

目次

1.	要旨	4
2.	発表論文	5
3.	謝辞	5
4.	略語一覧	6
5.	研究の背景と目的	7
	5-1 食塩と血圧と臓器障害	
	5-2 酸化ストレスと ASK1 と心血管病変	
	5-3 食塩過剰摂取と酸化ストレス	
	5-4 本論文の目的	
6.	実験方法	12
	6-1 実験動物	
	6-2 高食塩負荷と経時的血圧、尿データの取得、解剖	
	6-3 尿中電解質濃度、浸透圧、PRA、アルドステロンの測定	
	6-4 心臓の組織学的変化の評価	
	6-5 免疫染色	
	6-6 組織スーパーオキシドの評価	
	6-7 ウェスタンブロット	
	6-8 血管弛緩反応の評価	
	6-9 統計解析	
7.	実験結果	16
	7-1 高食塩食負荷の血圧、体重、心重量への影響	
	7-2 高食塩負荷の食餌量、飲水量、尿パラメーターへの影響	
	7-3 高食塩負荷のレニン・アンジオテンシン系への影響	
	7-4 高食塩負荷の心臓、血管の ASK1、p-38 への影響	
	7-5 高食塩負荷の心臓線維化への影響	
	7-6 高食塩負荷の新組織の炎症への影響	
	7-7 高食塩負荷の酸化ストレスへの影響	
	7-8 高食塩負荷の血管弛緩反応、血管組織酸化ストレスへの影響	
8.	考察	30
	8-1 本研究の結果の概要	

- 8-2 ASK1 は高食塩負荷により活性化され、心血管障害に関与している
- 8-3 ASK1 を介した TGF β 1 の発現亢進
- 8-4 高食塩負荷の酸化ストレスに対する影響と ASK1 (1)- 心臓の障害
- 8-5 高食塩負荷の酸化ストレスに対する影響と ASK1 (2)- 血管内皮障害
- 8-6 当研究の限界
- 8-7 臨床応用への展望

9.	結語	33
10.	参考文献	34

1. 要旨

【目的】食塩の過剰摂取と心血管イベントと関わりは古くから指摘されているが、その詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、正常血圧のマウスにおける高食塩負荷による心血管障害と、ストレス応答性のMAPKKKである、apoptosis signal-regulating kinase (ASK)1の関連性について明らかにすることを目的とした。

【方法】野生型マウスとASK1欠損マウスに正常食と高食塩食を10週間与え、血圧、食事摂取量、飲水量、尿量、尿電解質、心血管障害に関する影響を比較した。実験期間中にはメタボリックケージによる代謝パラメータの測定、採尿、非観血的血圧測定を行い、負荷10週後にマウスを解剖し、血液、臓器を採取、各種パラメータを検討した。

【結果】野生型マウスとASK1欠損マウスに高食塩食を与えると、両マウスにおいて食事摂取量、飲水量、尿量、尿中Na排泄は同程度に増加し、また、血漿レニン活性、血中アルドステロン濃度は減少した。これらの結果にASK1の欠損が影響しないことから、ASK1は、Na利尿や全身レニン・アンジオテンシン系における有意な役割はないという事が示された。野生型マウスへの高食塩負荷では、心臓や血管でのASK1のリン酸化が活性化していた。野生型マウスでは高食塩食により、心臓のtransforming growth factor- β 1 (TGF β 1)の発現が増加しており、心筋間質や冠動脈周囲の線維化が亢進し、炎症細胞浸潤も増加していた。また、心臓組織でのNox2の発現が増加しており、スーパーオキシドの産生も増加していた。これらの高食塩負荷による心臓の障害は全てASK1欠損マウスでは有意に軽減されていた。野生型マウスに対する高食塩負荷では、心臓の障害と伴にアセチルコリンによる血管弛緩反応も障害されていた。野生型マウスの血管におけるNox2発現、スーパーオキシドの産生は、高食塩負荷により亢進していたが、ASK1欠損マウスでは、これらの血管障害も有意に軽減されていた。

【考察】正常血圧のマウスに高食塩負荷を比較的長期に行うと、血圧は上昇せずとも、心臓、血管の組織でASK1の活性化を伴った、酸化ストレス増加、炎症が起こり、心血管の障害が惹起された。これらの反応は、ASK1欠損マウスでは有意に軽減される事から、ASK1は、正常血圧マウスへの高食塩負荷による心血管障害で、重要な役割を果たしている事が示された。

【結論】正常血圧マウスに対する高食塩負荷による心臓の線維化や血管内皮障害には、ASK1を介した、酸化ストレスの亢進と炎症が関与している。

発表論文

Apoptosis signal-regulating kinase 1 deficiency eliminates cardiovascular injuries induced by high-salt diet

Journal of Hypertens. 2010 Oct 7. [Epub ahead of print]

Kataoka K¹⁾, Tokutomi Y¹⁾, Yamamoto E¹⁾, Nakamura T¹⁾, Fukuda M¹⁾,
Dong YF¹⁾, Ichijo H²⁾, Ogawa H³⁾, Kim-Mitsuyama S¹⁾.

1) Department of Pharmacology and Molecular Therapeutics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto, Japan

2) Laboratory of Cell Signaling, Tokyo University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan

3) Department of Cardiovascular Medicine, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto, Japan.

2. 謝辞

本研究を行うにあたり、直接多大なるご指導頂いた光山勝慶教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にご支援頂いた小川久雄教授、一條秀憲教授を初め、多くの先生方に深く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたりご協力頂いた、研究室の教官、大学院生、実験技官、秘書の皆様方にも心より御礼申し上げます。

4. 略語一覽

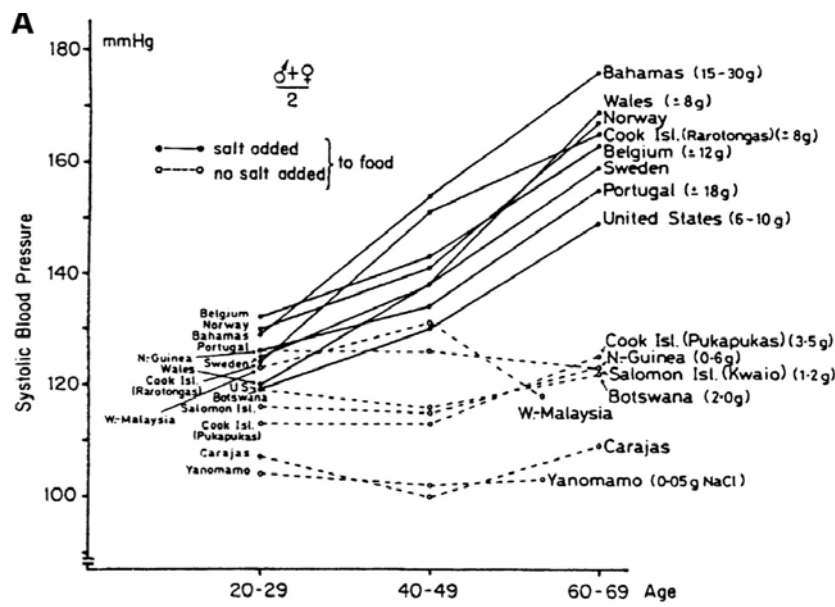
ASK1	apoptosis signal regulating kinase 1
DHE	dihydroethidium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ecSOD	extracellular superoxide dismutase
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase
HS	high salt
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen activated protein kinase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NS	normal salt
PEG-SOD	Polyethylene glycol, covalently linked to superoxide dismutase
PFA	paraformaldehyde
ROS	reactive oxygen species
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean SOD
SNP	sodium nitroprusside
TGF- β	transforming growth factor β
WT	wild type

5. 研究の背景と目的

5-1 食塩と血圧と臓器障害

我が国の高血圧患者数は3000万人を越えていると推定されており、成人の約1/3、高齢者では約6割が高血圧であるとも言われている。

先進諸国で高血圧患者が増えている原因として、食塩摂取が過多になっていることが挙げられる。食塩の血圧上昇作用は古くから疫学研究で示されており、世界32カ国からの1万人以上を対象としたINTERSALT研究¹でも食塩摂取量と血圧値に相関があることが示されている。

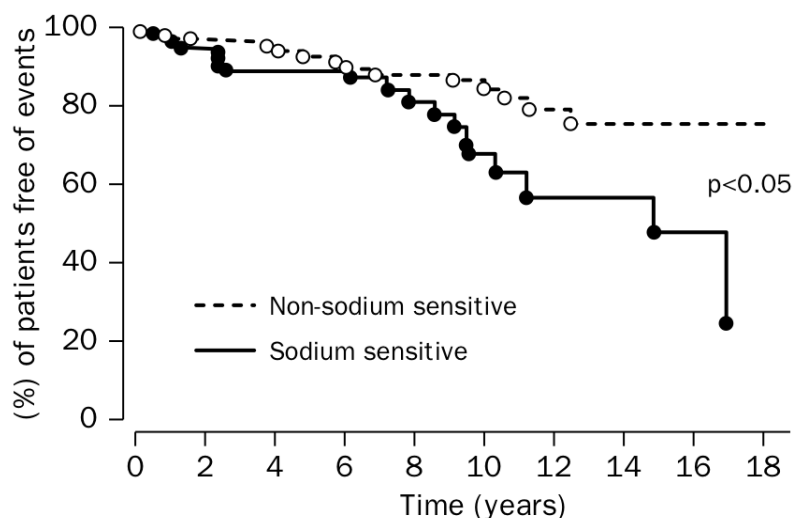


背景-図1 食塩摂取量と収縮期血圧 (INTERSALT 研究¹より)

