

カルモジュリン関連タンパク質による
高血圧症およびその合併症の病態制御機構に関する研究：
血管・心・腎・脳による臓器連関に着目した検討

亀島 聡

平成 28 年度

Studies on the mechanisms of regulation of hypertension and
its complications by calmodulin-related proteins: focusing on
organ interaction between blood vessels, heart, kidney and brain

Satoshi Kameshima

2016

| | | |
|-----|---|----|
| I. | 緒論 | 1 |
| II. | 第一章 | 7 |
| | 1. 緒言 | 8 |
| | 2. 材料および方法 | 9 |
| | 2-1. 試薬 | 9 |
| | 2-2. 一次抗体 | 9 |
| | 2-3. 二次抗体 | 9 |
| | 2-4. 動物実験 | 10 |
| | 2-5. 平均肺動脈圧の測定 | 10 |
| | 2-6. 等尺性収縮張力測定 | 11 |
| | 2-7. 形態学的観察 | 12 |
| | 2-8. アザン染色 | 12 |
| | 2-9. ウェスタンブロッティング | 13 |
| | 2-10. ゼラチンザイモグラフィ | 13 |
| | 2-11. 統計解析 | 14 |
| | 3. 実験結果 | 15 |
| | 3-1. MCT 処置による平均肺動脈圧上昇および右心室重量増加に及ぼす MC1568、A-484954 または DI 投与の影響 | 15 |
| | 3-2. MCT 処置による右心室心筋細胞肥大に及ぼす A-484954 の影響 | 15 |
| | 3-3. MCT 処置による IPAs の弛緩機能障害に及ぼす A-484954 の影響 | 16 |
| | 3-4. MCT 処置による IPAs 壁肥厚に及ぼす A-484954 の影響 | 16 |

| | | |
|------|---|----|
| 3-5. | MCT 処置による肺組織内 eEF2K タンパク質発現 およびリン酸化亢進に及ぼす A-484954 の影響 | 17 |
| 3-6. | MCT 処置による肺組織内 NOX-1 タンパク質発現 亢進および活性酸素種産生増加に及ぼす A-484954 の影響 | 17 |
| 3-7. | MCT 処置による MMP-2 活性亢進および IPAs 壁線 維化に及ぼす A-484954 の影響 | 18 |
| 4. | 考察 | 19 |
| III. | 第二章 | 23 |
| 1. | 緒言 | 24 |
| 2. | 材料および方法 | 25 |
| 2-1. | 一次抗体 | 25 |
| 2-2. | 二次抗体 | 25 |
| 2-3. | 動物実験 | 25 |
| 2-4. | 形態学的観察 | 25 |
| 2-5. | 免疫組織化学染色 | 26 |
| 2-6. | ウェスタンブロッティング | 26 |
| 2-7. | 統計解析 | 26 |
| 3. | 実験結果 | 28 |
| 3-1. | 生体パラメータおよび臓器重量 | 28 |
| 3-2. | WKY, SHR 脳組織における HDAC4, eEF2K および DAPK3 タンパク質発現量の比較 | 28 |
| 3-3. | WKY, SHR 左心室組織における HDAC4, eEF2K お よび DAPK3 タンパク質発現量の比較 | 28 |
| 3-4. | SHR 肥大左心室組織における eEF2K の発現および | |

| | |
|---|----|
| 局在 | 29 |
| 3-5. WKY, SHR 腎臓組織における HDAC4, eEF2K およ び DAPK3 タンパク質発現量の比較 | 29 |
| 3-6. 腎臓組織における DAPK3 の発現および局在 | 29 |
| 4. 考察 | 31 |
| IV. 第三章 | 34 |
| 1. 緒言 | 35 |
| 2. 材料および方法 | 37 |
| 2-1. 試薬 | 37 |
| 2-2. 一次抗体 | 37 |
| 2-3. 二次抗体 | 37 |
| 2-4. SHR, WKY | 37 |
| 2-5. 圧負荷誘発心肥大モデルマウスの作製 | 38 |
| 2-6. Isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの作製 | 38 |
| 2-7. アザン染色 | 39 |
| 2-8. 免疫組織化学染色 | 39 |
| 2-9. ウェスタンブロッティング | 39 |
| 2-10. 統計解析 | 39 |
| 3. 実験結果 | 41 |
| 3-1. 心肥大モデル動物の体重、左心室重量、心室壁厚 および心機能の変化 | 41 |
| 3-2. SHR 左心室組織における eEF2K/eEF2 のリン酸化 | 42 |
| 3-3. TAC マウス左心室組織における eEF2K/eEF2 のタ ンパク質発現およびリン酸化 | 42 |
| 3-4. ISO ラット左心室組織における eEF2K/eEF2 のタ | |

| | |
|---------------|----|
| ンパク質発現およびリン酸化 | 42 |
| 4. 考察 | 44 |
| V. 総括 | 47 |
| VI. 謝辞 | 54 |
| VII. 引用文献 | 55 |
| Tables | 71 |
| Figs | 76 |

I. 緒論

Calmodulin (CaM)はあらゆる組織に広く分布する 149 アミノ酸残基からなるカルシウム結合タンパク質であり、CaM 関連タンパク質の機能調節を介して細胞周期[43]、筋収縮[86]、免疫応答[39]、代謝[57]、シナプス可塑性(長期および短期記憶)[66]など様々な細胞機能を制御する。当研究室ではこれまで CaM 関連タンパク質である histone deacetylase (HDAC)4, eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) kinase (eEF2K), death-associated protein kinase (DAPK)3 の高血圧症の病態における役割について検討を行ってきた。その結果、本態性高血圧症モデルである自然発症高血圧ラット(spontaneously hypertensive rats; SHR)の腸間膜動脈において、上記 3 分子の発現レベルが亢進していることを発見し[73]、これら分子が「血管系」における炎症性反応や収縮機能障害[74, 75, 78]、および壁構造変化(リモデリング)の促進[76, 77, 79]を介して本態性高血圧症の病態を進展することを初めて明らかにした。

HDACs は分子構造やドメイン構成などの違いによりクラス I (HDAC1, 2, 3, 8)、クラス II、クラス III (sirtuin family: sirt1-7) およびクラス IV (HDAC11)の 4 つのグループに分類される。さらにクラス II HDACs はキナーゼドメインが 1 つのクラス IIa (HDAC4, 5, 7, 9)と 2 つのクラス IIb (HDAC6, 10)に分けられる。多くの組織において広範に発現が認められるクラス I HDACs に対し、クラス II HDACs は脳や心臓など組織特異的に発現している[85, 88]。さらにクラス I HDACs は主に核内に局在しているが、クラス II HDACs はその構造内に nuclear localization signal (NLS)

および nuclear export signal を有するため核-細胞質間を移動することが可能であり、その局在は活性(リン酸化)によって変化する[44]。例えば、HDAC4 は CaM-dependent protein kinase (CaMK)II によりリン酸化が促進され、核から細胞質への移行を介して生存シグナル因子の発現を亢進し、神経細胞死を抑制する[4]。またラット消化管上皮細胞において HDAC4, 5 および 7 は protein kinase D1 によりリン酸化が促進され、核から細胞質への移行を介して細胞増殖を亢進する[63]。

eEF2K (別名 CaMKIII)は α キナーゼファミリーという比較的新規の小グループに属している[59]。 α キナーゼ領域は一般的なセリン/スレオニン/チロシンキナーゼとは異なる特徴的な触媒ドメイン構造をしており、基質の α -ヘリックス構造を認識し、近傍のスレオニン残基をリン酸化する[45]。また eEF2K の N 末端側と C 末端側をつなぐ linker domain には、その活性を抑制的(Ser359, Ser366, Ser396 残基など)または促進的(Ser348, Ser398, Ser500 残基など)に制御するリン酸化部位が存在する。アミノ酸や成長因子などの存在下で活性化する mammalian target of rapamycin (mTOR) は下流に存在する cyclin-dependent kinase1 の活性化を介して Ser359 残基を[64]、また p70S6 kinase を介して Ser366 残基を[83]それぞれリン酸化する。また細胞内のエネルギーセンサーである adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK)は eEF2K の Ser398 残基をリン酸化し[6]、cAMP-dependent protein kinase は Ser500 残基をリン酸化する[12]。さらに eEF2K はリン酸化のみならず Pro98 残基の水酸化[46]や低 pH [58]によっても活性化する。eEF2K の特異的基質である eEF2 はタンパク質翻訳を

調節しており、リボソームにおける翻訳産物の A 部位から P 部位へのトランスロケーションを guanosine triphosphate (GTP) 依存的に促進する [27]。活性化した eEF2K は eEF2 の Thr56 残基をリン酸化し不活化することでタンパク質翻訳を抑制する。eEF2K は一般的なタンパク質翻訳の調節だけでなく、アポトーシス抑制を介した腫瘍細胞の生存性亢進 [38] や神経成長因子の発現促進によるシナプス可塑性の制御 [66] などにも関与している。

DAPK ファミリーは DAPK1 (DAPK), DAPK2 (別名 DAPK-related protein1), DAPK3 (別名 Zipper-interacting protein kinase), DAPK-related apoptosis-inducing protein kinase (DRAK)1 および DRAK2 の 5 分子で構成される。DAPK3 のキナーゼ領域は DAPK1 と 83% の相同性があるが、C 末端領域においては DAPK1 が有する Ca^{2+}/CaM 結合領域を含む多くのドメインを欠く。一方で、NLS および leucine zipper 領域を有する [62]。DAPK3 は leucine zipper 領域を介してアポトーシス関連転写因子 activating transcription factor 4 と結合し、アポトーシスを促進する [28]。また DAPK3 は regulatory light chain (LC) 20 のリン酸化 [48] および myosin LC phosphatase の不活化 [19] を介して平滑筋収縮を促進する。一方 DAPK1 は DAPK3 を活性化することが報告されており、DAPK3 キナーゼと考えられている [61]。

高血圧症は遺伝的素因や食塩高感受性などに起因する本態性高血圧症、脳腫瘍および脳炎による脳圧亢進や腎疾患など他の疾患に続発する二次性高血圧症、肺循環に限局した肺高血圧症に分類される。また血圧は末梢血管のみならず脳、心臓、腎臓といった様々な臓器が相互に関連することで調節されている。例えば

血圧が低下し動脈圧受容器からの求心性迷走神経活性が低下すると、それを感知する延髄に存在する孤束核(nucleus of the solitary tract; NTS)の神経活性が低下する。すると NTS からの抑制性ニューロンを受けとる延髄吻側外腹側野(rostral ventrolateral medulla; RVLN)の活性が亢進する。RVLN は脊髄を介して末梢血管、心臓、腎臓へと下行性に交感神経を投射するため、結果的に末梢血管抵抗、心拍出量および腎交感神経活性が亢進し、血圧は上昇する。また血圧の低下は心臓の圧受容体とともに腎動脈灌流圧の低下として傍糸球体装置で感知され、腎レニン分泌亢進を介して renin-angiotensin (Ang) system (RAS)の活性を亢進し昇圧をおこす。したがって血管系における炎症性反応、リモデリング、収縮機能障害のみならず、心血管運動中枢を介した交感神経活性および RAS といった血管系以外の臓器による機能調節機構の異常によっても高血圧症の病態は進展すると考えられる。また高血圧状態の持続は腎臓や心臓を二次的に傷害することで、腎不全や心肥大(不全)などの合併症を誘導し、死亡率が増加する。既存の高血圧症治療薬である Ang 変換酵素阻害薬、Ang II 受容体拮抗薬、NO ドナー(硝酸化合物)、カルシウムチャネル拮抗薬、 α アドレナリン受容体拮抗薬などは主に「血管系」を作用点とする。これらの薬剤を使用した治療により症状改善および病態進展の抑制が可能となったが、これら薬物治療に抵抗性の高血圧症も存在する。そこで既存の薬剤とは異なる作用点および作用機序を有する薬剤の開発が必要である。

