細胞を12時間培養した。その後FBS(-)DMEMに培養液を交換した。前処理後、新たにFBS(-)DMEMと交換し、ラット ANP $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$ mol/L 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> $10^{-5}$ mol/L、刺激を開始した。

#### 6-2-4. 心筋細胞培養実験プロトコール

心筋細胞培養系の実験を3タイプ行った。

第1にプレコンディショニング後に心筋細胞にラット ANP $10^{-8}$ ~ $10^{-9}$ mol/Lを投与し24時間後に細胞採取しそれらの細胞の Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を行った。

第2にプレコンディショニング後に心筋細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> $10^{-5}$ mol/L を用いて刺激をした。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対するラット ANP の効果を見るためにこれらにラット ANP $10^{-9}$ mol/L を投与し12時間後に細胞採取、それらの細胞の RT-PCR を行った。

第3に心筋細胞の ROS の産生を 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA) (モリキュウラープローブ, オレゴン, United States)を用いて測定した。

#### 6-3. 培養心筋細胞内酸化状態の測定

培養心筋細胞に 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA) (モリキュウラープローブ, オレゴン, United States)を細胞内へ添加し H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えて30分培養し、すばやく倒立形システム顕微鏡 (オリンパス IX 70、東京、日本) を用いて撮影し、その蛍光強度は高性能画像取得システムソフトである Lumina Vision (三谷商事、東京、日本) を用いて測定した。蛍光強度は、励起光 495nm 蛍光 529nm で表現される。

#### 6-4. 遺伝子発現の測定

##### 6-4-1. 全 RNA の抽出、精製

培養した細胞から RNeasy Mini kit (キアゲン, GmbH Hirden, Germany) および RNase free DNase kit (キアゲン) を用いて全 RNA を採取し精製した。

##### 6-4-2. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

左室心筋から抽出した全 RNA 500 ng を oligo (dT) をプライマーとして用いた Taq Man Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ、東京、日本) を用いて逆転写した。

##### 6-4-3. リアルタイム RT-PCR 法による各遺伝子発現の定量分析

ラット BNP, TRX 遺伝子の定量分析には 2 ステップ リアルタイム RT-PCR を用いた。ラット BNP 遺伝子の定量分析では 6-5-2 で作成した鋳型 cDNA 500 ng、各プライマー 800 nmol/L、TaqMan プローブ 800 nmol/L (表 6-5-2)、および 1× TaqMan universal master mix を含む 20  $\mu$ L 混合液を作成し、また、ラット TRX 遺伝子の定量分析では、アプライドバイオシステムズにて作成依頼したラット TRX のプライマー・プローブセット 2  $\mu$ l、および 1× TaqMan universal master mix を含む 20  $\mu$ L の混合液を作成し、ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ) を用いて、50° C  $\times$  2 分間、95° C  $\times$  10 分間の加熱処理後、PCR 反応 (95° C  $\times$  15 秒間、60° C  $\times$  1 分間を、40 回) を行った。検量線作成には、ラット心臓から抽出した全 cDNA の希釈系列を用いた。また、TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (アプライドバイオシステムズ) を用いて、各サンプルの GAPDH 遺伝子発現を定量し、ラット BNP、TRX の遺伝子発現量をサンプル毎に補正した。

## リアルタイムPCRに用いたBNP遺伝子発現用プライマーとTaqManプローブ

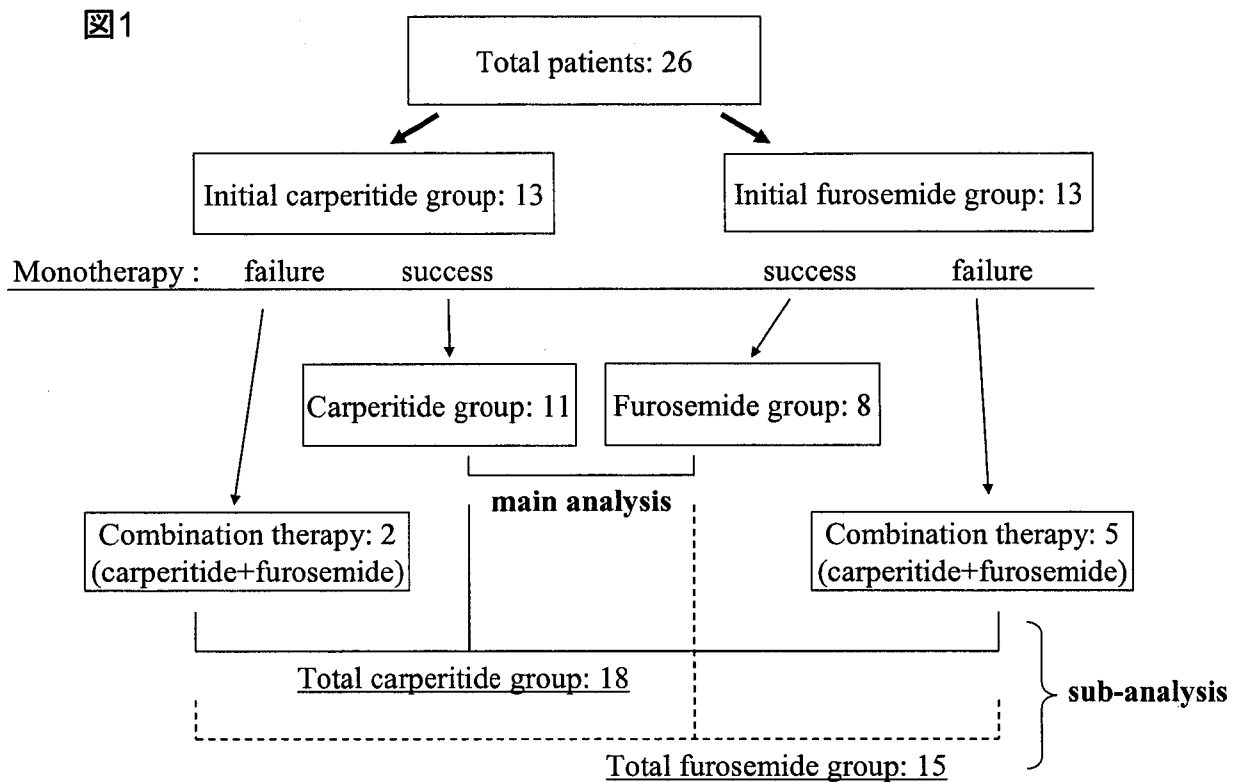
遺伝子	塩基配列	使用目的
ラット BNP	5'-CAGAAGCTGCTGGAGCTGATAAG-3'	Forward primer
	5'-TGTAGGGCCTTGGTCCTTTG-3'	Reverse primer
	5'-AAAGTCAGAGGAAATGGCTCAGAGACAGC-3'	TaqMan probe

