

学位論文
Doctoral Thesis

アンジオテンシンⅡによる高血圧性心臓傷害における
ASK1 と VEGF の役割

(Critical role of ASK1 and VEGF in angiotensin II –induced
hypertensive cardiac injury)

名幸 久仁
Hisato Nako

指導教員

光山 勝慶 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻生体機能薬理学

2011年度

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名 : アンジオテンシンⅡによる高血圧性心臓傷害におけるASK1とVEGFの役割
(Critical role of ASK1 and VEGF in angiotensin II-induced hypertensive cardiac injury)

著者名 : 名幸 久仁
Hisato Nako

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻生体機能薬理学
光山 勝慶 教授

審査委員名 :

分子遺伝学教授	尾池 雄一
代謝内科学教授	荒木 栄一
心臓血管外科学教授	川筋 道雄
細胞情報薬理学教授	中西 宏之

2011年度

目次

1. 要旨	1
2. 発表論文	2
3. 謝辞	3
4. 略語一覧	4
5. 研究の背景と目的	5
5-1 高血圧性心臓傷害とレニン・アンジオテンシン系	
5-2 酸化ストレスによる心血管傷害	
5-3 高血圧性心肥大と心筋毛細血管密度	
5-4 高血圧性心不全における心筋毛細血管密度と VEGF	
5-5 ストレス応答と MAP キナーゼカスケード	
5-6 酸化ストレスと ASK1	
5-7 VEGFとVEGFレセプターによるシグナル伝達	
5-8 本研究の目的	
6. 研究方法	11
6-1 実験動物	
6-2 研究のプロトコール	
6-3 心エコー検査	
6-4 心筋虚血の測定	
6-5 冠毛細血管密度の測定	
6-6 冠内皮アポトーシスの測定	
6-7 心臓スーパーオキシド測定	
6-8 ウェスタンブロット解析	
6-9 内皮細胞を用いた研究のプロトコール	
6-10 内皮細胞内における活性酸素種の検出	
6-11 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析	
6-12 組織学的評価と免疫組織化学検査	
6-13 統計学的解析	

7. 実験結果	16
7-1 血圧と左室重量、心機能への影響	
7-2 酸化ストレスと心筋虚血への影響	
7-3 冠毛細血管密度と冠内皮アポトーシスへの影響	
7-4 左室における VEGF と ASK1 への影響	
7-5 内皮細胞のアポトーシスにおける ASK1 と VEGF の役割	
8. 考察	18
8-1 心肥大と冠毛細血管密度	
8-2 左室肥大におけるアンジオテンシンⅡの影響	
8-3 左室肥大における酸化ストレスの影響	
8-4 冠内皮アポトーシスと VEGF・ASK1 の関連性	
8-5 今後の課題	
9. 結語	20
10. 表およびその説明	21
11. 図およびその説明	22
12. 文献	32

1. 要旨

[目的] アンジオテンシンⅡによる心傷害には酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、その詳細な分子的機序は明らかでない。今回、我々はアンジオテンシンⅡによる心臓傷害について、酸化ストレス及び冠血管に対する作用に着目し、その意義について検討した。

[方法] <実験 1> 高血圧性心不全モデルであるダール食塩高感受性ラット (DS ラット) を高食塩食で飼育し、イルベサルタン (angiotensin type I receptor blocker) 投与群、抗酸化薬のテンポール (superoxide dismutase 様物質) 投与群、ヒドララジン (血管拡張薬) 投与群に分け 4 週間投与後、心臓における酸化ストレス、冠毛細血管密度、血管内皮アポトーシス、Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) のひとつである Apoptosis-Signal Regulating Kinase 1 (ASK1)、vascular endothelial growth factor (VEGF) について比較検討した。<実験 2> VEGF と ASK1 の血管内皮アポトーシスへの関わりを検討するために、野生型マウスと ASK1(-/-)マウスの血管内皮細胞を単離培養し比較検討した。

[結果] <実験 1> DS ラットは食塩負荷を行うと著明な心肥大・線維化を来し、心臓の酸化ストレスが増加するが、更に、冠血管内皮のアポトーシスが著明に増加し、冠毛細血管密度が減少し心筋細胞の虚血面積が増加していた。イルベサルタンとテンポールは、上述の酸化ストレス産生を抑制し、冠血管の内皮アポトーシス、心筋毛細血管密度低下、心筋虚血を改善した。また、DS ラットの心臓では ASK1 の活性が増加し、一方 VEGF の発現は著明に低下していた。イルベサルタンとテンポールは、ASK1 の活性増加、VEGF の発現低下も有意に抑制していた。すなわち、DS ラットの心臓では、冠内皮アポトーシス・冠毛細血管密度低下に伴う心筋虚血が惹起されており、アンジオテンシンⅡと酸化ストレスがそれ関与していること、その分子的機序として ASK1 と VEGF が関与することが示唆された。一方、ヒドララジンは同程度の降圧効果を示したにもかかわらず、上述のような心保護作用を示さなかった。イルベサルタンとテンポールの心保護作用は、その降圧効果によるものではないと考えられた。

<実験 2> 野生型マウスに比べて ASK1 ノックアウトマウスでは過酸化水素刺激による血管内皮アポトーシスが有意に減少していた。また、VEGF 投与により、ASK1 活性化が抑制され、血管内皮アポトーシスも抑制された。更に VEGF 投与により過酸化水素刺激による細胞内の活性酸素種の発現が抑制された。

[結論] 著明な心肥大・心線維化を来した DS ラットにおいて、アンジオテンシンⅡは酸化ストレスを介して、心筋の VEGF を抑制し、ASK1 を活性化させる。この結果として、アンジオテンシンⅡは冠内皮アポトーシスを引き起こし、冠毛細血管密度を低下させ、心筋虚血を誘発し、心臓傷害をもたらす。

2. 発表論文

①関連論文

1 編 1 冊

Hisato Nako, Keiichiro Kataoka, Nobutaka Koibuchi, Yi-Fei Dong, Kensuke Toyama, Eiichiro Yamamoto, Osamu Yasuda, Hidenori Ichijo, Hisao Ogawa, Shokei Kim-Mitsuyama
Novel mechanism of angiotensin II-induced cardiac injury in hypertensive rats
-critical role of ASK1 and VEGF- *Hypertens Res.* 2011(in press)

②その他の論文

4 編 4 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. Fukuda M, Nakamura T, Kataoka K, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Ogawa H and 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
3. Dong YF, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Nako H, Ogawa H and 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
4. Yamamoto E, Kataoka K, Dong YF, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Matsuba S, Nako H, Ogawa H and 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

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、直接御指導を頂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表します。

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 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先生方に深く感謝申し上げます。

4. 略語一覽

RAS:	renin-angiotensin system
AT 1:	angiotensin type 1 receptor
ARB:	angiotensin type 1 receptor blocker
ROS:	reactive oxygen species
VEGF:	vascular endothelial growth factor
Hif-1	hypoxia-inducible factor-1
ASK 1:	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
SOD:	superoxide dismutase
LVDd:	left ventricular end-diastolic dimension
LVDs:	left ventricular end-systolic dimension
LVFS:	left ventricular fraction shortening
LVEF:	left ventricular ejection fraction
LVAW	left ventricular anterior wall
LVPW:	left ventricular posterior wall
TUNEL:	TdT-mediated dUTP nick-end labeling
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
DHE:	dihydroethidium
SDS-PAGE:	sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF:	polyvinylidene difluoride
H2DCFDA:	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
BNP:	brain natriuretic peptide
eNOS:	endothelial nitric oxide synthesis

5. 研究の背景と目的

5-1 高血圧性心臓傷害とレニン・アンジオテンシン系

レニン・アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System;RAS) は、アンジオテンシンⅡや、アルドステロンを中心としたカスケードであり、血圧や電解質バランスを調節する。RAS と高血圧は密接に関与しているが、昇圧の機序としては、アンジオテンシンⅡが AT1 受容体を介して血管平滑筋に作用して血管を収縮させることが主体である。その他にも腎の近位尿細管に作用してNa再吸収を亢進する、副腎皮質に作用してアルドステロン分泌を亢進する、中枢神経系に作用して飲水・Na摂取を促進し、交感神経活性やバゾプレシン分泌を亢進する、末梢神経系に作用して神経終末からのノルエピネフリン遊離を促進する、等の昇圧機序がある。

RAS系は血圧調節因子として創薬の標的分子となっているが、RAS系阻害薬は、腎血管性高血圧や高レニン性高血圧などの RAS系が活性化された場合だけでなく、低レニン性高血圧であっても明らかな降圧作用があること、また血中のアンジオテンシンⅡやアルドステロン濃度が元のレベル以上に上昇しても降圧作用が持続することが明らかになっている。この理由として、循環血中の RAS系に加え、局所組織レベルでの RAS系の関与が示唆されている。局所組織レベルで RAS系の各因子の mRNA 発現が確認されていること、循環 RAS系と独立して発現調節されていることが解明され、特にRAS系阻害薬の血圧低下作用に加えた長期的な臓器保護効果という観点から研究が進んでいる。近年、心血管細胞の肥大や増殖作用、いわゆるリモデリングを介した心血管疾患において局所組織での RAS の重要性が注目されている。心血管系において、アンジオテンシンⅡがアルドステロンと相互作用を持つことが報告されており、アルドステロン自体がアンジオテンシン変換酵素の発現を増加させ、さらにアンジオテンシンⅡの作用をAT1受容体以降のレベルで増強することが報告されている。¹⁻³

AT1受容体は7回膜貫通構造をとり、Gタンパク質共役型受容体に属するが、AT1受容体系活性化による種々の情報伝達系亢進の機序、およびAT1受容体自体の活性化機構あるいはAT1受容体のdownregulation の分子メカニズムについては、AT1受容体自体の立体構造の変化やリン酸化の関与などが報告されているが、なお不明な点が多い。

一方、アンジオテンシンⅡは代償性心肥大から非代償性心肥大、さらに心不全への移行に重要な役割を果たすことが報告されている。⁴⁻⁷ 様々な臨床研究により、AT1 受容体拮抗薬 (ARB) やアンジオテンシン変換酵素阻害薬といった RAS 系阻害薬が心肥大の治療に有効であるだけでなく、非代償性心肥大や心不全の治療にも有用であることが明らかになっている。^{8,9} しかし、RAS 系阻害薬が非代償性心肥大に対して持つ心保護的効果の詳細な機序は不明である。

