

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名:食塩/アルドステロンによる心臓の炎症と線維化促進の分子機序
-ASK1を介する酸化ストレス亢進と組織レニン・アンジオテンシン系活性化の重要性-
(The molecular mechanism of aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis;
critical role of the enhancement of cardiac oxidative stress and the activation of cardiac
renin-angiotensin system, via apoptois signal-regulating kinase 1 (ASK1))

著 者 名 : 中 村 太 志
Taishi Nakamura

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻生体機能薬理学 光山勝慶教
授

審査委員名 : 腎臓内科学担当教授 富 田 公 夫
代謝内科学担当教授 荒 木 栄 一
分子遺伝学担当教授 尾 池 雄 一
病態生化学担当教授 山 縣 和 也

2010年3月

目次

1.	要旨	3-4
2.	参考論文	5-6
3.	謝辞	7
4.	略語一覧	8-9
5.	研究の背景と目的	10-16
	5-1 アルドステロンについて	
	5-1-1 MRの古典的作用と非古典的作用	
	5-1-2 ゲノム作用と非ゲノム作用	
	5-1-3 アルドステロンと心血管疾患	
	5-1-4 アルドステロンと酸化ストレス	
	(1) 酸化ストレス産生系	
	(2) NADPH オキシダーゼ活性調節機構	
	5-1-5 アルドステロンと局所レニン・アンジオテンシン系	
	5-2 Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)について	
	5-2-1 ASK1 活性調節機構	
	5-2-2 MAP キナーゼカスケード	
	5-2-3 心血管疾患における酸化ストレスと ASK1	
	5-3 研究目的	
6.	実験方法	17-22
	6-1 実験動物と研究プロトコール	
	6-2 アルドステロン持続注入	
	6-3 血圧測定、代謝ケージ	
	6-4 経胸壁心エコー	
	6-5 尿中アルブミン排泄量測定	
	6-6 免疫組織化学検査	
	6-7 リアルタイム RT-PCR	
	6-7-1 RNA 抽出と逆転写反応	
	6-7-2 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析	

6-8	心臓スーパーオキシド測定	
6-8-1	DHE 染色による <i>in situ</i> スーパーオキシド測定	
6-8-2	Lucigenin 化学蛍光法を用いた <i>ex vivo</i> スーパーオキシド測定(NADPH オキシダーゼ活性)	
6-9	ウエスタンブロット分析	
6-9-1	心臓蛋白抽出と蛋白量調整	
6-9-2	SDS-PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)	
6-9-3	ウエスタンブロットティング	
6-10	統計学的検査	
7.	実験結果	23-27
7-1	アルドステロンの血圧への影響	
7-2	アルドステロンの電解質、腎障害への影響	
7-3	アルドステロンによる心臓 ASK1 活性化と MAPK への影響	
7-4	アルドステロンによる心肥大と心臓での炎症への影響	
7-5	アルドステロンによる心臓繊維化作用への影響	
7-6	アルドステロンによるスーパーオキシド産生と NADPH オキシダーゼ活性への影響	
7-7	アルドステロンの NADPH オキシダーゼサブユニットへの影響	
7-8	アルドステロンの局所 RA 系への影響	
8.	考察	28-31
9.	結語	32
10.	表およびその説明 (表 10-1, -2)	33-34
11.	図およびその説明 (図 11-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8)	35-42
12.	参考文献	43-49

1. 要旨

【目的、方法】アルドステロンの非上皮組織における多面的な作用が注目されているが、直接的な心血管障害の分子機序は不明である。今回、Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)のひとつである Apoptosis-Signal Regulating Kinase 1 (ASK1)の、アルドステロン誘導性心血管障害における役割を検討した。野生型マウスと ASK1 ノックアウトマウス(ASK1^{-/-})に 1%食塩水を飲水投与し、それぞれコントロール群、アルドステロン投与群、アルドステロン投与+塩化カリウム補充群の3群に分けた。浸透圧ポンプを用いてアルドステロンを4週間持続注入後、心血管および腎障害、炎症、酸化ストレス、およびレニン-アンジオテンシン(RA)系への影響を比較検討した。

【結果】アルドステロンの投与により血圧上昇やアルブミン尿排泄の増加、血中カリウム値の低下を認めたが、野生型マウスと ASK1^{-/-}間に有意差はなく、アルドステロンによる高血圧、腎障害、低カリウム血症に ASK1 は関与しなかった。また、ASK1 はアルドステロンによる心肥大にも影響を示さなかった。一方、野生型マウスでは、アルドステロン投与により心臓 ASK1 のリン酸化が亢進し、その下流分子 p38 も活性化された。さらに、アルドステロン投与により冠動脈周囲や心筋間質でのマクロファージ浸潤、線維化の著明な増強がみられ、MCP-1 や TGF- β 1、1 型コラーゲンの mRNA 発現の増加を認めたが、アルドステロンによるこれらの障害は野生型マウスと比べ ASK1^{-/-}で著明に減少した。また、カリウム補充により低カリウム血症を補正することでもこれらの障害は一部改善したが、アルドステロンによる心血管障害はやはり同様に ASK1^{-/-}で減弱した。以上から、血圧や腎障害、血中カリウム値とは独立し、ASK1 は食塩/アルドステロンによる心血管での炎症や繊維化の促進機序に直接的に関与していることが示された。次に、アルドステロンによる心血管障害と関連の深い NADPH オキシダーゼや組織 RA 系に注目し、ASK1 との関連性を検討した。野生型マウスでは、アルドステロン投与により心臓 NADPH オキシダーゼ活性化を介するスーパーオキシドの著明な増加と、心臓の ACE や AT1 受容体の mRNA および蛋白の著明な発現増加を認めたが、これらの増加はすべて ASK1^{-/-}で有意に減少した。また、野生型マウスでは、アルドステロン投与により NADPH オキシダーゼサブユニット Nox2 や Nox4 蛋白の発現増加がみられたが、ASK1^{-/-}において Nox2 の発現は著明に減少した。すなわち、食塩/アルドステロンによる心臓での酸化ストレス亢進と局所 RA 系活性化にも ASK1 の強い関与が示された。

【結論】(1)食塩/アルドステロンによる心筋間質および冠動脈周囲における炎症、線維化の機序に ASK1 の活性化が関与している。(2)ASK1 は、Nox2 を介した NADPH オキシダーゼ由来のスーパーオキシド産生増加と、ACE や AT1 受容体の発現増加による局所 RA 系活性化を介し、食塩/アルドステロンによる心血管障害に重要な役割を演じている。

Abstract of the Thesis

Aim / Method: The molecular mechanism underlying aldosterone-mediated cardiac injury is unclear. We examined the role of ASK1, a MAPKKK, in aldosterone (ALD)/salt-induced cardiac injury *in vivo*. ALD was infused into wild-type and ASK1 deficient (ASK1^{-/-}) mice for 4 weeks. Both strains of mice maintained on 1% NaCl drinking water were divided into 3 groups, including saline infusion (control), ALD infusion, or ALD infusion plus 0.3% KCl supplementation, to compare the *in vivo* effects of ALD/salt treatment.

Results: ALD/salt treatment activated cardiac ASK1, p38, and ERK1/2 in wild-type mice, while did not apparently activate cardiac p38 in ASK1^{-/-} mice. ALD/salt treatment in wild-type mice significantly increased blood pressure and albuminuria, and decreased plasma potassium levels. These effects of ALD/salt were not affected by ASK1 deficiency. Thus, ASK1 seems to play a minor role in ALD-induced hypertension and renal injury. ASK1 deficiency also failed to affect ALD-induced cardiac hypertrophy. However, ASK1 deficiency significantly ameliorated ALD-induced cardiac injury, such as the enhancement of cardiac macrophage infiltration, MCP-1 mRNA upregulation, cardiac interstitial and perivascular fibrosis, and mRNA upregulations of TGF- β 1 and collagen type 1. Potassium supplementation little affected these amelioration by ASK1 deficiency of ALD-induced cardiac injury. Thus, ASK1 participates in ALD/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis. Moreover, cardiac NADPH oxidase-mediated superoxide generation caused by ALD infusion was markedly lessened by ASK1 deficiency, ameliorating ALD-induced cardiac Nox2 upregulation. Furthermore, ALD/salt treatment significantly upregulated cardiac expressions of the ACE and AT1 receptor in wild-type mice, while these upregulations were abolished by ASK1 deficiency. Thus, ALD/salt-induced cardiac injury is partially attributed to the cross-talk of ASK1 between ALD and cardiac renin-angiotensin system (RAS). ***Conclusion:*** ASK1 is implicated in ALD/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis, through the enhancement of cardiac NADPH oxidase-mediated ROS and the activation of cardiac RAS.

2. 参考論文

① 関連論文

3 編 3 冊

- ①. Nakamura T, Kataoka K, Fukuda M, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Ichijo H, Ogawa H and Kim-Mitsuyama S. Critical Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Aldosterone/Salt-Induced Cardiac Inflammation and Fibrosis. *Hypertension*. 2009; 54(3): 544-551.
2. Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H and Kim-Mitsuyama S. Beneficial Effects of Pioglitazone on Hypertensive Cardiovascular Injury Are Enhanced by Combination With Candesartan. *Hypertension*. 2008; 51(2): 296-301.
3. Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H and Kim-Mitsuyama S. Pioglitazone Exerts Protective Effects Against Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, Independently of Blood Pressure. *Stroke*. 2007; 38(11): 3016-3022.

② その他の論文

5 編 5 冊

1. Fukuda M, Nakamura T, Kataoka K, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Potentiation by candesartan of protective effects of pioglitazone against type 2 diabetic cardiovascular and renal complications in obese mice. *J. Hypertens*. 2010; 28(2): 340-52
2. Dong YF, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Nako H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010; 53(1): 180-91
3. Yamamoto E, Kataoka K, Dong YF, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi

Y, Matsuba S, Nako H, Nakagata N, Kaneko T, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice.

Hypertension. 2009; 54(3): 633-8.

4. Yamamoto E, Tamamaki N, Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Dong YF, Fukuda M, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. *Stroke*. 2008; 39(11): 3049-56.
5. Yamashita T, Yamamoto E, Kataoka K, Nakamura T, Matsuba S, Tokutomi Y, Dong YF, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Apoptosis signal-regulating kinase-1 is involved in vascular endothelial and cardiac remodeling caused by nitric oxide deficiency. *Hypertension*. 2007; 50(3): 519-24.

3. 謝辞

本研究に際し、直接御指導、御支援をいただきました熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻生体機能薬理学分野 光山勝慶教授に深甚なる謝意を申し上げます。また、本研究において全面的に御支援下さいました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分野 小川久雄教授、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学分野 一條秀憲教授をはじめ多くの諸先生方に深謝申し上げます。

4. 略語一覽

MR:	mineralocorticoid receptor
CYP11B2:	cytochrome p450, family 11, subfamily B, polypeptide 2
11 β -HSD2:	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2
NYHA:	New York Heart Association
PIIINP:	procollagen type III amino-terminal peptide
NO:	nitric oxide
PAI-1:	plasminogen activator inhibitor-1
NF- κ B:	nuclear factor- κ B
AP-1:	activator protein 1
NADPH:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
TBARS:	thiobarbituric acid-reactive substances
mRNA:	messenger ribonucleic acid
Nox:	NADPH oxidase
gp91 ^{phox} :	granulocyte protein 91 phagocyte oxidase
Nox1:	Nox organizer 1
AngII:	angiotensin II
ACE:	angiotensin converting enzyme
RA:	renin-angiotensin
AT1:	angiotensin type 1 receptor
ASK1:	apoptosis signal-regulating kinase 1
MAPK:	mitogen activated protein kinase
MAPKK:	mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK:	mitogen activated protein kinase kinase kinase
JNK:	c-jun N-terminal kinase
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
IL-1:	interleukin-1
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction

Ct:	threshold cycle
IVST:	intraventricular septum wall thickning
PWT:	posterior wall thickning
LVEDd:	left ventricular end diastolic diameter
LVESd:	left ventricular end systolic diameter
FS:	fractional shortening
ELISA:	enzyme linked immunosorbent assay
PBS:	phosphate-buffered saline
DAB:	3,3'-diaminobenzidine
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
BNP:	natriuretic peptide precursor type B
Colla1:	procollagen type 1
MCP-1:	monocyte chemoattractant protein-1
TGF- β 1:	transforming growth factor- β 1
OCT:	optimal cutting temperature
DHE:	dihydroethidium
SDS-PAGE:	sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF:	polyvinylidene difluoride
TBS:	tris buffered saline
BSA:	bovine serum albumin
HRP:	horseradish peroxidase
ECL:	enhanced chemiluminescence method
BUN:	blood urea nitrogen
NHE1:	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1