これまで HDAC4, eEF2K, DAPK3 の脳、心臓、腎臓における役割を示唆する研究報告がいくつか存在する。HDAC4 はクラス

IIa HDACs のなかでも脳組織における発現レベルが高く、視床下部に存在する心血管運動中枢の 1 つ室傍核 (paraventricular nucleus; PVN) においても発現が認められる [67]。また HDAC4 は腎糸球体足細胞におけるオートファジー抑制および炎症性反応の促進を介して糖尿病性腎症の病態を進展する [84]。 α アドレナリン受容体作動薬 phenylephrine (PE) は、CaMKII 依存的な HDAC4 のリン酸化を介して心筋細胞を肥大化する [1]。GABA_A 受容体選択的拮抗薬である bicuculline による神経細胞活性化に伴い eEF2K の活性化が亢進する [30]。腎糸球体足細胞における高グルコース負荷は eEF2K/eEF2 シグナルを介してタンパク質合成を促進する [36]。また成体ラット由来心筋細胞において adenosine triphosphate (ATP) 産生阻害は eEF2 リン酸化を亢進し、タンパク質翻訳を抑制する [41]。DAPK3 は新生仔ラット由来心筋細胞において、心筋型 myosin LC のリン酸化を促進する [8]。このような報告がこれまでになされているものの 3 分子の『本態性高血圧以外の高血圧症および合併症の病態』における役割、および『血管系以外の血圧調節臓器』における機能の制御機構の詳細はほとんど明らかになっていないと言える。そこで本研究では、肺高血圧発症・進展における 3 分子の役割(第一章)、SHR の脳、心臓、腎臓組織における 3 分子の発現と局在(第二章)、そして心肥大モデル動物の心臓組織における eEF2K および eEF2 の発現とリン酸化(第三章)について明らかにすることを目的として検討を行った。

本研究の結果、eEF2K が肺動脈壁のリモデリングを促進し肺高血圧症の病態を進展すること(第一章)、SHR の脳組織および心臓組織において HDAC4 および eEF2K の発現量がそれぞれ亢進しており、DAPK3 発現は腎臓組織で高く尿細管上皮細胞に局在していること(第二章)、そして肥大左心

室組織において eEF2K 活性が亢進し、それに伴い eEF2 が不活化していること(第三章)が明らかとなった。すなわち eEF2K は本態性高血圧以外の高血圧症および高血圧合併症の病態を制御すること、3 分子が血管系以外の血圧調節臓器の機能調節を介して高血圧症と合併症の病態を制御する可能性が初めて示された。

II. 第一章

モノクロタリン誘発肺高血圧発症・進展における CaM 関連タンパク質の
役割解明

1. 緒言

肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension; PAH)は圧負荷による右心不全を誘導する致死性疾患である。PAHは肺内肺動脈(intrapulmonary arteries; IPAs)の収縮機能障害、新生内膜形成および血管壁リモデリングなどによる血管内腔の狭窄が原因となり発症・進展する[65]。これまでにエンドセリン受容体やホスホジエステラーゼ 5、プロスタサイクリンなど様々な分子を標的とした薬剤が臨床応用されてきた。これらの併用による薬物治療は、PAH患者の症状を劇的に改善し、生活の質向上に貢献した。しかし症状が進行したPAH患者に対する治療法は肺移植による外科治療を除いて他に無いため、PAHに対する新規治療薬の開発が急務となっている。

当研究室では、HDAC4阻害薬MC1568[76]またはDAPK3阻害薬DAPK inhibitor (DI)[79]の投与が、マウス頸動脈結紮モデルにおける新生血管内膜形成を抑制すること、またeEF2K阻害薬NH125投与がSHRの腸間膜動脈における炎症性反応促進、収縮機能障害および血管壁リモデリングの抑制を介して降圧作用を示すこと[75]を明らかにした。HDAC4、eEF2KおよびDAPK3の3分子がPAHの病態にも関与することが推測される。そこで本章ではPAH発症・進展における上記3分子の役割解明を目的として検討を行った。

2. 材料および方法

2-1. 試薬

Monocrotaline (MCT; Wako Pure Chemical, Osaka, Japan), acetylcholine (ACh; Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan), noradrenaline (NA), sodium nitroprusside (SNP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), MC1568 (3-[5-(3-(3-fluorophenyl)-3-oxopropen-1-yl)-1-methyl-1H-pyrrol-2-yl]-N-hydroxy-2-propenamide; Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA), eEF2K inhibitor A-484954 (7-amino-1-cyclopropyl-3-ethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrido[2,3-*d*]-pyrimidine-6-carboxamide (Merck, Darmstadt, Germany), DI ((4*Z*)-4-(3-pyridylmethylene)-2-styryl-oxazol-5-one).

2-2. 一次抗体

Phospho-eEF2K (Ser500; EP4451, ECM Biosciences, Versailles, KY, USA), total eEF2K (GTX107879, Gene Tex, Irvine, CA, USA), NADPH oxidase (NOX)-1 (sc-25545, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), total actin (MAB1501, Sigma-Aldrich), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE; MHN-020P, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan).

2-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody, anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked whole antibody

(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2-4. 動物実験

動物の取り扱いについては「北里大学における動物実験と動物の飼育及び保管等に関する規定」に従い適切に行った(承認番号: 15-027)。5週齢の雄性 Wistar rats (Clea Japan, Tokyo, Japan) を対照群 (Cont, n = 9)、MCT 処置群 (MCT, n = 9)、MCT 処置に加えて MC1568 (MCT + MC; n = 4)、eEF2K 阻害薬 A-484954 (MCT + A-484954; n = 10)、DI (MCT + DI; n = 3) をそれぞれ投与した群の 5 群に無作為に分けた。MCT (60 mg/kg) の単回腹腔内投与により PAH を誘発した [29, 51]。Cont には滅菌生理食塩水を単回腹腔内投与した。各阻害薬の溶媒である 0.5% カルボキシメチルセルロース (Cont および MCT) または MC1568 (40 mg/kg, EOD)、A-484954 (2.5 mg/kg/day)、DI (0.5 mg/kg/day) の腹腔内投与は MCT 処置と同時に開始し 14 日間行った。投与終了後、ラットの平均肺動脈圧を測定し、ウレタン (1.5 g/kg, i.p.) 深麻酔下において放血により安楽殺した。右心室を摘出し湿重量を測定した。摘出肺左葉より IPAs (直径 500-1,000 μm) を単離し、等尺性収縮張力の測定に使用した。また右肺中葉は組織形態学および生化学的解析に使用した。

2-5. 平均肺動脈圧の測定

ウレタン (1.5 g/kg, i.p.) 麻酔下で右頸静脈を切開し、ヘパリン加生理食塩水で満たしたカテーテルを挿入した。右心房、三尖弁、右心室を經由してカテーテルの先端を肺動脈起始部にあて、

肺動脈圧を直接測定した [29, 51]。カテーテルは MLT0670 BP transducer (AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA) に接続し、ML117 BP Amp (AD Instruments)、ML825 PowerLab 2/25 (AD Instruments) および Chart5 software (AD Instruments) を用いて肺動脈圧を測定・記録した。

2-6. 等尺性収縮張力測定

ラット摘出肺左葉より IPAs (直径 500-1,000 μm) を単離し、2本の血管リング(動脈標本)を作製した。動脈標本の収縮張力測定は正常栄養液中 [136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 23.8 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 0.001 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)] で行った。等張性高濃度 K⁺液 (72.7 mM) は NaCl と同じ濃度の KCl を置換することにより作製した。これらの栄養液は 95% O₂ と 5% CO₂ の混合ガスを通気し、37 °C、pH7.4 に保った。肺動脈平滑筋の収縮は張力トランスデューサー (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) により等尺性に測定し、アンプ (EF601G, Nihon Kohden) および PowerLab system を用いて記録した [49, 87]。動脈標本は、正常栄養液を満たした容量 3 ml のマグナス管内で静止張力 0.5 g を負荷し [29]、30 分間静置した。安定化後、高濃度 K⁺液を繰り返し投与し、収縮張力が一定になった後に実験を開始した。濃度反応曲線は NA (100 nM; 最大収縮張力を誘導する濃度) による前収縮が安定した後に ACh (1 nM-30 μM) または SNP (100 pM-3 μM) を累積投与することにより求めた。最大弛緩率 (E_{max}) および pD₂ 値 (-log EC₅₀) は Sigma Plot software (Jandel Scientific, Richmond, CA, USA) を使用して算出した。

2-7. 形態学的観察

ラット摘出右肺中葉および右心室組織を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンで包埋した。作製した薄切切片 (4 μm) を hematoxylin and eosin (H&E) 染色し [29, 79]、光学顕微鏡 (BX-51, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察および写真の撮影 (MicroPublisher 5.0, QImaging, Surrey, Canada) を行った。血管壁肥厚は、無作為に選択した 3 本の IPAs (直径 50-100 μm) における内腔/血管壁面積比 (%) を Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて算出・平均し評価した。また右心室心筋細胞肥大は、3 視野からそれぞれ 10 個の心筋細胞を無作為に選択し、その横断面積を Image J software を用いて算出・平均し評価した。

2-8. アザン染色

ラット摘出右肺中葉を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、薄切切片 (4 μm) を作製した。脱パラフィン処理した切片を 5% potassium dichromate solution に 1 時間浸漬後、室温で azocarmine G 液 (Waldeck, Division Chroma, Munster, Germany) に一晩静置して染色した。切片を 12-tungsto-(VI)-phosphoric acid *n*-hydrate solution に 1 時間浸漬後、aniline blue-orange G 液 (Waldeck, Division Chroma) に 15 分静置して染色した [53]。光学顕微鏡 (BX-51) を用いて観察および写真の撮影 (MicroPublisher 5.0) を行った。血管壁の線維化は、無作為に選択した 3 本の IPAs (直径 50-100 μm) における線維化領域/血管壁面積比 (%) を Image J software を用いて算出・平均し評価した。

2-9. ウエスタンブロッティング

凍結したラット摘出右肺中葉に Triton-based lysis buffer [1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerol phosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin and 0.1% protease inhibitor mixture; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan]を処置して可溶化後、遠心分離(13000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間)してタンパク質サンプルを得た。サンプル中のタンパク質濃度は bicinchoninic acid (BCA)法 (Pierce, Rockford, IL, USA)を用いて定量した。等量のタンパク質(10-15 μg)を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 7.5%)で分離後(80-120 V, 1.5-2 時間)、ニトロセルロース膜(Pall, Ann Arbor, MI, USA)に転写した(400 mA, 1.5 時間)。転写膜を 3%ウシ血清アルブミン(抗リン酸化抗体を用いる場合)または 0.5%スキムミルク(その他)でブロッキングした後、一次抗体(1:500 希釈)を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。転写膜に結合した一次抗体はペルオキシダーゼ標識二次抗体(1:10,000 希釈、45 分間)と EZ-ECL system (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)を用いて可視化した。等量のタンパク質が泳動されていたことは抗 total actin (内部標準)抗体で発現量を調べることにより確認した。可視化したバンドの定量・解析は CS Analyzer 3.0 software (ATTO, Tokyo, Japan)を用いて行った[74]。

2-10. ゼラチンザイモグラフィ

Matrix metalloproteinase (MMP)-2 の活性を測定するためゼ

ラチンザイモグラフィーを行った [53]。Triton-based lysis buffer を用いてラット摘出右肺中葉から抽出した等量のタンパク質 (10 μg) を、ゼラチン (1.8 mg/ml) 含有 SDS-PAGE (7.5%) で分離した (120 V, 90 分間)。タンパク質を分離したゲルを extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5% Triton-X-100, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) 中で 1 時間振盪し SDS を除去した後、incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) 中で反応させた (6 時間、37°C)。ゲルを 0.1% Coomassie blue G-250 (Merck) で染色 (20 分間) した後、バンドが可視化するまでイオン交換水で洗浄した。バンドの定量・解析は CS Analyzer 3.0 software を用いて行った。

2-11. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で表した。また、統計評価は one-way ANOVA による分散分析後、Bonferroni の post hoc test を用いて行った。また、危険率 (p 値) が 5% 未満の場合に有意差ありとした。