5-2 酸化ストレスによる心血管傷害

酸化ストレスは、内因性もしくは外因性の原因で生じた活性酸素種（ROS）を生体が十分に処理することができなくなるために発生する。酸化ストレスは直接、細胞を傷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 ）、ヒドロキシラジカル（ HO^\cdot ）などが知られている。近年、糖尿病、高血圧、脂質異常症といった病態では酸化ストレスの産生が増加しており、これが血管内皮機能障害、動脈硬化、心血管リモデリングに関与していることが明らかになっている。また、アンジオテンシンⅡは血管内皮細胞、血管平滑筋細胞において酸化ストレスを増大させることが明らかにされており、増加したスーパーオキシドなどの ROS によって一酸化窒素の不活化が生じ、高血圧、動脈硬化が促進すると考えられている。しかし、アンジオテンシンⅡを介した酸化ストレスによる心傷害の詳細なメカニズムは明らかでない。

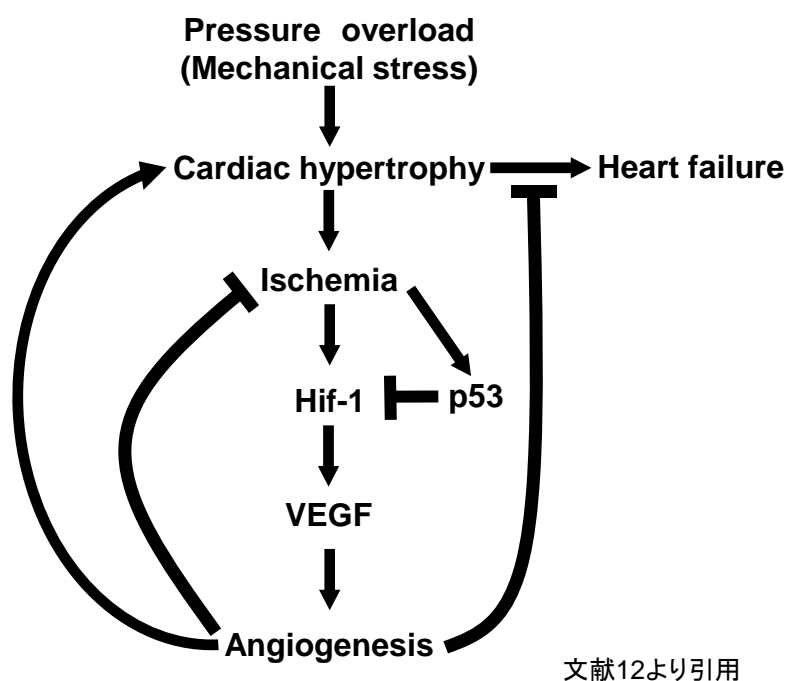
5-3 高血圧性心肥大と心筋毛細血管密度

近年、代償性心肥大から非代償性心肥大、心不全への移行には、心筋細胞そのものの異常だけでなく、心筋毛細血管密度の減少による心筋虚血も大きな影響を与えていると報告されている。¹⁰⁻¹³ 心肥大における心筋毛細血管密度の減少の機序について。しかし、この心肥大における心筋毛細血管密度の減少に関して、アンジオテンシンⅡの果たす役割は明らかでない。

5-4 高血圧性心不全における心筋毛細血管密度とVEGF

代償性心肥大期から非代償性心肥大、心不全への移行には、心筋毛細血管密度の低下が関与している。¹⁰⁻¹³ 心筋毛細血管密度には vascular endothelial growth factor (VEGF) が深く関与しており、VEGF は非代償性心肥大に至る過程において、心保護的な役割をもつことが報告示されている。¹⁴ 大動脈結紮により後負荷・高血圧を惹起したマウスを用いた研究によると、代償性心肥大期においては、機械的ストレスにより生じた心筋肥大に伴い、相対的な心筋虚血が生じるものの、hypoxia-inducible factor-1 (Hif-1) が活性化されることにより VEGF が発現し、心肥大に見合った血管新生が行われ、心不全への進行が抑制されている。しかし、血管新生は更なる心肥大を惹起し、相対的な心筋虚血の原因となる。代償性心肥大の末期になると、心筋虚血そのものが p53 を活性化させるようになる。p53 は Hif-1に直接結合し、Hif-1を不活化させるため、結果的に VEGF が抑制され、血管新生が抑制される。血管新生の抑制は、更なる心筋虚血を招き、その結果、代償性心肥大から心不全に陥る機序が報告された（次頁図A参照）。¹² しかし、高血圧性心不全において、心筋虚血や心筋毛細血管密度、VEGF に対し、アンジオテンシンⅡがどのような影響を及ぼしているかについては明らかでない。

図A



文献12より引用

5-5 ストレス応答とMAPキナーゼカスケード

細胞は細胞外からの刺激にさらされると、刺激の種類に応じて増殖、分化、アポトーシスなどの適応反応を示す。細胞はその細胞膜上にある受容体によって外界からの刺激を感知し、さらにその受容体の細胞質側に付随した酵素活性を変化させることによって細胞内シグナルを生成する。受容体からの情報は、細胞質内のシグナル伝達系路によって増幅され、遺伝子調節の場である細胞核へと伝えられる。一方で、このような刺激応答機構の破たんが神経変性・癌・アレルギー・糖尿病など、多様な疾患の原因となることが分子レベルで明らかになっている。Mitogen-Activated Protein (MAP) キナーゼカスケードは、このような細胞外から核への情報伝達を担う重要な細胞内シグナルシステムの1つであり、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¹⁵⁻¹⁷。MAPキナーゼカスケードは MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) - MAP Kinase Kinase (MAPKK) - MAP Kinase (MAPK) の3段階の酵素反応によってシグナルを増強するとともに、刺激に対する反応性を鋭敏なものにすると考えられている。いずれのMAPKファミリーもスレオニン残基とチロシン残基がリン酸化されることで活性化する。MAPKKKはMAPKK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させ、更にMAPKKは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させる。MAPKは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。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

どのストレス刺激やTNF- α 、IL-1などの炎症性サイトカインによって活性化する。活性化したJNKファミリーのキナーゼは、かくにおいて転写因子 c-Jun、ATF-2、Elk-1や癌抑制遺伝子産物 p53などをリン酸化することにより活性化する。ノックアウトマウスによる解析から、JNKは組織や細胞の状態により、生存を促進する場合とアポトーシスを促進する場合とがあることが示されている。一方、p38ファミリーのストレスMAPKには $\alpha \sim \delta$ の4種の遺伝子が存在し、JNK同様、各種ストレス、炎症性サイトカインの刺激により活性が誘導される。p38の機能はアイソフォームによって異なり、組織・細胞の種類によっても異なる。ある場合には細胞の生存や活性化に必要であり、他の場合には逆に細胞のアポトーシスに関与する。この作用の選択性については他の経路のシグナルとの相互作用も重要視されている。

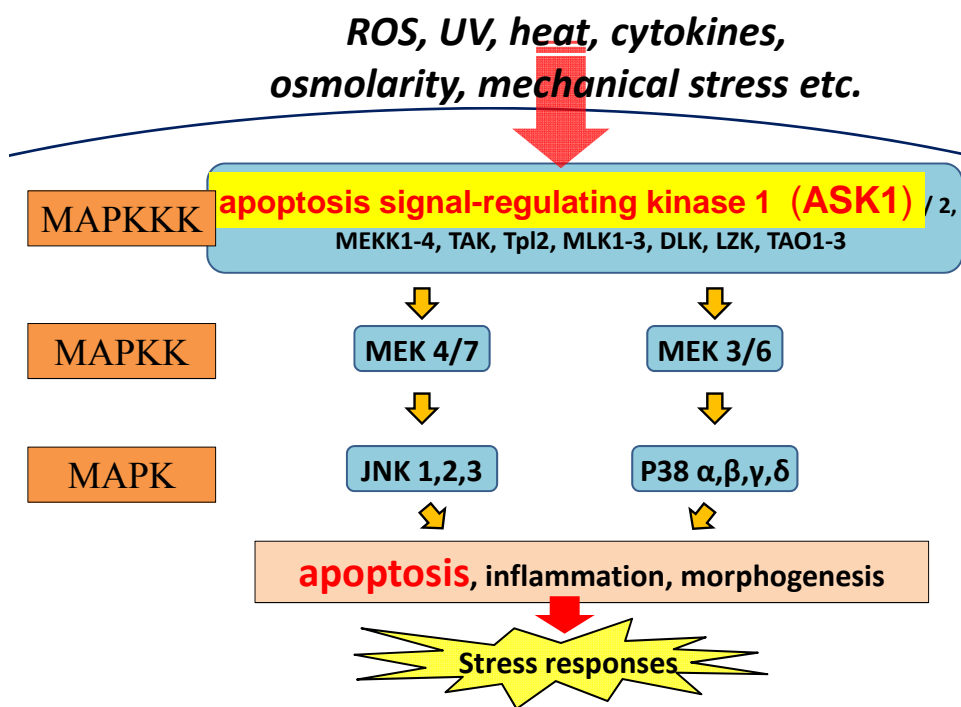
5-6 酸化ストレスとASK1

Apoptosis-Signal Regulating Kinase 1 (ASK1) は元々、1997年にアポトーシスを誘導する MAPKKK として報告され¹⁸、その後、様々な細胞腫で細胞死誘導機能が示されてきた。ASK1はその下流のMAPKKであるMKK4/7、MKK3/6をリン酸化し、それぞれがJNKや p38をリン酸化することにより細胞内情報伝達機構を担っている（次頁図B参照）。ASK1は各種ストレスや炎症性サイトカインなどで活性化され、その活性化は各種抗酸化剤で抑制されることから、ROSがASK1活性化に寄与していると考えられている¹⁹。定常状態においてASK1のN末端領域には還元型チオレドキシシン (TRX) が直接結合し、その活性が抑制されているが、酸化還元タンパク質のひとつであるTRXはROS刺激により酸化型へと変換されてASK1より解離することで ASK1は活性化される¹⁹。ASK1はROS依存性の MAPKKKである。

我々は ASK1 がアンジオテンシン 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おり、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かかわっていることを報告してきた。^{4, 20-23} 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・心リモデリングモデル²⁰、ラット頸動脈のバルーン傷害モデル²¹、Dahl食塩感受性ラットの高血圧性心拡張不全モデル²²による検討で、アンジオテンシン II による心肥大や心血管リモデリング、血管内皮機能障害に ASK1が関与していることを以前に報告している。ASK1ノックアウトマウスにアンジオテンシン II を持続注入したモデルを用い、ASK1が大動脈においてアンジオテンシン II による酸化ストレス発生、血管内皮アポトーシス、血管内皮機能障害に関与していることを報告した²²。また、Dahl 食塩感受性ラットへ ARB を投与することにより血管の ASK1活性が抑制され、血管内皮アポトーシスが抑制されることも報告している²²。しかし、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 の心血管疾患における詳細な役割は不明である。また、アンジオテンシン II と ASK1 及び心筋虚血・心筋毛細血管密度、VEGF の関連性は不