食塩摂取と高血圧が密接に関連していることは、医学的にも疫学的にも明らかであり^{2 3 4 5}、減塩の重要性が訴えられて久しいが、未だ食塩過剰摂取が高血圧を起こすメカニズムについては、不明な点も多い。

近年、食塩過剰摂取が血圧とは独立して種々の臓器障害を促進するという可能性が指摘されている⁶。例えば、Finlandにおける成績では、血圧を補正しても、食塩摂取量の増加に伴い、虚血性心疾患は、1.56倍、脳卒中は1.36倍、全死亡は1.22倍の有意に増加したという事が報告されている⁷。

一方で、血圧に対する、食塩過剰摂取の影響は個人差があることが分かっている⁸。Morimotoらの研究では、食塩に対する血圧の反応により、食塩感受性群と食塩非感受性群に分けると、食塩感受性群は、病気を発症する率が有意に高い事を示している⁹。



背景-図2 食塩感受性とイベント発生率(文献9より引用)

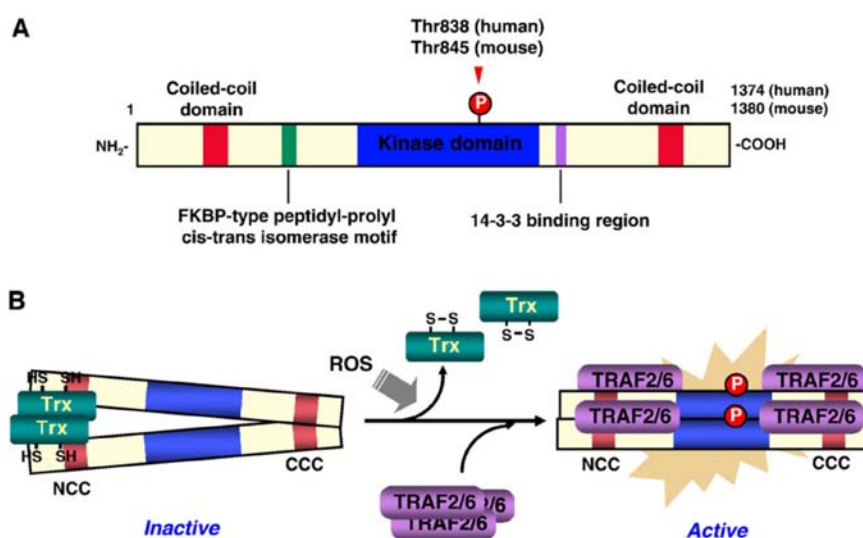
以上の背景から、食塩摂取による高血圧および臓器障害は、高齢化社会を迎えるにあたり大きな問題となる可能性が高いにもかかわらず、詳細なメカニズムは分かっておらず、非常に重要な研究のターゲットである。

5-2 酸化ストレスとASK1と心血管病変

酸化ストレスは、心血管病変と密接に関係しており、この関連のメカニズム解き明かす事は、心血管病の予防、治療につながりうる。心血管での酸化ストレスの産生系としては、ミトコンドリア電子伝達系、NADPH オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、eNOS アンカップリングなどが重要なものとして挙げられる¹⁰。これら由来の酸化ストレスは直接的にも間接的にも臓器に影響を与え、しばしば疾患の原因となる。

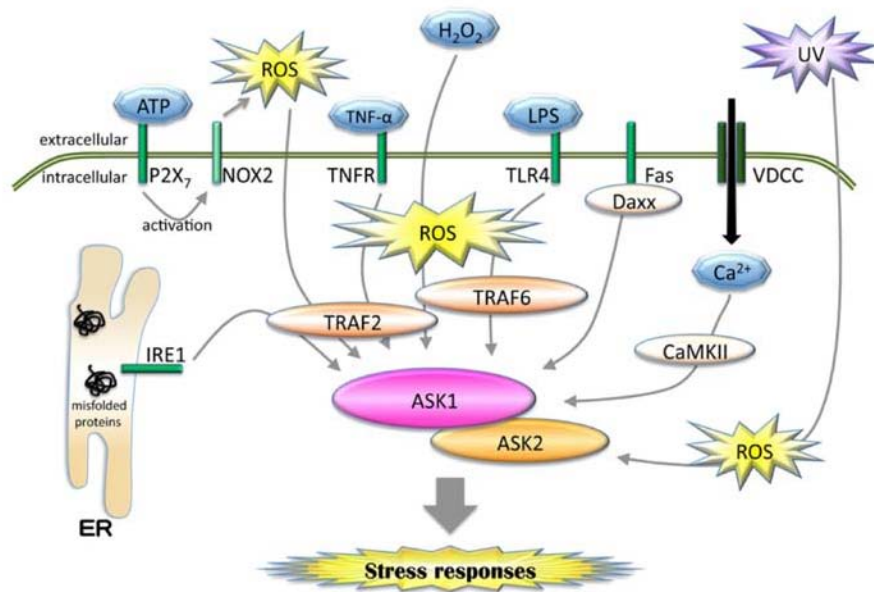
ASK1は、酸化ストレスを含む様々なストレスによって活性化されるMAPKKKであり、細胞外から受ける環境ストレスを細胞内に伝え、細胞死や細胞増殖、細

胞分化など導くシグナル伝達において非常に重要な役割を果たしている^{11,12}。酸化ストレスが少ない状態では、ASK1はチオレドキシシンと結合しており、不活性化状態にある（背景-図3A）が、活性酸素によりチオレドキシシンが酸化型となりASK1から解離すると、ASK1は活性化する。ASK1はオリゴマーとして細胞内に存在しており、背景-図3Bの様に、チオレドキシシンが解離する際、リン酸化され、TRAFなどの他因子と結合し活性化する事が分かっている¹³。ASK1はMAPKKKなので、活性化すると、下流のMAPKであるp38やJNKがリン酸化される。このASK1→p38 and/or JNKのシグナルが数々の病態で重要な役割を果たしている。



背景-図3 チオレドキシシンとASK1の活性化(文献13より引用)

このチオレドキシシン-ASK1のシステムは、細胞がさらされている酸化ストレスのセンサーとして働くので、酸化ストレスそのもののみならず、ERストレス、UV等がこの系を活性化するが、注目に値する事は、いくつかのレセプターがこのシステムを使って、細胞内にシグナルを伝達するという事である¹⁴（背景-図4）。例えば、TNF α のレセプターや、Toll like receptor 4などは、このASK1のシステムを介してリガンドに対する細胞反応を惹起している。



背景-図4 ASK1の活性化の上流(文献14より引用)

我々の研究室では、拡張障害型の心不全において、キサンチンオキシダーゼ由来の酸化ストレスによるASK1の活性化が臓器障害に重要な役割を果たしていることや、Angiotensin IIやAldosteroneの刺激により生じる、NADPHオキシダーゼ、あるいはeNOSアンカップリング由来の酸化ストレスがASK1を活性化し、心肥大、血管内皮障害が起こっている事を示してきた^{15 16 17 18}。ASK1欠損マウスを用いて検討した多くのエビデンスにより、この酸化ストレス→ASK1→MAPKのシステムは心血管系の病態で非常に役割が大きいということが明らかになっている。

5-3 食塩過剰摂取と酸化ストレス

近年の研究により、食塩による臓器障害のメカニズムに酸化ストレスが関与していることが明らかになっている^{19 20 21}。食塩感受性高血圧の動物に対する高食塩負荷による検討によると、酸化ストレスを介して高血圧が起こり、心臓、腎臓、血管の障害が起こっていること²²を、多くの論文が示している。

5-4 本論文の目的

食塩過剰摂取は、高血圧と臓器障害を引き起こすということは、多くの論文

が示しているが、そのメカニズムを論じる為に、ほとんどの論文が食塩感受性の高血圧動物を使用している。正常血圧の哺乳動物に対して、高食塩負荷を行っても、軽度の心肥大、血管内皮障害などの臓器障害がおこることがわかっており^{23 24}、マウスに対する実験的高食塩負荷でも、血圧はほとんど変化することなく、臓器障害が惹起されるが、そのメカニズムの詳細は未だ明らかではない。

そこで、今回の研究では、正常血圧マウスへの慢性食塩負荷による臓器障害のメカニズムにASK1が関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

6. 実験方法

6-1 実験動物

雄の ASK1 欠損マウスと、遺伝子背景の同じ野生型マウス (C57BL/6) をこの実験に用いた。実験動物は 12 時間毎の明暗の照明の調節が行なわれている部屋で適切な標準の温度、湿度の元、飼育、実験を行った。野生型マウスは、日本 SLC から購入した。本実験は、熊本大学動物実験委員会のガイドラインに基づいて行なわれた。

6-2 高食塩負荷と経時的血圧、尿データの取得、解剖

18 週令の ASK1 欠損マウス (n=35) と、同週令の野生型マウスを 2 グループに分け、(1)通常食 (0.5%NaCl) と(2)高食塩食 (8%NaCl) をそれぞれ 10 週間与えた。負荷期間中には、経時的に非観血的血圧 (tail-cuff method:BP98A; Softron) を測定した。負荷後 3, 5, 7 週で、マウスを個々にメタボリックケージ (LSG Co.; TECNIPLAST 3600M021) に入れ、24 時間尿を集め各パラメーターを測定した。10 週間の負荷期間の後、エーテル麻酔下で、解剖を行い、血漿を採取、心臓、胸腹部大動脈を摘出し、各組織学的、生化学的な評価を行った。