3. 実験結果

3-1. MCT 処置による平均肺動脈圧上昇および右心室重量増加に及ぼす MC1568、A-484954 または DI 投与の影響

はじめに MCT 処置 (60 mg/kg, i.p.) による平均肺動脈圧上昇及び右心室重量増加に及ぼす MC1568 (40 mg/kg, EOD)、A-484954 (2.5 mg/kg/day) または DI (0.5 mg/kg/day) 投与 (14 日間) の影響を検討した。MCT 群の平均肺動脈圧は Cont 群と比較して有意に上昇することを確認した (25.6 ± 0.9 mmHg, MCT vs. 15.0 ± 0.8 mmHg, Cont, $n = 8$, $p < 0.01$, 表 1)。A-484954 (17.8 ± 2.1 mmHg, $n = 9$, $p < 0.05$, 表 1) はこれを有意に抑制したが、MC1568 (22.0 ± 3.6 mmHg, $n = 4$, 表 1) および DI (22.9 ± 1.0 mmHg, $n = 2$, 表 1) は影響を及ぼさなかった。肺動脈圧の上昇は圧負荷による右心室肥大を誘発する。MCT 群の右心室重量/尾長比は Cont 群と比較して有意に増加することを確認した (16.2 ± 0.6 mg/cm, MCT vs. 11.9 ± 0.5 mg/cm, Cont, $n = 9$, $p < 0.01$, 表 1)。A-484954 (14.1 ± 0.5 mg/cm, $n = 10$, 表 1) および MC1568 (14.2 ± 0.6 mg/cm, $n = 4$, 表 1) はこれを抑制したが、DI (16.6 ± 1.6 mg/cm, $n = 3$, 表 1) は影響を及ぼさなかった。また MC1568 および DI は MCT 処置による肺動脈圧上昇に影響を及ぼさなかったため、これ以降は Cont 群、MCT 群、MCT + A-484954 群の 3 群において比較検討した。

3-2. MCT 処置による右心室心筋細胞肥大に及ぼす A-484954 の影響

MCT 群における右心室心筋細胞の横断面積は Cont 群と比較し有意に増加することを確認した ($n = 5-7$, $p < 0.01$, 図 1AB)。
A-484954 はこれを有意に抑制した ($n = 7$, $p < 0.01$, 図 1AB)。

3-3. MCT 処置による IPAs の弛緩機能障害に及ぼす A-484954 の影響

IPAs の弛緩機能障害は PAH の病態進展を促進する。そこで MCT による内皮依存性および非依存性弛緩機能障害に及ぼす A-484954 の影響について検討した。NA で前収縮させた Cont 群のラット摘出 IPAs (500-1,000 μm) において、ACh (1 nM-30 μM , $n = 14$, 図 2A、黒丸) または SNP (100 pM-3 μM , $n = 15$, 図 2B、黒丸) の累積投与は濃度依存性の弛緩反応を誘導した (ACh: $pD_2 = 6.13 \pm 0.04$, $E_{\text{max}} = 73.0 \pm 3.3\%$; SNP: $pD_2 = 7.61 \pm 0.02$, $E_{\text{max}} = 95.5 \pm 1.8\%$, 表 2)。
MCT ラット摘出 IPAs において、ACh ($n = 9$, $p < 0.05$: 1 μM および $p < 0.01$: 3-30 μM , 図 2A、白丸) または SNP ($n = 8$, 10 nM-3 μM , $p < 0.01$, 図 2B、白丸) による弛緩反応は Cont 群と比較して有意に減弱することを確認した (ACh: $pD_2 = 5.99 \pm 0.20$, $E_{\text{max}} = 45.8 \pm 6.2\%$; SNP: $pD_2 = 6.40 \pm 0.30$, $E_{\text{max}} = 70.4 \pm 8.0\%$, 表 2)。
A-484954 (ACh: $n = 10$, 図 2A、白四角; SNP: $n = 14$, 図 2B、白四角) は MCT による IPAs の弛緩機能障害には影響を及ぼさなかった (ACh: $pD_2 = 6.19 \pm 0.10$, $E_{\text{max}} = 48.0 \pm 6.6\%$; SNP: $pD_2 = 6.74 \pm 0.28$, $E_{\text{max}} = 68.6 \pm 6.5\%$, 表 2)。

3-4. MCT 処置による IPAs 壁肥厚に及ぼす A-484954 の影響

IPAsの壁肥厚はPAHの病態進展に重要な役割を担っている。そこでMCTによるIPAs壁肥厚に及ぼすA-484954の影響について検討した。MCT処置によりIPAsの内腔/血管壁面積比が有意に低下することを確認した($31.4 \pm 3.0\%$, MCT vs. $64.0 \pm 5.0\%$, Cont, $n = 9$, $p < 0.01$, 図 3AB)。A-484954はこれを有意に抑制した($58.8 \pm 8.0\%$, $n = 10$, $p < 0.01$, 図 3AB)。

3-5. MCT処置による肺組織内eEF2Kタンパク質発現およびリン酸化亢進に及ぼすA-484954の影響

次に肺組織におけるeEF2Kタンパク質発現およびリン酸化の解析を行った。MCTはeEF2Kタンパク質発現($n = 9$, 図 4)およびSer500残基のリン酸化($n = 9$, $p < 0.01$, 図 4)を亢進した。A-484954はMCTによるeEF2K Ser500残基のリン酸化(活性化)亢進を有意に抑制した($n = 10$, $p < 0.05$, 図 4)。一方、A-484954はMCTによるeEF2Kタンパク質発現の亢進には影響を及ぼさなかった($n = 9-10$, 図 4)。

3-6. MCT処置による肺組織内NOX-1タンパク質発現亢進および活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)産生増加に及ぼすA-484954の影響

ROSがPAHの病態を促進的に制御することが報告されている[80]。そこで主要なROS産生酵素であるNOX-1のタンパク質発現およびROS由来脂質過酸化物である4-HNEの付加体発現をウ

エステンブロッティングにより検討した。MCT ラット摘出肺組織における NOX-1 タンパク質発現 ($n = 9, p < 0.01$, 図 5A) および 4-HNE 付加体の蓄積 ($n = 4, p < 0.05$, 図 5B) は Cont 群と比較し有意に亢進していた。A-484954 はこれらを有意に抑制した (NOX-1: $n = 10, p < 0.05$, 図 5A; 4-HNE: $n = 4, p < 0.05$, 図 5B)。なお、MCT 肺組織における NOX-2 および -4 の mRNA 発現量は Cont 群と比較して変化がなかった ($n = 3-4$; data not shown)。また抗酸化酵素である extracellular (EC)-superoxide dismutase (SOD), Mn-SOD および Cu/Zn-SOD の発現量を比較したところ、MCT 肺組織において EC-SOD タンパク質発現量が Cont 群と比較して減少していたが、A-484954 はこれに影響を及ぼさなかった。Mn-SOD および Cu/Zn-SOD のタンパク質発現量は各群で変化がなかった ($n = 6-7$; data not shown)。

3-7. MCT 処置による MMP-2 活性亢進および IPAs 壁線維化に及ぼす A-484954 の影響

最後に ROS の制御分子であり、血管壁の線維化に関連する MMP-2 の活性および IPAs 壁の線維化を検討した。MCT ラット摘出肺組織における MMP-2 活性 ($n = 7-9, p < 0.01$, 図 6) および IPAs 壁線維化 ($n = 6, p < 0.01$, 図 7AB) は Cont 群と比較し有意に亢進した。A-484954 は MCT による MMP-2 活性亢進 ($n = 8, p < 0.05$, 図 6) および IPAs 壁線維化 ($n = 6, p < 0.01$, 図 7AB) を有意に抑制した。一方、MMP-9 の活性は各群で変化がなかった ($n = 2-3$; data not shown)。

4. 考察

PAHはIPAsにおける血管収縮機能障害や新生内膜形成、血管壁リモデリングなどにより生じる持続的な肺動脈圧上昇を特徴とする疾患である[65]。本章ではeEF2K阻害薬A-484954長期間(2週間)投与がMCTによる肺動脈圧上昇を阻害し(表1)、右心室心筋細胞肥大を抑制する(図1AB)ことを示した。またA-484954はMCTによるIPAsの弛緩機能障害には影響を及ぼさなかったが(図2AB)、血管壁肥厚を抑制した(図3AB)。さらにA-484954はMCT肺組織におけるNOX-1タンパク質発現亢進(図5A)およびROS産生増加(図5B)を抑制した。以上の結果からeEF2Kは血管収縮機能障害ではなく、ROS依存性の機序を介した血管壁リモデリングを促進しMCT誘発PAHの病態の発症・進展に関わることが示唆された。当研究室ではこれまでに、eEF2Kが腸間膜動脈平滑筋細胞におけるROS産生増加と血管壁リモデリング促進を介してSHRの全身血圧上昇に関与することを明らかにしていることから[75, 77]、eEF2Kが共通の機序により全身性のみならず肺高血圧の病態に関わることが示された。一方、HDAC4阻害薬MC1568およびDAPK3阻害薬DIはMCTによる肺動脈圧上昇に影響を及ぼさなかった(表1)ため、MCT誘発PAHの病態にHDAC4およびDAPK3は関与しない可能性が示唆された。

本章ではさらにMCTラット摘出肺組織においてMMP-2活性が亢進し、A-484954投与はこれを有意に抑制することを示した(図6)。MMP-2は肺動脈壁の肥厚および線維化を亢進する重要な因子であり、血管内皮細胞および平滑筋細胞の遊走・増殖、血管外膜由来線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化、コラーゲン産生、

血管中膜へのリンパ球浸潤などを促進する[9]。特発性 PAH 患者由来の肺動脈平滑筋細胞において、MMP-2 の発現および活性が亢進している[37]。また PAH 患者の尿中から高濃度の MMP-2 前駆体が検出されている[2]。さらに肺高血圧症モデル動物の IPAs においても MMP-2 の発現および活性が亢進する[10, 15, 35]。一方、誘導型ゼラチナーゼである MMP-9 も PAH の病態進展に重要な役割を担っている[17]。しかし、本研究では MCT により MMP-9 の活性は変化しなかった(n = 2-3; data not shown)。Frisdal ら[15]も MCT 誘発 PAH モデルの摘出肺動脈において MMP-9 活性は変化していないと報告している。以上より MMP-9 活性は PAH の病態および病期により変化する可能性がある。これまでに特異的 MMP 阻害薬である batimastat が低酸素誘発 PAH の病態進展を抑制したと報告されている[20]。PAH の病態を促進する分子である ROS は MMPs の活性化に重要である[68]。A-484954 は MCT による IPAs 壁の線維化を有意に抑制した(図 7AB)。Poiani ら[54]は、低酸素誘発 PAH モデルラットから摘出した肺動脈においてコラーゲン産生が亢進していることを示した。よって eEF2K は NOX-1/ROS/MMP-2 経路を介して IPAs 壁の線維化を伴うリモデリングを促進することが示唆される。

MCT ラット摘出肺組織において、eEF2K Ser500 残基のリン酸化だけでなく発現量も亢進していた。eEF2K のキナーゼ活性は多くのリン酸化部位により制御されている。Ser500 残基のリン酸化は eEF2K を活性化することが知られている[12]。すなわち eEF2K タンパク質発現の増加に伴い Ser500 残基のリン酸化(活性化)が亢進したと考えられる。当研究室ではこれまで、ラット腸間

膜動脈由来平滑筋細胞 (rat mesenteric arterial smooth muscle cells; rMASMCs)において eEF2K が血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF)による extracellular signal-regulated kinase (ERK), Akt, p38 の活性化に関与することを明らかにしている [77]。これらのシグナル伝達分子が NOX の遺伝子発現を制御することも報告されている [70]。したがって eEF2K は ERK, Akt, p38 の活性化を介して NOX-1 発現を制御すると考えられる。さらに ROS の制御分子である nuclear factor- κ B および c-Jun N-terminal kinase は MMP 活性を亢進することが報告されている [72]。よって eEF2K はこれらのシグナル伝達分子を介して MMP-2 を活性化すると推測される。ERK, Akt, p38 は細胞増殖および遊走に関連するシグナル伝達分子である。当研究室では eEF2K がこれらの分子を活性化することで rMASMCs の増殖および遊走を促進することを明らかにしている [77]。したがって eEF2K は肺動脈平滑筋細胞においても同様の機序により IPAs 壁の肥厚を促進する可能性がある。Veit ら [80]は、MCT ラット肺動脈由来平滑筋細胞において NOX-1 mRNA 発現の亢進に伴い細胞増殖および遊走が促進することを報告しており、本研究結果を支持している。

本章で用いた MCT 誘発 PAH モデルでは、ヒトにおける PAH の病態を完全には再現していない。例えば、ヒト PAH の IPAs における特徴的な叢状病変が、このモデルの IPAs では観察されない。肺動脈中膜壁の肥厚に加えて叢状病変も血管内腔を狭窄する原因であり、PAH に対する新たな治療標的となっている。MCT 処置に加え片側肺葉切除術を施した PAH モデル、または血管内皮増殖因子受容体阻害薬である SU-5416 を投与し低酸素に暴露した PAH