明である。

図B

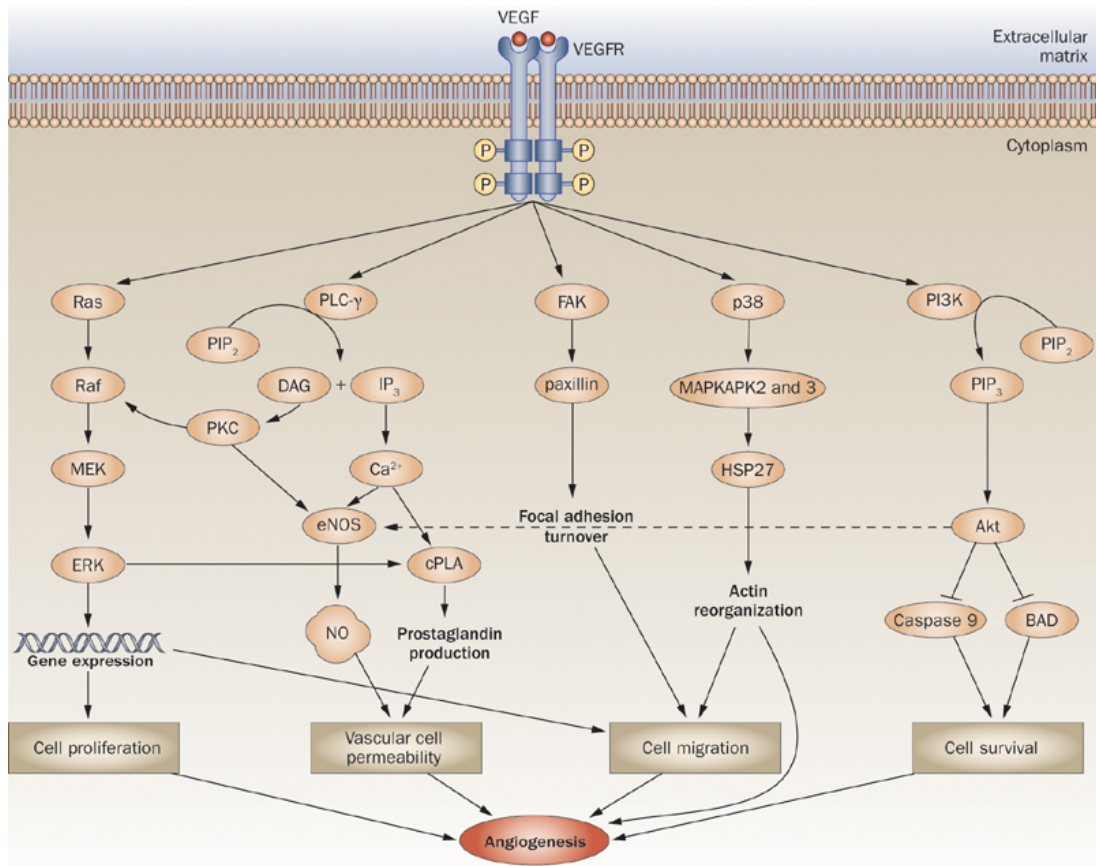


5-7 VEGFとVEGFレセプターによるシグナル伝達

VEGFは血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞などの組織実質細胞や間葉系細胞から産生される。VEGFのレセプターはレセプター型チロシンキナーゼ VEGFR-1 (Flt-1) およびVEGFR-2 (KDR/Flk-1) であり、細胞外ドメインに7個の免疫グロブリン(Ig)様構造をもち、細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ。このうち、VEGFR-2がVEGFの増殖・血管透過性等のシグナル伝達の中心的な役割を果たす。VEGFR-2 から Ras/MEK/ERKを介したシグナルにより細胞増殖が惹起される。また、PLC- γ を介したシグナルにより eNOS を活性化させ、NO産生を促し、更に細胞質ホスホリパーゼAを活性化させ、プロスタグランジン産生を促すことにより、血管透過性を亢進させる。他にも focal adhesion kinase (FAK)やp38 を介したシグナルにより、細胞の遊走を促進させ、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)を介したシグナルにより Akt を活性化させ、細胞の生存に寄与する²⁴ (次頁図C参照)。

このように多面的な作用を持つVEGFであるが、アンジオテンシンIIやASK1、及び心筋虚血や心筋毛細血管との関連性は不明である。

図C



文献24より引用

5-8 本研究の目的

今回の研究で我々は、アンジオテンシンⅡによる心傷害の新たな機序を解明するために、高血圧性心肥大、非代償性心肥大および心不全の有用なモデル動物であるダール食塩感受性高血圧ラット（DSラット）に ARB を投与し、その効果を心筋毛細血管密度の面から比較検討した。

本研究の目的はアンジオテンシンⅡを阻害することが、心筋毛細血管密度、更に心筋虚血にどのような影響を与えるか、また、その分子機序として酸化ストレス、ASK1、VEGF がどのように関与するかを明らかにすることである。

6. 実験方法

6-1 実験動物

全ての実験操作は、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。今回の実験に雄性Dahl食塩感受性ラット(DSラット) (日本SLC、静岡) を使用した。以前、我々²⁻⁴ や他のグループ²⁵ により、DSラットに7週齢から高食塩負荷を行うと、高血圧を来し、12週齢には心機能は正常に保たれたまま代償性心肥大となり、20週齢で著明な心不全を来すことが明らかにされている。そこで、今回、DSラットを0.3%食塩含有食(低食塩食)で飼育し、7週齢に8%食塩含有食(高食塩食)負荷へと変更し、12週齢より薬剤の投与を開始し、心不全に至る前の16週齢で評価した。コントロールのDSラットは、実験期間中を通じて低食塩食のままで飼育した。

6-2 研究のプロトコール

高血圧性心傷害におけるAIIの役割を酸化ストレス及び冠血管の面から検討するために、食塩負荷したDSラットにAT1受容体拮抗薬；イルベサルタン、抗酸化剤としてsuperoxide dismutase (SOD) 様物質であるテンポール(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl)、および血管拡張薬；ヒドララジンを投与し、その効果を比較した。投与量はイルベサルタン 20mg/kg/day、テンポール 0.1mmol/kg/day、ヒドララジン 3mg/kg/day とし、16週齢までの4週間、1日1回強制経口投与した。イルベサルタンは0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)液に懸濁した。また、準備実験によって、上記投与量にて3剤のDSラットに対する降圧効果は同等であることを確認している。血圧の測定にはプレチスモグラフィ(BP-98A; Softron, Tokyo)とカフを用い、週1回、経口投与の3~5時間後に無麻酔下ラットの尾動脈で非観血的に行った。また、隔週で経胸壁心エコーによる評価(後述)を行った。4週間の投与終了後、DSラットをエーテルによる吸入麻酔後、速やかに心臓をラットより直ちに摘出し、後述のパラメーターについて評価した。

6-3 心エコー検査

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)を用いて経胸壁心エコーを行った。DSラットをケタミンHCl(50mg/kg)とキシラジンHCl(10mg/kg)の腹腔内注射で浅麻酔し、左側臥位下にて検査した。Mモード法で、左室乳頭筋レベルでの左室拡張末期径(LVDd)、左室収縮末期径(LVDs)、収縮短縮率(LVFS)、左室駆出率(LVEF)と、拡張末期での左室前壁・後壁(LVAW・LVPW)径を測定した。

6-4 心筋虚血の測定

組織学的な心筋虚血範囲の測定には HypoxyprobeTM-1 (Hypoxyprobe, Burlington) を用いた。HypoxyprobeTM-1の主な構成要素である Pimonidazole は、低酸素細胞に特異的に結合し、DAB (DAKO, Glostrup, Denmark)により染色される。DS ラットの腹腔内に HypoxyprobeTM-1(60mg/kg) を投与し、15分後に麻酔下にて心臓をリン酸化バッファーにて還流し、速やかに摘出、凍結切片を作成し、染色を行った。切片を200倍に拡大して、10視野観察し、Lumina Vision バージョン2.2分析ソフトを用いて Pimonidazole 陽性領域を求め、各群間でその割合を比較した。

6-5 冠毛細血管密度の測定

DSラットから摘出した心臓を、直ちにTissue-Tek OCT (Sakura Finetek) にて凍結包埋した。凍結標本をクリオスタットを用いて10 μ mの凍結切片を作成した。200倍で希釈した抗CD31抗体 (Santa Cruz) と4 $^{\circ}$ C・overnight で反応させた後、HRP標識二次抗体 (Biosource) と反応させ、DAB (DAKO) で発色させた。切片を200倍に拡大し、心臓の横断面を10視野観察し、CD31陽性細胞数を計測した。CD31陽性細胞数を心筋細胞数で除し、冠毛細血管密度を求め、各群間で比較した。

6-6 冠内皮アポトーシスの測定

10 μ mで薄切した心臓凍結切片に対しTdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色と抗CD31抗体(Santa Cruz)による免疫染色を併用してDSラットの冠内皮アポトーシスを検出した。TUNEL染色にはIn situ Apoptosis Detection Kit (Takara Shiga Japan) を用い、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した2次抗体を暗所で反応させ、蛍光免疫染色を行い評価した。抗CD31抗体は200倍で希釈し、4 $^{\circ}$ C・overnightで反応させた後、Alexa Flour®で標識した2次抗体を暗所で反応させ、蛍光免疫染色を行い評価した。切片を200倍に拡大し、心臓の横断面を10視野観察し、TUNELとCD31共に陽性の細胞、CD31陽性細胞を計測した。TUNELとCD31共に陽性の細胞数をCD31陽性数で除し、各群間で比較した。

6-7 心臓スーパーオキシド測定

DSラットから摘出した心臓を、直ちにTissue-Tek OCT (Sakura Finetek) にて凍結包埋した。凍結標本をクリオスタットを用いて10 μ mに薄切し、蛍光プローブである Dihydroethidium (DHE) (Sigma Chemical Co)2 μ mol/Lで、暗所にて37 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした。蛍光顕微鏡Excitation ; 488 nm、 Emission 574-59 nmを用い、心臓のスーパーオキシド量を蛍光強度にて評価した²⁶。DHE蛍光強度の定量は、Lumina Visionバージョン2.2分析ソフトを用いて、平均蛍光強度の測定結果を対照ラットにおける蛍光強度に対する割合として表した。