6-3 尿中電解質濃度、浸透圧、PRA、アルドステロンの測定

尿の Na, K 濃度は、イオン選択性電極法で測定した。尿浸透圧は、凝固点降下法で測定した。血漿レニン活性 (PRA) と血漿 Aldosterone 濃度は RIA 法により測定した。

6-4 心臓の組織学的変化の評価

10 週間の負荷の後、解剖し摘出した心臓は、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、パラフィンに包埋した後、5 μ m で切片を作製した。心臓線維化の評価は 0.5%飽和ピクリン酸水溶液で溶解した Sirius red F3BA で染色後、画像解析ソフト (LuminaVision ver.2.2) を用いて評価した。

6-5 免疫染色

心臓、血管の凍結切片または、パラフィン切片を用いて免疫染色を行った。

パラフィン切片は、脱パラフィン後、EDTA (1mM) を用いた熱処理による抗原賦活化を行い、標準的免疫化学染色を行った。

免疫化学染色には一次抗体として以下の抗体を用いた。

- anti-CD45 antibody (Rat, 1:300 dilution, BD Pharmingen)
- anti-CD68 antibody (Rat, 1:300 dilution, AbD Serotec)
- anti-TGF β 1 antibody (Rabbit, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-Nox2phox antibody (Rabbit, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-p22phox antibody (Rabbit, 1:150 dilution, Santa Cruz Biotechnology),
- anti-nitrotyrosine (Rabbit, 1:200 dilution, Millipore)

一次抗体で切片を処理後、一次抗体の作製種により以下の二次抗体から選択し、使用した。

- HRP conjugated anti Rat IgG secondary antibody (ZYMED)
- anti Rabbit IgG secondary antibody (DAKO Cytomation)
- the goat ABC staining system (Santa Cruz Biotechnology)

HRP 活性の可視化は、3,3'-diaminobenzidine (Dako Cytomation)にて行った。

心組織中の CD45 と CD68 の浸潤は、顕微鏡で 200 倍で拡大した、3 視野中の陽性細胞をカウントし、平均した数値を各動物のデータとした。

免疫染色を用いたタンパク発現の組織学的半定量 (semi-quantitative measurement) は、画像解析ソフト (Lumina Vision) を用いて免疫化学法の発色の強さの数値化を行い、各個体のデータを得た。

6-6 組織スーパーオキシドの評価

摘出した、心臓と大動脈は、Tissue-Tek OCT に包埋し凍結した。10 μ m で凍結切片を作製し、乾燥後、固定をせずに、5 μ M の dihydroethidium (DHE) で 37°C で 30 分間 incubation を行い、洗浄後グリセロールで封入を行い、即座に組織スーパーオキシドの定量を行った。具体的には DHE 処理した切片を、520-540nm の蛍光で励起し、rhodamine フィルターを通った光を蛍光顕微鏡と画像解析ソフトウエア (Lumina Vision) でコンピューターに取り込み、DHE のシグナルの数値化を行い、各個体のデータとした。

6-7 ウェスタンブロット

心臓、血管の組織を、凍結粉碎し、タンパク質抽出緩衝液を加え、さらに氷

上で 10 秒間ソニケーションを行い、遠心分離機で得た上清をタンパク溶液とした。タンパク濃度を Bradford 法で測定し、サンプル間の濃度を一定に調整した後、熱変性させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE で分離したタンパクをセミドライ転写装置にて、PVDF メンブレンに転写した。タンパクの検出は、以下の一次抗体を用いた。

- anti-phospho ASK1 antibody (1:1000 dilution)
- anti-phospho-p38 antibody (1:5000 dilution, Cell Signaling)
- anti-Cu/ZnSOD antibody (1:20000 dilution, Stressgen)
- anti-MnSOD antibody (1:5000 dilution, Stressgen)
- anti-ecSOD antibody (1:1000 dilution, Upstate)
- anti-eNOS antibody (1:2000 dilution, Pharmingen)
- anti-phospho eNOS antibody (1:2000 dilution, Pharmingen)
- anti-GAPDH antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnologies).

適切な二次抗体との反応後、enhanced chemiluminescence method (ECL Plus; Amersham Bioscience) で発光させ、X 線フィルムに感光しバンドを可視化した。バンドの濃さは画像処理ソフト (ImageJ, NIH) を用い、数値化し、個体のデータとした。

6-8 血管弛緩反応の評価

血管用のオーガンチャンバーは、37°C に保ち、95%O₂, 5%CO₂ の混合ガスで飽和させた modified Tyrode バッファー (pH 7.4; NaCl 121 mM, KCl 5.9 mM, CaCl₂ 2.5mM, MgCl₂ 1.2mM, NaH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 15.5mM, D(+)-Glucose 11.5mM) で満たした。マウスから摘出した胸部大動脈を 1.0 mm のリングにカットし、血管内皮を傷付けない様、オーガンチャンバーの張力測定様のフックにセットし、張力を PowerLab (ADInstrument) で記録した。初期張力を 1.0 g とし、KCl (50 mM) で収縮のコントロールを取った後に、L-フェニレフリン (10⁻⁷M) で、前収縮させ、その後、Acetylcholine や Sodium Nitroprusside の濃度を漸増させながら、張力を記録し、弛緩物質濃度と血管弛緩の関係を記録した。

6-9 統計解析

データは全て、平均値±標準誤差で表記した。多群間の統計値の比較は、one-way ANOVA 後に Fisher' s PLSD test で post hoc を行った。血管弛緩反応の群間比

0、two-way ANOVA 後に Bonferroni 法で post hoc を行った。統計ソフトは、StadView(SAS Institute, Inc.)または、Prism(GraphPad Software, Inc.)を用い、 $P < 0.05$ を以て、統計学的有意とした。

7. 実験結果

7-1 高食塩食負荷の血圧、体重、心重量への影響

高食塩負荷による血圧への影響は、WT でも ASK1 欠損マウスでも有意ではなかった (Figure. 1)。Table 1 に示すように、通常食の野生型マウスの体重は ASK1 欠損マウスより、若干重かった。野生型では高食塩食を負荷した群が、通常食群のマウスより、若干体重が軽かったが、ASK1 欠損マウスでは、その差は見られなかった。野生型、ASK1 欠損、通常食、高食塩食いずれも、左室重量には影響を与えなかった。

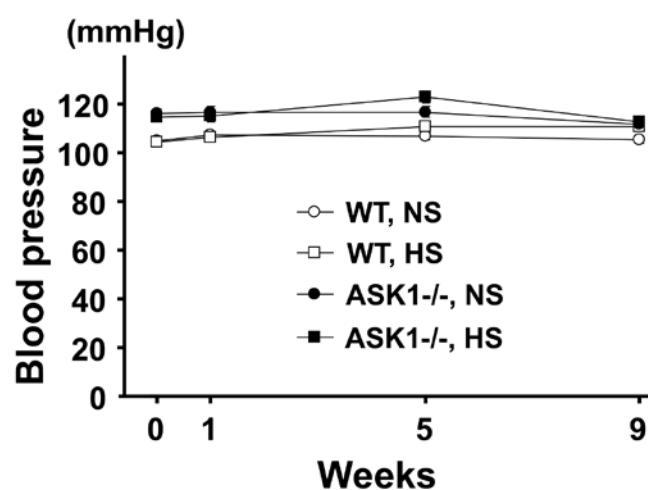


Figure 1. Effect of high-salt loading on blood pressure in wild-type and ASK1^{-/-} mice

Abbreviations used: WT, wild-type mice; ASK1^{-/-}, ASK1 deficient mice; NS, normal -salt diet; HS, high-salt diet. Each value represents mean±SEM (n=10-16)

Table 1. Body weight and left ventricular weight in wild-type and ASK1-deficient mice

Experimental group	Body weight (g)	LV weight (mg/mm tibia length)
WT, NS	33.7 ± 0.8	5.13 ± 0.19
WT, HS	31.5 ± 0.7*	5.19 ± 0.06
ASK1 ^{-/-} , NS	30.0 ± 0.8*	5.03 ± 0.15
ASK1 ^{-/-} , HS	30.3 ± 0.7*	5.30 ± 0.16

Abbreviations used: WT, wild-type mice; ASK1^{-/-}, ASK1-deficient mice; NS, normal salt diet; HS, high salt diet. Values are means ± SEM (n=10-16). * p<0.05 vs WT, NS

7-2 高食塩負荷の食事量、飲水量、尿パラメーターへの影響

Figure 2 に示すように、高食塩負荷では、食餌量、飲水量、尿量、尿中 Na 排泄，尿中 K 排泄は、野生型マウス、ASK1 欠損マウスいずれも有意に増加した。尿浸透圧は、野生型、ASK1 欠損とも有意に低下した。これらのパラメーターには、野生型と ASK1 欠損の間に有意な差を認めなかった。負荷 3 週間後、7 週間後の尿でも同傾向のデータが得られた。以上の様に、飲水量や、尿パラメーターにおける高食塩食の影響は、野生型マウス、ASK1 欠損マウスの間での有意な差は認めなかった。