モデルでは叢状病変が生じると報告されている[40]。今後これらのモデルを用いて eEF2K が病態に及ぼす影響を検討する必要がある。また本章では右心機能について評価していない。右心不全は PAH 患者の致死率に対する主要な予測因子である。さらに長期間の A-484954 投与により右心不全が改善する可能性があり、今後の重要な検討項目である。

結論として、eEF2K は NOX-1/ROS/MMP-2 経路を介して肺動脈壁の線維化を含むリモデリングを誘導することで肺動脈圧を上昇し、PAH の発症・進展に関わることを明らかにした(図 8)。本章における結果から、eEF2K が PAH に対する新規創薬標的となることが大いに期待される。

III. 第二章

SHR の脳、心臓、腎臓組織における CaM 関連タンパク質の発現および局在の解析

1. 緒言

CaM 関連タンパク質は平滑筋収縮 [86] や細胞周期 [43]、代謝 [57] など様々な細胞機能を制御する。当研究室ではこれまでに CaM 関連タンパク質である HDAC4, eEF2K (CaMKIII) および DAPK3 が SHR の腸間膜動脈で高発現していることを発見した [73]。加えて、これらの分子が血管平滑筋細胞において ROS を介した tumor necrosis factor (TNF)- α 誘導性炎症性反応 [74, 75, 78]、および PDGF-BB 誘導性細胞増殖・遊走 [76, 77, 79] を亢進することで末梢血管抵抗を増大し、SHR における高血圧症病態を促進的に制御することを初めて明らかにした。

全身血圧は末梢血管抵抗および血液量によって調節されているが、これには血管系のみならず脳、心臓、腎臓など他の臓器も影響を及ぼす。近年 CaMKII が脳、心臓、腎臓の機能調節を介した循環器系疾患の病態制御に関与する可能性が示唆されている。例えば、SHR から摘出した肥大心臓組織において CaMKII のタンパク質発現 [18] および活性 [3] が亢進している。CaMKII は cyclic AMP response element-binding protein/Wnt/ β -catenin シグナル経路を介して Ang II による腎臓足細胞障害およびアルブミン尿症を促進する [22]。加えて、CaMKII 阻害薬 tatCN21 は脳梗塞モデルマウスにおける神経細胞死を抑制する [81]。したがって HDAC4, eEF2K および DAPK3 を含む他の CaM 関連タンパク質も心臓、腎臓および脳の機能調節を介して本態性高血圧症の病態を制御する可能性がある。そこで本章では SHR 摘出心臓、腎臓、脳組織における HDAC4, eEF2K および DAPK3 の発現および局在について検討した。

2. 材料および方法

2-1. 一次抗体

Total HDAC4 (E021141, Eno Gene, New York, NY, USA), total eEF2K (GTX1078079, Gene Tex), total DAPK3 (GTX102404, Gene Tex), β -actin (21338, Signalway Antibody, College Park, MD, USA).

2-2. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Biosciences).

2-3. 動物実験

動物の取り扱いについては「北里大学における動物実験と動物の飼育及び保管等に関する規定」に従い適切に行った(承認番号: 15-022)。12週齢の雄性 SHR (Hoshino Laboratory Animals, Inc, Ibaraki, Japan) および Wistar Kyoto rats (WKY) の収縮期血圧 (systolic blood pressure, SBP) をテイルカフ法により測定した [75]。測定後、ラットをウレタン (1.5 g/kg, i.p.) 深麻酔下において放血により安楽殺し、脳、左心室および腎臓を摘出した後、それぞれの湿重量を測定した。各組織はタンパク質発現解析および組織形態学的解析に使用した。

2-4. 形態学的観察

摘出左心室および左腎臓組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋した。作製した薄切切片 (4 μ m) を H&E

染色し[29, 79]、光学顕微鏡(BX-51)を用いて観察及び写真の撮影(MicroPublisher 5.0)を行った。左心室心筋細胞肥大は、3視野からそれぞれ10個の心筋細胞を無作為に選択し、その横断面積をImage J softwareを用いて算出・平均し評価した。

2-5. 免疫組織化学染色

左心室および左腎臓組織の薄切切片を脱パラフィン処理後、マイクロウェーブで加熱することにより抗原を賦活化した。Dako REAL peroxidase-blocking solution (Dako, Glostrup, Denmark)を15分間処置し内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。5%正常ヤギ血清によりブロッキング(60分間)後、一次抗体(希釈倍率 1:250)を4℃で一晩反応させた。洗浄後、biotinylated link (Dako)を10分間、つづいて streptavidin-HRP (Dako)を10分間室温で処置し、liquid DAB + substrate chromogen system (Dako)を用いて可視化した。光学顕微鏡(BX-51)を用いて観察及び写真の撮影(MicroPublisher 5.0)を行った。左心室組織におけるeEF2Kタンパク質発現量は、3視野の抗eEF2K抗体陽性領域をImage J softwareにより算出・平均し評価した。

2-6. ウェスタンブロッティング

第一章 2.材料および方法、2-9.ウェスタンブロッティングの項を参照[74]。なお本章の実験では、等量のタンパク質(10 µg)をSDS-PAGE (10%)により分離した。

2-7. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表した。6群間の統計評価は one-way ANOVA による分散分析後、Bonferroni の post hoc test を、2群間の統計評価は Student の t-test を用いて行った。また、危険率 (p 値) が 5% 未満の場合に有意差ありとした。

3. 実験結果

3-1. 生体パラメータおよび臓器重量

SHRの体重はWKYと比較して有意に低かった(260.4 ± 5.5 g, SHR vs. 281.0 ± 3.8 g, WKY, $n = 7$, $p < 0.01$, 表 3)。SHRの収縮期血圧(179.3 ± 2.8 mmHg, SHR vs. 114.6 ± 5.7 mmHg, WKY, $n = 7$, $p < 0.01$, 表 3)および左心室重量/体重比(3.11 ± 0.06 mg/g, SHR vs. 2.62 ± 0.08 mg/g, WKY, $n = 7$, $p < 0.01$, 表 3)はWKYと比較して有意に高かった。一方、左または右腎臓重量/体重比は両群間で差がなかった($n = 7$, 表 3)。

3-2. WKY, SHR 脳組織におけるHDAC4, eEF2KおよびDAPK3タンパク質発現量の比較

WKY脳組織において、eEF2KおよびHDAC4タンパク質発現量は同程度であり、DAPK3タンパク質発現量はそれらと比較し低かった($n = 5$, 図 9AB)。SHR脳組織におけるHDAC4タンパク質発現量はWKYと比較して有意に高かった($n = 5$, $p < 0.01$, 図 9AB)。

3-3. WKY, SHR 左心室組織におけるHDAC4, eEF2KおよびDAPK3タンパク質発現量の比較

WKY左心室組織において、eEF2Kタンパク質発現量はDAPK3およびHDAC4タンパク質発現量と比較し高かった($n = 7$,

図 9AC)。SHR 左心室組織における eEF2K タンパク質発現量は WKY と比較して有意に高かった ($n = 7, p < 0.05$, 図 9AC)。

3-4. SHR 肥大左心室組織における eEF2K の発現および局在

次に、組織形態学的手法を用いて SHR における左心肥大および eEF2K タンパク質の発現・局在について検討した。SHR 左心室心筋細胞の横断面積は WKY と比較し有意に増加していた ($400.7 \pm 27.4 \mu\text{m}^2$, SHR vs. $266.6 \pm 19.6 \mu\text{m}^2$, WKY, $n = 5, p < 0.01$, 図 10A-a, b and B)。ラット左心室組織において eEF2K タンパク質は主に心筋細胞に局在していた ($n = 5$, 図 10A-c, d)。加えて SHR 左心室心筋細胞における抗 eEF2K 抗体陽性領域は WKY と比較して有意に増加していた (1.84-fold relative to WKY, $n = 5, p < 0.05$, 図 10A-c, d and C)。

3-5. WKY, SHR 腎臓組織における HDAC4, eEF2K および DAPK3 タンパク質発現量の比較

WKY 腎臓組織において、DAPK3 タンパク質発現量が eEF2K および HDAC4 タンパク質発現量と比較して高かった ($n = 7$, 図 9AD and E)。いずれのタンパク質も両群間で発現量に差は認められなかった ($n = 7$, 図 9AD and E)。

3-6. 腎臓組織における DAPK3 の発現および局在

次に免疫組織化学染色により腎臓組織における DAPK3 タンパク質の発現と局在について検討した。左腎臓組織における DAPK3 発現量は、ウエスタンブロッティングによる解析結果と同様に両群間で差は認められなかった (n = 5, 図 11)。また DAPK3 タンパク質発現は腎皮質よりも腎髄質で高く、尿細管上皮細胞に局在していた (n = 5, 図 11)。

4. 考察

本章では、WKY および SHR の脳、心臓、腎臓組織における HDAC4, eEF2K および DAPK3 タンパク質の発現量および局在について検討し、以下のことが明らかになった。(1) 3 分子のタンパク質発現レベルは各組織で異なっていた。(2) 左心室組織において eEF2K タンパク質は心筋細胞に、腎臓組織において DAPK3 タンパク質は尿細管上皮細胞に局在していた。(3) SHR の脳組織における HDAC4 タンパク質発現および左心室組織における eEF2K タンパク質発現は WKY と比較して有意に高かった。これらの結果は、脳組織における HDAC4 発現亢進および左心室心筋細胞における eEF2K 発現亢進が、それぞれの組織における機能調節を介して SHR の高血圧症病態に関与する可能性を示唆している(図 12)。

ラット脳組織において HDAC4 および eEF2K タンパク質発現量は同程度であり、それらと比較して DAPK3 タンパク質発現量は低かった。加えて SHR 脳組織における HDAC4 タンパク質発現量は WKY と比較して有意に高かった(図 9AB)。HDAC4 は神経細胞の生存性やシナプス可塑性など中枢神経系の機能を制御することが知られている[44]。アディポサイトカインであるアペリンは、ヒト臍帯静脈内皮細胞において HDAC4 のリン酸化および核から細胞質への移行を促進する[26]。加えて Zhang ら[92]は、心血管機能の制御中枢である延髄 RVLM におけるアペリン発現量が WKY と比較し SHR において有意に亢進していることを明らかにした。さらに WKY の RVLM におけるアペリンタンパク質過剰発現は有意な血圧上昇を誘導した。これらの報告から、本章で明らかにした SHR 脳組織における HDAC4 発現亢進は RVLM の機能

制御を介して血圧上昇に関わる可能性を示唆している。

ラット左心室組織において eEF2K タンパク質発現量は DAPK3 および HDAC4 タンパク質発現量と比較して高かった。さらに SHR 左心室の肥大心筋細胞における eEF2K 発現量は WKY 正常心筋細胞と比較して有意に高かった(図 9AC, 10A-c, d and C)。eEF2K は特異的基質である eEF2 の活性を調節することでタンパク質翻訳を制御する。eEF2K が不活化することで eEF2 の脱リン酸化が亢進し(活性化)、タンパク質翻訳が促進する[55]。タンパク質合成の促進は心筋細胞を肥大化する要因の一つである。新生仔ラット由来心筋細胞において、Ang II は ERK および phosphatidylinositol-3 kinase 経路を介した eEF2 の脱リン酸化亢進によりタンパク質合成を促進する[14]。eEF2K の Ser359, Ser366 および Ser396 残基は mTOR, ERK, p38 を含むシグナル伝達分子によってリン酸化が亢進し、その活性が抑制される[69]。したがって eEF2K 発現亢進に伴う上記セリン残基のリン酸化亢進は eEF2 の脱リン酸化を介した心肥大の促進機序に関与するかもしれない。

ラット腎臓組織において DAPK3 タンパク質発現量が最も高かったが、SHR と WKY との間で差は認められなかった(図 9AD and E)。また DAPK3 タンパク質は腎尿細管上皮細胞に局在していた(図 11)。DAPK はタンパク質間相互作用や種々のシグナル経路を介してアポトーシス、オートファジー、成長、免疫応答などの細胞機能を制御する[39]。遺伝的に DAPK のキナーゼ活性を欠損したマウスは、腎尿細管上皮細胞のアポトーシス抑制を介して虚血再灌流による腎障害に抵抗性を示す[33]。したがって DAPK3 は

腎障害を促進的に制御することで、高血圧症の病態を進展する可能性が示唆される。しかし、WKY および SHR の腎臓における DAPK3 タンパク質発現量は同程度であったため、SHR の血圧上昇には関与しないかもしれない。