6-8 ウェスタンブロット法

DSラットから抽出した心臓を、タンパク質抽出緩衝液（Hepes 20mmol/L pH 7.2）； NaCl 25 mmol/L, EGTA 2 mmol/L, DTT 0.2 mmol/L, aprotinin 60µg/mL, leupeptin 2 µg/mL, PMSF 1 mmol/L, NaF 5 mmol/L, β-glycerophosphate 25 mmol/L, Na₃VO₄ 1mmol/L, TritonX-100 0.1%）にて、Ultraturrax T8を用いて氷上でホモジナイズした。さらにこれを、4°Cで30分間インキュベートした後、氷上で1分間ソニケートし、高速遠心後の上清を熱変性させ血管抽出蛋白サンプルとして電気泳動に用いた。抽出したサンプルの蛋白量はBradford法を用いて定量し、等しい蛋白濃度になるようにサンプルを調整後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行った。泳動終了後、ゲルをセミドライ転写装置にて polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写し、ブロッキング緩衝液にてovernight でブロッキング後、メンブレンにそれぞれの特異的抗体を用いて、以下の蛋白の検出を行った²⁶。

抗VEGF抗体（2000倍希釈、Santa Cruz）、抗リン酸化ASK1抗体（1000倍希釈）¹⁸、抗α-チューブリン抗体（5000倍希釈、CALBIOCHEM）。各バンドの強度は NIH Image analysis software v.1.61.を用いて解析し、各検体のα-チューブリン発現量を定量し、上記の蛋白発現量を検体毎に補正した。

6-9 内皮細胞を用いた研究のプロトコール

酸化ストレス刺激による内皮細胞のアポトーシスにおける ASK1 と VEGF の役割を明らかにするために血管内皮細胞を用いた研究を行った。雄性 ASK1 遺伝子欠損マウス（ASK1^{-/-}）²⁷（東京大学医学薬学研究科 一條秀憲教授よりご提供頂いた）と、野生型マウス（C57 BL/6J）（日本チャールズリバー）の大動脈から EasySep Mouse PE Selection kit (STEMCELL Tokyo Japan) を用いて血管内皮細胞を単離培養した。血管内皮細胞はEGM-2 BulletKit (Lonza, Basel Switherland) 内で培養し、4~6継代までの細胞を実験に用いた。

ASK1^{-/-} マウス及び野生型マウス由来の内皮細胞をそれぞれサブコンフルエント状態まで培養し、2 ng/mLのVEGF₁₆₄ (R&D) を添加する群、しない群に振り分け、1.2%の血清入り EBM-2 (Lonza, Basel Switherland)にて1 overnight スタベーションを行った。その後、それぞれに200µMのH₂O₂を添加し、細胞のアポトーシスを比較検討した。アポトーシスは細胞を抗 active-caspase 3抗体(100倍希釈 Santa Cruz)による免疫染色を用いて検出した。細胞を400倍に拡大して10視野（1視野の細胞数は300-400個程度）を観察し、active-caspase 3 陽性細胞数を計測し、比較検討した。

また、酸化ストレス刺激による ASK1 活性化における VEGF の役割を明らかにするために、野生型マウス由来の内皮細胞をサブコンフルエント状態まで培養し、2ng/mLの VEGF₁₆₄ を添加する群、しない群に振り分け、1.2%の血清入りEBM-2にて1 overnight スタベーションを行った後、それぞれに200µMのH₂O₂を添加し、5分後、30分後の ASK1

の活性化を比較検討した。内皮細胞における ASK1 の活性化は前述のウェスタンブロット法にて評価した。

6-10 内皮細胞内における活性酸素種の検出

酸化ストレス刺激による内皮細胞内の活性酸素種生成における VEGF の役割を明らかにするために、2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA, Sigma) を用いた実験を行った。H2DCFDA は細胞内で酸化されると蛍光物質となり、酸化活性を検出する蛍光プローブとして有用である。野生型マウス由来の内皮細胞をサブコンフルエント状態まで培養し、2 ng/mL の VEGF₁₆₄ を添加する群、しない群に振り分け、1.2% の血清入り EB M-2 にて 24 時間スタベーションを行い、10 μM の H2DCFDA で 15 分間、前処置をした。そして、それぞれに 200 μM の H₂O₂ を添加し、5 分後に PBS に置換し、蛍光顕微鏡で観察した。H2DCFDA の蛍光強度の定量は Lumina Vision バージョン 2.2 分析ソフトを用いて、平均蛍光強度の測定結果を対照細胞における蛍光強度に対する割合として表した。

6-11 リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

凍結心臓組織をフェノールとチオシアン酸グアニジンの混合液の TRIzol reagent (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 μg の RNA から QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) 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した。

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。プロトコールは、初期変性として 95°C 10 秒、1 サイクル、PCR を 95°C 5 秒、60°C 30 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 法で算出された Ct 値はハウスキーピング遺伝子 GAPDH で標準化し相対定量を行った²⁷。使用した BNP のプライマー塩基配列は以下の通りである。

BNP; primer forward: 5'-GTCTCCAGAACAATCCACGATG-3'

primer reverse: 5'-AAGGCGCTGTCTTGAGACCTAA-3'

6-12 組織学的評価と免疫組織化学検査

心筋間質の線維化を評価するために Sinus Red F3BA (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, USA) 染色を行った。摘出心臓を4%のパラホルムアルデヒドに overnight で浸して固定し、パラフィン包埋して5 μ mの切片を作成した。これを、0.5%飽和ピクリン酸水溶液で溶解した Sinus Red F3BA で染色し、心臓間質の線維化を評価した。定量はLumina Vision バージョン2.2分析ソフトを用いた²⁸。

心臓へのマクロファージ浸潤を評価するために ED1 免疫染色を行った。抗 ED-1 抗体 (500倍希釈、BMA Biomedicals AG) を用い、以前我々が報告した方法²⁸ で染色した。切片を200倍に拡大し、10視野観察し、ED-1 陽性細胞数を計測し、各群間で比較検討した。

6-13 統計学的解析

データは全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で表記した。継時的な評価はWindows 版 Stat View (SAS Institute, Inc. Cary, NorthCarolhla, USA) を用いて、二元配置分散分析法 (ANOVA) を用い、最小有意差法 (FisherのPLSD法) で解析した。これら以外のデータの有意差検定には、一元の ANOVA と Fisher の PLSD 法を用いた。全ての検討において、P値0.05未満を統計学的有意と判定した。

7. 結果

7-1 血圧と左室重量、心機能への影響

DSラットは食塩負荷にて著明な高血圧を来すが、イルベサルタン、テンポール、ヒドララジンは4週間の投与期間中を通して、同程度に血圧を低下させた(図1)。イルベサルタンとテンポールは左室重量を減少させ(表1)、左室におけるBNP遺伝子発現を抑制し(表1)、心筋間質へのマクロファージ浸潤を抑制し(図2(A))、心筋間質線維化を抑制した(図2(B))。しかし、ヒドララジンは、同程度の降圧効果を示したにも関わらず、これらの心保護効果を示さず、またイルベサルタン、テンポールはヒドララジンよりも有意差をもって、これらの心保護効果において優れていた(図2(A)(B)、表1)。また、イルベサルタン、テンポールはDSラットの肺重量増加を抑制したが、ヒドララジンは抑制しなかった(表1)。

心エコーによる検討では、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室駆出率、左室内径短縮率のパラメーターは高食塩食群、低食塩食群の間で有意差を認めなかった。すなわち、今回の研究ではDSラットの食塩負荷による明らかな心機能障害は認めなかった。前述の肺重量増加は心機能低下に伴うものではなく、よく知られているDSラットの体液貯留によるものと考えられた。

7-2 酸化ストレスと心筋虚血への影響

DHE染色を用いた検討にて、高食塩負荷を行ったDSラットは低食塩食のDSラットと比し、著明に左室の酸化ストレスが増加していた。イルベサルタン、テンポールはこの酸化ストレスの増加を有意に抑制したが、ヒドララジンは抑制しなかった(図3(A))。

Pimonidazoleを用いた検討にて、高食塩負荷を行ったDSラットの左室では低食塩食のDSラットと比し、著明な心筋虚血領域の増加を認めた。イルベサルタンとテンポールは心筋虚血を軽減させたが、ヒドララジンはその効果を示さなかった(図3(B))。この結果より、酸化ストレスと心筋虚血は密接に関与することが示唆された。

また、酸化ストレスに関与する因子として、心臓におけるeNOSの発現をウェスタンブロット法で検討したが、eNOS、リン酸化eNOS共に各群間で有意な差は認めなかった。

7-3 冠毛細血管密度と冠内皮アポトーシスへの影響

組織学的に心筋横断面積を評価したところ、高食塩負荷を行った16週齢のDSラットは、低食塩食DSラットと比し、著明な心筋肥大を認めた。イルベサルタン、テンポールは、この心筋肥大を有意に抑制していたが、ヒドララジンは抑制していなかった(図4(A))。また、左室の横断面において、CD31陽性細胞数を計測し、心筋細胞数で除して冠毛細血管密度を求め、比較検討したところ、高食塩負荷を行ったDSラット

は低食塩食の DS ラットと比し、著明な冠毛細血管密度の低下を認めた。イルベサルタンとテンポールは同程度に冠毛細血管密度の低下を抑制したが、ヒドララジンは抑制しなかった（図4(B)）。更に、CD31 と TUNEL の2重染色を用いて冠内皮アポトーシスを検討したところ、高食塩負荷を行った DS ラットは低食塩食の DS ラットと比し、著明な冠内皮アポトーシスの増加を認めた。イルベサルタンとテンポールは冠内皮アポトーシスを抑制したが、ヒドララジンは抑制しなかった（図4(C)）。

尚、12週齢の代償性心肥大期の DS ラットについても冠毛細血管密度、冠内皮アポトーシスを評価したが、16週齢のような冠毛細血管密度低下や冠内皮アポトーシスの増加は認めなかった。即ち、代償性心肥大から非代償性心不全に至る過程で冠毛細血管密度の低下、冠内皮アポトーシスが関与しており、可能性が示唆された。

7-4 左室におけるVEGFとASK1への影響

ウェスタンブロット法による検討にて、高食塩負荷を行った16週齢の DS ラットの左室ではコントロールと比し、VEGF の発現が有意に低下していた。イルベサルタンとテンポールは VEGF の発現をコントロールの DS ラットと同程度まで増加させていたが、ヒドララジンは増加させていなかった（図5(A)）。また、高食塩負荷を行った DS ラットの左室ではコントロールと比し、リン酸化 ASK1 の発現が著明に上昇しており、イルベサルタンとテンポールはヒドララジンと比し、有意差をもって、この上昇を抑制していた。