5. 研究の背景と目的

5-1 アルドステロンについて

5-1-1 MR の古典的作用と非古典的作用

アルドステロンはアンジオテンシン II、カリウム、副腎皮質刺激ホルモンなどの刺激により、主に副腎皮質球状帯で合成されるステロイドホルモンであり、生体内で体液、電解質の恒常性を維持するために重要な役割を果たしている。ミネラルコルチコイドとして作用するアルドステロンはレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の最終シグナルであり、腎および大腸の上皮細胞に作用してNaの再吸収とKの排泄を制御している。アルドステロンによる臓器障害は、これまで腎遠位尿細管においてミネラルコルチコイド受容体(MR)を介したNaの再吸収亢進による高血圧が主因と考えられており、このような作用は古典的作用とよばれている。しかし近年、アルドステロンは、心臓、血管、脳、脂肪組織などの非上皮組織に存在するMRを介し直接的に臓器障害を惹起することがわかってきており、このような血圧を介さない作用が注目を集めている。

5-1-2 ゲノム作用と非ゲノム作用

アルドステロンの作用は、細胞質内に存在するMRとの結合・遺伝子の転写活性を介するゲノム作用と、比較的迅速に認められる遺伝子の転写活性を介さない非ゲノム作用に区別される。

アルドステロンなどのステロイドホルモンは細胞質内に存在する受容体との結合、共役因子のリクルート、核内への移行を経て転写因子としての役割を果たすが、これら一連のゲノム作用の課程は一定の時間(約30分以上)を要する。

一方、ステロイドにはゲノム作用では説明できない数分以内の早い時間経過で認められる現象があり、転写や蛋白合成を阻害する薬物に影響を受けないことから遺伝子の転写を介しないとされる。この迅速なステロイドの作用は非ゲノム作用とよばれる。非ゲノム作用の細胞内シグナルは細胞や組織によって異なっているとされ、当初、MR阻害薬のスピロノラクトンでブロックされず、グルココルチコイドでは認められないことからMRを介さない現象と考えられ¹、膜に存在する未知のアルドステロン特異的受容体を介した現象であると提唱された。しかし、その後アルドステロンによる非ゲノム作用の一部がMR阻害薬に影響を受けるという *in vitro* の成績が報告されるようになっており、未知の膜受容体と古

典型的な MR を介した非ゲノム作用をまとめて機能的新規受容体として提唱されるむきもある。

5-1-3 アルドステロンと心血管疾患

MR は、腎遠位尿細管のみならず心血管組織(心筋細胞、繊維芽細胞、内皮細胞)などの非上皮組織にも広く分布しており、またアルドステロン合成酵素(CYP11B2)の存在²や、アルドステロンが MR に結合するために必要な 11 β 水酸化ステロイド脱水素酵素タイプ 2(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase2; 11 β -HSD2)の存在が心血管を構成する細胞に示されてから³、アルドステロンが直接心血管系に作用することが明らかになってきた。とくに、RALES(Randomized Aldactone Evaluation Study)⁴ 研究以降、アルドステロンの心血管病における役割は注目されている。

Pittsらにより報告された RALES 試験は、NYHAⅢからⅣ度、左室駆出率 35%以下の重症心不全症例を対象とし、従来の標準治療にアルドステロン受容体拮抗薬であるスピロノラクトンを併用することで、死亡率が 30%減少したと報告している。スピロノラクトンによる死亡率の減少は、進行性心不全による突然死の抑制によるものであり、その後の報告で、RALES 試験で心筋繊維化の指標とされた PⅢ NP(procollagen typeⅢ amino-terminal peptide)濃度が上昇している症例が予後不良であること、さらに PⅢ NP が上昇している症例でスピロノラクトンの効果が顕著に見られたことがわかった⁵。このことは、スピロノラクトンの心不全予後改善効果に、アルドステロンを介する心筋繊維化、心室リモデリングの抑制が関与していることを示唆している。また、左室機能不全および心不全を合併した急性心筋梗塞患者にエプレレノンを投与した効果を二重盲検プラセボ対照試験で検討した研究 EPHEBUS(Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study)試験でも、エプレレノン群で全死亡、心臓死が有意に低下した⁶。

また、基礎研究においても、Weber らがラットにおいて血圧とは独立したアルドステロンの心筋繊維化作用を報告⁷して以来、アルドステロンが心筋の繊維化とリモデリングを促進することが明らかになっており、アルドステロンは心臓においてコラーゲン産生を亢進し、繊維芽細胞の増殖を促すこと、さらに血管内皮細胞の NO(nitric oxide)を減少させ、過酸化脂質および血液凝固を促進する PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)発現を促進し、血栓性イベントを惹起することが知られている(アルドステロン誘導性血管炎:

aldosterone-induced vasculopathy)。心筋繊維化の機序として、①直接効果としての心筋繊維化、および②アルドステロン誘導性血管炎によって組織の微小梗塞が生じるため、と考えられているが詳細は未だ不明である。ヒトの不全心では、MR 発現が亢進しており、アルドステロンの取込みが上昇していると報告されている⁸。これらの知見から、不全心はアルドステロンの標的臓器であると考えられる。Rochaらはラット高血圧モデルを用いた検討から、アルドステロンと食塩の負荷が血圧や心肥大の程度と独立して心筋の繊維化作用を有することを明らかにした⁹。一方、アルドステロンの作用は高食塩下で増強され、低食塩では血管周囲繊維化などの組織変化は減弱することも知られている。また、以前より血漿アルドステロン濃度が軽度上昇群で心血管障害が多いことが報告されている。アルドステロンによる心血管障害は独立した作用にも関わらず、その作用は食塩環境によって異なり、アルドステロンと食塩との適切ではないバランスがある場合、たとえ血漿アルドステロン濃度が正常範囲であっても臓器障害が認められる可能性が強く示唆されている¹⁰。

5-1-4 アルドステロンと酸化ストレス

(1) 酸化ストレス産生系

酸化ストレスは、直接細胞を障害するばかりではなく、細胞内シグナル伝達系に影響を与え、細胞の分化や増殖、アポトーシスなどに関与している。レドックスシグナリングの伝達を担う活性酸素として、スーパーオキシド(O_2^-)と過酸化水素(H_2O_2)が知られている。アルドステロン誘導性血管炎では、血管壁に出現してくる接着因子や炎症性メディエーターなどの遺伝子発現が炎症に先行して認められ、その大部分は酸化ストレスで誘導されるレドックス感受性遺伝子群(NF- κ BやAP-1など)であるとされ、アルドステロンによる炎症誘導の機序として、MR 活性化により惹起される酸化ストレスの重要性が注目されている。また、ラットに対してアルドステロンと食塩を数週間負荷すると、高血圧を伴った心血管、腎障害が観察されるが^{11,12}、これら組織内のNADPHオキシダーゼの各種膜コンポーネントのmRNA発現は増加し、過酸化脂質(TBARS; thiobarbituric acid-reactive substances)などの酸化ストレスのマーカーも増加することが報告されている^{13,14}。一方、MR拮抗薬や抗酸化薬は、アルドステロンによる酸化ストレスを減少させ、臓器障害を著明に抑制する。このことから、アルドステロンによる臓器障害はMRを介したNADPHオキシダーゼ、酸化ストレスの活性化によって生じていると考えられている^{12,13,14}。

(2) NADPH オキシダーゼ活性調節機構

活性酸素を生成する酵素として、膜タンパク質である NADPH オキシダーゼ(Nox)が知られている。以前より、好中球やマクロファージなどの食細胞 NADPH オキシダーゼの活性中心は、gp91^{phox} という膜タンパク質に存在することが知られていた。しかし、最近 gp91^{phox} のホモログが見出され、Nox(NADPH oxidase)ファミリーとよばれており、多様な発現パターンを示すことがわかってきている^{15, 16, 17}。ヒトには 5 種の Nox が存在するが、その中の Nox1 から Nox4 は p22^{phox} と恒常的に会合している¹⁶。p22^{phox} は、2 回膜貫通型のタンパク質であり、細胞質側にある C 末端側は Nox の活性化を担う可溶性タンパク質(p47^{phox} および Noxo1)が結合するための足場(プロリンリッチ領域)として働いている。Nox の活性調節機構は未だ不明な点が多く、アルドステロンによる NADPH オキシダーゼの活性化機序も組織によって多様な報告があり、その詳細な機序は不明である。

5-1-5 アルドステロンと局所レニン-アンジオテンシン系

Ang II は多面的な作用を介し心血管障害の発症や進展に寄与する代表的な心血管リスクホルモンである。最近、Ang II やアルドステロンの相互作用が注目されている。すなわち、アルドステロン自体が ACE の発現を増加させ、さらに Ang II の作用を AT1 受容体以降のレベルで増強することが心血管で示されている^{18, 19, 20}。全身性 RA 系が必ずしも亢進していなくても、局所 RA 系の活性化が心血管障害の進展に重要な役割を果たしており、この場合 ACE 活性が Ang II 産生の律速因子と考えられている。高アルドステロン血症で循環血漿量が増加し、全身性 RA 系が抑制された状態でも、アルドステロンによる心血管局所での ACE 活性化による Ang II 産生の増加や AT1 受容体および受容体以降での Ang II の作用増強が生じ、局所での Ang II とアルドステロン間に悪循環(vicious cycle)を形成し、心血管障害が進展していく機序が想定されている。アルドステロンによる心血管障害機序の少なくとも一部には、局所 RA 系活性化による vicious cycle 形成の関与が示唆されているが、その詳細な機序は不明である。

5-2 Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)について

5-2-1 ASK1 の活性調節機構

ASK1 は、様々な物理・化学ストレスによって誘導される細胞死や細胞分化などの細胞内シグナル伝達を仲介する分子として 1997 年に明らかにされた

MAP(Mitogen-activated protein)キナーゼキナーゼキナーゼであり、細胞外ストレス刺激により ASK1 から p38/JNK という下流のストレス感受性 MAP キナーゼへシグナルを伝達することが明らかになっている²¹。また、ASK1は細胞内で2000kDaにも達する巨大なシグナルソーム(細胞内情報伝達複合体)を形成し、厳密な制御を受けていると考えられており、その構成因子には、ASK1 活性化阻害因子であるチオレドキシニンなど酸化ストレスセンサー分子や、ASK1 活性化因子であるアダプター分子 TRAF2 および TRAF6 などのユビキチン化関連分子が含まれていることがわかっている²²。通常、ASK1 はチオレドキシニンと複合体を形成することで、不活性化状態にあるが、活性酸素によりチオレドキシニンが解離し、TRAF との複合体形成が促進されると、ASK1 は強く活性化される。また、ASK1 の構造変化が ASK1 の活性化に重要であることもわかってきている²³。しかし、チオレドキシニンや TRAF がどのように ASK1 に作用し機能しているのか、活性酸素などのストレスを感知する機構についてはまだ解明されていない部分が多い。ASK ファミリー分子としては他に、ASK1 と非常に高い相同性をもつ ASK2 や ASK3 が同定されている。ASK2 は ASK1 同様に広範な組織に分布し、細胞内で ASK1 と複合体を形成することで安定化すること²⁴、ASK3 は腎臓に高発現し、浸透圧の恒常維持など独自の機能をもっている可能性が考えられており、機能解析が今も進んでいる。

5-2-2 MAP キナーゼカスケード

MAP キナーゼ(MAPK)は酵母からヒトまで進化上高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、哺乳類では少なくとも、ERK(古典的 MAPK)、JNK、p38、ERK5 の 4 つのサブファミリーが存在する。MAPK カスケードは、細胞内シグナル伝達機構の中でも特に重要な役割を果たしており、細胞の増殖、分化、細胞運動、細胞死といった現象に深く関わっていることが明らかになっている²⁵⁻²⁸。いずれの MAPK ファミリーもスレオニン残基およびチロシン残基がリン酸化されることで活性化する。MAPK のスレオニン残基とチロシン残基の両残基をリン酸化して活性化する分子が MAPK キナーゼ(MAPKK)であり、MAPK は自身のセリン残基あるいはスレオニン残基が MAPKK キナーゼ(MAPKKK)でリン酸化されることで活性化される。このような、MAPKKK⇒MAPKK⇒MAPK と連続したリン酸化を通じて上流から下流へとシグナルを伝える反応を MAPK カスケードと呼ぶ。

JNK は、紫外線照射、熱ショック、高浸透圧、タンパク質合成阻害などのストレス刺激、

また TNF- α 、IL-1 などの炎症性サイトカインによって活性化し、ストレス応答、細胞の生存またはアポトーシス、サイトカインの誘導などに重要な役割を果たす一方、分化や形態形成にも関与することが知られている。p38 も、JNK 同様に様々なストレス刺激、炎症性サイトカインによって活性化され、ストレス応答、細胞分化、さらには細胞周期の制御にも関与することが知られている。ほか、最近ではインスリン抵抗性²⁹や記憶³⁰、老化³¹などと MAPK の関係が注目されている。