### 6-5. 統計学的解析

結果は平均値 ± 標準誤差にて表記した。統計学的解析は Fisher' s protected least-significant difference を用い、正規分布しない2群間統計学的解析に対しては、Mann-Whitney U test と Wilcoxon signed-rank test を用いた。P 値 0.05 未満を有意と判断した。

## 7. 研究結果

### プロトコール1 臨床研究



今回の臨床研究において上記 図1 に示すようにカルペリチド群の2名に対してフロセミドを投与し最終的にカルペリチドを投与したグループは、計18名となった。フロセミド群は5名にカルペリチドを投与し、最終的にフロセミドを投与した群は計15名となった。単剤投与にて24時間治療できたカルペリチド群11名、フロセミド群8名を主解析とし、追加治療を行った総カルペリチド群18名、総フロセミド群15名に対して副解析を行った。

Table 1. Clinical Characteristics of the Study Population

	Furosemide Group (n=8)	Carperitide Group (n=11)	P Value
Age	70±5	67±4	N.S.
Male/Female	3/5	4/7	N.S.
Blood Pressure			
Systole (mmHg)	118±7	121±8	N.S.
Diastole (mmHg)	69±3	76±3	N.S.
Heart Rate (bpm)	88±7	86±6	N.S.
NYHA Classification (I/II/III/IV)	0/1/4/3	0/3/5/3	N.S.
Underlying Disorders	IHD 2 DCM 3 AR 2 MR 1	IHD 4 DCM 3 AR 2 MR 2	N.S.
<i>Risk Factors at Admission</i>			
Hypertension	4/8 (50%)	6/11 (55%)	N.S.
Current Smoking	1/8 (13%)	2/11 (18%)	N.S.
Diabetes Mellitus	3/8 (38%)	4/11 (36%)	N.S.
Hypercholesterolemia	3/8 (38%)	5/11 (45%)	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6±0.8	22.4±0.6	N.S.
<i>Medication at Admission</i>			
Diuretic	5/8 (63%)	8/11 (73%)	N.S.
ACE inhibitor	4/8 (50%)	7/11 (64%)	N.S.
ARB	3/8 (38%)	5/11 (45%)	N.S.
Niterate	1/8 (13%)	1/11 (9%)	N.S.
Beta blocker	1/8 (13%)	2/11 (18%)	N.S.
Digoxin	1/8 (13%)	2/11 (18%)	N.S.
Calcium channel blocker	2/8 (25%)	2/11 (18%)	N.S.
Statin	1/8 (13%)	1/11 (9%)	N.S.

NYHA indicates New York Heart Association; IHD, ischemic heart disease; DCM, dilated cardiomyopathy; AR, aortic regurgitation; MR, mitral regurgitation; BMI, body mass index; ACE, angiotensin converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker. Hypertension was defined as systolic blood pressure >140mmHg and/or diastolic blood pressure >90mmHg. Diabetes Mellitus was defined as a fasting plasma glucose 126mg/dl or higher or treatment with either insulin or a hypoglycemic agent. Hypercholesterolemia was defined as treatment with anti-hypercholesterol agents such as statin etc, or when patients had serum blood cholesterol levels 220 mg/dl or higher. Values are mean ±SE.