一方で、12週齢の代償性心肥大期の DS ラットの左室では、上記のような VEGF 発現の低下や ASK1 の活性化は認めなかった。即ち、代償性心肥大から非代償性心不全に至る過程で VEGF 低下や ASK1 の活性化が関与している可能性が示唆された。

7-5 内皮細胞のアポトーシスにおけるASK1とVEGFの役割

抗 active caspase 3 抗体を用いた免疫染色にて血管内皮細胞のアポトーシスを評価したところ、H₂O₂ 投与は著明に内皮細胞のアポトーシスを増加させた（図6(A)）。一方で、ASK1(-/-)マウス由来の内皮細胞は、野生型マウス由来の内皮細胞と比し、H₂O₂ 投与によるアポトーシスが有意に少なかった（図6(A)）。また、VEGF を前投与すると、H₂O₂ 投与によるアポトーシスが有意に抑制された（図6(B)）。更に、野生型マウス由来の内皮細胞において、H₂O₂ 投与にて ASK1 が活性化されたが、VEGF を前投与すると、H₂O₂ 投与によるASK1 活性化が抑制された（図6(C)）。また、H2DCFDA を用いた検討にて、野生型マウス由来の内皮細胞にVEGFを前投与すると、H₂O₂ 投与による活性酸素種の増加が抑制された（図6(D)）。

8. 考察

本研究の主目的は、アンジオテンシンⅡによる心筋傷害の分子的機序を明らかにすることである。今回の実験で、アンジオテンシンⅡを阻害し、心肥大を抑制すると、心筋における冠毛細密度低下が抑制され、心筋虚血が改善することが示された。また、酸化ストレスによる冠内皮アポトーシスが抑制されることにより、この心保護効果がもたらされること、そこに VEGF と ASK1 の正常化が深く関与していることが明らかになった。

8-1 心肥大と冠毛細血管密度

代償性心肥大期には、心筋毛細血管数は正常に保たれるか、むしろ増加する¹⁰⁻¹³。一方で、心肥大が長期間持続すると心筋の冠毛細血管密度が低下し、心筋虚血を来すが、このことが代償性心肥大が非代償性心肥大に至る主な機序のひとつと考えられている¹⁰⁻¹³。また、圧負荷により心肥大を惹起させた実験モデルにおいて、VEGF を阻害し、心筋の冠毛細血管密度を低下させると、代償性心肥大から非代償性心肥大に至り、心不全を来すことが報告されている¹³。更に、VEGF 欠損マウスに圧負荷をかけ、心肥大を惹起させると、心筋の冠毛細血管密度が低下し、より早期に代償性心肥大から心不全に至ることが明らかになっている¹⁴。この結果より、非代償性心肥大に至る過程において、VEGF は心保護的な役割を果たすことが示された。しかし、心肥大における冠毛細血管密度の減少において、アンジオテンシンⅡがどのような影響を及ぼしているかについては明らかでない。

8-2 左室肥大におけるアンジオテンシンⅡの影響

今回の研究において、イルベサルタンとヒドララジンの効果を比較することにより、左室肥大と線維化を来す週齢のDSラットにおいて、血圧上昇とは無関係に、アンジオテンシンⅡを介した刺激により、冠毛細血管密度の低下と、それに基づく心筋虚血が惹起されることが明らかになった。そして、アンジオテンシンⅡによる心筋虚血には冠内皮細胞のアポトーシス、左室におけるVEGF発現の低下、ASK1の活性化が深く関与していることも明らかになった。

8-3 左室肥大における酸化ストレスの影響

心不全の病態に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることは、多くの報告により明らかにされている²⁹⁻³¹。更に、アンジオテンシンⅡが心血管において酸化ストレスの発生を誘発しており、これがアンジオテンシンによる心血管傷害の重要なメカニズムのひとつであることはよく知られている²⁹⁻³¹。我々は、今回の研究において、DSラットの心傷害における酸化ストレスの役割を明らかにするために、抗酸化作用を持つ

SOD 様物質であるテンポールを用い、その効果を検討した。その結果、テンポールは DSラットの心臓において酸化ストレス発生を抑制することにより、左室肥大・線維化を抑制し、冠毛細血管密度の低下を抑制した。更に、冠内皮細胞のアポトーシスを抑制し、VEGF 発現低下や ASK1 活性化を抑制していた。テンポールのこれらの効果は、イルベサルタンと同程度であった。この結果より、アンジオテンシンⅡを介した酸化ストレスは DSラットの心臓において非常に重要な役割を果たしていることが示された。イルベサルタンが DSラットの心臓において、酸化ストレスの増加をテンポールと同程度まで抑制していたという結果を併せると、イルベサルタンの心保護効果は、主に酸化ストレスの抑制によりもたらされると考えられた。

8-4 冠内皮アポトーシスとVEGF・ASK1の関連性

前述の通り、今回の研究で、酸化ストレスはDSラットの著明に肥大した左室において、冠内皮アポトーシスを引き起こすことが明らかになった。一方で、ASK1は酸化ストレスによる細胞のアポトーシスにおいて重要な分子的役割を持つことが知られている^{14, 18, 27-32}。しかし、酸化ストレスによる内皮細胞のアポトーシスにおけるASK1とVEGFの役割は明らかでない。これらの関係を明らかにするために、ASK1(-/-)マウスと野生型マウス由来の内皮細胞を用いた実験を行った。この結果から、H₂O₂ 刺激は内皮細胞内の活性酸素種の増加を惹起すること、VEGF 前投与はその活性酸素種の増加を抑制することが明らかになった。また、ASK1 が欠損すると H₂O₂ 刺激による内皮細胞のアポトーシスが減少すること、VEGF を前投与するとASK1の欠損と同様にH₂O₂ 刺激による内皮細胞のアポトーシスが減少することが分かった。更に、内皮細胞に H₂O₂ 刺激を行うと、ASK1 が活性化され、VEGF を前投与するとH₂O₂ による ASK1 の活性化が抑制されることが分かった。以上の結果より、VEGF は酸化ストレスによる内皮細胞内の活性酸素種の増加を抑制し、酸化ストレスによる内皮細胞アポトーシスを抑制するが、その機序には、VEGF による ASK1 活性化の抑制が関与していることが明らかになった。

8-5 今後の課題

今回の研究で明らかになった解決すべき課題を以下に記す。

8-5-1 eNOSとの関わりについて

今回の実験では各群間の DSラットの心臓におけるリン酸化eNOS と eNOS に有意な差を認めなかった。この結果からは DSラットにおける心臓にeNOS は関与していないこととなる。しかし、eNOS は心保護作用を持つ NO を産生するが、アンカップリングにより酸化ストレスの主な発生源となる面も持っており、また、VEGF 自身も eNOS をリン酸化する作用を持つなど多面的・複雑な働きがあり、心臓における eNOS の役割には不明な部分も多く、その解明が待たれる。

8-5-2 血行動態的評価について

今回の実験ではDSラットの正確な血行動態的な評価は行えておらず、各薬剤の血行動態への効果も不明である。従って、今回明らかになった ASK1 や VEGF の変化が、代償性心肥大から非代償性心肥大に移行する際に関与しているか否かは分かっていない。

8-5-3 血圧の評価について

今回の実験では血圧を直接測定ではなく、尾動脈をカフにて非観血的に測定し、評価している。多数のラットの血圧評価を行わなければなかったため、致し方ない部分もあるが、正確な血圧評価ではないという問題点がある。

8-5-4 VEGF とASK1の関わりについて

今回の研究では VEGF が ASK1 の活性化を抑制する機序の解明には至っておらず、また、ASK1 が VEGF 発現の調整に直接関与しているか否かも不明である。これらの解明には更なる研究が必要である。

9. 結語

著明な心肥大・心線維化を来した DSラットにおいて、アンジオテンシンⅡは酸化ストレスを介して、心筋の VEGF を抑制し、ASK1 を活性化させる。この結果として、アンジオテンシンⅡは冠内皮アポトーシスを引き起こし、冠毛細血管密度を低下させ、心筋虚血を誘発し、心臓傷害をもたらす（図7）。本研究にて、我々はアンジオテンシンⅡによる心傷害の新たな分子機序を明らかにした。しかし、高血圧性心肥大において、代償性心肥大が非代償性心肥大・心不全に移行する際に、今回、我々が得た心臓傷害の分子的機序が、関与するか否かを明らかにするには更なる研究が必要である。

10. 表およびその説明

表1 体重、心重量、心臓におけるBNP mRNA、肺重量

	Low Na (n=5)	High Na			
		Veh (n=9)	Hyd (n=7)	Tem (n=7)	Irb (n=8)
BW (g)	400±10 #	376±6	384±4	405±6*	391±3 #
LV/BW(mg/g)	2.21±0.07 #	3.42±0.04	3.25±0.03*	3.03±0.06 #§	3.08±0.03*§
BNP mRNA expression	1.26±0.22 #	3.69±0.30	3.51±0.32	3.08±0.50*	2.65±0.48*
Lung/BW (mg/g)	3.42±0.04 #	4.31±0.08	4.29±0.07	3.94±0.07 #	3.89±0.05 #

略語

Low Na ; 低食塩食の DS ラット

High Na ; 高食塩食の DS ラット

Veh ; vehicle ビークル群、 Hyd ; hydralazine ヒドララジン投与群、

Tem ; tempol テンポール投与群、 Irb ; irbesartan イルベサルタン投与群

各群は7週齢から計4週間の薬剤投与を行った。

BW ; body weight 体重、LV ; left ventricular weight 左室重量

BNP ; brain natriuretic peptide 脳性ナトリウム利尿ペプチド

値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

* P<0.05, # P<0.01 vs Veh. § P<0.01 vs Hyd.