また、アポトーシス誘導リン酸化酵素として認識された ASK1 は、JNK や p38 といった MAPK の上流に存在する MAPKKK であるが、最近ではストレスに応じて細胞成長、生存、分化や炎症反応を含めた様々な細胞機能に関与することが報告されており、これまでの我々の研究でも Ang II によって引き起こされる酸化ストレスや様々な病態に深く関与していることが示されている³²⁻³⁵。

5-2-3 心血管疾患における酸化ストレスと ASK1

以前より我々は、ASK1 が Ang II によって引き起こされる酸化ストレスなどの一連のシグナル伝達に重要な役割を演じていること、アポトーシスのみならず炎症や細胞増殖など様々な細胞応答に関与し、心血管病の発症に深く関わっていることを報告してきた。例えば、マウスのアンジオテンシン II 持続注入による高血圧・心肥大・心臓リモデリングモデル³²、ラット頸動脈のバルーン傷害モデル³³、マウスの下肢虚血モデル³⁴、あるいはダール食塩感受性高血圧ラットの高血圧性心拡張不全モデル³⁵による検討で、Ang II による心肥大や心血管リモデリング、血管新生、血管内皮機能不全に ASK1 が関与していることを以前に報告している。しかしながら、酸化ストレスによる ASK1 活性化の機序や、ASK1 の下流である JNK や p38 それぞれの心血管病における詳細な役割など依然不明な点は多い。また、レニン-アンジオテンシン系の最終ホルモンであるアルドステロンと ASK1 との関係についてはこれまでに報告がなく、不明である。

5-3 研究目的

脳血管や心臓、腎臓などの非上皮組織におけるアルドステロンの多面的な作用が注目されている。心臓では心筋細胞や繊維芽細胞、内皮細胞に MR の存在が示されており、アルドステロンが心血管の独立したリスクホルモンであることがわかってきているが、その詳細なメカニズムは不明である。また、我々はこれまでに、Ang II によって惹き起こされる様々な病態に ASK1 が深く関与していることを報告してきたが、レニン-アンジオテンシン系の最終ホルモンであるアルドステロンと ASK1 との関係を示す *in vivo* での報告はこれまでになく、不明である。今回、食塩/アルドステロンの心血管障害における ASK1 の役割を ASK1 ノックアウトマウスを用いて検討し、その分子機序について検討した。

6. 実験方法

6-1 実験動物と研究プロトコール

雄性ASK1ノックアウトマウス(ASK1^{-/-})^{21, 36}と野生型マウス(C57BL/6)(日本チャールズ・リバー)を今回の実験で使用した。ASK1^{-/-}は、東京大学医学薬学研究科 一條秀憲教授から頂いたものを当教室で繁殖させた。また、同マウスの遺伝的な変異を減らすため10世代以上C57BL/6と戻し交配させたものを使用した。尚、動物実験は熊本大学動物実験委員会の定める動物実験等に関するガイドラインに従って行った。

アルドステロンによる心血管障害におけるASK1の役割を検討するため、13週齢のASK1^{-/-}と同週齢にマッチングさせた野生型マウスに対し、1%食塩水を飲水³⁷⁻³⁹させると同時に、浸透圧ポンプを用いてアルドステロンを4週間持続注入させ、アルドステロンによる臓器障害への影響を比較した⁴⁰⁻⁴²。グループは、①野生型マウス、生理食塩水投与(対照)群、②野生型マウス、アルドステロン投与群、③野生型マウス、アルドステロン投与+0.3%塩化カリウム補充群、④ASK1^{-/-}、生理食塩水投与(対照)群、⑤ASK1^{-/-}、アルドステロン投与群、⑥ASK1^{-/-}、アルドステロン投与+0.3%塩化カリウム補充群、の計6群に分け評価した。アルドステロン投与4週間後、エーテル吸入麻酔し右心系より経心臓的にヘパリン採血を行い、4°C、3000回転、10分で遠心後に血漿を凍結保存した。また、頸動脈や胸部大動脈、心臓を速やかに摘出し、心臓は左心室のみ分離し病理組織(凍結切片、パラフィン切片)、リアルタイムRT-PCR、ウェスタンブロッティングにて評価を行った。

6-2 アルドステロン持続注入

10%ネンブタールをマウス腹腔内に投与し鎮静後、5%エタノールに溶解したアルドステロン(SIGMA)を浸透圧ミニポンプ(DURECT Co.; alzet model 1002)を用いて皮下に埋め込み、0.2mg/kg/dayで持続注入させた⁴⁰⁻⁴¹。また、浸透圧ポンプは2週間後に新しいものへ交換し、計4週間アルドステロンを持続投与させた。

6-3 血圧測定、代謝ケージ

実験期間中、プレチスモグラフィとカフを用いて血圧や心拍数を毎週tail cuff法により非観血的に測定した。また、毎週マウスを1ケージ1匹ずつマウス用代謝ケージ(LSG

Co.; TECNIPLAST 3600M021)に入れ、飲水量や尿量(24 時間蓄尿)などの代謝動態を評価した。

6-4 経胸壁心エコー

経胸壁心エコー検査は、12MHz の心エコー用プローブのついた心エコーシステム (PHILIPS SONOS-4500)を用いた。マウスを、2%キシラジン (5mg/kg)とケタミン (50mg/kg)の腹腔内注射で浅麻酔し、剃毛後に仰臥位にて検査した。左室乳頭筋レベルの M モード法で、拡張末期での左室心室中隔厚 (IVST)、後壁厚 (PWT)、左室拡張末期径 (LVEDd)、左室収縮末期径 (LVESd)、短縮率 (FS) を測定し、 $[(LVEDd+IVST+PWT)^3 - LVEDd^3] \times 1.055$ (mg/mm³)を用い LV mass を推算した⁴³。

6-5 尿中アルブミン排泄量測定

尿中アルブミン量は、市販のアルブミン測定キット AssayMax Mouse Albumin ELISA Kit (Assaypro LLC)を使用し測定し、尿中クレアチニン値で補正した。

6-6 免疫組織化学検査

心筋組織でのマクロファージ浸潤を評価するため、CD68免疫染色を行った。10 μ m に薄切した凍結心臓切片を、4%パラホルムアルデヒド/PBS に 15 分間浸し固定させた後、0.3% H₂O₂にて 30 分間、内因性ペルオキシダーゼブロックを行い、PBS で洗浄。PBS で希釈した Triton-X 入り 2%スキムミルクで 30 分ブロッキングを行った後、ラット抗マウスマクロファージ CD68 (Serotec)の一次抗体を 500 倍希釈で 4°C overnight でインキュベートした。その後、PBS で洗浄し、ラット IgG 二次抗体 (BioSource, Camarillo, CA, USA) を 500 倍希釈で室温 2 時間で反応させ、洗浄後に 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA)で検鏡しながら発色。ヘマトキシリンで対比染色させた。マクロファージ浸潤の定量は 1 視野あたりの陽性細胞数をカウントし、10 視野以上の平均陽性細胞数で各群間を比較した。

心筋間質および冠動脈周囲の繊維化を評価するため、Sirius red F3BA (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA)染色を行った。摘出した心臓組織は解剖後に、4%パラホルムアルデヒドで一晩浸して固定し、パラフィン包埋させ 5 μ m スライスの切片を作成。0.5%飽和ピクリン酸水溶液で溶解した Sirius red F3BA で染色後、Lumina

Vision version 2.2 の解析ソフトを用いて評価した。左室心筋間質の繊維化は、抽出した Sirius redF3BA 陽性部を全面積あたりの面積比で算出し、冠動脈周囲の繊維化は、血管周囲の繊維化面積を血管面積との比で評価した⁴⁴。

6-7 リアルタイム RT-PCR

6-7-1 RNA 抽出と逆転写反応

凍結心臓組織 30mg 程度をフェノールとチオシアン酸グアニジンの混合液 TRIzol Regent(Invitrogen)に加え溶解ホモジナイズし、クロロホルムを加え 4°C、12000g、10 分で遠心分離した。RNA を含む水層を回収しイソプロパノールを加え RNA を沈殿させ、全 RNA を単離した。単離 RNA は乾燥させないように RNase free の蒸留水(DEPC 水; diethylpyrocarbonate、SIGMA)に溶解し、吸光度を測定した。

また、速やかに溶解した 1 μ g の RNA から QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc., Hilden、ドイツ)を用いてプロトコールに従い、相補的 DNA を合成し、鋳型 DNA として PCR を行った。ゲノム DNA は、逆転写反応を行う際にゲノム DNA 除去反応液添加による除去ステップを行い除去させた⁴⁴。

6-7-2 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

PCR 増幅産物の蛍光検出法としてインターカレーター法を用い、SYBR[®] Green I を使用し、DNA polymerase や MgCl₂、DNA 分解酵素が含まれる SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa Bio Inc.)を反応系に加え、PCR システム Thermal Cycler Dice[®] Real Time System (TaKaRa Bio Inc.)で増幅産物の生成量をモニターした⁴⁴。

プロトコールは、初期変性として 95°C10 秒、1 サイクル、PCR を 95°C5 秒、60°C30 秒の 40 サイクルとし、最終ステップとして PCR 増幅産物の特異性を融解曲線分析で確認した。閾値と増幅曲線の交点を Ct 値とする Crossing point 法で算出られた Ct 値は、ハウスキープ遺伝子 GAPDH で標準化し相対定量を行った。使用したプライマーの塩基配列は以下の通りである。

ACE;	F(forward), 5'-AGTACAACCTGGGCGCCAAACA-3'
	R(reverse), 5'-GGAAATTGACGCGGTTGGAC-3'
AT1a;	F, 5'-GGACACTGCCATGCCATAAC-3'
	R, 5'-TGAGTGCGACTTGGCCTTTG-3'

BNP;	F, 5'-AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGAGCA-3'
	R, 5'-AGAGCTGTCTCTGGGCCATTTTC-3'
Colla1;	F, 5'-CCTGGCAAAGACGGACTCAAC-3'
	R, 5'-GCTGAAGTCATAACCGCCACTG-3'
MCP-1;	F, 5'-GCATCCACGTGTTGGCTCA-3'
	R, 5'-CTCCAGCCTACTCATTGGGATCA-3'
TGF- β 1;	F, 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAAGTCTA-3'
	R, 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'

6-8 心臓スーパーオキシド測定

6-8-1 ジハイドロエチジウム(DHE)染色による *in situ* スーパーオキシド測定

マウスより摘出した心臓組織(左室心筋)は、すぐに Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek)にて急速凍結し包埋した。凍結標本はクライオスタットを用いて $10\ \mu\text{m}$ に薄切し、蛍光プローベである DHE(Sigma Chemical Co) $2\ \mu\text{mol/L}$ で暗所 37°C にて 30 分間インキュベートした。蛍光顕微鏡を用い、 488nm 、 $574\text{-}595\text{nm}$ の励起波長で心臓のスーパーオキシド産生量を蛍光強度にて評価した。DHE 蛍光強度の定量は、Lumina Vision version 2.2 の解析ソフトを用いて、平均蛍光強度の測定結果を対照群の蛍光強度に対する割合で評価した⁴⁴。

6-8-2 Lucigenin 化学蛍光法を用いた *ex vivo* スーパーオキシド測定(NADPH オキシダーゼ活性)

摘出した心臓組織を POLYTRON homogenizer PT1200E (KINEMATICA AG)を用い modified-Krebs/HEPES バッファー(pH 7.4)にて氷上でホモジナイズし、遠心分離($1000\text{g} \times 5$ 分)後に上清を採取した。 37°C 、30 分間平衡化した上清サンプルに基質である NADPH($10\ \mu\text{M}$)と電子供与体である Lucigenin $10\ \mu\text{M}$ (Sigma Chemical Co.)を添加し、Lucigenin による化学発光を 15 秒毎に計 5 分間、化学蛍光測定器(BLR-201、Aloka)を用いて NADPH オキシダーゼ活性として測定した⁴⁵。サンプルの蛋白量は Bradford 法にて定量し、蛍光測定値を蛋白量で補正した。

6-9 ウェスタンブロット分析

6-9-1 心臓蛋白抽出と蛋白量調整

心臓組織をタンパク質抽出緩衝液(Hepes 20mmol/L(pH 7.2)、NaCl 25mmol/L、TritonX-100 0.1%、EGTA 2mmol/L、NaF 50mmol/L、 β -glycerophosphate 25mmol/L、aprotinin 60 μ g/mL、Leupeptin 2 μ g/mL、Na₃VO₄ 1mmol/L、PMSF 1mmol/L、DTT 0.2mmol/L)で、POLYTRON homogenizer PT1200E を用いて氷上でホモジナイズし、さらに氷上で1分間ソニケーションを行った。4°C、10000g、30分の高速度遠心で得た上清サンプルは、Bradford法を用い蛋白定量し、濃度を調整後に熱変成させ、抽出蛋白サンプルとして電気泳動に用いた⁴⁴。