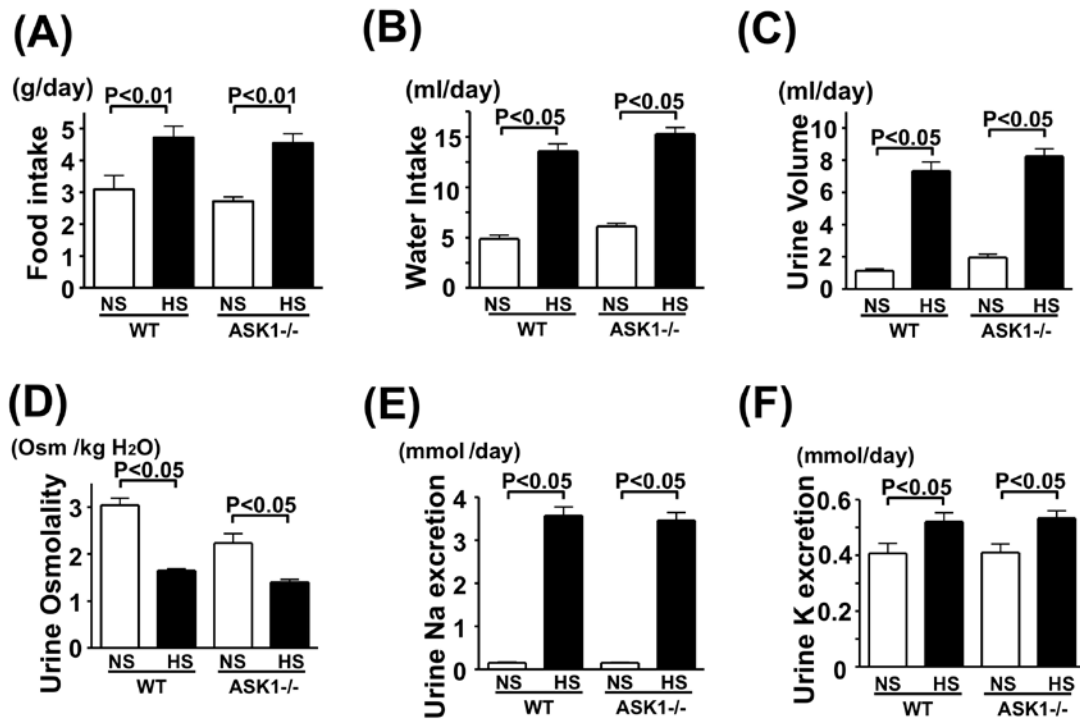


Figure 2. Effect of high-salt diet on food intake (A), water intake (B), urine volume (C), urinary osmolality (D), and urinary sodium (E) and potassium (F) excretions in wild-type and ASK1^{-/-} mice

These data were obtained from mice on a low or a high salt diet for 5 weeks. Abbreviations used: WT, wild-type mice; ASK1^{-/-}, ASK1 deficient mice; NS, normal salt diet; HS, high salt diet. Each value represents mean±SEM (n=14-16).

7-3 高食塩負荷のレニン・アンジオテンシン系への影響

Figure 3 に示すように、血漿レニン活性と血漿アルドステロン濃度は、高食塩負荷により、野生型、ASK1 欠損のいずれも低下した。野生型マウスと ASK1 欠損マウスの間には差は認めなかった。

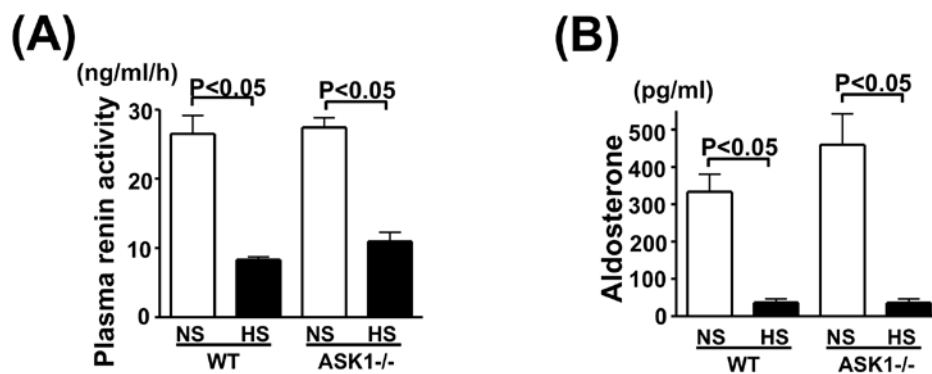


Figure 3. Effect of high-salt diet on plasma renin activity (A) and aldosterone (B) in wild type and ASK1-/- mice

Abbreviations used are the same as in Figure S1. Each value represents mean \pm SEM (n=6-10).

7-4 高食塩負荷の心臓、血管のASK1、p38 への影響

心臓、血管の組織で、ウエスタンブロットを施行したところ、野生型マウスに対する高食塩負荷により、ASK1 と、p38 のリン酸化が増加していた (Figure 4(A), 4(B), 4(C))。ASK1 欠損マウスの心臓、血管では、ASK1 のタンパクは検出できず、p38 のリン酸化は、野生型マウスと比べて顕著に低下していた (Figure 4(A), 4(B), 4(C))。

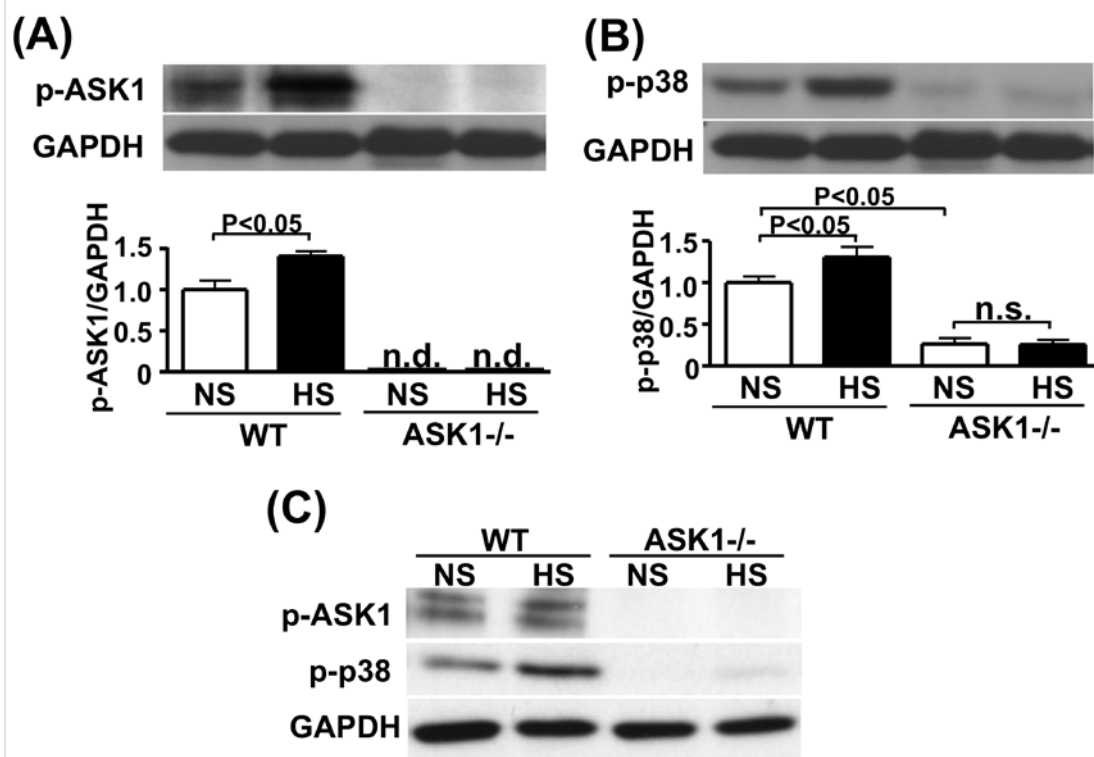


Figure 4. Effect of high-salt diet on ASK1 and p38 in cardiac (A, B) and vascular (C) tissues in wildtype and ASK1^{-/-} mice

Abbreviations used are the same as in Figure 1. n.s., not significant; n.d., not detected. Each value represents mean±SEM (n=4).