表2 DS ラットの各群における心エコー結果

	Low Na (n=9)	High Na			
		Veh (n=12)	Hyd (n=9)	Tem (n=11)	Irb (n=13)
LVAw (mm)	1.38±0.04#	2.16±0.03	1.95±0.04#	1.76±0.04#§	1.77±0.03#§
LVPw (mm)	1.38±0.04#	2.14±0.02	1.95±0.03#	1.78±0.04#§	1.77±0.03#§
LVDd (mm)	8.67±0.12	8.46±0.10	8.46±0.26	8.90±0.13	8.79±0.20
LVDd/BW (mm/100g BW)	2.23±0.05	2.44±0.11	2.33±0.03	2.47±0.11	2.45±0.06
LVDs (mm)	5.56±0.15	5.08±0.26	5.15±0.44	5.72±0.19	5.38±0.25
LVDs/BW (mm/100g BW)	1.43±0.05	1.44±0.06	1.40±0.09	1.58±0.06	1.51±0.05
EF (%)	69.8±2.46	74.6±2.67	73.7±3.99	71.1±2.0	73.7±2.46
FS (%)	35.7±2.06	40.2±2.67	39.9±3.95	35.9±1.46	39.0±2.14

各群の表記は表1と同様。その他の略語は以下の通り

LVAw ; left ventricular anterior wall 左室前壁厚、

LVPw ; left ventricular posterior wall 左室後壁厚、

LVDd ; left ventricular end-diastolic dimension 左室拡張末期径、

LVDs ; left ventricular end-systolic dimension 左室収縮末期径、

EF ; ejection fraction 駆出率、

FS ; fraction shortning 収縮短縮率

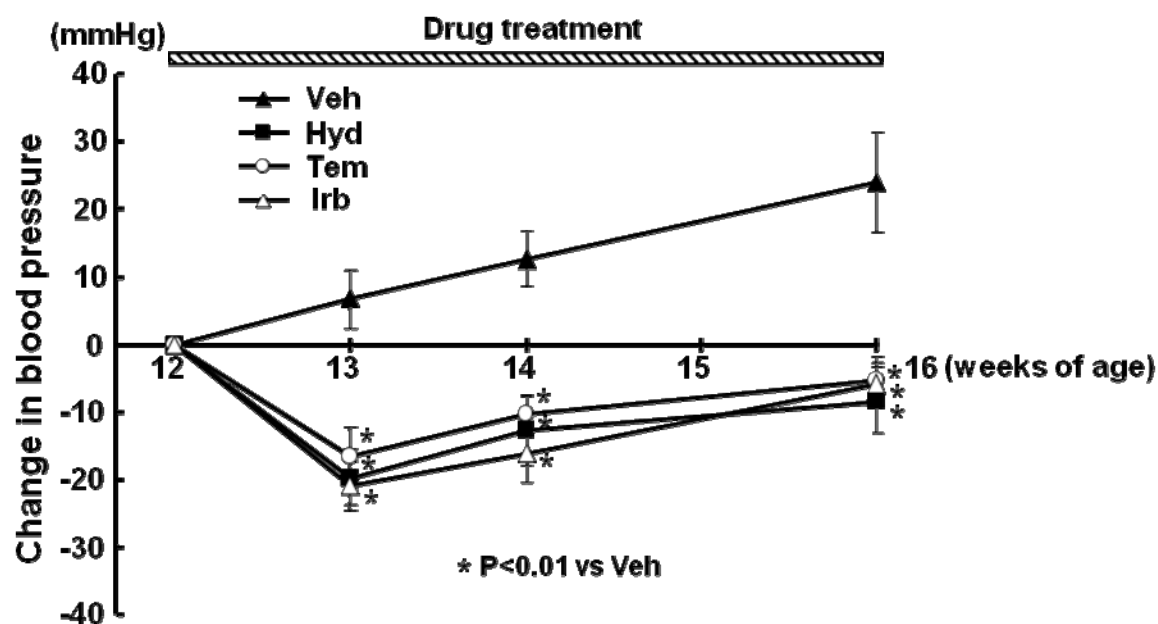
値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

P<0.01 vs Veh. § P<0.01 vs Hyd.

11. 図およびその説明

図1

DSラットの血圧に対するヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの効果



略語

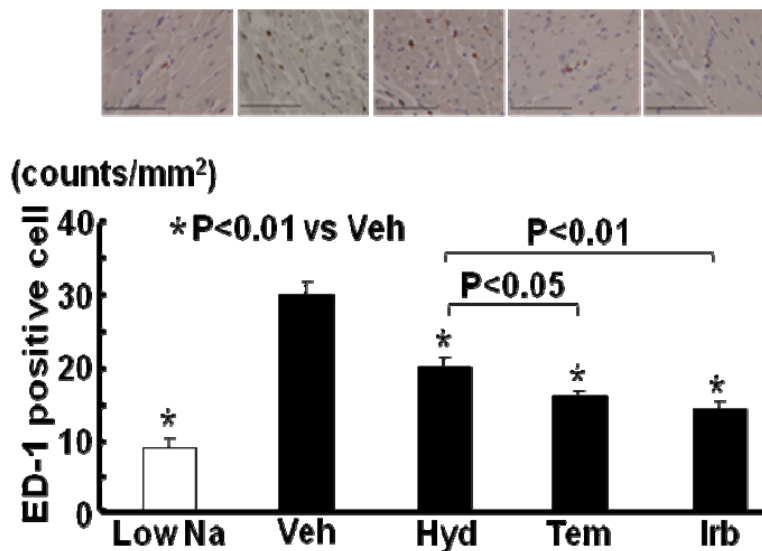
Veh ; vehicle ビークル群、 Hyd ; hydralazine ヒドララジン投与群、
 Tem ; tempol テンポール投与群、 Irb ; irbesartan イルベサルタン投与群

値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

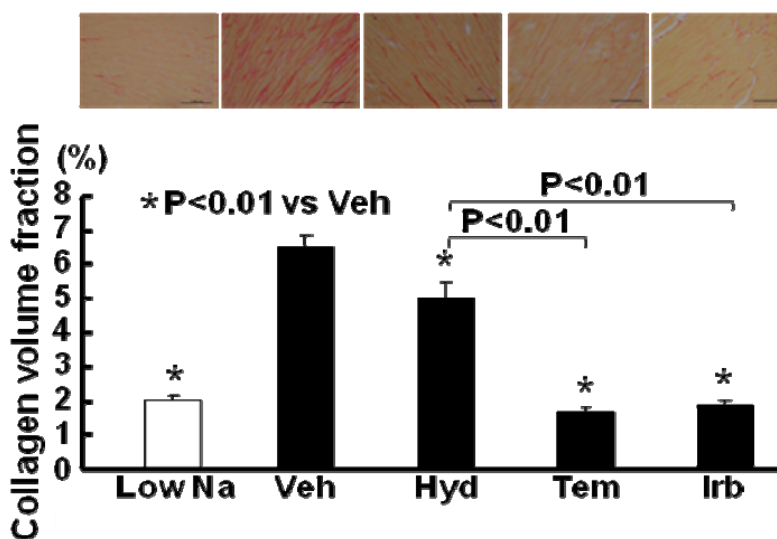
(n=9 in Veh, n=7 in Hyd, n=7 in Tem, n=8 in Irb)

図2

(A) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心臓の炎症に対する効果



(B) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心筋間質線維化への効果



(A) ED-1免疫染色による心筋マクロファージ浸潤の評価 (Bar=100 μm)

(B) シリウスレッド染色による心筋間質線維化の評価 (Bar=100μm)

Low Na ; 低食塩食のDSラット 以下の群は高食塩食のDSラット

Veh ; vehicle ビークル群、 Hyd ; hydralazine ヒドララジン投与群、

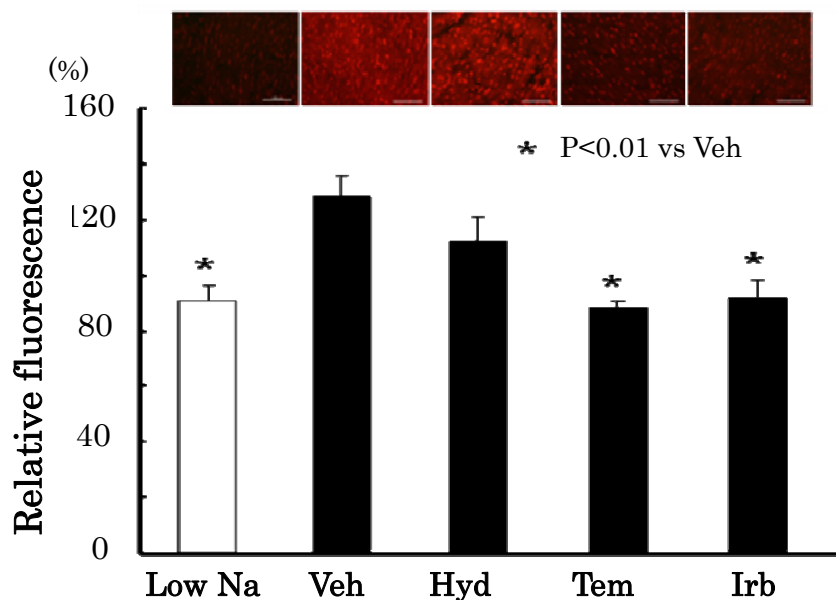
Tem ; tempol テンポール投与群、 Irb ; irbesartan イルベサルタン投与群

値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

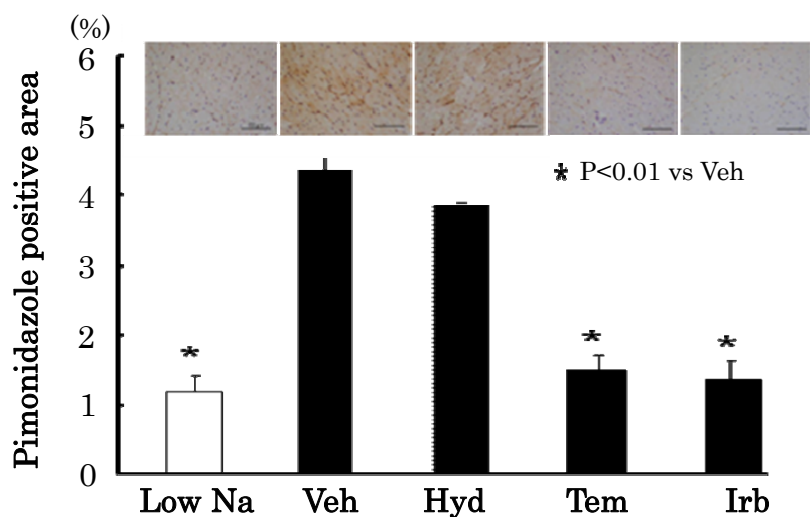
(n=5 in Low Na, n=9 in Veh, n=7 in Hyd, n=7 in Tem, n=8 in Irb)

図3

(A) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心臓の酸化ストレスに対する効果



(B) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心筋虚血に対する効果



(A) DHE 染色による心臓の酸化ストレスの評価 (Bar=100 μ m)

(B) Pimonidazole 染色による心筋虚血の評価 (Bar=100 μ m)