6-9-2 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

分離ゲル 7.5%あるいは12%のアクリルアミドゲルとスラブ型の泳動槽を用い、ゲル1枚あたり20mAの定電流設定で泳動を行った。泳動用緩衝液としてトリス-グリシン-SDSを用い、ゲルの各ウェルにサンプルと分子量マーカーを注入し泳動した⁴⁴。

6-9-3 ウェスタンブロットティング

電気泳動で分離したゲル中の蛋白を膜(メンブレン)に転写するため、セミドライブロットティング装置(BIO-RAD Trans-Blot SD cell)に、PVDF(polyvinylidene difluoride)メンブレンとゲルを重ね、同じ大きさのろ紙ではさみ、2mA/cm²の定電流で通電した。PVDFメンブレンは疎水性のため、使用前にメタノールに浸し親水化処理を行った。転写したメンブレンを洗浄の上、ブロッキング緩衝液(TBS-Tween液で希釈した0.1%BSA)で一晩ブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンは1次抗体と4°Cで一晩緩やかに震盪させ、TBS-Tween20液で洗浄後にHRP標識2次抗体で室温1時間反応させた。メンブレンはECL-plus(Amersham Bioscience)を用いて現像しバンドを可視化した。バンドの濃度はJ-imageソフトを使用して定量化し、各検体をそれぞれの α -チューブリン発現量で補正した。

各種一次抗体の抗体濃度は以下の通りである。

抗リン酸化ASK1抗体(1000倍希釈)、抗リン酸化p38抗体(2000倍希釈、Cell signaling Technology Inc)、抗p38抗体(2000倍希釈、Cell signaling Technology Inc)、抗リン酸化ERK抗体(2000倍希釈、Cell signaling Technology Inc)、抗ERK抗体(2000倍希釈、Cell signaling Technology Inc)、抗Nox2抗体(2000倍希釈、BD

Transduction Laboratories)、抗 Nox4 抗体(1000 倍希釈、Abcam)、抗 p22^{phox} 抗体(2000 倍希釈、Santa Cruz Biotechnology Inc)、抗 AT1 受容体抗体(2000 倍希釈、Santa Cruz Biotechnology Inc)、抗 ACE 抗体(2000 倍希釈、Abcam)、抗ミネラルコルチコイド受容体抗体(1000 倍希釈、Santa Cruz Biotechnology Inc)。

6-10 統計学的検査

データ値はすべて平均値±標準誤差で表記した。経時的な評価は、Windows 版 Stat View (SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA) を用いて二元配置分散分析 (two way ANOVA)、最小有意差法 (Fisher の PLSD 法) で解析した。その他のデータは一元配置分散分析 (one way ANOVA)、Fisher の PLSD 法を用いた。すべての検討において、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

7. 実験結果

Wild-type mice と ASK1 deficient mice (ASK1^{-/-})に対するアルドステロン持続投与の影響の比較

7-1 アルドステロンの血圧への影響

ASK1^{-/-}は Wild-type と比較し、発育の課程で外見上特に差を認めなかった。アルドステロンの持続投与により、血圧は徐々に上昇しアルドステロン投与 4 週後にはアルドステロン非投与群と比較し最終的に 20mmHg 程度の昇圧を認めた。しかし、Wild-type と ASK1^{-/-}の昇圧効果は経時的にどの週齢においても同等であり、両系統間で差を認めなかった。

また、飲水による 0.3%塩化カリウムの補充は、アルドステロン投与による血圧上昇に影響を示さず、アルドステロン投与+カリウム補充群の両系統間でも経時的な差を認めなかった。(図 11-1)

7-2 アルドステロンの電解質、腎障害への影響

Wild-type と ASK1^{-/-}間のコントロール群において、体重、血漿ナトリウム濃度、血漿カリウム濃度、BUN、クレアチニン値、尿中クレアチニン値で補正した尿中アルブミン排泄量に差を認めなかった (表 10-1)。また、アルドステロンの 4 週間持続投与により、血漿ナトリウム濃度の有意な上昇 ($p < 0.01$ vs アルドステロン非投与群(A(-))、血漿カリウム濃度の有意な低下 ($p < 0.01$ vs A(-))、BUN やクレアチニン値の有意な低下を認めたが ($p < 0.01$ vs A(-))、いずれも両系統マウス間で差を認めなかった。

さらに、アルドステロンの 4 週間持続投与は、尿中アルブミンの排泄量を著明に増加させた ($p < 0.01$ vs A(-))。しかし、アルドステロンによるアルブミン排泄量増加は Wild-type と ASK1^{-/-}の両系統マウス間で差を認めなかった。

0.3%の塩化カリウム補充は、アルドステロン投与群と比較し、アルドステロン持続投与による低カリウム血症を有意に改善し ($p < 0.05$)、またアルドステロン持続投与による尿中アルブミン排泄量増加を有意に抑制させた ($p < 0.01$)。しかし、カリウム値、アルブミン排泄量ともに、アルドステロン投与+カリウム補充群の両系統マウス間で差を認めなかった。

7-3 アルドステロンによる心臓 ASK1 活性化と MAPK への影響

図 11-2(A)に示すように、アルドステロンの持続投与は Wild-type 心臓における ASK1 のリン酸化を有意に亢進させた ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-))。当然、ASK1^{-/-}では ASK1 の発現を認めなかった。

また、アルドステロンの持続投与は、Wild-type において p38 や ERK のリン酸化も有意に増加させた (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ vs Wild-type, A(-)) (図 11-2(B)、図 11-2(C))。しかし、当然のことながら ASK1 の下流にある p38 のリン酸化は、ASK1^{-/-}で有意に抑制されていた ($p < 0.01$ Wild-type, A(+)) vs ASK1^{-/-}, A(+))のに対し、ERK のリン酸化は Wild-type と ASK1^{-/-}との間で差を認めなかった (図 11-2(C))。

7-4 アルドステロンによる心肥大と心臓での炎症への影響

図 11-3(A)に示すように、アルドステロン持続投与は Wild-type と ASK1^{-/-}の左心室重量を同程度に増加させた ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-), $p < 0.05$ vs ASK1^{-/-}, A(-))が、両系統マウス間で差を認めなかった。また、0.3%塩化カリウムの補充は、両系統マウスともにアルドステロンによる心重量増加に影響を示さなかった (図 11-3(A))。これらの結果は、経胸壁心エコー所見と同様であり、アルドステロン持続投与は、左室中隔壁厚と左室後壁厚の有意な肥厚を認め (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ vs A(-))、また体重補正による推定式で算出される LV mass index の有意な増加を認めたが ($p < 0.01$ vs A(-))、両系統マウス間に差を認めなかった (NS Wild-type, A(+)) vs ASK1^{-/-}, A(+)) (表 10-2)。一方、アルドステロン持続投与により Wild-type と ASK1^{-/-}で有意に増強された心臓での BNP の mRNA 発現は ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-), $p < 0.01$ vs ASK1^{-/-}, A(-))、Wild-type と比較し ASK1^{-/-}でその発現増強が有意に抑制され ($p < 0.01$ Wild-type, A(+)) vs ASK1^{-/-}, A(+))、アルドステロン投与+カリウム補充群でも ASK1^{-/-}においてその発現増強は有意に抑制された ($p < 0.05$ Wild-type, A(+)+KCl vs ASK1^{-/-}, A(+)+KCl) (図 11-3(B))。

アルドステロンの持続投与は、Wild-type 心臓においてマクロファージの浸潤を有意に増強させ ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-))、その浸潤は心筋間質と冠動脈周囲に集簇していた (図 11-3(C))。同様に、アルドステロン持続投与は Wild-type 心臓での MCP-1 の mRNA 発現を有意に増強させたが ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-)) (図 11-3(D))、Wild-type と比較し ASK1^{-/-}はアルドステロンによる炎症細胞浸潤や MCP-1 の発現増強

を有意に抑制した（それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ Wild-type, A(+) vs ASK1^{-/-}, A(+))。また、0.3%塩化カリウムの補充は、アルドステロン持続投与による炎症細胞浸潤や MCP-1 発現増強を Wild-type で一部改善させた（それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ Wild-type, A(+) vs Wild-type, A(+) + KCl)。しかし、アルドステロン投与+カリウム補充群において炎症細胞浸潤と MCP-1 発現増強はやはり Wild-type に比べ ASK1^{-/-} で有意に抑制された（それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ Wild-type, A(+) + KCl vs ASK1^{-/-}, A(+) + KCl)。

また、アルドステロン持続投与は、左室拡張末期の内腔径を有意に拡大させた ($p < 0.05$ vs Wild-type, A(-), $p < 0.05$ vs ASK1^{-/-}, A(-)) が、Wild-type と ASK1^{-/-} との間に差はなかった。左室収縮期末期径と短縮率は、アルドステロンを投与しても変化はみられず、両系統マウス間にも差を認めなかった (表 10-2)。

7-5 アルドステロンによる心臓繊維化作用への影響

図 11-4(A)、(B)に示すように、アルドステロン持続投与は、Wild-type および ASK1^{-/-} での心筋間質 ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-), $p < 0.05$ vs ASK1^{-/-}, A(-)) や冠動脈周囲 ($p < 0.01$ vs Wild-type, A(-), $p < 0.01$ vs ASK1^{-/-}, A(-)) の繊維化を有意に増強した。しかし、アルドステロンによる繊維化促進は、Wild-type と比較し ASK1^{-/-} で有意に抑制された (心筋間質; $p < 0.01$, 冠動脈周囲; $p < 0.01$ それぞれ Wild-type, A(+) vs ASK1^{-/-}, A(+))。同様に、アルドステロンの持続投与は Wild-type において心臓での TGF- β 1 や 1 型コラーゲンの mRNA 発現を有意に増強したが (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ vs Wild-type, A(-))、アルドステロンによるこれらの発現増強は Wild-type と比較し ASK1^{-/-} で有意に抑制された (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.01$ Wild-type, A(+) vs ASK1^{-/-}, A(+)) (図 11-4(C)、(D))。

また、0.3%塩化カリウムの補充は、アルドステロンによる心筋間質や冠動脈周囲の線維化増強、TGF- β 1 や 1 型コラーゲンの発現増強に関し改善傾向を示し、一部は冠動脈周囲繊維化や TGF- β 1 (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$ Wild-type, A(+) vs Wild-type, A(+) + KCl) の発現を有意に改善させた。しかし、アルドステロン投与+カリウム補充群において心筋間質や冠動脈周囲の線維化増強、TGF- β 1 や 1 型コラーゲンの mRNA 発現増強は、やはり Wild-type と比較し ASK1^{-/-} でいずれも有意に抑制された (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$ Wild-type, A(+) + KCl vs ASK1^{-/-}, A(+) + KCl)。

7-6 アルドステロンによるスーパーオキシド産生と NADPH オキシダーゼ活性への影響

in situ ジハイドロエチジウム染色と、ex vivo でルシゲニンアッセイを用いて、心臓におけるスーパーオキシド産生を評価した。アルドステロンの持続投与は Wild-type において、心臓でのスーパーオキシド産生を有意に増加させ ($p < 0.01$ vs A(-))、心臓 NADPH オキシダーゼの活性を有意に増強した ($p < 0.01$ vs A(-))。これらのアルドステロンによる酸化ストレス増強効果は、0.3%塩化カリウムを補充しても変化せず、Wild-type と比べ ASK1-/- で有意な抑制を認めた (図 11-5(A); $p < 0.01$ Wild-type, A(+)) vs ASK1-/-, A(+), $p < 0.05$ Wild-type, A(+)+KCl vs ASK1-/-, A(+)+KCl, 図 11-5(B); $p < 0.01$ Wild-type, A(+)) vs ASK1-/-, A(+), $p < 0.01$ Wild-type, A(+)+KCl vs ASK1-/-, A(+)+KCl)。

7-7 アルドステロンの NADPH オキシダーゼサブユニットへの影響

NADPH オキシダーゼサブユニットの膜タンパク Nox2、Nox4、p22^{phox} の発現をウエスタンブロット法を用いて調べた。アルドステロンの持続投与は、心臓 Nox2 の蛋白発現を Wild-type および ASK1-/- の両系統マウスで有意に増強したが (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ vs A(-))、アルドステロンによる発現増強効果は Wild-type に比べ ASK1-/- で有意に抑制された ($p < 0.01$ Wild-type, A(+)) vs ASK1-/-, A(+)) (図 11-6(A))。心臓 Nox4 は、Nox2 同様にアルドステロン投与により両系統マウスで有意な発現増加を認めた (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ vs A(-))。しかし、Wild-type と ASK1-/- との間に差はみられなかった (NS Wild-type, A(+)) vs ASK1-/-, A(+)) (図 11-6(B))。また、心臓 p22^{phox} はアルドステロンを投与しても発現に変化がなく、Wild-type と比較し ASK1-/- においてベースラインから低値を呈していた ($p < 0.01$ Wild-type, A(-)) vs ASK1-/-, A(-), $p < 0.01$ Wild-type, A(+)) vs ASK1-/-, A(+)) (図 11-6(C))。