研究対象となった患者の臨床的特徴を Table 1 に示した。フロセミド群とカルペリチド群間に年齢、性、血圧、心拍数、NYHA 分類、において有意さは認められなかった。

## 患者背景

Table 2. Change in NYHA Classification, Levels of BNP, TRX and Aldosterone before, and 4 and 24hours after the treatment.

	before	4 hours	24 hours
<i>Furosemide Group (n=8)</i>			
NYHA Classification (I/II/III/IV)	0/1/4/3	—	1/6/1/0
Plasma BNP Levels (pg/ml)	889±143	898±159	666±108**
Serum TRX Levels (ng/ml)	30.1±4.9	25.6±4.7	25.4±3.0
Serum Aldosterone Levels (pg/ml)	54.8±10.7	54.0±10.1	50.1±12.0
<i>Carperitide Group (n=11)</i>			
NYHA Classification (I/II/III/IV)	0/3/5/3	—	2/7/2/0
Plasma BNP Levels (pg/ml)	929±138	1132±168***	681±124***
Serum TRX Levels (ng/ml)	32.5±3.7	23.6±2.5**	24.6±2.1*
Serum Aldosterone Levels (pg/ml)	57.5±18.9	39.6±10.7**	37.3±8.3**

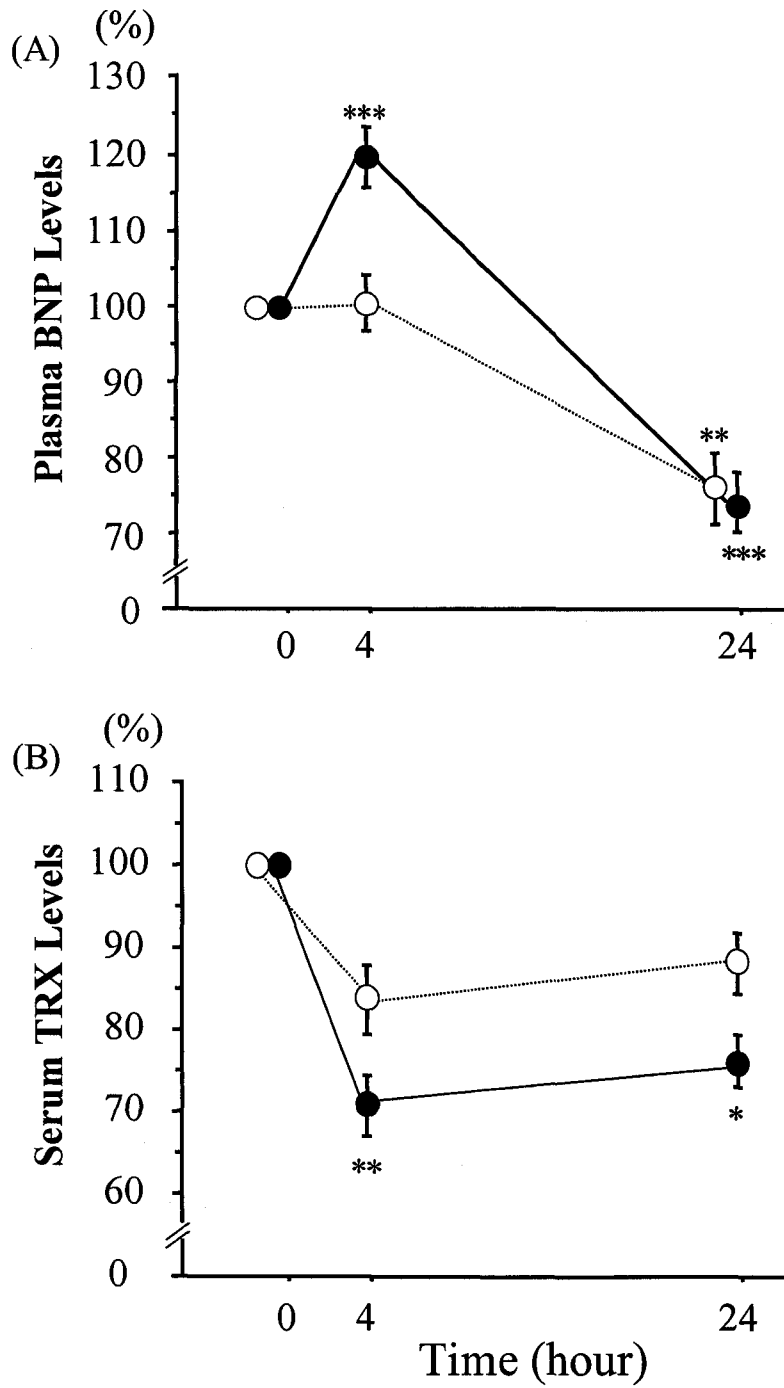
BNP, B-type natriuretic peptide; TRX, thioredoxin; NYHA, New York Heart Association; \*,p<0.05; \*\*,p<0.03; \*\*\*, p<0.01 vs. time 0. Value are mean ±SE.