7-5 高食塩負荷の心臓線維化への影響

高食塩負荷は、野生型マウスの心筋間質の線維化と、冠動脈周囲の線維化を増加させたが、ASK1 欠損マウスでは、高食塩食負荷の線維化に対する影響は認めなかった (Figure 5 (A) and 5 (B))。心臓組織での TGF β 1 の発現は、野生型マウスでは高食塩食により増加していたが、ASK1 欠損マウスでは高食塩の影響は認めなかった (Figure 5(C))。

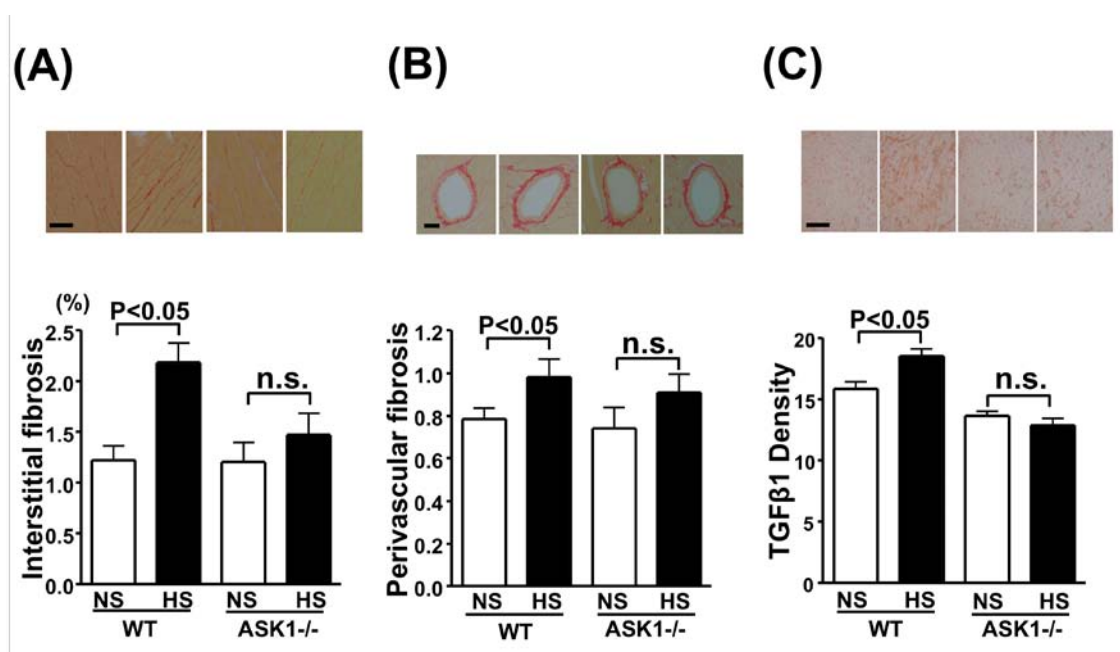


Figure 5. Effect of high-salt diet on myocardial interstitial fibrosis (A), perivascular fibrosis (B), and TGF β 1 (C) in wild-type and ASK1^{-/-} mice

Upper panels in (A), (B), and (C) indicate representative photomicrographs of cardiac sections stained with Sirius red, Sirius red, and anti-TGF β 1 antibody, respectively. Abbreviations used are the same as in Figure 1. n.s., not significant. Scale Bar=100 μ m in (A), 50 μ m in (B), and 100 μ m in (C). Each value represents mean \pm SEM(n=7-9).

7-6 高食塩負荷の心組織の炎症への影響

Figure 6 に示すように、高食塩食により、心臓組織への CD45 陽性細胞、CD68 陽性細胞の浸潤が、野生型マウスでは増加していたが、ASK1 欠損マウスでは、それらの炎症細胞の増加は認めなかった。

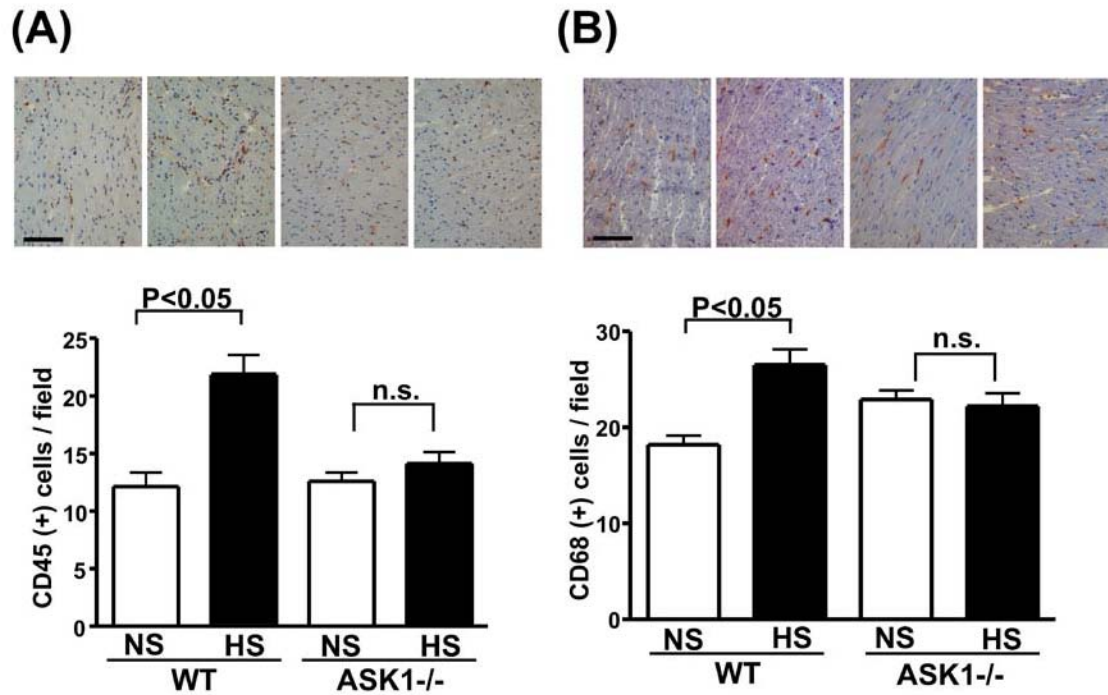


Figure 6. Effect of high-salt diet on cardiac inflammation in wild-type and ASK1^{-/-} mice

Upper panels in (A) and (B) indicate representative photomicrographs of cardiac sections immunostained with CD45 and CD68, respectively. Scale Bar=100 μ m. Abbreviations used are the same as in Figure 1. n.s., not significant. Each value represents mean \pm SEM(n=7-9).

7-7 高食塩負荷の酸化ストレスへの影響

心臓組織のスーパーオキシドを定量したところ、高食塩負荷は野生型マウスの心臓でのスーパーオキシドを増加させたが、ASK1 欠損マウスでは影響を認めなかった (Figure 7(A))。NADPH Oxidase のサブユニットである、Nox2 と p22phox の発現量を組織の免疫染色で調べたところ、高食塩負荷により、心臓 Nox2 の発現が野生型では増加していたが、ASK1 欠損マウスでは、有意な変化がなかった。また、高食塩負荷は、野生型、ASK1 欠損とも、p22phox の発現には有意な影響は認めなかった (data not shown)。ウエスタンブロットで、SOD アイソフォーム (Cu/ZnSOD, MnSOD, ecSOD) の発現を調べたが、いずれのアイソフォームも野生型マウス、ASK1 欠損マウスとも、食塩負荷での有意な影響は認めなかった (Figure 8)

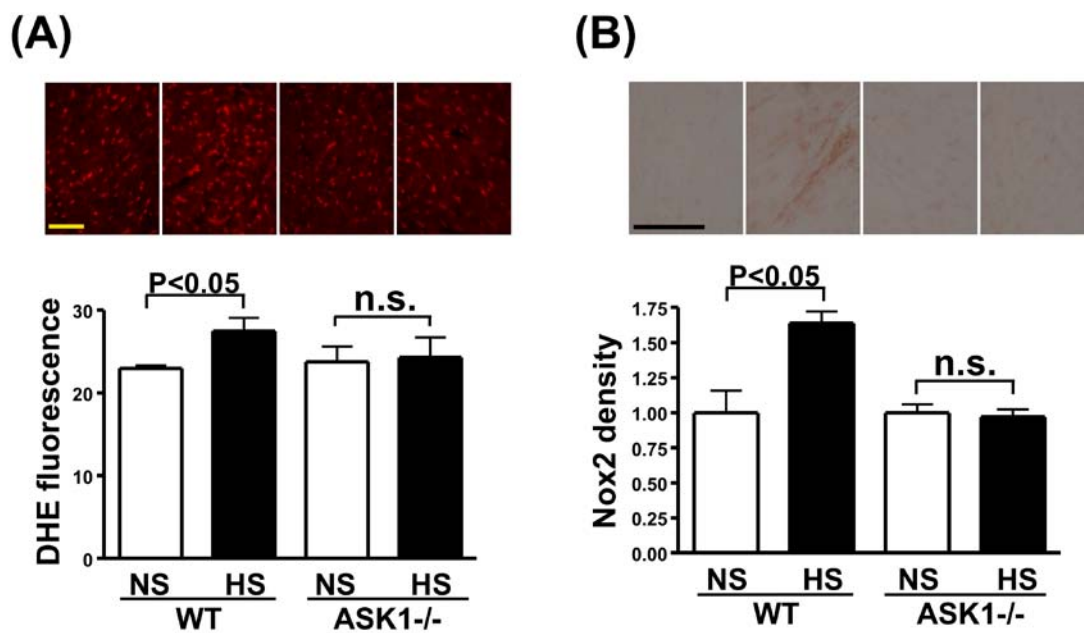


Figure 7. Effect of high-salt diet on cardiac superoxide (A) and Nox2 (B) in wild-type and ASK1^{-/-} mice

Upper panels in (A) and (B) indicate representative photomicrographs of cardiac sections stained with dihydroethidium and anti-Nox2 antibody, respectively. Abbreviations used are the same as in Figure 1. n.s., not significant. Scale Bar=100 μ m. Each value represents mean \pm SEM (n=7-9).