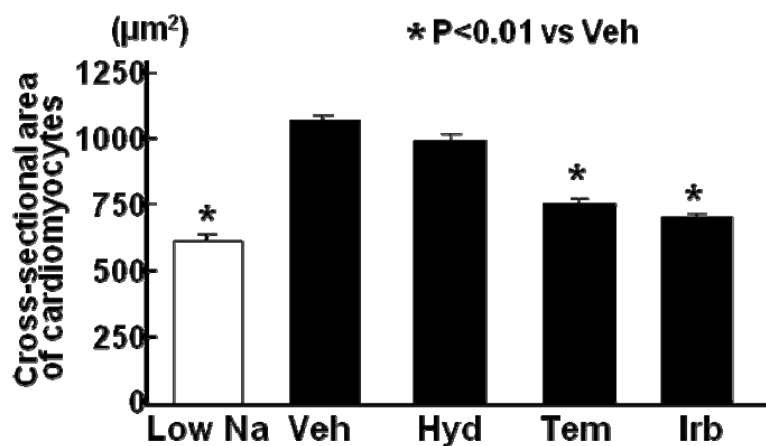
各群の略語は図2と同様に表記した。

値は平均値 \pm 標準誤差 (means \pm SEM) にて記した。

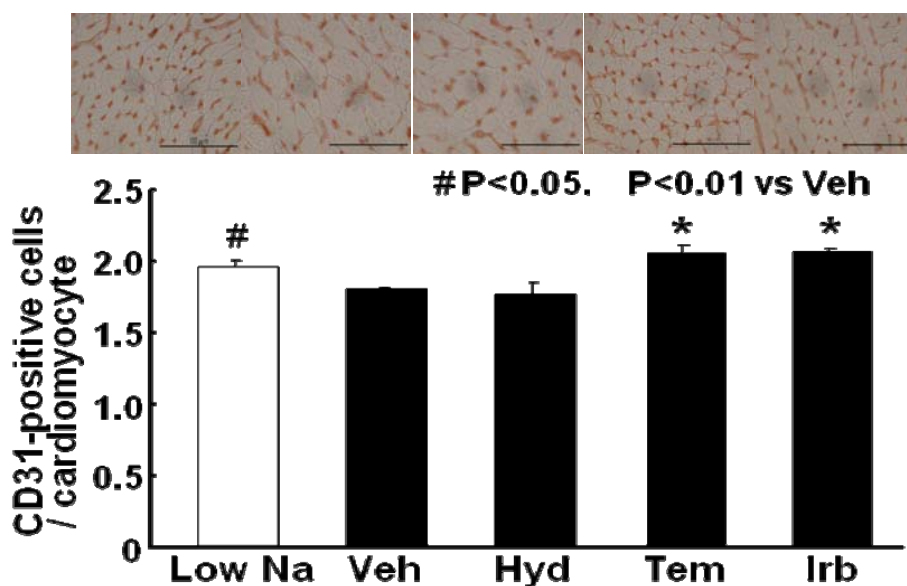
(n=5 in Low Na, n=9 in Veh, n=7 in Hyd, n=7 in Tem, n=8 in Irb)

図4-1

(A) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心筋細胞横断面積に対する効果



(B) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心筋冠毛細血管密度に対する効果



(A) シリウスレッド染色による心筋細胞横断面積の評価(Bar=100 µm)

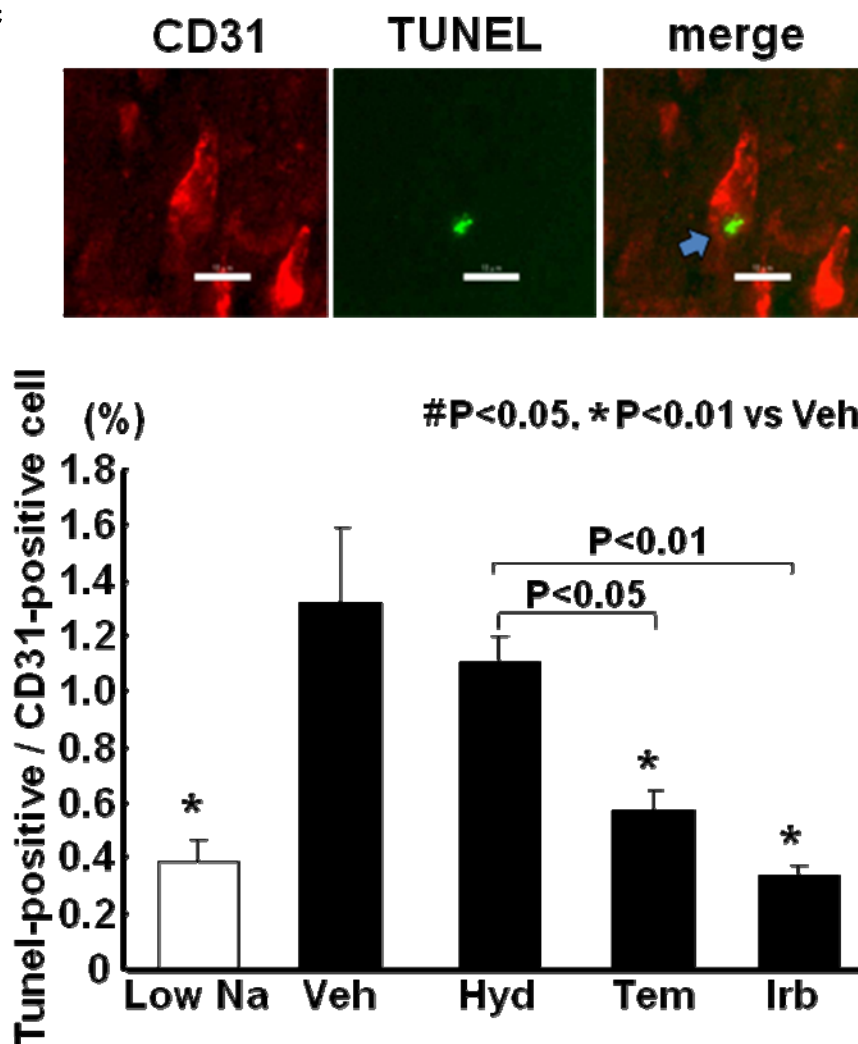
(B) CD31染色による心筋冠毛細血管密度の評価 (Bar=100µm)

各群の略語は図2と同様に表記した。

値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

図4-2

(C) ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの冠内皮アポトーシスに対する効果



(C) CD31免疫染色とTUNEL染色の二重染色による冠内皮アポトーシスの評価 (Bar=100 μ m)

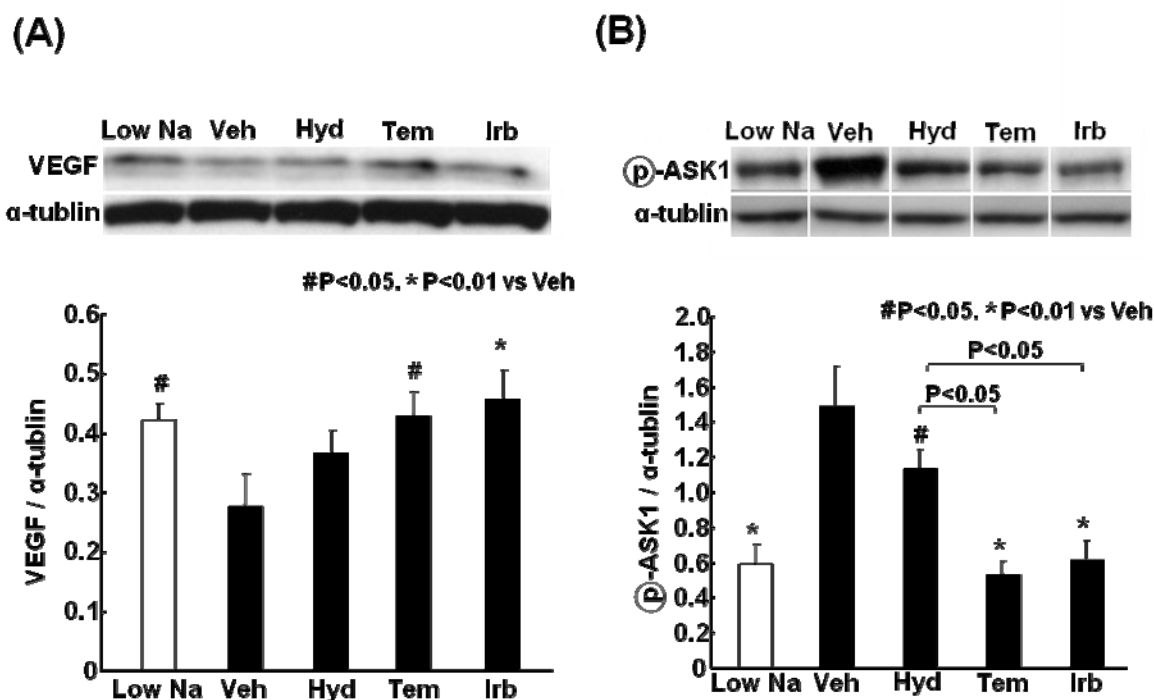
各群の略語は図2と同様に表記した。

値は平均値 \pm 標準誤差 (means \pm SEM) にて記した。

(n=5 in Low Na, n=9 in Veh, n=7 in Hyd, n=7 in Tem, n=8 in Irb)

図5

ヒドララジン、テンポール、イルベサルタンの心臓におけるVEGFに対する効果 (A) とリン酸化ASK1に対する効果 (B)



ウェスタンブロット法により心臓におけるVEGF (A) 及びリン酸化ASK1 (B) の発現を評価した。各検体の α -チューブリン発現量を測定し、各検体毎に補正した。