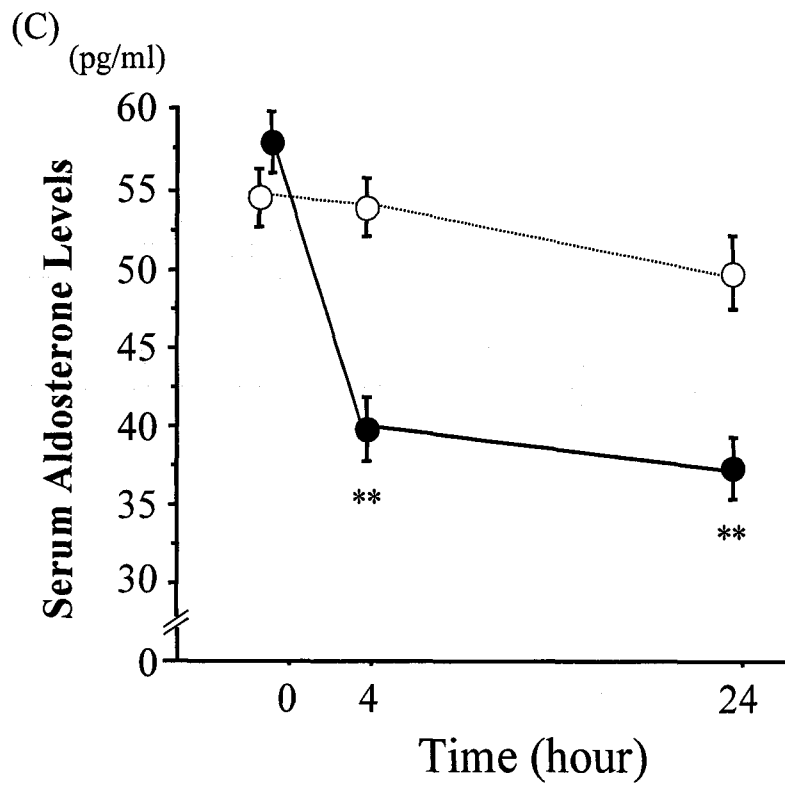
Table 2 に治療前、治療後、それぞれの NYHA 分類、血漿 BNP、血清 TRX、血清 Aldo を示した。治療前に血漿 BNP、血清 TRX、血清 Aldo レベルで両群間に有意さは認めなかった。入院時の心不全レベルは、同程度の重症度であり両群間に有意さは認めなかった。また、酸化ストレスに関してもチオレドキシシンレベルより同程度のレベルであった。

Table 2 に示したとおり、NYHA 分類において両群間のすべての患者にて心不全の改善を認めている。フロセミド、カルペリチド両方の治療がともに効果的であった。



图 2





7-1 臨床研究における治療前後の血漿 BNP 濃度の推移を図 2A に示した。

カルペリチド群における BNP 濃度は 4 時間後に一時的に 1 度上昇して 24 時間後には有意な低下を認めた。フロセミド群では、4 時間後有意な変化認めないが、24 時間後には有意に低下を認めた。

臨床研究における治療前後の血清 TRX 濃度の推移を図 2B に示した。

カルペリチド群における TRX 濃度は 4 時間後から有意に低下を認めそれが 24 時間後にも持続していた。しかしながら、フロセミド群では 4 時間後、24 時間後、伴に有意な低下を認めなかった。

臨床研究における治療前後の血清アルドステロン濃度の推移を図 2C に示した。

カルペリチド群におけるアルドステロン濃度は 4 時間後から有意に低下を認めそれが 24 時間後にも持続していた。しかしながら、フロセミド群では 4 時間後、24 時間後、伴に有意な低下を認めなかった。

## 7-2 副解析

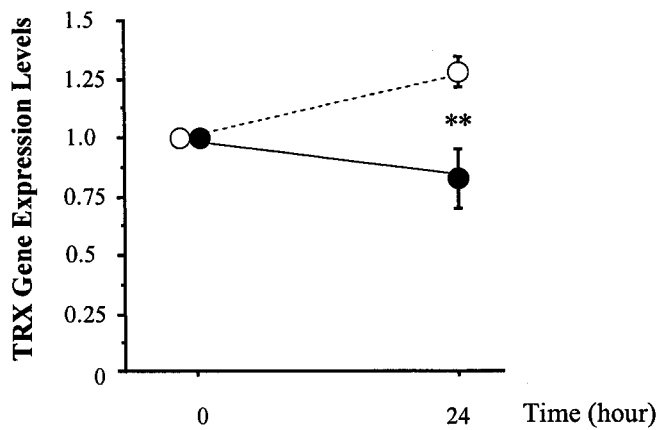
カルペリチドを投与した計 18 名を総カルペリチド群とし、またフロセミドを投与した計 15 名を総フロセミド群として治療前、治療後においてチオレドキシンの値を解析した。これにて総カルペリチド群は、24 時間後に有意なチオレドキシンの低下を認めたが(前:  $33.9 \pm 3.6$  ng/ml; 24 時間後:  $24.7 \pm 2.1$  ng/ml,  $p < 0.03$ )、フロセミド群においては、低下傾向ではあるが、有意な変化を認めなかった(前:  $32.1 \pm 3.7$  ng/ml; 24 時間後:  $24.4 \pm 2.9$  ng/ml, N. S.)。

プロトコル 2 基礎研究(培養心筋細胞を用いて)

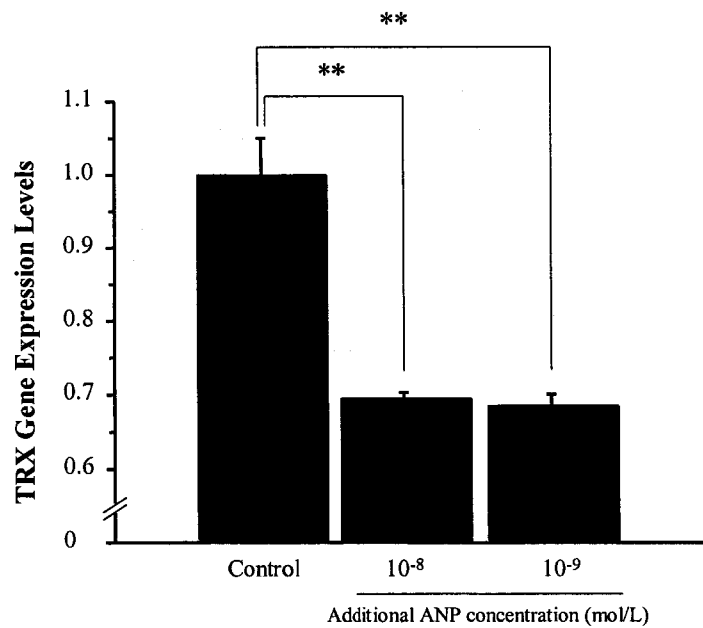
プロトコル 1 にてカルペリチド群のみに血清チオレドキシンを減少させる効果を認めたことよりプロトコル 2 においては培養心筋細胞を用いて不全心筋における外因性 ANP の直接的な抗酸化作用に関して検討した。