7-8 アルドステロンの局所レニン・アンジオテンシン系への影響

アルドステロンの持続投与は、Wild-type において心臓での ACE ならびに AT1 受容体の蛋白発現 (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ vs A(-))、mRNA の発現 (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ vs A(-)) をいずれも有意に増加させた。しかし、ASK1-/- では、アルドステロンによるこれら RA 系コンポーネントの蛋白発現ならびに mRNA 発現の増加効果を全く認めなかった (図 11-7(A)、(B)、(C)、(D))。

また、心臓におけるミネラルコルチコイド受容体の蛋白発現は、アルドステロンを投与しても変化はなく、Wild-type と ASK1^{-/-}の間にも差を認めなかった (NS Wild-type, A(-) vs ASK1^{-/-}, A(-)、NS Wild-type, A(+) vs ASK1^{-/-}, A(+)) (図 11-8)。

8. 考察

本研究は、食塩存在下でアルドステロンによって惹起される心臓間質および血管周囲の炎症と繊維化促進の機序に、ASK1 が重要な働きをしていることを証明した。また、その機序として、ASK1 の活性化を伴った、NADPH オキシダーゼの活性化による酸化ストレスの亢進と、ACE や AT1 受容体の発現増加による局所レニン・アンジオテンシン系の活性化が深く関与していることをはじめて証明した。本研究により、以前より指摘されている酸化ストレス亢進と局所 RA 系活性化を介した食塩/アルドステロンによる心血管障害の分子機序を解明した。

各種疾患モデル動物を用いた研究や臨床試験の結果より、アルドステロンが高血圧や心血管障害の独立したリスクホルモンであることが明らかとなっている。心血管系におけるアルドステロンの作用としては、心臓繊維化、心肥大、血管内皮機能障害が知られている。高食塩摂取下でのミネラルコルチコイド依存性高血圧モデルラットでも繊維化を伴った心肥大や腎障害が生じ、これらは非降圧量の MR 拮抗薬の投与により改善することが確認され³⁸、血圧に依存しないアルドステロンの心血管作用を示す結果が同様に次々と報告されている。また、Rocha らはラット高血圧モデルを用いた検討から、アルドステロンと食塩の負荷が血圧や心肥大の程度と独立して心筋の繊維化などの心血管作用をもつことを明らかにした⁹。一方、アルドステロンの作用は高食塩下で増強され、低塩では血管周囲繊維化などの組織変化は減弱することも知られている。このようにアルドステロンは心血管系に独立して作用するにもかかわらず、その作用は食塩環境によって異なり、アルドステロンと食塩との不適切なバランスがある場合、アルドステロンの濃度が正常範囲であっても臓器障害が認められる可能性が強く示唆されている¹⁰。

本実験では、1%の食塩水を飲水させた環境下でアルドステロンの持続投与により、高血圧、血漿カリウム値の低下、心肥大、冠動脈周囲や心筋間質におけるマクロファージの浸潤と繊維化の増強、アルブミン排泄量の増加が生じた。この中で ASK1-/- は、アルドステロンによる血圧上昇や低カリウム血症、アルブミン尿に影響を示さなかったが、マクロファージ浸潤や心臓繊維化の増強を有意に抑制することが示された。このように、ASK1 は血圧やカリウム値、腎系球体障害に関係なくアルドステロンによる心臓での炎症と繊維化に深く関与していることが示唆された。また、ASK1-/- はアルドステロンによる心肥大を本

実験では抑制しなかった。アルドステロンと心肥大の関連性を示した論文は以前より散見されるが、血管障害に伴い二次的に心筋が障害されることも容易に想像され、なかにはアルドステロンの心筋への影響は強くないとする報告もあり心筋肥大とアルドステロンの直接の関係については以前より若干議論の分かれるところである。一方、高食塩状態でアルドステロンは Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) を介し強い細胞肥大作用を引き起こすことも示されている⁴⁶。このようにアルドステロンは心血管系に独立して作用するにもかかわらず、その作用は食塩環境によって異なり複雑であり、ASK1 が本実験において心肥大に影響を示さなかった理由は不明である。しかし、ASK1 を介したアルドステロンによる心臓での炎症や繊維化が血管周囲や間質を中心に惹起されていることをふまえると、今回のアルドステロンによる臓器障害は心筋細胞というよりは繊維芽細胞や内皮細胞の ASK1 を介した作用が中心であった可能性が推測される。

本実験ではアルドステロンにより低カリウム血症を誘導した。そのため、低カリウム血症自体が心筋のネクロシスの結果、二次的に炎症と繊維化を引き起した⁶⁷ 可能性が考えられた。そこで、本実験ではアルドステロン投与に加え塩化カリウム補充群を追加し、低カリウム血症による臓器障害の関与を検討した。しかし、塩化カリウムによりカリウムを補正しても、アルドステロンによる炎症や繊維化促進への影響はわずかであり、やはり ASK1-/- で有意に抑制されることがわかった。このことから、今回の ASK1 を介した障害は低カリウム血症による心筋ネクロシスの結果生じた炎症や繊維化によるものではなく、ASK1 活性化による直接的な障害と考えられた。また、本実験においてアルドステロンはマクロファージ浸潤を引き起こす炎症性ケモカイン MCP-1 や組織繊維化をおこす増殖因子 TGF- β 1 の発現を著明に増強した。ASK1-/- は、アルドステロンによるこれら MCP-1 や TGF- β 1 の発現増強を有意に抑制させ、ASK1-/- でのアルドステロンによるマクロファージ浸潤やコラーゲン発現、心筋間質や血管周囲の繊維化の抑制効果と相関した。このように、アルドステロンによる炎症や繊維化促進の機序の一部として、血圧やカリウム値とは独立し、ASK1 活性化と MCP-1 や TGF- β 1 の発現増強の関与が示された。

これまでの研究により、酸化ストレスは心血管病の発症や進展に深く関与していることが示されている^{47, 48} が、アルドステロンによる炎症誘導の機序にも、MR 活性化により惹起される酸化ストレスの重要性が示されている。アルドステロン食塩負荷高血圧ラットで誘導される心筋の炎症性変化の成立過程を時間・空間的に詳細に検討した Sun らの解析⁴⁹ では、まず冠動脈周囲および内皮に NADPH オキシダーゼ(gp91^{phox})および酸化ストレ

スマーカー(3-nitrotyrosine)の増加、同部位での NF- κ B の活性化および ICAM1、MCP-1、TNF- α の mRNA 発現増加、冠動脈周囲へのマクロファージ浸潤を認め、その後血管周囲繊維化の進行、心筋組織の繊維化へと移行することが示され、さらにこれら一連の変化がスピロラクトンあるいは抗酸化薬の投与により著明に抑制されることが示されている。アルドステロン食塩負荷ラットの大動脈においても向炎症性因子 mRNA の発現増加と内皮への酸化ストレスマーカーの集積を認め、これらの変化が抗酸化薬 (tempol) で改善することが確認されている⁵⁰。同様の酸化ストレスの亢進および抗酸化薬による臓器保護作用はアルドステロンによる腎障害モデルでも示されており、心・腎臓・血管組織ではアルドステロンによる MR の活性化により酸化ストレスが増加すると、NF- κ B や AP-1 の活性化により一連のレドックス感受性向炎症性因子の遺伝子発現が増加し、炎症誘導につながると考えられている。また、酸化ストレスの産生機序についても徐々に分子機序が明らかになってきており、アルドステロンは NADPH オキシダーゼのコンポーネントである p22^{phox}、gp91^{phox}、Nox4 などの発現を誘導することにより酸化ストレスを増加させると考えられている^{12, 40-41, 49, 51}。本実験でも、アルドステロンの投与は心臓組織においてスーパーオキシドの産生、NADPH オキシダーゼの活性を増強し、Nox2(gp91^{phox})や Nox4 の発現を増加させていることがわかったが、興味深いことに ASK1 は NADPH オキシダーゼサブユニットの Nox2(gp91^{phox})や p22^{phox} を介し、NADPH オキシダーゼの活性化とスーパーオキシドの産生亢進にも関与していることが示された。このように、今回の我々の結果は、MCP-1 や TGF- β 1 の発現増強を介したアルドステロンによる心臓での炎症や繊維化に ASK1 の活性化と酸化ストレスの亢進が深く関与していることを示すものである。また、通常は酸化ストレスにより刺激を受けるとされる ASK1 自体そのものが、Nox2 や p22^{phox} を介し NADPH オキシダーゼ、酸化ストレスにも深く関与し vicious cycle を形成している可能性を示唆したはじめての報告である。

Ang II は多面的な作用を介し心血管障害の発症と進展に寄与する代表的な心血管リスクホルモンであり、我々はこれまでに ASK1 が Ang II による心肥大や線維化、心血管リモデリングにおいて重要なシグナル分子であることを報告している³²。最近、アルドステロンと Ang II の相互作用が注目されている^{52, 54-58} が、心血管細胞においてアルドステロンが Ang II の作用を AT1 受容体以降のレベルで増強し⁵⁹⁻⁶¹、ACE の発現も増強することが示されており^{18, 19}、高アルドステロン血症で循環血漿量が増加し全身性 RA 系が抑制された状態でも、局所での Ang II とアルドステロンで vicious cycle を形成し、心血管障

害が進展していく機序が想定されている。これまでに *in vivo* でも、AT1 受容体拮抗薬がアルドステロンによるコラーゲン発現や心臓繊維化を抑制することが報告されている⁵⁹。本研究でも、アルドステロンの持続投与により心臓組織において ACE と AT1 受容体の発現が有意に増強され、アルドステロンにより局所 RA 系の活性化が起こっていることが示唆されたが、興味深いことに ASK1-/- ではアルドステロンによる ACE および AT1 受容体の蛋白発現、mRNA の発現増強を認めなかった。この結果は、ASK1 の ACE や AT1 受容体を介した局所 RA 系の活性化が、アルドステロンによる酸化ストレス亢進の一部や心臓での炎症と繊維化に深く関わっていることを示したはじめての報告である。

本実験により、ASK1 を介したアルドステロンによる心臓での炎症と繊維化の機序に、ACE や AT1 受容体、MCP-1、NADPH オキシダーゼが関与していることがわかった。しかし、今回の実験ではこれらの組織学的局在を同定することが困難であった。これまでの報告によると、アルドステロンは、ACE の発現を心筋細胞¹⁸や血管内皮細胞¹⁹、マクロファージ⁴¹で、AT1 受容体の発現を心筋細胞⁵⁹や血管平滑筋細胞^{60, 61}で、Nox2 を心筋細胞⁶²やマクロファージ⁴¹、繊維芽細胞⁶³、血管内皮細胞^{64, 65}、血管平滑筋細胞⁶⁶で増強することが示されている。さらに *in vivo* では、アルドステロンの投与が炎症細胞や内皮細胞で MCP-1、Nox2 の発現を増強することが報告され⁴⁹、最近、Nox2 を血管内皮特異的に過剰発現させたマウスで、血管周囲や心筋間質に同様の炎症細胞浸潤や繊維化が惹起されることが報告されている。このように、食塩/アルドステロンによる心血管障害の機序や標的細胞は大変複雑であり、心筋細胞や繊維芽細胞、炎症細胞、血管内皮細胞などが互いに相互作用している可能性が容易に推測される。ただ、我々はアルドステロンによる血管内皮機能障害にも ASK1 が酸化ストレスを介し関与している結果を得ており、最近の報告とあわせるとアルドステロンの心臓での炎症と繊維化の機序に、血管内皮細胞の ASK1 が深く関与している可能性を推測している。アルドステロンによる NADPH オキシダーゼ活性化、局所 RA 系活性化の標的細胞を想定した今後のさらなる詳細な検討が必要である。

9. 結語

(1)食塩/アルドステロンによる心臓の間質および冠動脈周囲における炎症、線維化の機序に ASK1 の活性化が関与している。(2) ASK1 は、Nox2 を介した NADPH オキシダーゼ由来のスーパーオキシド産生増加と、ACE や AT1 受容体 upregulation による局所 RA 系の活性化を介し、食塩/アルドステロンによる心血管障害に関与している。本研究は、以前から指摘されている酸化ストレス亢進と RA 系活性化を介した食塩/アルドステロンの心血管障害の分子機序を明らかにしたものであり、我々は ASK1 がアルドステロンの心血管障害の機序に中心的役割を演じていることを初めて証明した。

表10-1 アルドステロン4週投与後の体重、アルブミン尿、血漿ナトリウムとカリウム値、BUN、クレアチニン値への影響

Parameters	Wild-type mice			ASK1 ^{-/-} mice		
	A (-)	A (+)	A(+) + KCl	A (-)	A (+)	A(+) + KCl
Body Weight (g)	28.1±0.3	27.6±0.5	27±0.5	27.5±0.6	27±0.1	26.3±0.7
Urinary Albumin / Cr (μg/mg)	16±2 _f	333±68	120±21 _f	19±2 _§	329±63	109±17 _§
Plasma Na (mEq/L)	147±1 _f	152±1	154±2	148±1 _§	154±1	156±1
Plasma K (mEq/L)	5.1±0.5 _f	3.6±0.3	4.6±0.4*	5.8±0.1 _§	4.0±0.2	4.9±0.3 _Ω
BUN (mg/dl)	25±1 _f	13±1	13±1	27±2 _§	13±1	14±1
Creatinine (mg/dl)	0.09±0.003 _f	0.07±0.00	0.07±0.005 ₃	0.09±0.005 _§	0.07±0.003	0.07±0.003

Urinary Albumin/Cr: クレアチニン補正尿中アルブミン排泄量, Na: ナトリウム, K: カリウム, BUN: Blood Urea Nitrogen
 Creatinine: 血漿クレアチニン値, A(-), A(+), A(+) + KClの略語は図11-1に同じ
 それぞれの値は、平均値±標準誤差SEMで表記した(n=6-7).