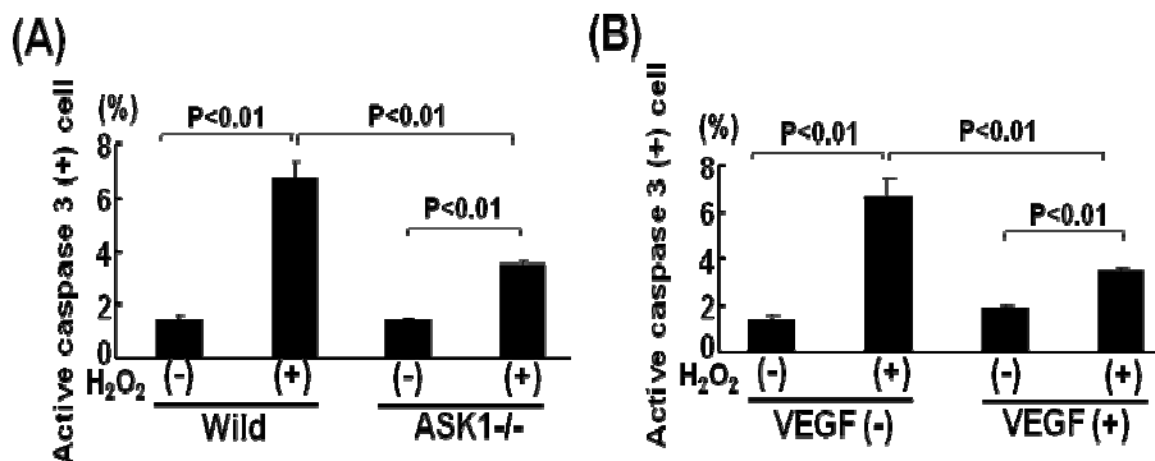
各群の略語は図2と同様に表記した。

値は平均値 \pm 標準誤差 (means \pm SEM) にて記した。

(n=5 in Low Na, n=9 in Veh, n=7 in Hyd, n=7 in Tem, n=8 in Irb)

図6-1

H₂O₂刺激による内皮細胞のアポトーシスにおけるASK1の役割 (A) 及び VEGFの役割 (B)



(A) 野生型マウス由来内皮細胞とASK1(-/-)マウス由来内皮細胞のH₂O₂刺激によるアポトーシスの比較。Active-caspase 3免疫染色にて評価した。

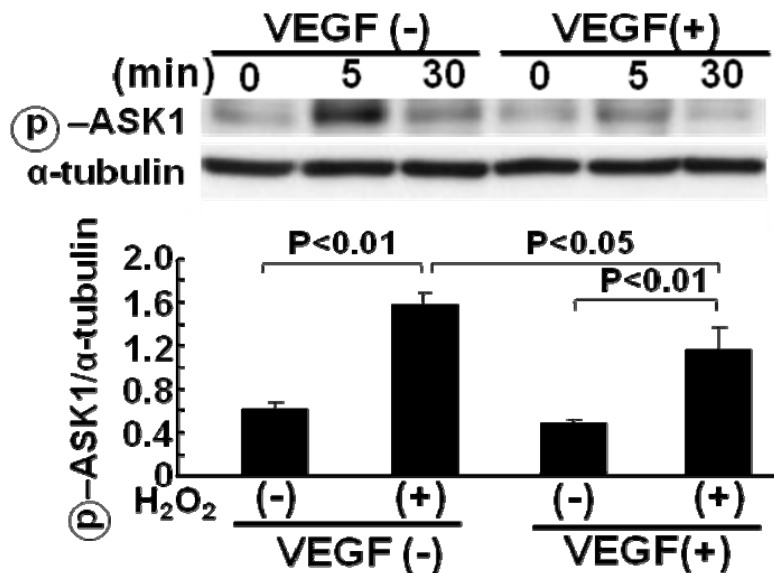
(B) 野生型マウス由来内皮細胞のH₂O₂刺激によるアポトーシスをVEGF投与、未投与で比較した。Active-caspase 3免疫染色にて評価した。

値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

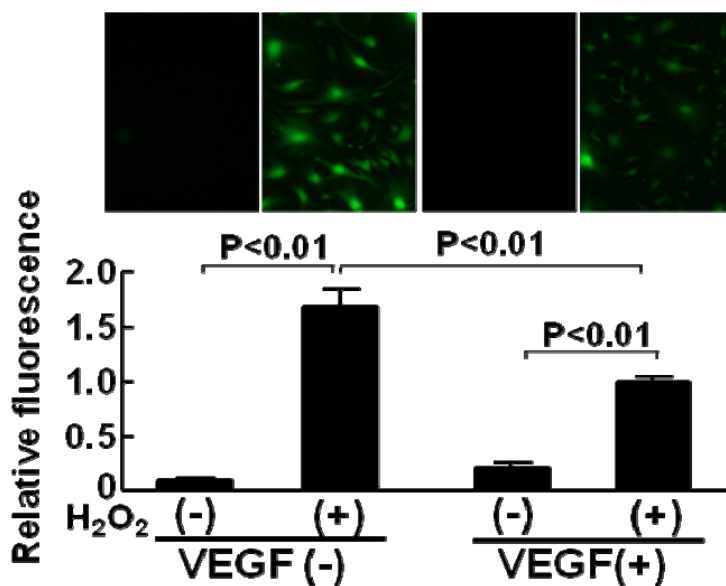
(各群で n=5)

図6-2

(C) ASK1の活性化におけるVEGFの役割



(D) 内皮細胞の酸化ストレス発生におけるVEGFの役割



(C) ウェスタンブロット法を用いて、野生型マウス由来内皮細胞のH₂O₂刺激によるASK1活性化をVEGF投与、未投与で比較した。

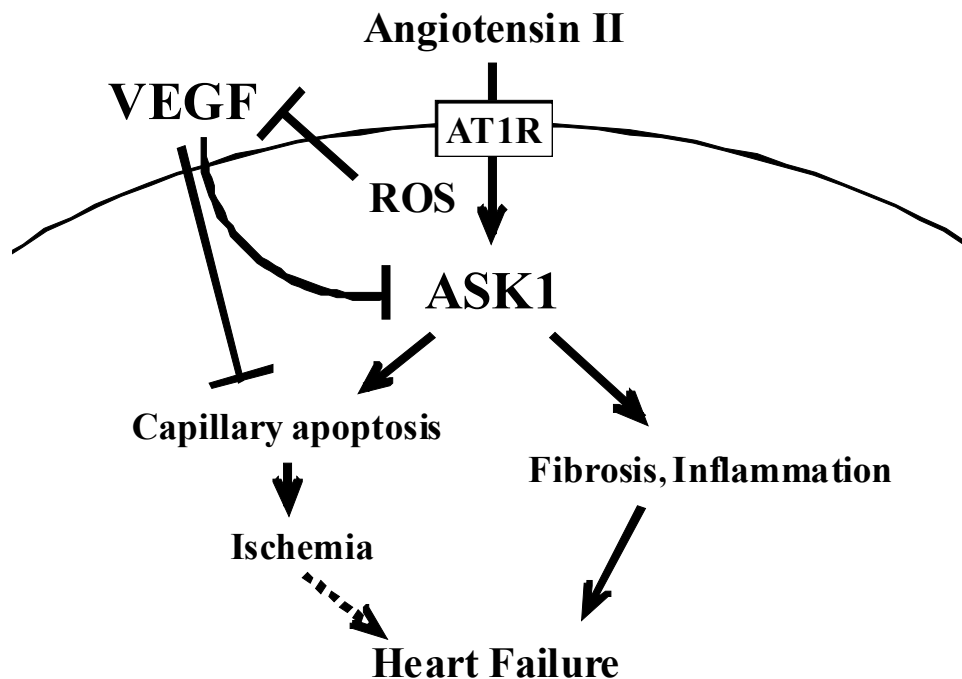
(D) 野生型マウス由来内皮細胞のH₂O₂刺激による酸化ストレス発生をVEGF投与、未投与で比較した。H₂DCFDA の蛍光強度を対照細胞比で示した。

値は平均値±標準誤差 (means±SEM) にて記した。

(各群で n=5)

図7

本研究で示されたアンジオテンシンⅡによる心臓傷害におけるASK1とVEGFの役割



本研究では、上図の分子機序により、最終的に代償性心肥大が非代償性心肥大・心不全に移行することを示すことができなかった（上図点線部分）。これを明らかにするには更なる研究が必要である。

12. 文献

1. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, Mizuno Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Ito T, Nakamura S, Kuwahara K, Saito Y, Nakao K, Ogawa H. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*. 2001;**104**:137-139
2. Sugiyama T, Sugiyama T, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Gochou N, Hirono Y, Tateno T, Fukai N, Shichiri M, Hirata Y. Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells. *Endocrinology*. 2005;146:3900-3906
3. Farez J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. Cardiac type-1 angiotensin II receptor status in deoxy-corticosterone acetate-salt hypertension in rats. *Hypertension*. 1997;30:1253-1259
4. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin ii-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;**52**:11-34
5. Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y, Kawano H, Kimoto M, Zhan Y, Iwao H. Effects of combination of ace inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure. *Circulation*. 2001;**103**:148-154
6. 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*. 2007;**27**:2569-2575
7. Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Role of xanthine oxidoreductase in the reversal of diastolic heart failure by candesartan in the salt-sensitive hypertensive rat. *Hypertension*. 2007;**50**:657-662
8. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005;**111**:2837-2849
9. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J. Effects of candesartan in patients with

- chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: The charm-preserved trial. *Lancet*. 2003;**362**:777-781
10. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;**25**:581-611
 11. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev*. 1992;**72**:369-417
 12. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y, Komuro I. P53-induced inhibition of hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007;**446**:444-448
 13. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. 2005;**115**:2108-2118
 14. Izumiya Y, Shiojima I, Sato K, Sawyer DB, Colucci WS, Walsh K. Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension*. 2006;**47**:887-893
 15. Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci*. 1993;18:128-131
 16. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80:179-185
 17. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8:205-215
 18. 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*. 1997;**275**:90-94
 19. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J*. 1998;17:2596-2606
 20. 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.* 2003;93:874-883
21. 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.* 2003;108:2812-2818
 22. Izumi Y, Kim-Mitsuyama S, Yoshiyama M, Omura T, Shiota M, Matsuzawa A, Yukimura T, Murohara T, Takeya M, Ichijo H, Yoshikawa J, Iwao H. Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1877-1883
 23. Yamamoto E, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y, Lai ZF, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Pravastatin enhances beneficial effects of olmesartan on vascular injury of salt-sensitive hypertensive rats, via pleiotropic effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:556-563
 24. S.Percy Ivy, Jeannette Y, Wick & Bennett M, Kaufman. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2009;6:569-579
 25. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, Doi Y, Mano T, Sakata Y, Ono K, Kuzuya T, Hirota S, Koyama T, Miwa T, Hori M. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: Systolic versus diastolic failure in dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* 2000;18:111-120
 26. Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Beneficial effects of pioglitazone on hypertensive cardiovascular injury are enhanced by combination with candesartan. *Hypertension.* 2008;51:296-301
 27. 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.* 2001;2:222-228
 28. Yamamoto E, Lai ZF, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y, Ito T, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens.*

2006;**24**:2057-2069

29. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;**87**:840-844
30. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. Nad(p)h oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;**86**:494-501
31. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007;**49**:241-248
32. Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. The ask1-map kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem.* 2004;**136**:261-265