図 3

(A)



(B)



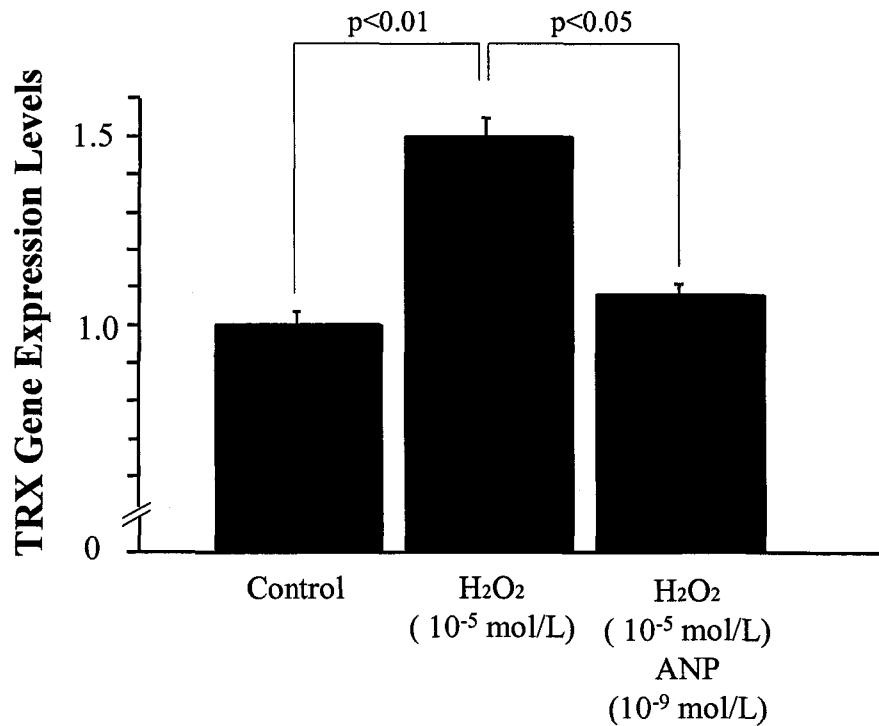
基礎研究(培養心筋細胞を用いて)における TRX の発現の推移を図 3A に示した。

コントロール群における TRX 発現量は 24 時間後上昇している。ANP 群では、24 時間後その発現を抑制し 24 時間後の TRX 発現量に有意な差を認めた。

投与 ANP の量依存的に TRX の発現の抑制度を図 3B に示した。

コントロール群における TRX 発現量を 1.0 とした場合。ANP 群では、 $10^{-8}$  mol/L ( $p < 0.03$ ) と  $10^{-9}$  mol/L ( $p < 0.03$ ) の濃度を投与した群において TRX 発現を有意に抑制した。

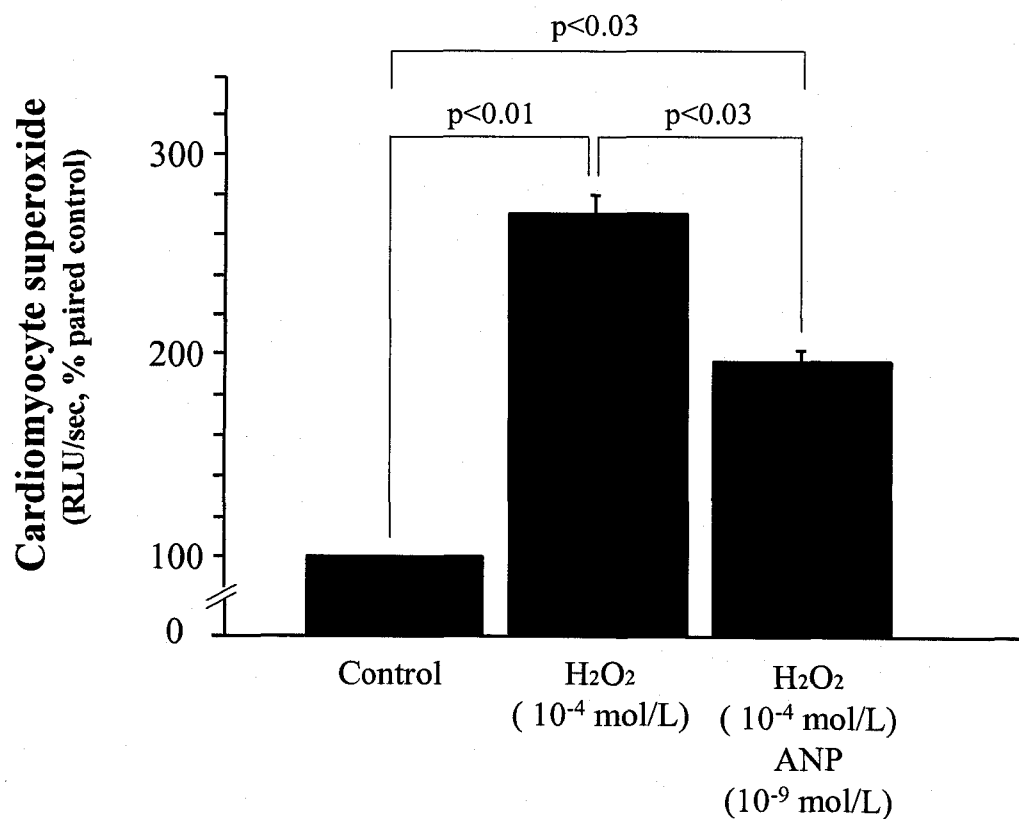
図 4



培養心筋細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与し ANP による TRX 発現の抑制を図 4 に示した。