結論として、本章では SHR の脳組織における HDAC4 タンパク質発現量および左心室組織における eEF2K タンパク質発現量が WKY と比較して有意に高いことを初めて示した。さらに詳細な検討が必要であるが、本研究結果から脳組織における HDAC4 発現亢進および左心室組織における eEF2K 発現亢進が、SHR における高血圧症の病態進展に関与する可能性が示唆された。

IV. 第三章

心肥大モデル動物の左心室組織における eEF2K/eEF2 タンパク質発現と
活性化の解析

1. 緒言

CaM 関連タンパク質の一つである eEF2K のアミノ酸配列は高度に保存されており、ヒトと齧歯類の間で 90%、マウスとラットの間に 97% の相同性がある [60]。eEF2K は α キナーゼファミリーという比較的新規の小グループに属しており [58]、その構造に含まれる α キナーゼ触媒領域は eEF2K がもつ基質特異性に大きく貢献している [45]。 α キナーゼ触媒領域の近傍には CaM 結合領域や linker domain と呼ばれる領域が存在し、Ser78, Thr348, Ser366 残基など様々なリン酸化部位が含まれている。これらのリン酸化部位は eEF2K の活性を促進的または抑制的に制御する。活性化した eEF2K は特異的基質である eEF2 の Thr56 残基をリン酸化する。eEF2 の構造および機能も高度に保存されている [47]。eEF2 はリボソームにおいて、GTP 依存的にペプチド鎖と結合した tRNA を A 部位から P 部位へと転移させることでタンパク質翻訳を促進する [27]。eEF2 はリン酸化により不活化されるため、結果的にタンパク質翻訳は抑制される。したがって活性化した eEF2K は eEF2 のリン酸化を介してその機能を抑制する。

心肥大は高血圧症や心筋症、弁膜疾患、先天性心奇形などによって誘導される代償性の反応であるが、最終的には心不全へと進展し死に至る。タンパク質合成の亢進は心肥大を引き起こす主要な原因の一つであることが知られている。心肥大を誘導する生理活性物質である Ang II は、新生仔ラット由来心筋細胞において protein phosphatase 2A の活性化または mitogen-activated protein kinases シグナル経路を介して eEF2 の脱リン酸化を亢進する [16]。一方、 β アドレナリン受容体作動薬である isoproterenol は、成体

ラット由来心筋細胞において $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性に eEF2 リン酸化を亢進しタンパク質合成を抑制する [42]。第二章において、SHR の肥大左心室心筋細胞における eEF2K タンパク質発現量が WKY と比較して有意に増加していることを示した。しかし SHR を含む心肥大モデル動物の左心室組織における eEF2K/eEF2 の発現および活性については明らかにしていない。そこで本章では SHR、圧負荷および isoproterenol 誘発心肥大モデル動物の左心室組織における eEF2K/eEF2 の発現およびリン酸化について明らかにすることを目的とした。

2. 材料および方法

2-1. 試薬

Propofol (Mylan N. V., Tokyo, Japan), diethyl ether (Wako Pure Chemical), buprenorphine (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan), isoproterenol bitartrate (Sigma-Aldrich), pentobarbital (Sumitomo Dainippon Pharma, Tokyo, Japan).

2-2. 一次抗体

Phospho-eEF2K (Ser366; A0071, Assay Biotech, Sunnyvale, CA, USA), total eEF2K (GTX107879, Gene Tex), phospho-eEF2 (Thr56; ADI-905-775-100, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA), total eEF2 (A301-688A-T, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), GAPDH (GTX100118, Gene Tex).

2-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Biosciences).

2-4. SHR, WKY

全ての動物の取り扱いについては「北里大学における動物実験と動物の飼育及び保管等に関する規定」に従い適切に行った(承認番号: 10-099, 14-123, 15-022)。12週齢の雄性 SHR (Hoshino Laboratory Animals, Inc.)および WKY をウレタン(1.5 g/kg, i.p.)深麻酔下で放血により安楽殺し、左心室を摘出した。タンパク質抽

出後、ウエスタンブロッティングによる発現解析に使用した。

2-5. 圧負荷誘発心肥大モデルマウスの作製

雄性 C57BL/6NJcl マウス(15-27 g; Clea Japan)に横行大動脈狭窄術(transverse aortic constriction; TAC)を施した。マウスの腹腔内に propofol (100 mg/kg)を投与後、diethyl ether の吸入により麻酔した。頸胸部を正中切開し、横行大動脈を露出した。大動脈の腕頭動脈と左総頸動脈の間を鈍化した 27 G 注射針(外径: 0.40 mm)と共に 7-0 絹糸で結紮後、すぐに注射針を抜去した。皮膚を 6-0 ナイロン糸で縫合し、鎮痛のために buprenorphine (0.12 mg/kg)を皮下投与した。偽手術群(SHAM)のマウスには大動脈の狭窄を除き同様の処置を施した。TAC 3 日後、SONOS 5500 (Hewlett-Packard Co., Andover, MA, USA)を用いて心エコー検査を行った。心拍数を 420-480 bpm に維持し、M モードにて拡張(diastolic phase; d)および収縮末期(systolic phase; s)の心室中隔壁厚(interventricular septum; IVS)、左室内径(left ventricular internal diameter; LVID)、左室後壁厚(left ventricular posterior wall; LVPW)を測定した。また左室内径短縮率(fractional shortening; FS)を算出した $[(LVIDd-LVIDs)/LVIDd \times 100 (\%)]$ 。なお、一個体につき 3 点で測定を行い、その平均値を算出した。エコー検査後、pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)深麻酔下で左心室を摘出し湿重量を測定した。タンパク質抽出後、ウエスタンブロッティングによる発現解析に使用した。

2-6. Isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの作製

雄性 Wistar rats (150-180 g; Clea Japan)に isoproterenol (5 mg/kg/day)を皮下投与し心肥大を誘導した(ISO) [52]。対照群のラットには滅菌生理食塩水を皮下投与した(Cont)。投与 7 日後、pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)深麻酔下で左心室を摘出し湿重量を測定した。左心室組織はタンパク質抽出後にウエスタンブロッティングによる発現解析、または 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後に組織形態学的解析に使用した。

2-7. アザン染色

第一章 2.材料および方法、2-8.アザン染色の項を参照 [53]。

2-8. 免疫組織化学染色

第二章 2.材料および方法、2-5.免疫組織化学染色の項を参照。なお本章の実験では、一次抗体として total eEF2K (1:250 希釈)、phospho-eEF2K (1:250)、phospho-eEF2 (1:200)を使用した。

2-9. ウエスタンブロッティング

第一章 2.材料および方法、2-9.ウエスタンブロッティングの項を参照 [74]。なお本章の実験では、等量のタンパク質 (8-10 μ g) を SDS-PAGE (10%)により分離した。また total eEF2K および total eEF2 発現は GAPDH (1:1000 希釈)発現で標準化した。

2-10. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表した。また、統計評価は Student の t-test を用いて行い、危険率(p 値)が 5%未満の場合に有

意差ありとした。

3. 実験結果

3-1. 心肥大モデル動物の体重、左心室重量、心室壁厚および心機能の変化

圧負荷誘発心肥大モデルマウスにおいて、体重は SHAM および TAC 群の間で差はなかった ($n = 8$, 表 4)。TAC 群における左心室重量 (97.5 ± 5.3 mg, TAC vs. 76.8 ± 2.6 mg, SHAM, $n = 8$, $p < 0.01$, 表 4) および左心室重量/体重比 (4.43 ± 0.28 mg/g, TAC vs. 3.52 ± 0.07 mg/g, SHAM, $n = 8$, $p < 0.01$, 表 4) は、SHAM 群と比較して有意に高かった。TAC の LVIDd (2.80 ± 0.12 mm, TAC vs. 2.22 ± 0.16 mm, SHAM, $n = 6-8$, $p < 0.05$, 表 5)、LVPWd (1.46 ± 0.09 mm, TAC vs. 1.18 ± 0.07 mm, SHAM, $n = 6-8$, $p < 0.05$, 表 5) および LVPWs (1.72 ± 0.10 mm, TAC vs. 1.32 ± 0.10 mm, SHAM, $n = 6-8$, $p < 0.05$, 表 5) は SHAM 群と比較して有意に上昇した。これらの結果は TAC 群における左心室壁が SHAM 群と比較して肥厚したことを示している。

Isoproterenol 誘発心肥大モデルラットにおいて、体重は Cont および ISO 群の間で差はなかった ($n = 8$, 表 4)。ISO 群における左心室重量 (717.1 ± 17.0 mg, ISO vs. 545.1 ± 10.7 mg, Cont, $n = 8$, $p < 0.01$, 表 4) および左心室重量/体重比 (3.07 ± 0.08 , ISO vs. 2.39 ± 0.04 , Cont, $n = 8$, $p < 0.01$, 表 4) は、Cont 群と比較して有意に高かった。

SHR における左心室重量/体重比は WKY と比較して有意に高かった (第二章 3. 実験結果、3-1. 生体パラメータおよび臓器重量の項を参照)。

3-2. SHR 左心室組織における eEF2K/eEF2 のリン酸化

第二章において、SHR 左心室組織における eEF2K タンパク質発現量が WKY と比較して有意に高いことを示した。本章ではさらに eEF2K およびその特異的基質である eEF2 のリン酸化について検討した。SHR 左心室組織において eEF2K Ser366 残基(抑制的リン酸化部位)のリン酸化レベルは WKY と比較して有意に低かった($n = 7$, $p < 0.05$, 図 13)。また SHR 左心室組織における eEF2 Thr56 残基のリン酸化レベルは WKY と比較して高かった($n = 7$, $p = 0.0954$, 図 13)。なお、eEF2 発現は両群間で差はなかった($n = 7$, 図 13)。

3-3. TAC マウス左心室組織における eEF2K/eEF2 のタンパク質発現およびリン酸化

TAC 群の左心室組織における eEF2K タンパク質発現量は SHAM 群と比較して有意に高く($n = 8$, $p < 0.01$, 図 14)、Ser366 残基のリン酸化は有意に減少していた($n = 8$, $p < 0.05$, 図 14)。また TAC 群の左心室組織における eEF2 Thr56 残基のリン酸化は SHAM 群と比較して有意に亢進していた($n = 8$, $p < 0.05$, 図 14)。なお、eEF2 タンパク質発現は両群間で差はなかった($n = 8$, 図 14)。

3-4. ISO ラット左心室組織における eEF2K/eEF2 のタンパク質発現およびリン酸化

ISO 群の左心室組織における eEF2K Ser366 残基のリン酸化は Cont 群と比較して有意に減少していた ($n = 6, p < 0.01$, 図 15)。しかし、ウエスタンブロッティングによる解析では eEF2K タンパク質発現および eEF2 Thr56 残基のリン酸化は両群間で差は認められなかった ($n = 6$, 図 15)。ISO 群の左心室内腔側に顕著な線維化が認められた ($n = 6$, 図 16A-a, e)。次に ISO ラット左心室組織における eEF2K タンパク質発現、Ser366 残基のリン酸化、および eEF2 Thr56 残基のリン酸化について免疫組織化学染色により検討した。抗 total およびリン酸化 eEF2K 抗体、抗リン酸化 eEF2 抗体陽性領域は、線維化部分ではなく主に心筋細胞に局在していた ($n = 3-4$, 図 16A-b-d, f-h)。ISO 群の左心室心筋細胞における抗 total eEF2K 抗体 ($n = 4, p < 0.05$, 図 16A-b, f and B) および抗リン酸化 eEF2 抗体 ($n = 3-4, p = 0.0688$, 図 16A-d, h and D) 陽性領域は、Cont 群と比較して増加していた。またウエスタンブロッティングによる解析結果と同様に、ISO 群の左心室心筋細胞における抗リン酸化 eEF2K 抗体陽性領域は Cont 群と比較して有意に減少していた ($n = 3-4, p < 0.05$, 図 16A-c, g and C)。

4. 考察

心肥大は生理的負荷または高血圧症、心筋症、弁膜疾患など病的負荷に対する代償性反応の一つである。心肥大は心筋細胞の体積増加や線維化亢進などいくつかの組織学的変化によって生じる[13]。タンパク質合成は心筋細胞肥大を誘導する原因の一つであり、翻訳伸長因子である eEF2 はその一部を制御している。eEF2 は eEF2K によってリン酸化されることで不活化する。したがって eEF2K の不活化は eEF2 によるタンパク質翻訳を促進する。Ang II, endothelin-1 および PE など心筋細胞肥大を誘導するアゴニストは、ラット心筋細胞において eEF2 の脱リン酸化を亢進する[14, 82]。これらの報告は、心肥大が一部に eEF2K/eEF2 シグナル経路を介したタンパク質合成の促進により制御されることを示唆する。