* P<0.05, _f P<0.01 vs Wild-type mice, A (+). _Ω P<0.05, _§ P<0.01 vs ASK1^{-/-} mice, A (+).

10. 表およびその説明

表 10-2 アルドステロン持続投与 4 週後の経胸壁心エコー所見結果

	Wild-type mice		ASK1 ^{-/-} mice	
	A (-)	A (+)	A (-)	A (+)
IVS thickness (mm)	0.62±0.03	0.82±0.02*	0.62±0.01	0.83±0.02†
PW thickness (mm)	0.62±0.03	0.83±0.01*	0.62±0.02	0.84±0.02†
LVEDd (mm)	2.77±0.10	3.05±0.05‡	2.80±0.05	3.09±0.08§
LVESd (mm)	1.28±0.07	1.39±0.04	1.30±0.01	1.40±0.07
LV mass index (mg/g)	1.73±0.25	2.98±0.08*	1.66±0.07	3.03±0.13†
FS (%)	54±3	55±1	53±1	57±4

A(-): アルドステロン非投与(生理食塩水投与)

A(+): アルドステロン投与

IVS thickness: 心室中隔壁厚

PW thickness: 後壁厚

LVEDd: 左室拡張末期径

LVESd: 左室収縮期末期径

LV mass index: LV mass/体重比

FS: 短縮率

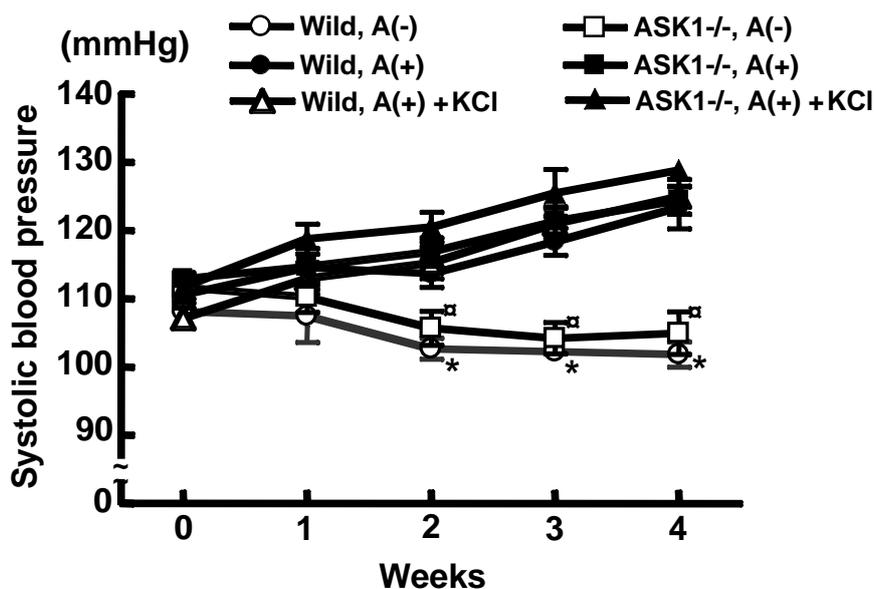
それぞれの値は、平均値±標準誤差 SEM で表記した(n=5-6)。

‡ p<0.05, * p<0.01 vs Wild, A (-)

§ p<0.05, † p<0.01 vs ASK1^{-/-}, A (-)

11. 図およびその説明

図 11-1 アルドステロン持続投与による血圧の経時的変化



Wild, A(-): 野生型マウス、アルドステロン非投与群

Wild, A(+): 野生型マウス、アルドステロン投与群

Wild, A(+)+KCl: 野生型マウス、アルドステロン投与+塩化カリウム補充群

ASK1^{-/-}, A(-): ASK1 ノックアウトマウス、アルドステロン非投与群

ASK1^{-/-}, A(+): ASK1 ノックアウトマウス、アルドステロン投与群

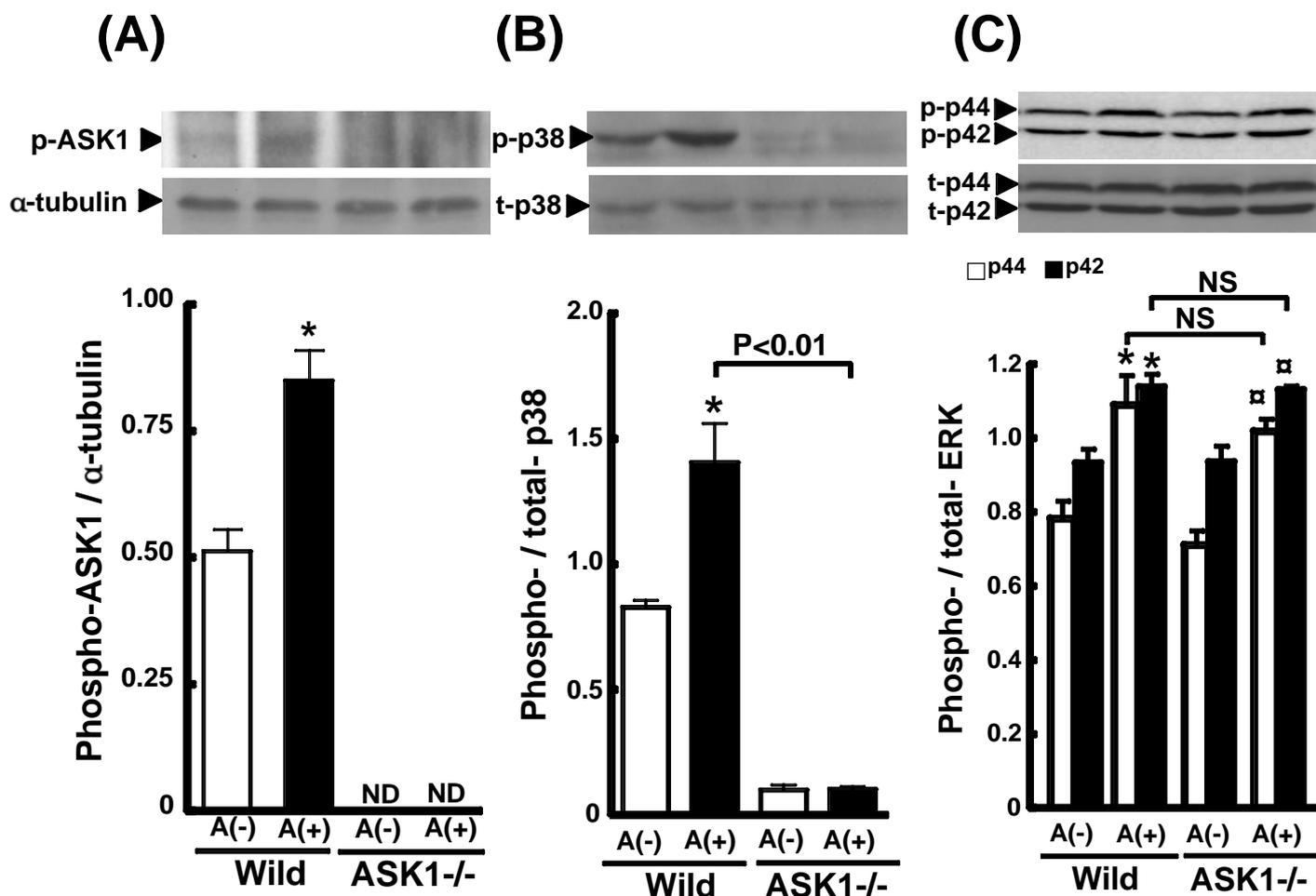
ASK1^{-/-}, A(+)+KCl: ASK1 ノックアウトマウス、アルドステロン投与+塩化カリウム補充群

それぞれ、平均値±標準誤差で示されている(n=6-7)。

* p<0.01 vs Wild, A (+)

§ p<0.01 vs ASK1^{-/-}, A (+)

図 11-2 アルドステロン持続投与による心臓 ASK1 リン酸化(A)、p38 リン酸化(B)、ERK(p44/p42)リン酸化(C)への影響



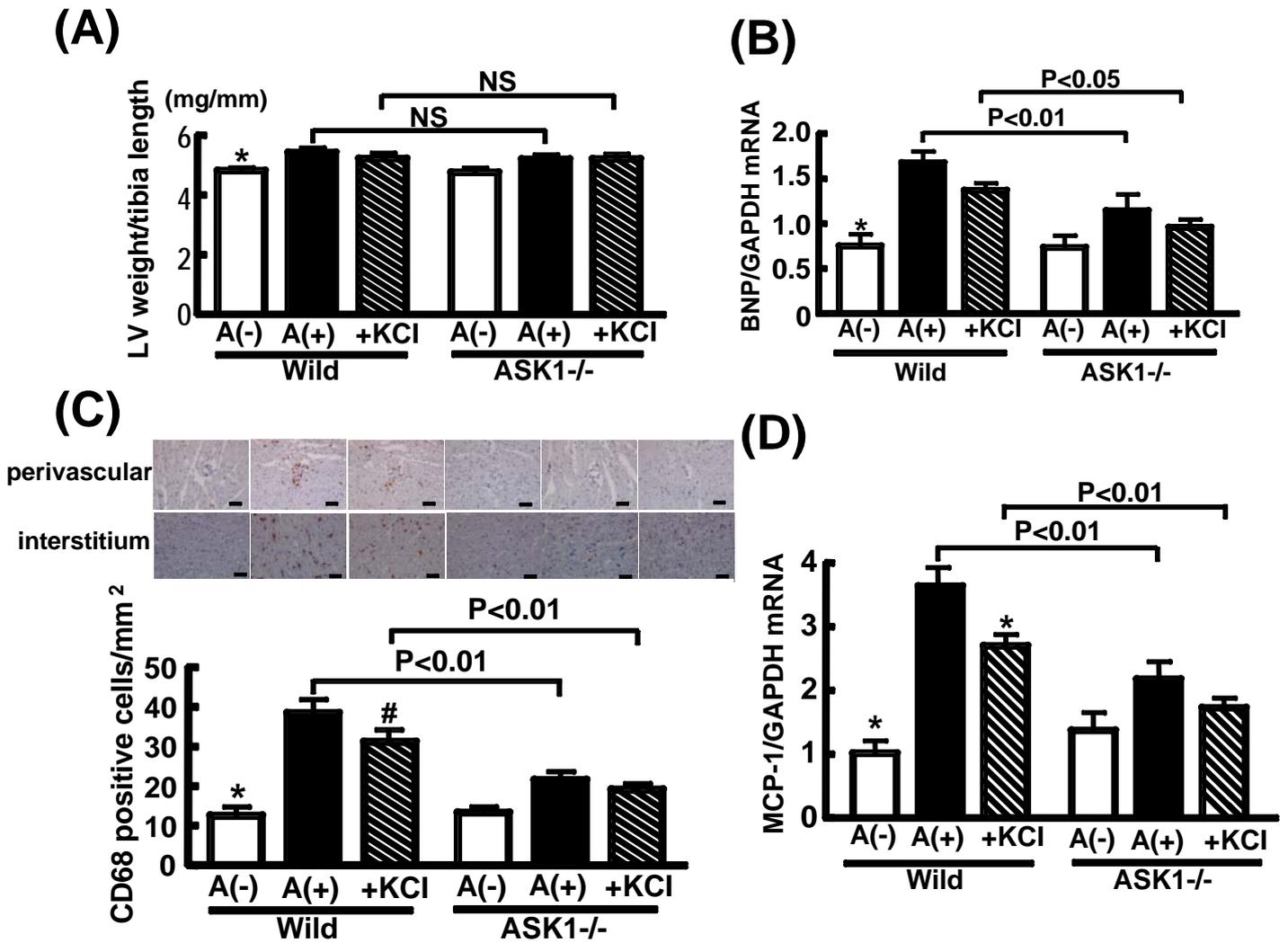
- (A) ウェスタンブロット法による Wild と ASK1-/- の心臓 ASK1 リン酸化蛋白検出
 (B) ウェスタンブロット法による Wild と ASK1-/- の心臓 p38 リン酸化蛋白の検出
 (C) ウェスタンブロット法による Wild と ASK1-/- の心臓 ERK リン酸化蛋白の検出