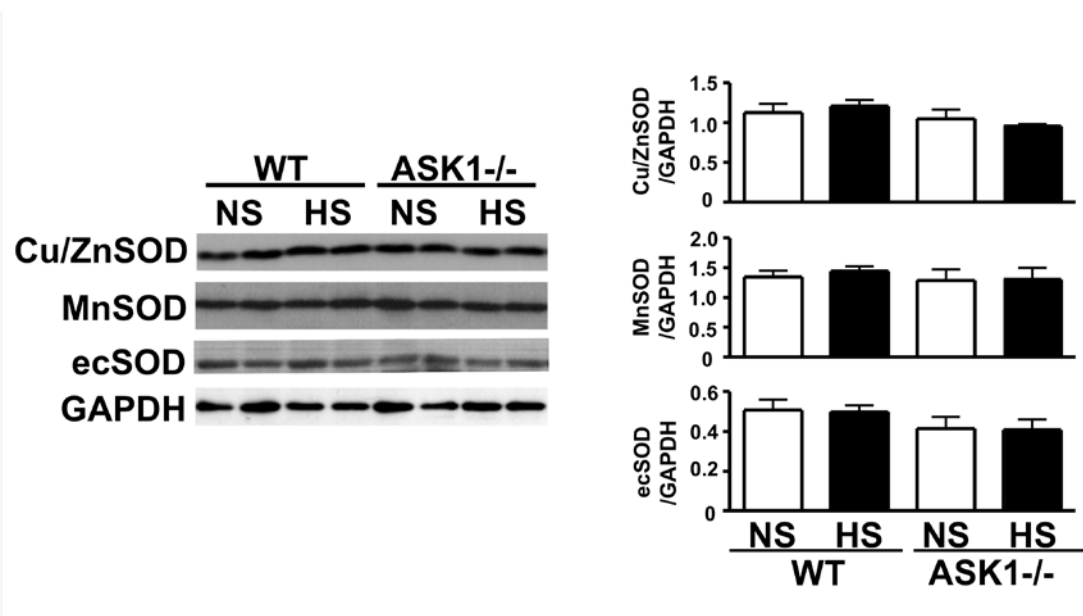


Figure 8. Effects of high-salt diet on cardiac Cu/Zn-SOD, MnSOD, and ecSOD in wild-type and ASK1-/- mice

Abbreviations used are the same as in Figure S1. Each value represents mean \pm SEM (n=4 to 6).

7-8 高食塩負荷の血管弛緩反応、血管組織酸化ストレスへの影響

アセチルコリンによる、血管内皮依存性血管弛緩反応は、高食塩負荷により野生型マウスでは有意に障害されたが、ASK1 欠損マウスでは影響を受けなかった (Figure 9(A), 9(C))。SNP による血管内皮非依存性の血管弛緩反応は、野生型、ASK1 とも高食塩食による影響を受けなかった (Figure 9(B), 9(D))。

高食塩負荷は野生型マウスの大動脈のスーパーオキシドを増加させ、同時に Nox2 の発現も増えていたが、ASK1 欠損マウスでは高食塩負荷の影響は認めなかった (Figure 10)。DHE のシグナルがスーパーオキシドによるものかを確認する為に、PEG-SOD (細胞浸透性 SOD) と DHE で同時に処理したところ、全ての群の DHE のシグナルは顕著に低下し、有意差は消失した (Figure 11)。

さらに、酸化ストレスの影響を確認するために、血管のニトロチロシンレベルを定量したところ、野生型の血管では、高食塩負荷によりニトロチロシンレベルが有意に上昇していたが、ASK1 欠損マウスでは高食塩負荷の影響を受けていなかった (Figure 12)。

高食塩負荷は、野生型、ASK1 欠損の大動脈のいずれの SOD アイソフォームにも影響を与えなかった (data not shown)。また、高食塩負荷による、野生型マウス、ASK1 欠損マウスの血管の eNOS のリン酸化も有意な影響を認めなかった (Figure 13)。

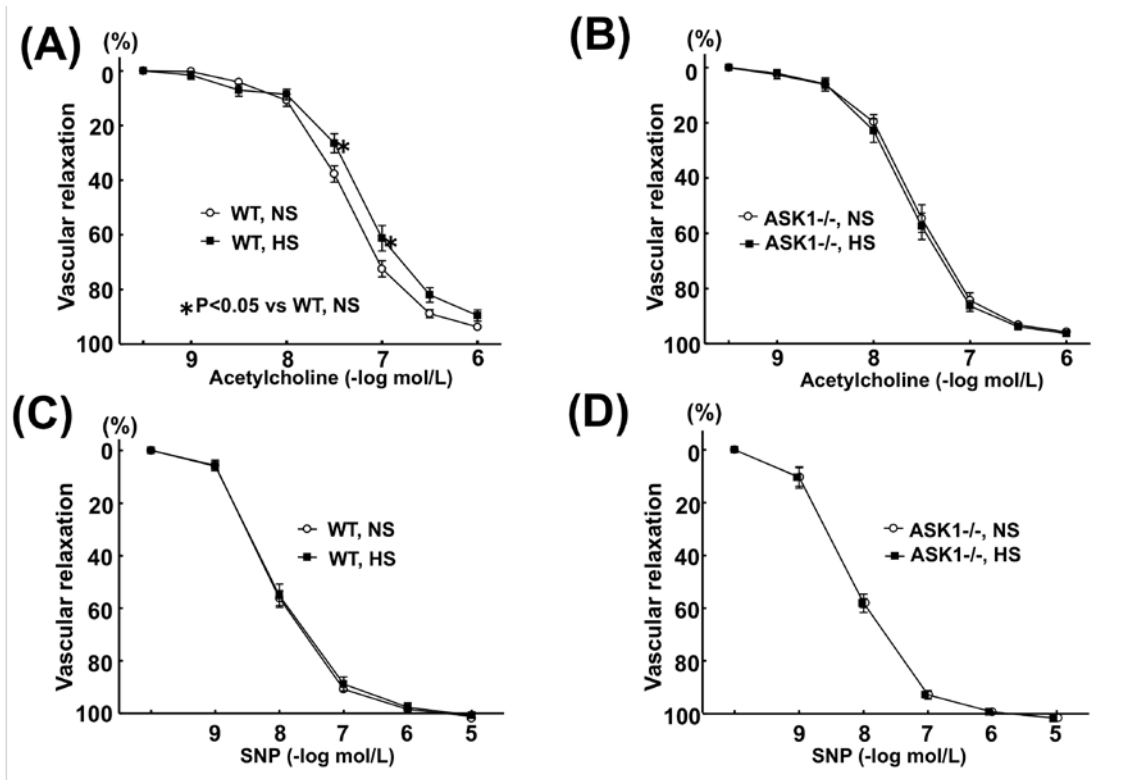


Figure 9. Effect of high-salt diet on vascular endothelium-dependent relaxation in wild-type (A) and ASK1-/- (B) mice, and vascular endothelium-independent relaxation in wild (C) and ASK1-/- (D) mice.

Abbreviations used are the same as in Figure 1. SNP, sodium nitroprusside. n.s., not significant. Each value represents mean \pm SEM (n=7-9).

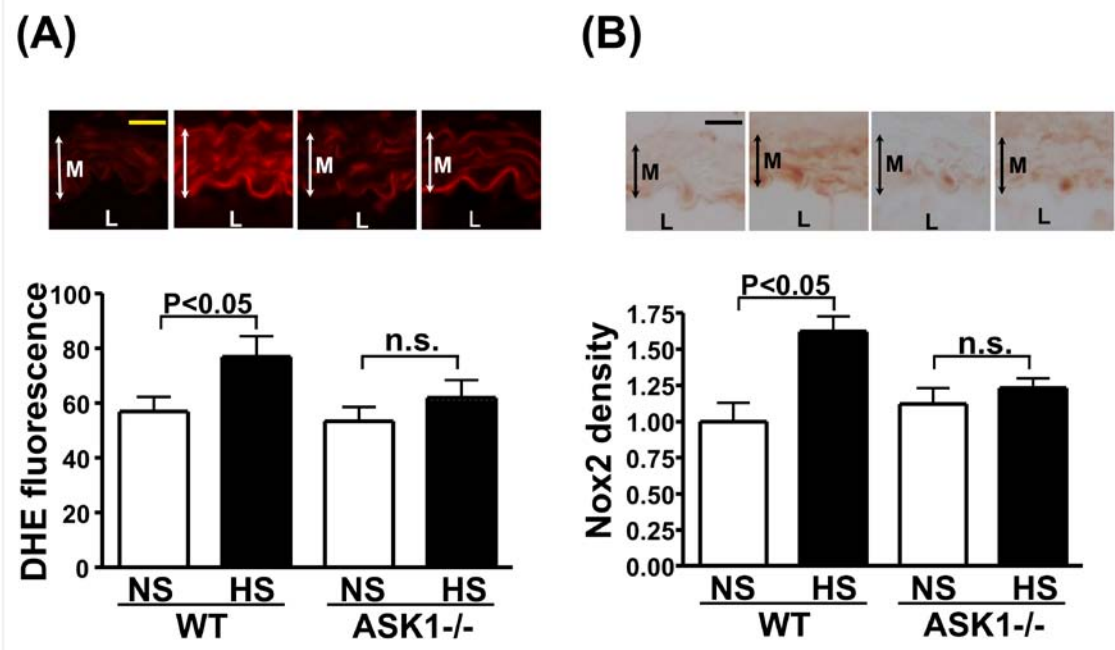


Figure 10. Effect of high-salt diet on vascular superoxide (A) and Nox2 (B) in wild-type and ASK1 deficient mice

Upper panels in (A) and (B) indicate representative photomicrographs of aortic sections stained with dihydroethidium and immunostained with Nox2, respectively. L indicates aortic lumen. M indicates medial area. Abbreviations used are the same as in Figure 1. n.s., not significant. Scale Bar=20 μ m. Each value represents mean \pm SEM (n=7to 9).