コントロール群における TRX 発現量を 1.0 とした場合、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独投与群では TRX の発現が約 1.5 倍に上昇した。しかしながら H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与と共に ANP 10<sup>-9</sup> mol/L の濃度を投与した群においては TRX 発現を有意に抑制した。

図 5



培養心筋細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与し ANP による superoxide 発現の抑制を図 5 に示した。

コントロール群における superoxide 発現量を 100% とした場合、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独投与群では superoxide 発現が約 2.7 倍に上昇した。しかしながら H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与と共に

ANP  $10^{-9}$  mol/L の濃度を投与した群においては superoxide 発現を有意に抑制した。

## 8. 考察

### 8-1

今研究におけるプロトコール 1 の主解析において、24 時間のカルペリチド治療、フロセミド治療ともに、NYHA 分類や、血漿 BNP 濃度により評価すると、心不全治療に効果的であることが示された。しかしながら、酸化ストレスを反映するチオレドキシシン濃度を変化させる能力に関しては、カルペリチド治療とフロセミド治療の間に明らかな違いが存在した。フロセミド治療群において血清チオレドキシシンの減少度は小さいものであったが、カルペリチド治療群においては、4 時間後より速やかにチオレドキシシン濃度は減少しその効果は 24 時間持続した。この結果は、急性心不全における治療においてカルペリチド治療は、フロセミド治療に比しより効果的に酸化ストレスを抑える可能性を示唆した。不全心筋にいたる心筋の繊維化が酸化ストレスあるいは炎症の終末像であるならば、血行動態の改善だけでなく抗酸化作用を有する心不全治療であれば、より効果的な治療であると思われる。

### 8-2

本研究におけるプロトコール 1 に副解析を追加した。対象症例は 33 名であり、総フロセミド群が 4 時間後 24 時間後ともにチオレドキシシン濃度に有意な変化を認めなかったのに対し、総カルペリチド群では 24 時間後には有意なチオレドキシシン濃度の低下を認めた。これらの解析結果は、主解析の結果を後押

しする結果であった。

### 8-3

ANP の抗酸化作用の正確なメカニズムは、現在のところ判っていない。しかし、そのメカニズムの一つとして免疫反応における作用が示唆されている。ANP, BNP の受容体である GC-A 受容体は多くの炎症細胞に発現している。ANP は炎症細胞において貪食能を亢進させることで初期の ROS の産生を抑制することが報告されている。また、マクロファージにおいても ANP がその活動性を iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  などの炎症誘導物質の産生を抑制することで調節していることが報告されている。また、ANP は、樹枝状細胞に作用することによって、胸腺細胞分化と T 細胞成熟に影響を及ぼし、TH1 と TH2 の間のバランスを調整する。このような背景の中、我々は ANP が抗酸化作用有するのではないかと推測した。しかし、これまで ANP による抗酸化作用に対する研究は殆どなかった。本研究において、急性心不全を有する患者の治療において、フロセミド治療より有意に ANP 治療が酸化ストレスを減じることが明らかとなった。

### 8-4

本研究において、カルペリチド治療における血清アルドステロン濃度の変化についても明らかとなった。本研究において、血清アルドステロン濃度は、カルペリチド治療群でのみ有意に減少し、フロセミド治療群では有意な変化を認めなかった。これまでの研究において、心臓血管系においてアルドステロンが病態生理学的に重要な役割を演じていることは報告されている。アルドステロンは、高濃度塩分環境下において、間接的に NADPH オキシダーゼの還元形の活動を増加させる。そして、それはスーパーオキシドラジカルの産生を促進す



る。ラットにおける高アルドステロン/高塩分環境は NADPH オキシダーゼと関連して心筋傷害、脈管および非脈管系で炎症と線維化を引き起こす。我々はアルドステロンが高いナトリウム環境下で直接、心筋細胞肥大を誘発することを最近報告した。カルペリチドは副腎においてアルドステロンの合成を減少させることにより酸化ストレスを減らす効果を有する可能性がある。アルドステロンによる酸化ストレス促進作用および血管炎の促進作用が報告されている。心筋において同様の作用があるかは確かめられていないが今研究からも十分にその可能性が示唆される。今研究におけるカルペリチドの抗酸化作用のひとつの要因として抗アルドステロン作用の可能性が示唆されている。我々はアルドステロンがヒトの不全心において合成されることを報告し、その後、他の研究者によって確認されている。さらに、培養新生仔ラット心筋細胞を用いた研究によって、内因性及び外因性の ANP が心筋におけるアルドステロン合成を抑制することを報告した。カルペリチド治療は、心臓アルドステロン合成（腎上体によるそれと同様に）を減らす可能性がある。