それぞれ、平均値±標準誤差で示されている(n=4)。

* p<0.01 vs Wild, A (-)

§ p<0.01 vs ASK1-/-, A (-)

図 11-3 アルドステロン 4 週間持続投与後の左心室重量(A)、心臓 BNP mRNA の発現(B)、マクロファージ浸潤(C)、心臓 MCP-1 mRNA 発現(D)



(A)脛骨長で補正した左心室重量

(B)心臓 BNP mRNA の発現

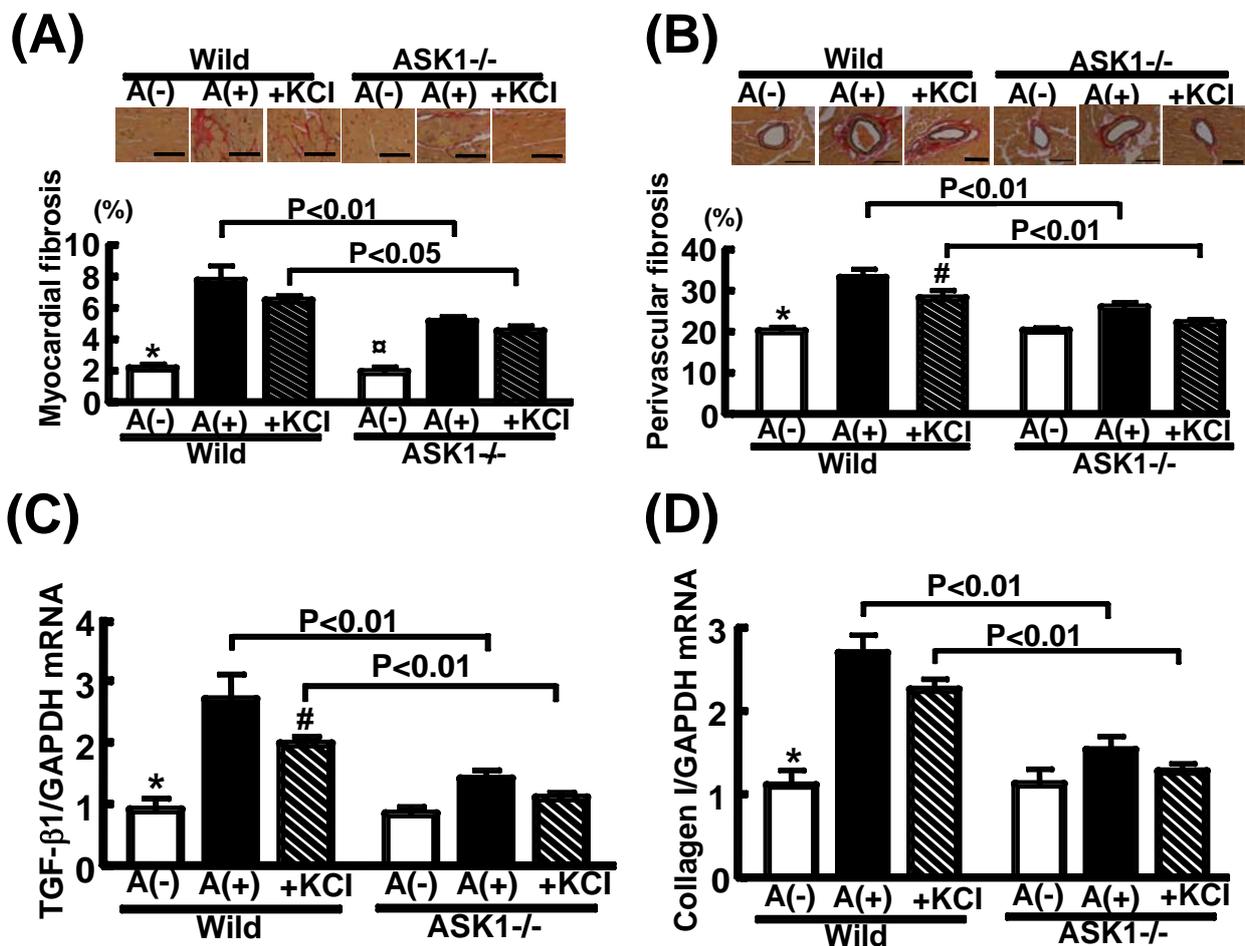
(C)血管周囲および心臓間質におけるマクロファージ浸潤(CD68 陽性細胞数)の評価

(D)心臓 MCP-1 mRNA 発現

それぞれ、平均値±標準誤差で示されている(n=6-7)。

p<0.05, * p<0.01 vs Wild, A (+) † p<0.05 vs ASK1^{-/-}, A (+)

図 11-4 アルドステロン持続投与による心筋間質線維化(A)、冠動脈周囲の
 線維化(B)、心臓 TGF- β 1 mRNA 発現(C)、1 型コラーゲン mRNA 発現(D)



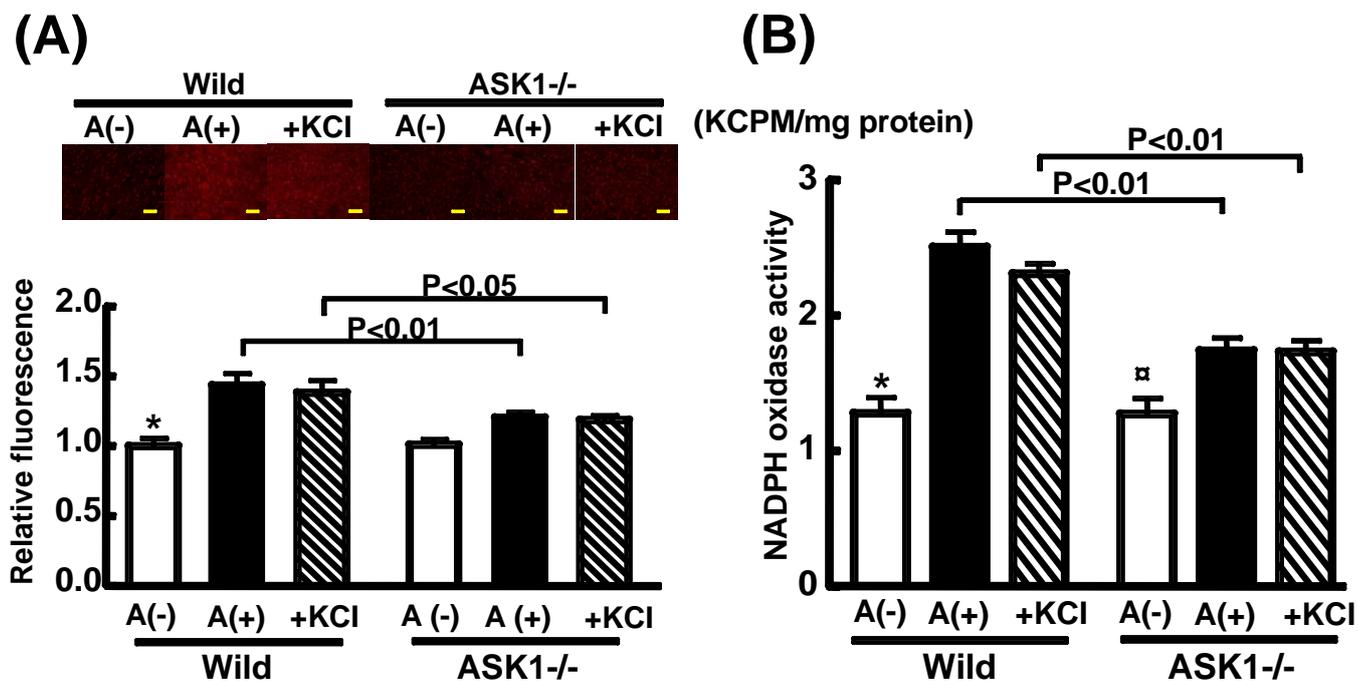
- (A) Sirius red F3BA 染色による心筋間質線維化の評価
- (B) Sirius red F3BA 染色による冠動脈周囲線維化の評価
- (C) 心臓 TGF- β 1 mRNA 発現
- (D) 心臓 1 型コラーゲン mRNA 発現

それぞれ、平均値 \pm 標準誤差で示されている(n=6-7)。

p<0.05, * p<0.01 vs Wild, A (+)

§ p<0.05, † p<0.01 vs ASK1-/-, A (+)

図 11-5 アルドステロン持続投与による心臓スーパーオキシド産生(A)、
NADPH オキシダーゼ活性(B)への影響



(A) DHE 染色評価による心臓スーパーオキシド産生

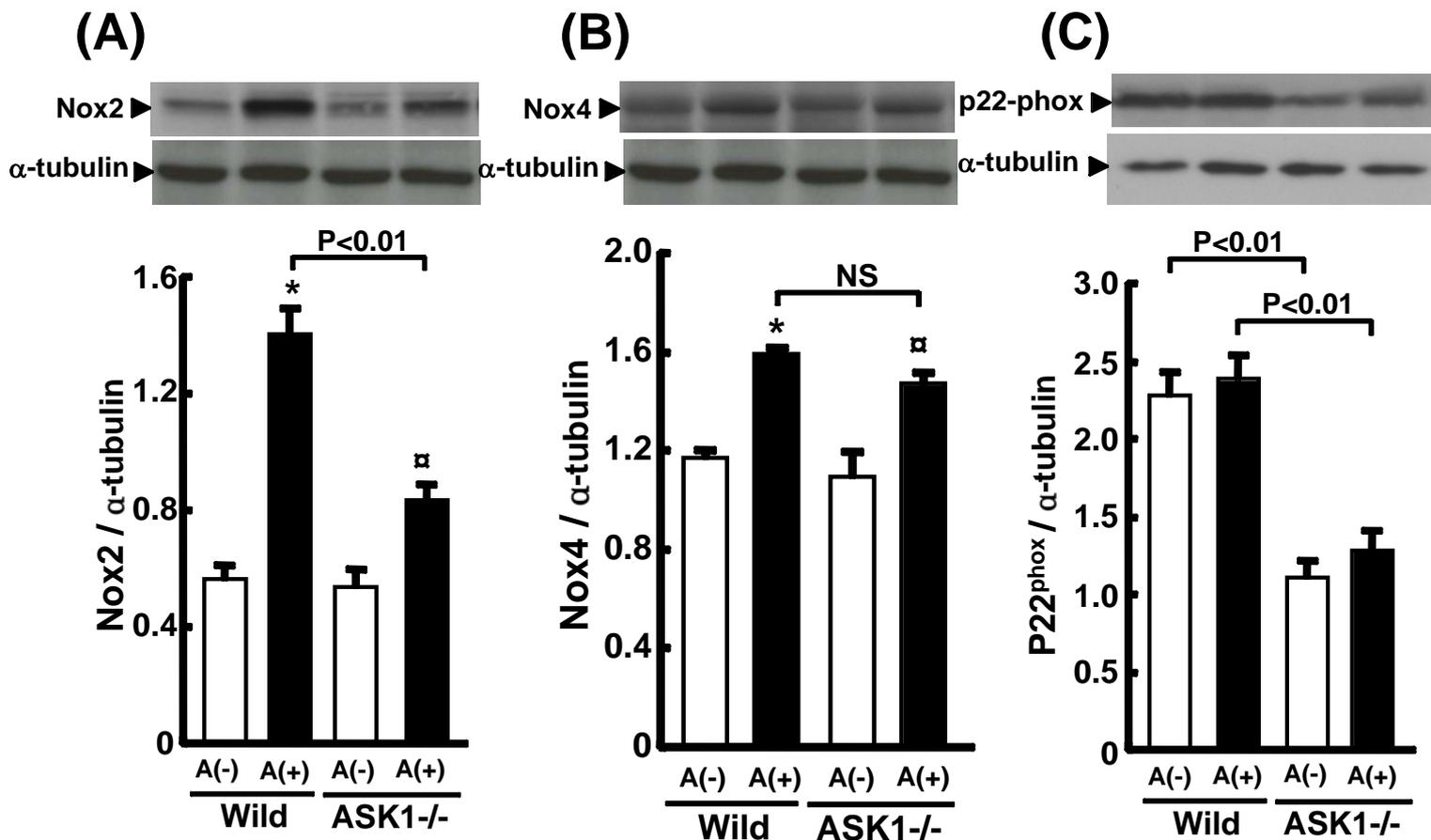
(B) 蛋白量補正による心臓 NADPH オキシダーゼ活性

それぞれ、平均値±標準誤差で示されている(n=6-7)。

* p<0.01 vs Wild, A (+)

§ p<0.05, † p<0.01 vs ASK1-/-, A (+)