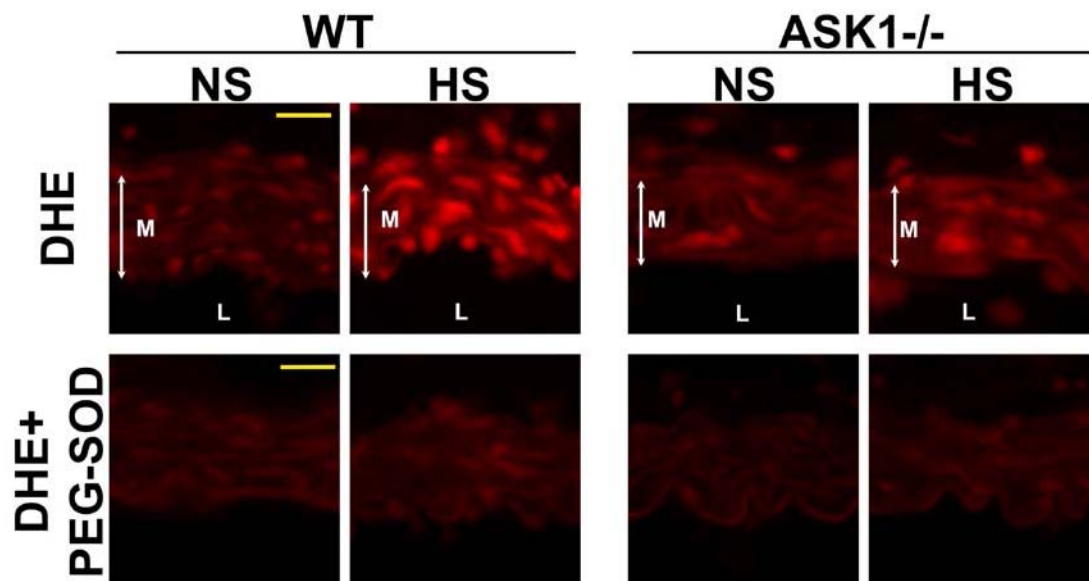


Figure 11. Effect of superoxide dismutase on DHE staining of aortic sections

To verify the contribution of superoxide to DHE signal of aortic sections, aortic sections were incubated with PEG-SOD and DHE. L indicates aortic lumen. M indicates medial area. Abbreviations used are the same as in Figure 1. Scale Bar= 20 μ m.

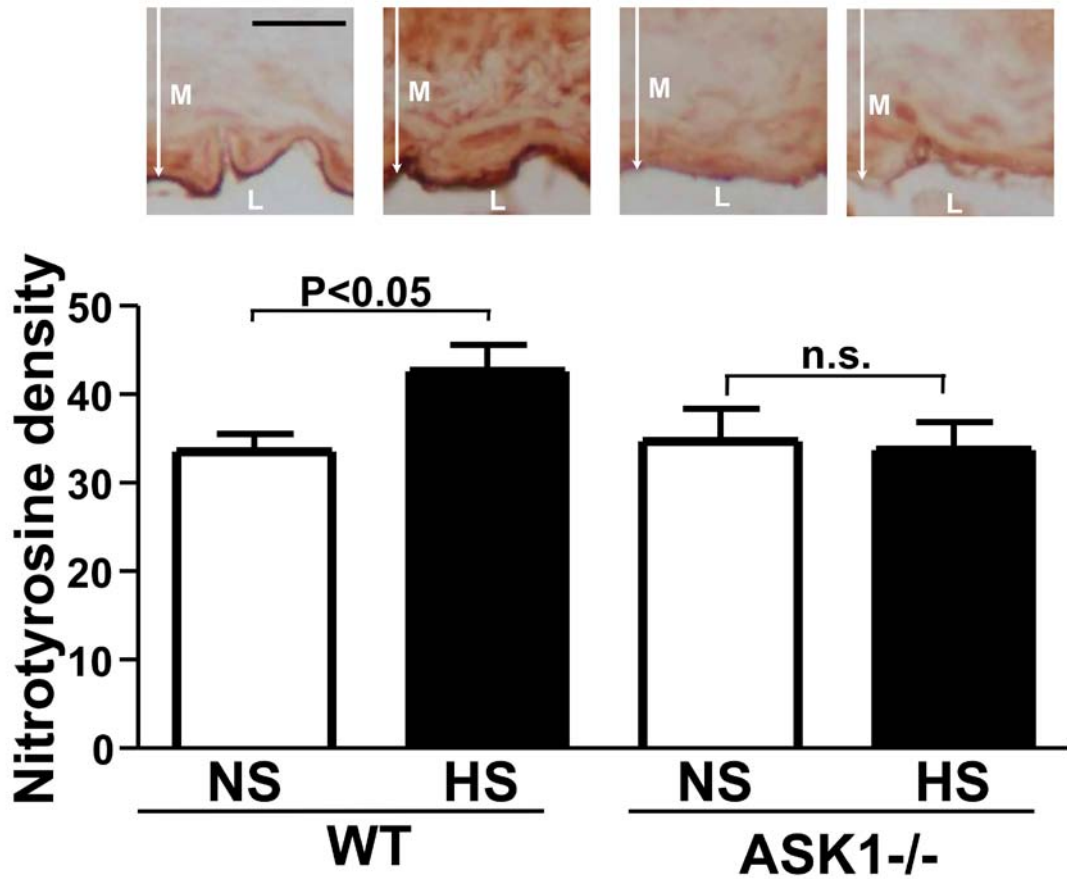


Figure 12. Effect of high-salt diet on vascular nitrotyrosine density in wild-type and ASK1 deficient mice

Upper panels indicate representative photomicrographs of aortic sections immunostained with anti-nitrotyrosine antibody. L indicates aortic lumen. M indicates medial area. Abbreviations used are the same as in Figure 1. n.s., not significant. Each value represents mean±SEM (n=7 to 9). Scale Bar= 20µm

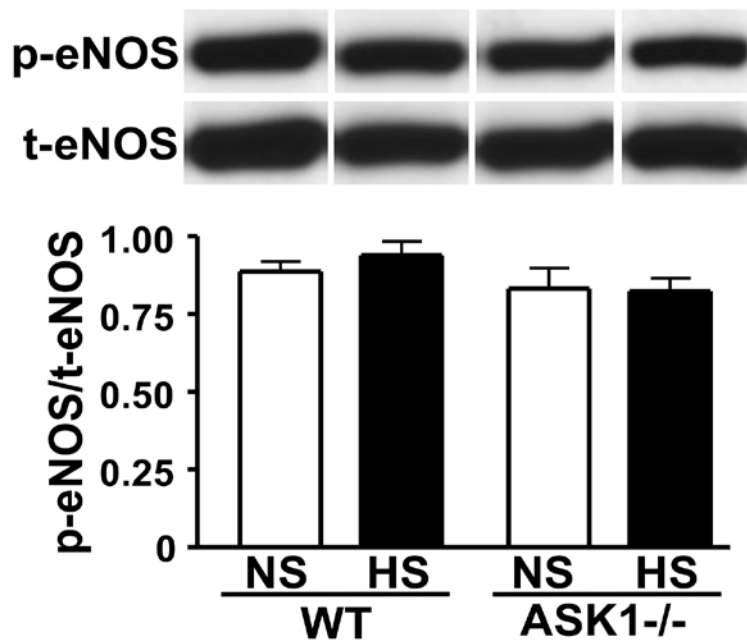


Figure 13. Effect of high-salt diet on vascular eNOS phosphorylation in wild -type and ASK1 deficient mice

Upper panels indicate representative Western blots. The lanes were run on the same gel but were noncontiguous. Abbreviations used are the same as in Figure 1. Each value represents mean±SEM (n=4).

8. 考察

8-1 本研究の結果の概要

本研究で、明らかになったことは、正常血圧マウスにおける、高食塩負荷により誘発された心臓の炎症、線維化、血管内皮障害が ASK1 をノックアウトすることにより、有意に軽減されたということである。高食塩負荷により野生型マウスで誘発される、TGF β の発現増加、Nox2 の発現増加とスーパーオキシドの増加が、ASK1 欠損マウスではブロックされることが、ASK1 欠損マウスが高食塩負荷による心血管障害が起こりにくいメカニズムである事を示した。この研究で、正常血圧マウスに対する高食塩負荷で起こる心血管障害の新しい分子メカニズムを明らかにしたといえる。

8-2 ASK1 は高食塩負荷により活性化され、心血管障害に関与している

本研究では、正常血圧の野生型マウスに対する高食塩負荷で、血圧には有意に影響することなく、心臓の炎症、線維化を増強し、血管内皮障害を誘発した。これらには、心血管での ASK1 の活性化とその下流の p38 の活性化が関与していた。さらに、ASK1 欠損マウスでは、これらの高食塩負荷に由来する、心血管障害が軽減される事が、明らかに示された。この事実は、ASK1 は食塩負荷による心血管障害において、血圧を介さないメジャーな役割があることが示された。一方で、ASK1 欠損は、高食塩負荷によって誘発される、食餌量、飲水量、Na 利尿の増加、尿浸透圧の低下には影響を及ぼさなかった。また、高食塩負荷による、血漿レニン活性や、血漿アルドステロン濃度にも影響を及ぼさなかった。よって、これらの食塩負荷による Na 利尿の亢進や、レニン・アンジオテンシン系の抑制における、ASK1 の役割はマイナーであるということも、明らかとなった。これらの結果をまとめると、本研究では、正常血圧マウスに対する高食塩慢性投与で誘発される心血管障害に直接的に ASK1 が関わっている、ということ初めて明らかにしたといえる。