第二章において、SHR の肥大左心室心筋細胞における eEF2K タンパク質発現が WKY の正常左心室心筋細胞と比較して有意に高いことを示した。本章ではさらに eEF2K および eEF2 のリン酸化について検討した。SHR 左心室組織における eEF2K Ser366 残基のリン酸化レベルは WKY と比較して有意に低かった(図 13)。eEF2K は Ser366 残基の脱リン酸化により活性が亢進し、eEF2 をリン酸化する[83]。この報告通り、SHR 左心室組織における eEF2 Thr56 残基のリン酸化レベルは高かった(図 13)。圧負荷誘発心肥大モデルマウスにおいても同様の検討を行ったところ、TAC 群の左心室組織において、SHAM 群と比較して eEF2K タンパク質発現が有意に亢進し、Ser366 残基のリン酸化が有意に減少していた(図 14)。さらに TAC 群の左心室組織における eEF2 Thr56

残基のリン酸化が有意に亢進していた(図 14)。これらの結果は SHR 左心室組織における eEF2K/eEF2 シグナルの変化と同様であった。さらにこの eEF2K/eEF2 シグナルについて isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左心室組織においても検討を行った。ウェスタンブロッティングによる解析では、ISO 群の左心室組織における eEF2K Ser366 残基のリン酸化が Cont 群と比較して有意に減少していたが、eEF2K タンパク質発現および eEF2 リン酸化は両群間で差がなかった(図 15)。Isoproterenol 投与(7日間)によりラット左心室において線維化が生じることが知られている[52]。本章においても ISO ラット左心室の内腔側に顕著な線維化が生じることを確認した(図 16A-a, e)。免疫組織化学染色により、抗 total およびリン酸化 eEF2K 抗体、抗リン酸化 eEF2 抗体陽性領域が線維化部分ではなく心筋細胞に局在することを明らかにした(図 16A-b-d, f-h)。ISO 群の左心室組織における抗 total eEF2K 抗体および抗リン酸化 eEF2 抗体陽性領域は Cont と比較して増加していた(図 15)。結果的に eEF2K タンパク質の発現亢進および Ser366 残基リン酸化の減少、eEF2 リン酸化亢進は本章で検討した全ての心肥大モデル動物の左心室組織において共通して認められた(図 16)。

本章の結果は肥大左心室組織におけるタンパク質翻訳が低下していることを示唆している。肥大心臓組織における心筋細胞は、微小血管の消失により低酸素および飢餓状態に陥っている[50]。このような状況下では AMP/ATP 比が増加し、細胞内のエネルギーセンサーである AMPK が活性化する[56]。ラット由来心筋細胞において、活性化 AMPK は eEF2 リン酸化を亢進し、つづく

タンパク質合成を抑制することが報告されている [7, 41]。加えて Crozier ら [11] は、ラット摘出心臓において虚血により AMPK および eEF2 のリン酸化が亢進することを報告している。したがって心肥大の病態進展には AMPK/eEF2K/eEF2 シグナル経路が関与する可能性がある。

正常な心筋細胞において、筋収縮、 Ca^{2+} 恒常性維持およびタンパク質合成により細胞内エネルギーの大半が消費される [34]。心疾患の病態進展に伴い心収縮力は低下するため、それを維持するにはその他のエネルギー消費を最低限に抑える必要がある [21]。したがって、心疾患の病態において eEF2 不活化によるタンパク質合成の低下は、心収縮力の維持に貢献すると考えられる。一方、eEF2K/eEF2 シグナルは腫瘍細胞においてアポトーシスおよびオートファジーを制御することが報告されている [93]。したがって eEF2K/eEF2 シグナルによる細胞死の制御も心肥大の病態進展に関与しているかもしれない。

本章で検討した心肥大モデル動物である SHR、圧負荷誘発心肥大モデルマウスおよび isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左心室組織において、eEF2K タンパク質の発現亢進および Ser366 残基のリン酸化減少、eEF2 Thr56 残基のリン酸化亢進が共通して認められた (図 16)。これらの結果は eEF2K/eEF2 シグナルの変化が心肥大の病態進展に関与する可能性を示唆している。eEF2K/eEF2 シグナル経路と心肥大の関係についての詳細を明らかにするため、今後さらなる検討が必要である。

V. 総括

【背景・目的】

高血圧症の病態には末梢血管の収縮機能障害、壁リモデリングを始めとし、交感神経活性の亢進や心拍出量の増大、腎 RAS の活性亢進など脳、心臓、腎臓といった様々な臓器の機能変化が関連している。また高血圧状態の持続による圧負荷は心臓や腎臓を二次的に傷害し、心肥大(不全)や腎不全などの合併症を誘導する。これらの高血圧合併症により死亡率が増加する。高血圧症は遺伝的素因や食塩高感受性などに起因する本態性高血圧症、脳腫瘍などによる脳圧亢進や腎障害に続発する二次性高血圧症、そして肺循環に限局した肺高血圧症などに分類される。現在、高血圧症および心不全の治療にはアンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、NO ドナー(硝酸化合物)、カルシウムチャネル拮抗薬、 β および α アドレナリン受容体拮抗薬などが、また肺高血圧症の治療にはエンドセリン受容体拮抗薬、プロスタサイクリン製剤、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬など主に「血管系」に作用する薬剤が使用されている。これらを使用した治療により症状の改善および病態進展の抑制が可能となったが、これら薬物治療に抵抗性の高血圧症も存在する。よって既存の薬剤とは異なる作用機序および作用点を有する薬剤の開発が急務となっている。

当研究室では CaM 関連蛋白質である HDAC4、eEF2K、DAPK3 の 3 分子が、本態性高血圧症モデル動物である SHR の「血管系」において高発現していることを発見し[73]、これらが ROS による血管炎症性反応、血管収縮機能障害[74, 75, 78]および血管壁リモデリング[76, 77, 79]の促進を介して「本態性高血圧症」の病態を進展することを初めて明らかにした。しかし、3 分子の『本態性高血圧以外の高血圧症及び合併症の病態』における役

割、及び『血管系以外の血圧調節臓器』における役割は明らかになっていない。そこで本研究では、肺高血圧発症・進展における 3 分子の役割(第一章)、SHR の脳、心臓、腎臓組織における 3 分子の発現と局在(第二章)、そして心肥大モデル動物の心臓組織における eEF2K 及び eEF2 の発現とリン酸化(第三章)について明らかにすることを目的とした。

【結果】

(第一章)

肺高血圧症は遺伝的素因、左心不全、血栓塞栓など様々な原因により発症する進行性・致死性の疾患である。病態は主に IPAs の炎症性反応、収縮機能障害およびリモデリングなどにより進展する。肺高血圧状態の持続は右心系への圧負荷増大により右心肥大(不全)を誘導する。現在、肺高血圧発症・進展における HDAC4、eEF2K、DAPK3 の役割については明らかになっていない。Wistar rats に MCT を投与し、肺高血圧を誘導した。MCT 投与と同時に HDAC4 阻害薬 MC1568、eEF2K 阻害薬 A-484954、DAPK3 阻害薬 DI の投与を開始した。2 週間後肺動脈圧を測定した後、摘出した肺動脈、肺および右心室組織を各解析に使用した。MCT 投与により対照(MCT 非投与)群と比較して有意に肺動脈圧が上昇した(表 1)。MC1568 及び DI はこれに影響を及ぼさなかったが、A-484954 は有意に抑制した(表 1)。加えて A-484954 は MCT による右心室心筋細胞横断面積の増加を有意に抑制した(図 1AB)。また A-484954 は MCT による肺動脈弛緩機能障害には影響を及ぼさなかったが(図 2AB)、IPAs (直径 50~100 μm)壁肥厚を有意に抑制した(図 3AB)。肺組織において A-484954 は MCT による eEF2K Ser500 残基のリン酸化亢進を有意に抑制した(図 4)。加えて A-484954 は MCT による ROS 産生亢進(図 5B)および主要 ROS 産生酵素 NOX-1 タンパク質発現亢進(図 5A)を有意に抑制し

た。さらに A-484954 は MCT による MMP-2 活性亢進(図 6)および IPAs 壁の線維化(図 7AB)を有意に抑制した。以上の結果から、eEF2K は MCT 誘発肺高血圧症の病態において NOX-1/ROS/MMP-2 経路を介して、線維化を含む肺動脈壁リモデリングを促進することで肺動脈圧を上昇し、右心肥大を誘導することが初めて明らかになった(図 8)[24]。

(第二章)

末梢血管のみならず脳、心臓、腎臓なども全身血圧を制御しており、高血圧発症・進展にも関わると考えられている。SHR から脳、左心室、腎臓を摘出し、各組織における HDAC4、eEF2K、DAPK3 タンパク質の発現と局在を検討した。SHR の収縮期血圧及び左心室重量/体重比が WKY と比較して有意に増加していること(心肥大)を確認した(表 3)。脳組織において HDAC4 および eEF2K タンパク質発現量は同程度であり、それに比べて DAPK3 タンパク質発現量は低かった(図 9AB)。加えて SHR 脳組織における HDAC4 タンパク質発現量は、WKY と比較して有意に高かった(図 9AB)。一方、左心室組織においては、eEF2K タンパク質発現量が HDAC4 および DAPK3 タンパク質発現量と比較して高かった(図 9AC)。また eEF2K タンパク質は心筋細胞に局在しており、SHR 左心室心筋細胞の eEF2K タンパク質発現量は WKY と比較して有意に高かった(図 9AC, 10A-c, d and C)。さらに、腎臓組織においては DAPK3 タンパク質発現量が最も高く(図 9AD and E)、尿管上皮細胞に局在していた(図 11)。以上の結果から、SHR 脳組織における HDAC4 タンパク質発現亢進および左心室組織における eEF2K タンパク質発現亢進は高血圧症の病態進展に影響を及ぼす可能性が初めて示唆された(図 12) [23]。

(第三章)

第二章において SHR 肥大左心室心筋細胞における eEF2K タンパク質発現量が WKY 正常左心室心筋細胞と比較して有意に高いことを示した(図 9AC, 10) [23]。そこで SHR を含む心肥大モデル動物の左心室組織における eEF2K およびその特異的基質である eEF2 のタンパク質発現およびリン酸化について検討した。C57BL/6NJcl マウスに TAC (3 日間)を、Wistar rats に isoproterenol 投与(7 日間)をそれぞれ行い、心肥大モデルを作製した。心肥大モデル動物より摘出した左心室を各解析に使用した。TAC マウスおよび ISO ラットにおける左心室重量/体重比がそれぞれの対照群と比較して有意に増加していることを確認した(表 4)。SHR 左心室組織において、WKY と比較し eEF2K Ser366 残基のリン酸化レベル減少及び eEF2 Thr56 残基のリン酸化レベル亢進が認められた(図 13)。TAC 群の左心室組織においても、偽手術群と比較し有意な eEF2K タンパク質発現亢進及び Ser366 残基のリン酸化減少が認められた。加えて eEF2 Thr56 残基のリン酸化が有意に亢進していた(図 14)。ISO 群の左心室組織においては、対照(ISO 非投与)群と比較し eEF2K Ser366 残基のリン酸化が有意に減少していた。一方、ウェスタンブロットティングによる解析では、eEF2K タンパク質発現及び eEF2 Thr56 残基のリン酸化には変化が認められなかった(図 15)。ISO 群の左心室組織切片をアザン染色し線維化について評価したところ、内腔側に広範囲な線維化が認められた(図 16A-a, e)。加えて抗 eEF2K 抗体及び抗リン酸化 eEF2 (Thr56)抗体を使用した免疫組織化学染色を行ったところ、心筋細胞における eEF2K タンパク質発現及び eEF2 リン酸化が亢進していた(図 16)。従って、本章で検討したすべての心肥大モデル動物由来左心室組織において eEF2K タンパク質発現亢進及び Ser366 残基のリン酸化減少(活性化)、eEF2 Thr56 残基のリン酸化亢進(不活化)が共通して認められた(図 17)。以上の結果から、

eEF2K/eEF2 シグナルが心肥大の病態発症・進展において重要な役割を担う可能性が示唆された[25]。

【考察】

第一章において eEF2K が肺動脈壁リモデリングを促進的に制御し、MCT 誘発 PAH の病態を進展することから、eEF2K が『本態性高血圧以外の高血圧症の病態制御』にも関与することが初めて明らかとなった(図 18)。加えて eEF2K 阻害薬 A-484954 は MCT による肺動脈圧上昇を阻害し、PAH の合併症である右心肥大を抑制したことから、eEF2K は PAH に対する新規創薬標的となることが期待される。これまで eEF2K は高血圧症のみならず、マクロファージなど免疫系細胞の活性化による炎症性反応促進が原因で発症・進展するアテローム性動脈硬化症の病態にも関与することが報告されている[91]。アテローム性動脈硬化症モデルマウスに、eEF2K の酵素活性を遺伝的に消失させたマウスの骨髄を移植したところ、wild-type マウスの骨髄を移植した場合と比較して大動脈壁における動脈硬化巣が有意に減少する。また催炎症性 M1 マクロファージにおいて eEF2K の酵素活性を消失させたところ、培養液中への炎症性サイトカイン TNF- α 分泌量が wild-type と比較して減少する。これらの報告も併せて eEF2K は高血圧症を含む様々な血管系疾患の病態を制御する新たな分子である可能性が示唆された。