#### 8-5

我々は、プロトコール 1 でカルペリチド単独療法による正確な作用を解明することはできなかった。ANP 受容体 GC-A が体の全体に存在するので、カルペリチド治療は腎臓、血管、心臓を含む多くの器官に効果的であると考えている。しかしながら、大量の内因性の ANP と BNP が不全心より産生されている環境下、カルペリチド治療量が適切に作用しているか否かがひとつの疑問であり、証明すべき点であった。そこで、プロトコール 2 において、外因の ANP は  $10^{-8}$  モル/L または  $10^{-9}$  モル/L と非常に低い濃度で心筋細胞に添加し、その作用を確認した。その量は、カルペリチド治療 ( $0.01-0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) とほぼ同量である。

その低濃度 ANP において TRX 遺伝子発現は顕著に抑制された。そして、それは不全心においてカルペリチド治療が直接、抗酸化剤作用を有することを示唆している。

#### 8-6

プロトコール 2 において、我々は TRX 遺伝子発現に加えて、最近確立した方法により ROS 産生を確認した。この結果により TRX による間接的酸化ストレスマーカーだけでなく、心筋細胞において ANP が直接、強力に ROS を抑制することを示した。しかしながら、複雑な酸化ストレス・カスケードの中で ANP の正確な作用機構は未だ知られておらず、更なる研究が必要である。

#### 8-7

我々は以前、カルペリチド治療が心不全症例において血行動態を改善することを報告した。また、本研究において、我々はカルペリチドが酸化ストレスを減らすことを示した。しかし、我々は、これらの心不全症例の長期追跡調査研究による生存または心イベントの評価を行わなかった。このことから、我々はカルペリチドの酸化防止効果による本当の意味での臨床的効果を未だ述べることはできない。しかしながら、心不全の急性期において、カルペリチドによる抗酸化療法は臨床的に長期的効果を有している可能性があるため、我々は今後、長期的な臨床研究を行う予定である。

#### 8-8

血漿 BNP レベルの時間経過の評価において、カルペリチド治療群の血漿 BNP レベルが治療 4 時間後、一過性に増加していることを示した。フロセミド治療群では、そのような変化は認められなかった。ANP と BNP がクリアランス受容体

NP-C と中性エンドペプチダーゼによって代謝をうけるので、カルペリチドの投与が内因性の BNP の代謝を阻害することに関連があるのではないかと考えている。以前、我々は、内因性の ANP 濃度が心不全症例における BNP 投与により、一過性に上昇することを報告している。しかしながら、カルペリチド投与により、不全心により産生された高濃度の内因性 BNP がどのような役割を演じるかは未だ不明である。

#### 8-9

プロトコール 1 において、カルペリチド治療群で、治療の後 4 時間より TRX レベルの有意の減少を示した。プロトコール 2 において、TRX 遺伝子発現が 24 時間後に外因の ANP によって抑制されたことを示した。我々は、本研究において、TRX のタンパク質発現系の標準時間経過を確認していない。しかしながら、TRX 遺伝子発現が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加後 10 分で増加することが報告され、さらに、酸化ストレスにより 1 時間で TRX 蛋白が放出されることが報告されていることから、ANP によって TRX 発現は速やかに抑制されることが予想される。つまり、TRX は酸化ストレスに対して急速反応を示すタンパク質として認識されている。しかし、我々は本研究において、この直接的な効果を示すことはできなかった。ANP には、TRX を低下させる他の機序があるのかもしれない。

#### 8-10

日本では、カルペリチドが急性心不全治療に用いられている。一方、ネシリチド (BNP) は通常使用できないために、カルペリチドとネシリチドの酸化防止効果を比較することはできなかった。生物学的受容体 (GC-A) が ANP と BNP で同じであることを考えれば、親和性にわずかな違いはあるものの、ネシリチドの

効果はカルペリチドと類似していることが考えられる。さらに、ANP または BNP が経口的に投与可能となれば、これらの薬は抗酸化剤として作用することが予想される。

## 9. 結語

急性心不全治療においてカルペリチド（ANP）治療は、フロセミドと同程度効果的だった。カルペリチドは、血行動態を改善する効果に加えて、抗酸化作用を有する。さらに、カルペリチドによる抗酸化作用は、不全心に直接的に作用する。カルペリチドは心保護的なまたは抗酸化剤薬剤であると言ってさしつかえないであろう。その作用は、ACE 阻害薬、アンギオテンシン受容体拮抗薬またはアルドステロン拮抗薬と類似しているといえる。

## 12. 参考文献

1. Saito Y, Nakao K, Nishimura K, Sugawara A, Okumura K, Obata K, et al. Clinical application of atrial natriuretic polypeptide in patients with congestive heart failure: beneficial effects on left ventricular function. *Circulation* 1987; **76**: 115–124.
2. Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jogasaki M, Kuroe M, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1991; **84**: 1581-1588.
3. Suwa M, Seino Y, Nomachi Y, Matsuki S, Funahashi K. Multicenter prospective investigation on efficacy and safety of carperitide for acute heart failure in the 'real world' of therapy. *Circ J* 2005; **69**: 283-290.
4. Vollmar AM. The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. *Peptides* 2005; **26**: 1086-1094.
5. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α in pericardial fluid of patients with heart failure: A potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998; **97**: 1536-1539.
6. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002; **40**: 477-484.
7. Tsutsui H. Novel pathophysiological insight and treatment strategies for heart failure. *Circ J* 2004; **68**: 1095-1103.
8. Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res* 2001; **89**: 198-200.