8-3 ASK1 を介した TGF β 1 の発現亢進

TGF β 1 は、組織の線維化を起こす主要な growth factor としてよく知られている^{25 26}。この知見に基づき、この研究でも TGF β 1 の発現を調べたところ、野生型マウスでは、高食塩負荷により、TGF β 1 の発現が増加していたが、ASK1 欠損マウスでは、この増加が見られなかった。したがって、この TGF β 1 の発現亢

進がおこりにくいことが、高食塩負荷でも ASK1 欠損マウスに心臓の線維化が起こりにくい1つのメカニズムであることが示唆された。

8-4 高食塩負荷の酸化ストレスに対する影響と ASK1 (1) -心臓の障害

酸化ストレス^{27 28 29}、並びに eNOS^{10 30}は、心臓の炎症、線維化や、血管内皮障害に大きな関わりがある事が多くの報告から既に明らかになっている。この知見をもとに、本研究でも高食塩負荷による心血管障害における酸化ストレスと eNOS の役割について検討した。高食塩負荷により、野生型マウスでは、血圧とは独立してスーパーオキシドレベルを増加させたが、ASK1 欠損マウスでは食塩による変化がみられなかった。このメカニズムとして、NADPH オキシダーゼのサブユニットである Nox2 の発現の関与が示唆された。一方で、酸化ストレスの消去系である3つの SOD アイソフォームには発現の変化は認めず、SODs は、本実験の心臓での酸化ストレスの動きには関与していない様であった。まとめると、ASK1 欠損マウスに対する高食塩負荷で、心臓の障害が起こりにくい1つのメカニズムとして、食塩による Nox2 の発現亢進が ASK1 欠損マウスでは起こりにくく、結果 NADPH オキシダーゼ由来のスーパーオキシドの産生が増加せず、組織傷害が起こりにくいという事が示された。

8-5 高食塩負荷の酸化ストレスに対する影響と ASK1 (2) -血管内皮障害

野生型マウスに対する高食塩負荷で誘発された血管内皮障害は、Nox2 の発現増加とスーパーオキシドレベルの増加が関与していたが、今回の検討では eNOS のリン酸化や SODs の発現とは相関していなかった。ASK1 欠損マウスにおいて、高食塩食による血管内皮障害が起こらなかったメカニズムには、血管組織での食塩負荷による Nox2 の発現とスーパーオキシド産生の増加がブロックされた事と関連していると考えられた。これらのことから、正常血圧マウスへの高食塩負荷で、血圧に依存しない血管内皮障害が起こるメカニズムとして、ASK1 を介した Nox2 発現増加とそれに伴うスーパーオキシドの増加が関与していることが示された。

8-6 本研究の限界

この研究では、血圧を介さない臓器障害を捉える為に、高食塩食の負荷期間を10週間に設定した。10週間は実験期間としては比較的長期ではあるが、慢性

の高食塩負荷の影響を研究する上で、さらに長期負荷の実験を行うと、臓器障害がより顕著となり、さらに詳細な高食塩食による臓器障害のメカニズムや、ASK1 の機能が明らかになる可能性がある。

また、本研究では、高食塩により誘発される心血管障害を、特に酸化ストレスにフォーカスし、論じているが、NO に関する詳細な検討は行なっておらず、この切り口による検討により新たな知見が生まれる可能性は十分に考えられる。

高食塩負荷を行っても野生型マウス、ASK1 欠損マウスともに血圧が有意な変化を示さなかったが、これは過去の他報告^{31 32}でも同様の結果が提示されており、C57BL/6 を遺伝子背景に持つマウスでは食塩による高血圧は誘発されにくいといえる。正確なメカニズムは検討されていないので、明らかではないが、少なくとも尿量や、尿中 Na 排泄が増加することにより、水や Na が貯留しにくいということが 1 つの理由であろう。

最後に、高食塩食で心臓の線維化が亢進しても、心重量には有意差がつかなかった理由としては、様々な要因が考えられるが、心筋細胞の肥大と心筋間質の線維化は異なったメカニズムでおこる事がよくわかっており^{33 34}、必ずしも、線維化と心肥大が同時に起こるとは限らない。従って、本研究での結果の様に心筋間質線維化と心重量の結果が解離することもありうると考える。

8-7 臨床応用への展望

食塩過剰摂取そのものによる臓器障害が、血圧上昇とは独立して起こる事が示され、その食塩誘発性臓器障害は、ASK1 を介している事が明らかになった。ASK1 の活性を抑制することによる、臓器の炎症、酸化ストレスの抑制は、食塩摂取量が過剰な現代社会で心血管病を未然に防ぐストラテジーの一つとして十分に期待できる。既に開発されている ASK1 阻害薬に関する生体でのデータが待たれるところである。

9. 結語

本研究では、正常血圧マウスに対する高食塩負荷における ASK1 の役割を初めて検討したものである。血圧に依存しない、高食塩負荷自体により誘発される心臓の炎症、線維化、血管内皮機能障害は、ASK1 を介在している事が明らかになった。この機序として、すくなくとも、酸化ストレスの増強と、TGF- β 1 の発現増加が関与している。本研究により、高食塩負荷の血圧に依存しない、新しい心血管障害のメカニズムが明らかになった。

10. 参考文献

1. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ (Clinical research ed)*. Jul 30 1988;297(6644):319-328.
2. He J, Ogden LG, Vupputuri S, Bazzano LA, Loria C, Whelton PK. Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. *Jama*. Dec 1 1999;282(21):2027-2034.
3. Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev*. Apr 2005;85(2):679-715.
4. Perry IJ, Beevers DG. Salt intake and stroke: a possible direct effect. *J Hum Hypertens*. Feb 1992;6(1):23-25.
5. Zoccali C, Mallamaci F. The salt epidemic: old and new concerns. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Jun 2000;10(3):168-171.
6. De Wardener HE, MacGregor GA. Sodium and blood pressure. *Current opinion in cardiology*. Jul 2002;17(4):360-367.
7. Tuomilehto J, Jousilahti P, Rastenyte D, Moltchanov V, Tanskanen A, Pietinen P, Nissinen A. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. *Lancet*. Mar 17 2001;357(9259):848-851.
8. Fujita T, Ando K, Ogata E. Systemic and regional hemodynamics in patients with salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. Sep 1990;16(3):235-244.
9. Morimoto A, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T, Kimura G. Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential

- hypertension. *Lancet*. Dec 13 1997;350(9093):1734-1737.
10. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. Nov 10 2000;87(10):840-844.
 11. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. Jan 3 1997;275(5296):90-94.
 12. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*. Mar 2001;2(3):222-228.
 13. Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et biophysica acta*. Nov 2008;1780(11):1325-1336.
 14. Hattori K, Naguro I, Runchel C, Ichijo H. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal*. 2009;7:9.
 15. Izumiya Y, Kim S, Izumi Y, Yoshida K, Yoshiyama M, Matsuzawa A, Ichijo H, Iwao H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res*. Oct 31 2003;93(9):874-883.
 16. Yamamoto E, Kataoka K, Shintaku H, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism and role of angiotensin II induced vascular endothelial injury in hypertensive diastolic heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dec 2007;27(12):2569-2575.
 17. Izumi Y, Kim S, Yoshiyama M, Izumiya Y, Yoshida K, Matsuzawa A, Koyama H, Nishizawa Y, Ichijo H, Yoshikawa J, Iwao H.

- Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in injured artery and its critical role in neointimal hyperplasia. *Circulation*. Dec 2 2003;108(22):2812-2818.
18. Yamamoto E, Dong YF, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Matsuba S, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. *Hypertension*. Sep 2008;52(3):573-580.
 19. Banday AA, Muhammad AB, Fazili FR, Lokhandwala M. Mechanisms of oxidative stress-induced increase in salt sensitivity and development of hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. Mar 2007;49(3):664-671.
 20. Matsui H, Ando K, Kawarazaki H, Nagae A, Fujita M, Shimosawa T, Nagase M, Fujita T. Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*. Aug 2008;52(2):287-294.
 21. Nakamura T, Kataoka K, Fukuda M, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Critical role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis. *Hypertension*. Sep 2009;54(3):544-551.
 22. Shen B, Hagiwara M, Yao YY, Chao L, Chao J. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress. *Hypertension*. May 2008;51(5):1358-1365.
 23. Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. Dec 8 1998;98(23):2621-2628.
 24. Nurkiewicz TR, Boegehold MA. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via

- superoxide anion generated from nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Apr 2007;292(4):R1550-1556.
25. Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest*. Nov 2007;87(11):1077-1091.
 26. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. Jan 2008;214(2):199-210.
 27. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. Mar 17 2000;86(5):494-501.
 28. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2005;25(2):274-278.
 29. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. Feb 2007;49(2):241-248.
 30. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. Apr 4 2006;113(13):1708-1714.
 31. Mangrum AJ, Gomez RA, Norwood VF. Effects of AT(1A) receptor deletion on blood pressure and sodium excretion during altered dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep 2002;283(3):F447-453.
 32. Oliverio MI, Best CF, Smithies O, Coffman TM. Regulation of sodium balance and blood pressure by the AT(1A) receptor for angiotensin II. *Hypertension*. Feb 2000;35(2):550-554.
 33. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Aug 2006;7(8):589-600.
 34. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis:

TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners
in fibroblast activation. *Circ Res.* Jun 11
2010;106(11):1675-1680.