第二章において HDAC4、eEF2K および DAPK3 タンパク質がラットの脳、心臓、腎臓組織にそれぞれ特徴的な発現分布を示し、SHR 脳組織における HDAC4 タンパク質発現および左心室組織における eEF2K タンパク質発現が WKY と比較して有意に高いことが明らかになった。また第三章において eEF2K タンパク質発現亢進および Ser366 残基のリン酸化減少(活性化)と eEF2 Thr56 残基のリン酸化亢進(不活化)が今回検討した全ての心肥大モ

デル動物の左心室組織で共通して認められた。これらの結果は上記 3 分子が『血管系以外の血圧調節臓器機能を制御』し、高血圧症およびその合併症の病態の発症・進展に関わる可能性を示唆している(図 18)。

マウス脳組織において HDAC4 は他のクラス IIa HDACs (HDAC5, 7, 9)と比較して高発現している[67]。また Ang II 投与によりマウス腎臓および大動脈組織において HDAC4 リン酸化およびタンパク質発現がそれぞれ亢進する[32]。循環器系の制御中枢である PVN および RVLM において Ang II は交感神経活性を亢進し、昇圧作用を示す[5]。以上の報告から、高血圧症の病態において PVN や RVLM における HDAC4 は Ang II などのリガンド依存性に活性化し、交感神経活性亢進を介して血圧を上昇することが推測される。

本研究において、肥好心臓組織における eEF2K タンパク質発現および活性が亢進し、それに伴い eEF2 活性が低下していることを示した。心筋細胞は絶え間なく収縮と弛緩を繰り返す必要があるため、極めてエネルギー要求性の高い細胞の一つである。心肥大の病態進行に伴い心筋組織への血液供給は不足し、心筋細胞は低エネルギー状態に晒される。その結果、心筋細胞死や心機能低下が誘導されることで心不全へと進展する。eEF2 活性の低下により細胞内エネルギーの多くを消費するタンパク質翻訳過程が抑制されるため、本研究で示した心肥大病態における eEF2K/eEF2 シグナルの変化は心筋細胞保護的に作用すると考えられる。ランゲンドルフ灌流装置を用いてラット摘出心臓組織を虚血状態にすると eEF2 のリン酸化(不活化)が亢進する[31]。また新生仔ラット由来心筋細胞において、eEF2 リン酸化亢進によるタンパク質合成の抑制は小胞体ストレスを介した低酸素傷害を抑制する[71]。これらの報告は本研究結果を支持しているが、心肥大病態における eEF2K/eEF2 シグナルによる制御機構の詳細については依然不明である。

腎臓組織において DAPK は、尿管結紮[89]または虚血再灌流[33]によ

る尿細管上皮細胞死を促進するが、尿管結紮による腎臓間質の線維化は抑制する[90]。このように DAPK は腎障害を促進的または抑制的に制御しているが、高血圧発症・進展に関わる腎構造および機能変化における DAPK3 の役割については全く報告されていない。

今後、高血圧症および高血圧合併症の病態機序について、各臓器における 3 分子の機能に着目し更に詳細に検討を行うことで、HDAC4、eEF2K および DAPK3 のコントロールが臓器連関を考慮した循環器系疾患に対する新規治療戦略となることが大いに期待される。

VI. 謝辞

本研究の計画、遂行および論文作成にあたり、北里大学獣医学部獣医薬理学研究室、山脇英之教授、岡田宗善准教授より丁寧かつ熱心な御指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

また本実験にあたり助力を頂きましたミネソタ大学・風間恭輔博士、川崎市健康安全研究所・池田史朗氏、保田動物病院・渡邊優樹氏および獣医薬理学研究室の皆様にご心から感謝を申し上げます。

VII. 引用文献

1. Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S. and Olson, E. N. 2006. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* **116**: 1853-1864.
2. Benisty, J. I., Folkman, J., Zurakowski, D., Louis, G., Rich, S., Langleben, D. and Moses, M. A. 2005. Matrix metalloproteinases in the urine of patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* **128**: 572S.
3. Boknik, P., Heinroth-Hoffmann, I., Kirchhefer, U., Knapp, J., Linck, B., Luss, H., Muller, T., Schmitz, W., Brodde, O. and Neumann, J. 2001. Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. *Cardiovasc Res.* **51**: 717-728.
4. Bolger, T. A. and Yao, T. P. 2005. Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death. *J Neurosci.* **25**: 9544-9553.
5. Braga, V. A., Medeiros, I. A., Ribeiro, T. P., Franca-Silva, M. S., Botelho-Ono, M. S. and Guimaraes, D. D. 2011. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. *Braz J Med Biol Res.* **44**: 871-876.
6. Browne, G. J., Finn, S. G. and Proud, C. G. 2004. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its

- phosphorylation at a novel site, serine 398. *J Biol Chem.* **279**: 12220-12231.
7. Chan, A. Y., Soltys, C. L., Young, M. E., Proud, C. G. and Dyck, J. R. 2004. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem.* **279**: 32771-32779.
 8. Chang, A. N., Chen, G., Gerard, R. D., Kamm, K. E. and Stull, J. T. 2010. Cardiac myosin is a substrate for zipper-interacting protein kinase (ZIPK). *J Biol Chem.* **285**: 5122-5126.
 9. Chelladurai, P., Seeger, W. and Pullamsetti, S. S. 2012. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* **40**: 766-782.
 10. Cowan, K. N., Jones, P. L. and Rabinovitch, M. 2000. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *J Clin Invest.* **105**: 21-34.
 11. Crozier, S. J., Vary, T. C., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. 2005. Cellular energy status modulates translational control mechanisms in ischemic-reperfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **289**: H1242-1250.
 12. Diggle, T. A., Subkhankulova, T., Lilley, K. S., Shikotra, N., Willis, A. E. and Redpath, N. T. 2001. Phosphorylation of elongation factor-2 kinase on serine 499 by cAMP-dependent protein kinase induces Ca²⁺/calmodulin-independent activity.

- Biochem J.* **353**: 621-626.
13. Drazner, M. H. 2011. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation.* **123**: 327-334.
 14. Everett, A. D., Stoops, T. D., Nairn, A. C. and Brautigan, D. 2001. Angiotensin II regulates phosphorylation of translation elongation factor-2 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **281**: H161-167.
 15. Frisdal, E., Gest, V., Vieillard-Baron, A., Levame, M., Lepetit, H., Eddahibi, S., Lafuma, C., Harf, A., Adnot, S. and Dortho, M. P. 2001. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* **18**: 838-845.
 16. Fu, L. L., Xie, T., Zhang, S. Y. and Liu, B. 2014. Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K): a potential therapeutic target in cancer. *Apoptosis.* **19**: 1527-1531.
 17. George, J. and D'Armiento, J. 2011. Transgenic expression of human matrix metalloproteinase-9 augments monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *J Hypertens.* **29**: 299-308.
 18. Hagemann, D., Bohlender, J., Hoch, B., Krause, E. G. and Karczewski, P. 2001. Expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit isoforms in rats with hypertensive cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* **220**: 69-76.
 19. Haystead, T. A. 2005. ZIP kinase, a key regulator of myosin

- protein phosphatase 1. *Cell Signal.* **17**: 1313-1322.
20. Herget, J., Novotna, J., Bibova, J., Povysilova, V., Vankova, M. and Hampl, V. 2003. Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **285**: L199-208.
21. Ingwall, J. S. 2009. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res.* **81**: 412-419.
22. Jiang, L., Xu, L., Song, Y., Li, J., Mao, J., Zhao, A. Z., He, W., Yang, J. and Dai, C. 2013. Calmodulin-dependent protein kinase II/cAMP response element-binding protein/Wnt/beta-catenin signaling cascade regulates angiotensin II-induced podocyte injury and albuminuria. *J Biol Chem.* **288**: 23368-23379.
23. Kameshima, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2016. Expression and localization of calmodulin-related proteins in brain, heart and kidney from spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **469**: 654-658.
24. Kameshima, S., Kazama, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2015. Eukaryotic elongation factor 2 kinase mediates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via reactive oxygen species-dependent vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **308**: H1298-1305.
25. Kameshima, S., Okada, M., Ikeda, S., Watanabe, Y. and Yamawaki, H. 2016. Coordination of changes in expression

- and phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) and eEF2 kinase in hypertrophied cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res.* **7**: 218-224.
26. Kang, Y., Kim, J., Anderson, J. P., Wu, J., Gleim, S. R., Kundu, R. K., McLean, D. L., Kim, J. D., Park, H., Jin, S. W., Hwa, J., Quertermous, T. and Chun, H. J. 2013. Apelin-APJ signaling is a critical regulator of endothelial MEF2 activation in cardiovascular development. *Circ Res.* **113**: 22-31.
27. Kaul, G., Pattan, G. and Rafeequi, T. 2011. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct.* **29**: 227-234.
28. Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H. and Akira, S. 1998. ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol.* **18**: 1642-1651.
29. Kazama, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2014. A novel adipocytokine, omentin, inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **452**: 142-146.
30. Kenney, J. W., Sorokina, O., Genheden, M., Sorokin, A., Armstrong, J. D. and Proud, C. G. 2015. Dynamics of elongation factor 2 kinase regulation in cortical neurons in response to synaptic activity. *J Neurosci.* **35**: 3034-3047.
31. Kim, A. S., Miller, E. J., Wright, T. M., Li, J., Qi, D., Atsina, K., Zaha, V., Sakamoto, K. and Young, L. H. 2011. A small molecule AMPK activator protects the heart against

- ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* **51**: 24-32.
32. Kim, G. R., Cho, S. N., Kim, H. S., Yu, S. Y., Choi, S. Y., Ryu, Y., Lin, M. Q., Jin, L., Kee, H. J. and Jeong, M. H. 2016. Histone deacetylase and GATA-binding factor 6 regulate arterial remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens.* **34**: 2206-2219.
33. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S. and Mune, M. 2004. Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* **15**: 1826-1834.
34. Kolwicz, S. C., Jr., Purohit, S. and Tian, R. 2013. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* **113**: 603-616.
35. Koo, H. S., Kim, K. C. and Hong, Y. M. 2011. Gene expressions of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-2 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats after bosentan treatment. *Korean Circ J.* **41**: 83-90.
36. Lee, M. J., Feliers, D., Sataranatarajan, K., Mariappan, M. M., Li, M., Barnes, J. L., Choudhury, G. G. and Kasinath, B. S. 2010. Resveratrol ameliorates high glucose-induced protein synthesis in glomerular epithelial cells. *Cell Signal.* **22**: 65-70.