9. Kono Y, Nakamura K, Kimura H, Nishii N, Watanabe A, Banba K, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ J* 2006;**70**: 1001-1005
10. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 351-369.
11. Nakamura H, De Rosa S, Roederer M, Anderson MT, Dubs JG, Yodoi J, et al. Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996; **8**: 603-611.
12. Miyamoto S, Kawano H, Takazoe K, Soejima H, Sakamoto T, Hokamaki J, et al. Vitamin E improves fibrinolytic activity in patients with coronary spastic angina. *Thromb Res* 2004; **113**: 345-351.
13. Hirai N, Kawano H, Yasue H, Simomura H, Miyamoto S, Soejima H, et al. Attenuation of nitrate tolerance and oxidative stress by an angiotensin II receptor blocker in patients with coronary spastic angina. *Circulation* 2003; **108**: 1446-1450.
14. Jekell A, Hossain A, Alehagen U, Dahlstrom U, Rosen A. Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; **6**: 883-890.
15. Miwa K, Kishimoto C, Nakamura H, Makita T, Ishii K, Okuda N, et al. Serum thioredoxin and  $\alpha$ -tocopherol concentrations in patients with major risk factors. *Circ J* 2005; **69**: 291-294
16. Yasue H, Yoshimura M, Jougasaki M. Plasma levels of brain natriuretic peptide in normal subjects and patients with chronic congestive heart failure: Measurement by immunoradiometric assay (IRMA). *Horm Clin* 1993; **41**: 397-403.
17. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, et al.

- Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2001; **104**: 137-139.
18. Ito T, Yoshimura M, Nakamura S, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, et al. Inhibitory effect of natriuretic peptides on aldosterone synthase gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2003; **107**: 807-810.
  19. Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Shono M, Suzuki S, et al. Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium. *Endocrinology* 2006; **147**: 1314-1321.
  20. Coronella-Wood J, Terrand J, Sun H, Chen QM. c-Fos phosphorylation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prevents proteasomal degradation of c-Fos in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 33567-33574.
  21. Swift LM, Sarvazyan N. Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**: 982-990.
  22. Mattana J, Singhal PC. Effects of atrial natriuretic peptide and cGMP on uptake of IgG complexes by macrophages. *Am J Physiol* 1993; **265**: C92-C98.
  23. Kiemer AK, Lehner MD, Hartung T, Vollmar AM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 2002; **143**: 846-852.
  24. Kiemer AK, Vollmar AM. Autocrine regulation of inducible nitric oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13444-13451.
  25. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 984-993.
  26. Morita R, Ukyo N, Furuya M, Uchiyama T, Hori T. Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a Th2-promoting phenotype through its



- receptor guanylyl cyclase-coupled receptor A. *J Immunol* 2003; **170**: 5869-5875.
27. Lombès M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. Prerequisite for cardiac aldosterone action mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 1995; **92**: 175–182.
28. Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1 $\beta$ . *Eur J Pharmacol* 1995; **290**: 69–73.
29. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2002; **105**: 2212-2216.
30. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: Role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002; **161**: 1773–1781.
31. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T, Ogawa H, Kugiyama K, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001; **103**: 72-77.
32. Wasywich CA, Webster MW, Richards AM, Stewart RAH. Coronary sinus and ascending aortic levels of aldosterone, angiotensin II, and B-type natriuretic peptide in patients with aortic stenosis and in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2006; **97**: 1068-1072.
33. Laskowski A, Woodman OL, Cao AH, Drummond GR, Marshall T, Kaye DM, et al. Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2006; **72**:112-123.
34. Yagorova S, Liu A, Sahaf B, Lou MF. Human lens thioredoxin: Molecular cloning and functional characterization. *IOVS* 2003; **44**:3263-3271

35. Kondo N, Ishii Y, Kwon YW, Tanito M, Horita H, Nishinaka Y, et al.  
Redox-sensing of human thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops. *J Immunol* 2004 ; **172**: 442–448.
36. Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, et al.  
Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9395-9401.
37. Cataliotti A, Schirger JA, Martin FL, Chen HH, McKie PM, Boerrigter G, et al.  
Oral human brain natriuretic peptide activates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate and decreases mean arterial pressure. *Circulation* 2005; **112**:836-840.
38. Kenny AJ, Stephenson SL. Role of endopeptidase-24.11 in the inactivator of atrial natriuretic peptide. *FEBS Lett.* 1988; **232**: 1-8.
39. Berg JA, Hayashi M, Fujii Y, Katz AI. Renal metabolism of atrial natriuretic peptide in the rat. *AM J Physiol.* 1988; **255**: F466-F473.
40. Berg JA, Hayashi M, Fujii Y, Katz AI. Renal metabolism of atrial natriuretic peptide in the rat. *AM J Physiol.* 1988; **255**: F466-F473.
41. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA. *J Biol Chem.* 1988; **263**: 9395-9401.
42. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EG, MacMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; **283**: H1802–H1810.
43. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J

- The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med.* 1999; **341**: 709–717.
44. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991; **83**: 1849–1865.
45. Throsby M, Yang Z, Lee D, Huang W, Copolov DL, Lim AT. In vitro evidence for atrial natriuretic factor-(5–28) production by macrophages of adult rat thymi. *Endocrinology.* 2002; **132**: 2184–2190.