図 11-6 アルドステロン持続投与による NADPH オキシダーゼサブユニット Nox2 蛋白発現(A)、Nox4 蛋白発現(B)、p22^{phox} 蛋白発現(C)への影響



(A) ウェスタンブロット法による心臓 Nox2 蛋白の検出

(B) ウェスタンブロット法による心臓 Nox4 蛋白の検出

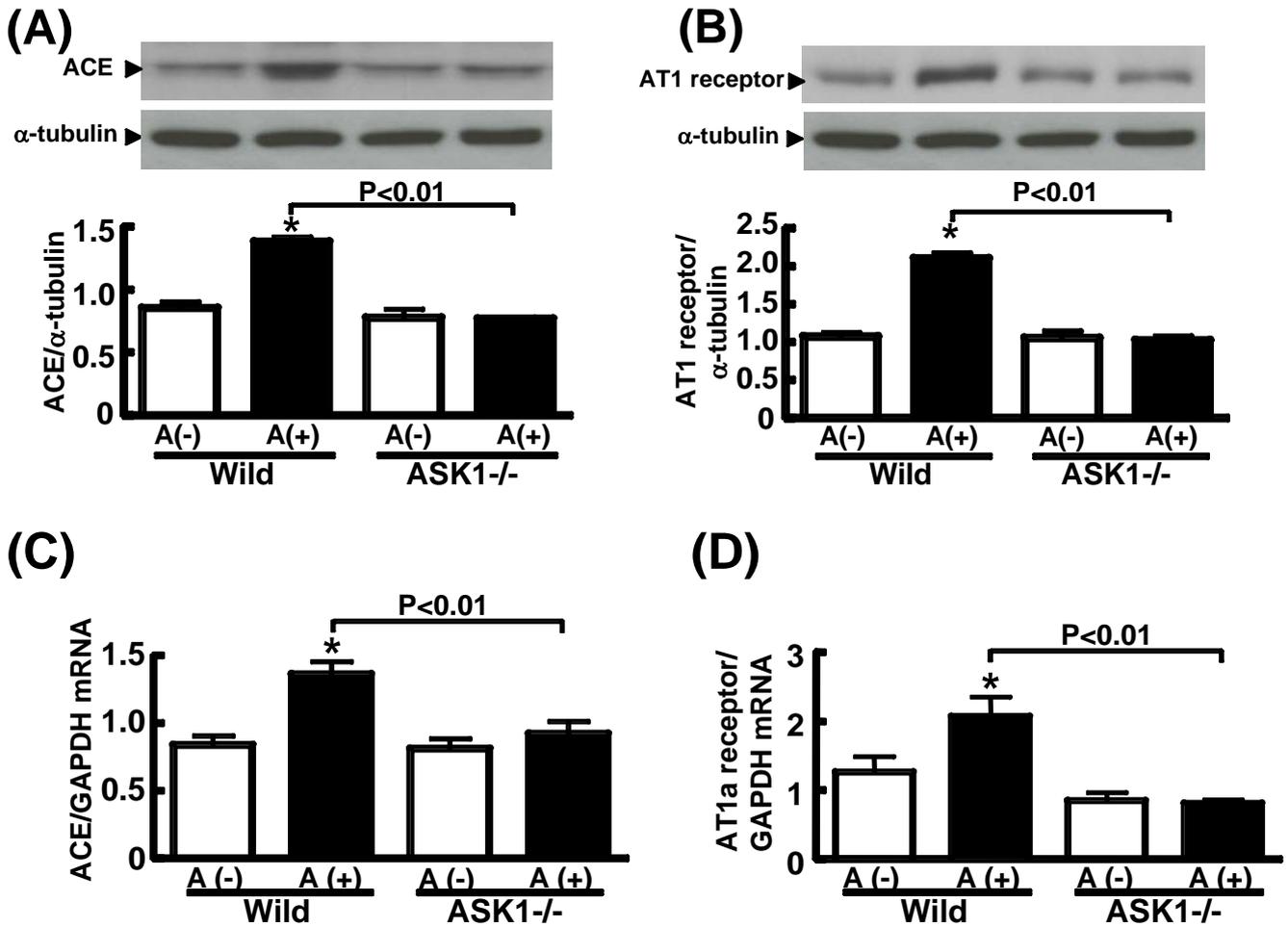
(C) ウェスタンブロット法による心臓 p22^{phox} 蛋白の検出

それぞれ、平均値±標準誤差で示されている(n=4)。

* p<0.01 vs Wild, A (-)

§ p<0.01 vs ASK1-/-, A (-)

図 11-7 アルドステロン持続投与による心臓 ACE 蛋白発現(A)、AT1 受容体蛋白発現(B)、ACE mRNA 発現(C)、AT1a 受容体 mRNA 発現(D)への影響

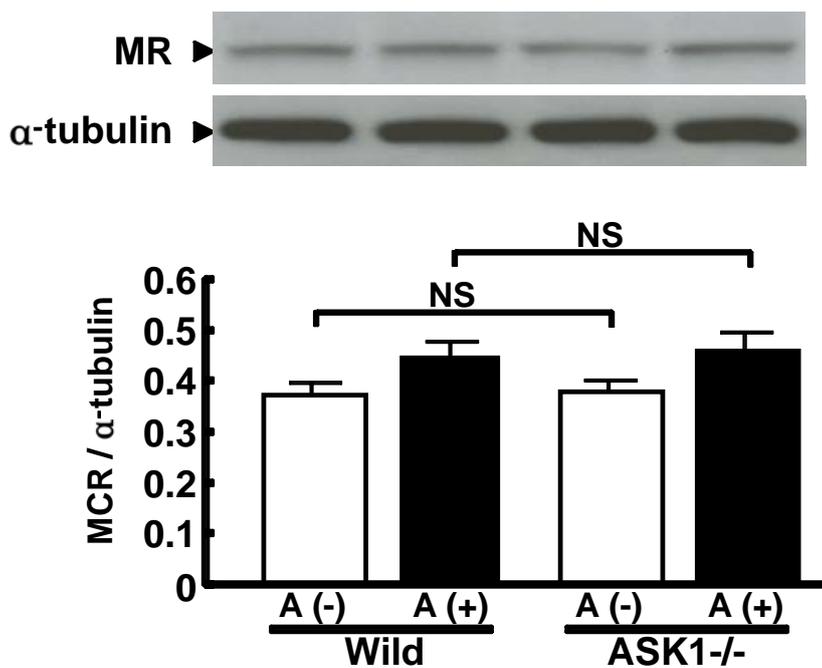


- (A) ウェスタンブロット法による心臓 ACE 蛋白の検出
- (B) ウェスタンブロット法による心臓 AT1 受容体蛋白の検出
- (C) 心臓 ACE mRNA 発現
- (D) 心臓 AT1 受容体 mRNA 発現

それぞれ、平均値 \pm 標準誤差で示されている(n=4)。

* p<0.01 vs Wild, A (-)

図 11-8 アルドステロン持続投与による心臓 MR 蛋白発現への影響



ウエスタンブロット法による心臓 MR 蛋白の検出

それぞれ、平均値 \pm 標準誤差で示されている(n=4)。

12. 文献

1. Haseroth K. et al: Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 266: 257-261, 1999
2. Takeda Y. et al: Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension.* 25: 170-173, 1995
3. Uhrenholt TR. et al: Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ Res.* 93: 1258-1266, 2003
4. Pitt B. et al: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 341: 709-717, 1999
5. Zannad F. et al: Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales investigators. *Circulation.* 102: 2700-2706, 2000
6. Pitt B. et al: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 348: 1309-1321, 2003
7. Weber KT. et al: Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 83: 1849-1865, 1991
8. Tsutamoto T. et al: Spironolactone inhibits the transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 36: 838-844, 2000
9. Rocha R. et al: Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283: H1802-H1810, 2002
10. Sato A. et al: Aldosterone-induced organ damage: plasma aldosterone

- level and inappropriate salt status. *Hypertens Res.* 27: 303-310, 2004
11. Fan YY. et al: Augmentation of intrarenal angiotensin II levels in uninephrectomized aldosterone/salt-treated hypertensive rats; renoprotective effects of an ultrahigh dose of olmesartan. *Hypertens Res.* 29: 169-178, 2006
 12. Nishiyama A. et al: Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension.* 43: 841-848, 2004
 13. Viridis A. et al: Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension.* 40: 504-510, 2002
 14. Rajagopalan S. et al: Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation.* 105: 2212-2216, 2002
 15. Lambeth JD. : NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Rev Immunol.* 4: 181-189, 2004
 16. Sumimoto H. et al: Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 677-686, 2005
 17. 住本英樹: 蛋白質核酸酵素. 50: 302-309, 2005
 18. Harada E. et al: Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation.* 104: 137-139, 2001
 19. Sugiyama T. et al: Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells. *Endocrinology.* 146: 3900-3906, 2005
 20. Fareh J. et al: Cardiac type-1 angiotensin II receptor status in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in rats. *Hypertension.* 30: 1253-1259, 1997
 21. Ichijo H. et al: Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways.

- Science*. 275(5296): 90-94, 1997
22. Noguchi T. et al: Recruitment of TRAF family proteins to the ASK1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem*. 280: 37033-37040, 2005
 23. Fujino G. et al: Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol*. 27: 8152-8163, 2007
 24. Iriyama T. et al: ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J*. 28: 843-853, 2009
 25. Nishida E. et al: The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci*. 18: 128-131, 1993
 26. Marshall CJ. : Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80: 179-185, 1995
 27. Treisman R. : Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. 8: 205-215, 1996
 28. Chang L. et al: Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature*. 410: 37-40, 2001
 29. Hirosumi J. et al: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 420: 333-336, 2002
 30. Sweatt JD. : Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 14: 311-317, 2004
 31. Iwasa H. et al: Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signaling pathway. *Genes Cells*. 8: 131-144, 2003
 32. Izumiya Y. et al: Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res*. 93: 874-883, 2003
 33. Izumi Y. et al: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in

- injured artery and its critical role in neointimal hyperplasia. *Circulation*. 108: 2812-2818, 2003
34. Izumi Y. et al: Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25: 1877-1883, 2005
 35. Yamamoto E. et al: Novel mechanism and role of angiotensin II-induced vascular endothelial injury in hypertensive diastolic heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27: 2569-2575, 2007
 36. Tobiume K. et al: ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*. 2: 222-228, 2001
 37. Rocha R. et al: Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283: H1802-1810, 2002
 38. Brilla CG. et al: Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 67: 1355-1364, 1990
 39. Garnier A. et al: Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice. *Circulation*. 110: 1819-1825, 2004
 40. Johar S. et al: Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB* 20: 1546-1548, 2006
 41. Keidar S. et al: Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*. 109: 2213-2220, 2004
 42. Cassis LA. et al: Aldosterone does not mediate angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Br J Pharmacol*. 144: 443-448, 2005
 43. Tanaka N. et al: Transthoracic echocardiography in models of cardiac

- disease in the mouse. *Circulation*. 94: 1109-1117, 1996
44. Nakamura T. et al: Beneficial effects of pioglitazone on hypertensive cardiovascular injury are enhanced by combination with candesartan. *Hypertension*. 51: 296-301, 2008
 45. Nakamura T. et al: Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke*. 38: 3016-3022, 2007
 46. Yamamuro M. et al: Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium. *Endocrinology*. 147: 1314-1321, 2006
 47. Griendling KK. et al: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 86: 494-501, 2000
 48. Takimoto E. et al: role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 49: 241-248, 2007
 49. Sun Y. et al: Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 161: 1773-1781, 2002
 50. Hirono Y. et al: Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension; the possible role of local renin-angiotensin system. *Endocrinology*. 148: 1688-1696, 2007
 51. Park YM. et al: NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 313: 812-817, 2004
 52. Di Zhang A. et al: Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension*. 52: 1060-1067, 2008
 53. Lemarie CA. et al: New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone. *J Mol Med*. 86: 673-678, 2008
 54. Iris Z. et al: Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription

- via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res.* 96:643-650, 2005
55. Catherine A. et al: New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone. *J Mol Med.* 86: 673-678, 2008
 56. Struthers AD. et al: Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovascular Research.* 61: 663-670, 2004
 57. Stas S. et al: Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. *Endocrinology.* 148: 3773-3780, 2007
 58. Fujita T. : Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. *J Mol Med.* 86: 729-734, 2008
 59. Robert V. et al: Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension.* 33: 981-986, 1999
 60. Schiffrin EL. et al: Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 63: 1522-1527, 1985
 61. Ullian ME. et al: Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension.* 20: 67-73, 1992
 62. Hayashi H. et al: Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens Res.* 31: 363-375, 2008
 63. Pagano PJ. et al: Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 14483-14488, 1997
 64. Gorlach A. et al: A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 87: 26-32, 2000

65. Li JM. et al: Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 277: 19952-19960, 2002
66. Callera GE. et al: Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension.* 45: 773-779, 2005
67. Campbell SE. et al: Myocardial fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol.* 269: E657-E662, 1995