37. Lepetit, H., Eddahibi, S., Fadel, E., Frisdal, E., Munaut, C., Noel, A., Humbert, M., Adnot, S., D'Ortho, M. P. and Lafuma, C. 2005. Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* **25**: 834-842.
38. Leprivier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A. R., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Somasekharan, S. P., Faubert, B., Bridon, G., Tognon, C. E., Mathers, J., Thomas, R., Li, A., Barokas, A., Kwok, B., Bowden, M., Smith, S., Wu, X., Korshunov, A., Hielscher, T., Northcott, P. A., Galpin, J. D., Ahern, C. A., Wang, Y., McCabe, M. G., Collins, V. P., Jones, R. G., Pollak, M., Delattre, O., Gleave, M. E., Jan, E., Pfister, S. M., Proud, C. G., Derry, W. B., Taylor, M. D. and Sorensen, P. H. 2013. The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell.* **153**: 1064-1079.
39. Lin, Y., Hupp, T. R. and Stevens, C. 2010. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *FEBS J.* **277**: 48-57.
40. Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F. and Sliwa, K. 2013. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm Circ.* **3**: 739-756.
41. McLeod, L. E. and Proud, C. G. 2002. ATP depletion increases phosphorylation of elongation factor eEF2 in adult

- cardiomyocytes independently of inhibition of mTOR signalling. *FEBS Lett.* **531**: 448-452.
42. McLeod, L. E., Wang, L. and Proud, C. G. 2001. beta-Adrenergic agonists increase phosphorylation of elongation factor 2 in cardiomyocytes without eliciting calcium-independent eEF2 kinase activity. *FEBS Lett.* **489**: 225-228.
43. Means, A. R. 1994. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Lett.* **347**: 1-4.
44. Mielcarek, M., Zielonka, D., Carnemolla, A., Marcinkowski, J. T. and Guidez, F. 2015. HDAC4 as a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases: a summary of recent achievements. *Front Cell Neurosci.* **9**: 42.
45. Moore, C. E., Regufe da Mota, S., Mikolajek, H. and Proud, C. G. 2014. A conserved loop in the catalytic domain of eukaryotic elongation factor 2 kinase plays a key role in its substrate specificity. *Mol Cell Biol.* **34**: 2294-2307.
46. Moore, C. E., Mikolajek, H., Regufe da Mota, S., Wang, X., Kenney, J. W., Werner, J. M. and Proud, C. G. 2015. Elongation Factor 2 Kinase Is Regulated by Proline Hydroxylation and Protects Cells during Hypoxia. *Mol Cell Biol.* **35**: 1788-1804.
47. Nairn, A. C., Bhagat, B. and Palfrey, H. C. 1985. Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A.* **82**: 7939-7943.
48. Niino, N. and Ikebe, M. 2001. Zipper-interacting protein kinase induces Ca(2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* **276**: 29567-29574.
49. Nomura, H., Yamawaki, H., Mukohda, M., Okada, M. and Hara, Y. 2008. Mechanisms underlying pioglitazone-mediated relaxation in isolated blood vessel. *J Pharmacol Sci.* **108**: 258-265.
50. Oka, T., Akazawa, H., Naito, A. T. and Komuro, I. 2014. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res.* **114**: 565-571.
51. Okada, M., Harada, T., Kikuzuki, R., Yamawaki, H. and Hara, Y. 2009. Effects of telmisartan on right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats. *J Pharmacol Sci.* **111**: 193-200.
52. Okada, M., Kosaka, N., Hoshino, Y., Yamawaki, H. and Hara, Y. 2010. Effects of captopril and telmisartan on matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions and development of left ventricular fibrosis induced by isoprenaline in rats. *Biol Pharm Bull.* **33**: 1517-1521.
53. Okada, M., Kikuzuki, R., Harada, T., Hori, Y., Yamawaki, H. and Hara, Y. 2008. Captopril attenuates matrix metalloproteinase-2 and -9 in monocrotaline-induced right

- ventricular hypertrophy in rats. *J Pharmacol Sci.* **108**: 487-494.
54. Poiani, G. J., Tozzi, C. A., Yohn, S. E., Pierce, R. A., Belsky, S. A., Berg, R. A., Yu, S. Y., Deak, S. B. and Riley, D. J. 1990. Collagen and elastin metabolism in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Circ Res.* **66**: 968-978.
55. Proud, C. G. 2015. Regulation and roles of elongation factor 2 kinase. *Biochem Soc Trans.* **43**: 328-332.
56. Qi, D. and Young, L. H. 2015. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab.* **26**: 422-429.
57. Racioppi, L. and Means, A. R. 2012. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem.* **287**: 31658-31665.
58. Ryazanov, A. G. 2002. Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. *FEBS Lett.* **514**: 26-29.
59. Ryazanov, A. G., Pavur, K. S. and Dorovkov, M. V. 1999. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr Biol.* **9**: R43-45.
60. Ryazanov, A. G., Ward, M. D., Mendola, C. E., Pavur, K. S., Dorovkov, M. V., Wiedmann, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parmer, T. G., Prostko, C. R., Germino, F. J. and Hait, W. N. 1997. Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase.

- Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 4884-4889.
61. Shani, G., Marash, L., Gozuacik, D., Bialik, S., Teitelbaum, L., Shohat, G. and Kimchi, A. 2004. Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol Cell Biol.* **24**: 8611-8626.
62. Shiloh, R., Bialik, S. and Kimchi, A. 2014. The DAPK family: a structure-function analysis. *Apoptosis.* **19**: 286-297.
63. Sinnott-Smith, J., Ni, Y., Wang, J., Ming, M., Young, S. H. and Rozengurt, E. 2014. Protein kinase D1 mediates class IIa histone deacetylase phosphorylation and nuclear extrusion in intestinal epithelial cells: role in mitogenic signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* **306**: C961-971.
64. Smith, E. M. and Proud, C. G. 2008. cdc2-cyclin B regulates eEF2 kinase activity in a cell cycle- and amino acid-dependent manner. *EMBO J.* **27**: 1005-1016.
65. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. and McMurtry, I. F. 2009. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **297**: L1013-1032.
66. Taha, E., Gildish, I., Gal-Ben-Ari, S. and Rosenblum, K. 2013. The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.* **105**: 100-106.
67. Takase, K., Oda, S., Kuroda, M. and Funato, H. 2013.

- Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases. *PLoS One*. **8**: e58473.
68. Taniyama, Y. and Griendling, K. K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. **42**: 1075-1081.
69. Tavares, C. D., O'Brien, J. P., Abramczyk, O., Devkota, A. K., Shores, K. S., Ferguson, S. B., Kaoud, T. S., Warthaka, M., Marshall, K. D., Keller, K. M., Zhang, Y., Brodbelt, J. S., Ozpolat, B. and Dalby, K. N. 2012. Calcium/calmodulin stimulates the autophosphorylation of elongation factor 2 kinase on Thr-348 and Ser-500 to regulate its activity and calcium dependence. *Biochemistry*. **51**: 2232-2245.
70. Taylor-Fishwick, D. A. 2013. NOX, NOX Who is There? The Contribution of NADPH Oxidase One to Beta Cell Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **4**: 40.
71. Terai, K., Hiramoto, Y., Masaki, M., Sugiyama, S., Kuroda, T., Hori, M., Kawase, I. and Hirota, H. 2005. AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. **25**: 9554-9575.
72. Tsai, S. H., Huang, P. H., Peng, Y. J., Chang, W. C., Tsai, H. Y., Leu, H. B., Chen, J. W. and Lin, S. J. 2013. Zoledronate attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through inactivation of Rho/ROCK-dependent JNK and

- NF-kappaB pathway. *Cardiovasc Res.* **100**: 501-510.
73. Usui, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2011. Exploring calmodulin-related proteins, which mediate development of hypertension, in vascular tissues of spontaneous hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **405**: 47-51.
74. Usui, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2012. Death-associated protein kinase 3 mediates vascular inflammation and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* **60**: 1031-1039.
75. Usui, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2013. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the development of hypertension through oxidative stress-dependent vascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **305**: H756-768.
76. Usui, T., Morita, T., Okada, M. and Yamawaki, H. 2014. Histone deacetylase 4 controls neointimal hyperplasia via stimulating proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* **63**: 397-403.
77. Usui, T., Nijima, R., Sakatsume, T., Otani, K., Kameshima, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2015. Eukaryotic elongation factor 2 kinase controls proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Acta Physiol (Oxf).* **213**: 472-480.

78. Usui, T., Okada, M., Mizuno, W., Oda, M., Ide, N., Morita, T., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2012. HDAC4 mediates development of hypertension via vascular inflammation in spontaneous hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **302**: H1894-1904.
79. Usui, T., Sakatsume, T., Nijima, R., Otani, K., Kazama, K., Morita, T., Kameshima, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2014. Death-associated protein kinase 3 mediates vascular structural remodelling via stimulating smooth muscle cell proliferation and migration. *Clin Sci (Lond).* **127**: 539-548.
80. Veit, F., Pak, O., Egemnazarov, B., Roth, M., Kosanovic, D., Seimetz, M., Sommer, N., Ghofrani, H. A., Seeger, W., Grimminger, F., Brandes, R. P., Schermuly, R. T. and Weissmann, N. 2013. Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal.* **19**: 2213-2231.
81. Vest, R. S., O'Leary, H., Coultrap, S. J., Kindy, M. S. and Bayer, K. U. 2010. Effective post-insult neuroprotection by a novel Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitor. *J Biol Chem.* **285**: 20675-20682.
82. Wang, L. and Proud, C. G. 2002. Regulation of the phosphorylation of elongation factor 2 by MEK-dependent signalling in adult rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* **531**: 285-289.

83. Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R. and Proud, C. G. 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* **20**: 4370-4379.
84. Wang, X., Liu, J., Zhen, J., Zhang, C., Wan, Q., Liu, G., Wei, X., Zhang, Y., Wang, Z., Han, H., Xu, H., Bao, C., Song, Z., Zhang, X., Li, N. and Yi, F. 2014. Histone deacetylase 4 selectively contributes to podocyte injury in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **86**: 712-725.
85. Wang, Z. Y., Qin, W. and Yi, F. 2015. Targeting histone deacetylases: perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease. *J Geriatr Cardiol.* **12**: 153-164.
86. Webb, R. C. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* **27**: 201-206.
87. Yamawaki, H., Takahashi, M., Mukohda, M., Morita, T., Okada, M. and Hara, Y. 2012. A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **418**: 676-681.
88. Yoon, S. and Eom, G. H. 2016. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Med J.* **52**: 1-11.
89. Yukawa, K., Hoshino, K., Kishino, M., Mune, M., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Tanaka, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K. and Akira, S. 2004.

- Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int J Mol Med.* **13**: 515-520.
90. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S. and Maeda, M. 2005. The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int J Mol Med.* **15**: 73-78.
91. Zhang, P., Riazzy, M., Gold, M., Tsai, S. H., McNagny, K., Proud, C. and Duronio, V. 2014. Impairing eukaryotic elongation factor 2 kinase activity decreases atherosclerotic plaque formation. *Can J Cardiol.* **30**: 1684-1688.
92. Zhang, Q., Yao, F., Raizada, M. K., O'Rourke, S. T. and Sun, C. 2009. Apelin gene transfer into the rostral ventrolateral medulla induces chronic blood pressure elevation in normotensive rats. *Circ Res.* **104**: 1421-1428.
93. Zhu, H., Yang, X., Liu, J., Zhou, L., Zhang, C., Xu, L., Qin, Q., Zhan, L., Lu, J., Cheng, H. and Sun, X. 2015. Eukaryotic elongation factor 2 kinase confers tolerance to stress conditions in cancer cells. *Cell Stress Chaperones.* **20**: 217-220.

Table 1. Changes in body weight, mean pulmonary arterial (PA) pressure and right ventricular (RV) weight of monocrotaline (MCT)-induced PA hypertensive rats treated with a class IIa histone deacetylase inhibitor, MC1568 (40 mg/kg, each other day, MCT + MC1568), a specific eukaryotic elongation factor 2 kinase inhibitor, A-484954 (2.5 mg/kg/day, MCT + A-484954), or death-associated protein kinase inhibitor (DI; 0.5 mg/kg/day, MCT + DI) for 2 weeks.

| Group | BW (g) | Mean PA pressure (mmHg) | RV weight (mg) | TL (cm) | RV/TL (mg/cm) |
|----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Cont | 226.3±4.3 (n = 9) | 15.0±0.8 (n = 8) | 166.0±6.9 (n = 9) | 14.0±0.2 (n = 9) | 11.9±0.5 (n = 9) |
| MCT | 199.9±3.8 ^{**} (n = 9) | 25.6±0.9 ^{**} (n = 8) | 212.3±9.6 ^{**} (n = 9) | 13.1±0.1 (n = 9) | 16.2±0.6 ^{**} (n = 9) |
| MCT + MC1568 | 177.2±11.1 ^{**} (n = 4) | 22.0±3.6 (n = 4) | 177.3±10.7 (n = 4) | 12.5±0.3 (n = 4) | 14.2±0.6 (n = 4) |
| MCT + A-484954 | 191.8±5.2 ^{**} (n = 10) | 17.8±2.1 [#] (n = 9) | 181.6±6.5 (n = 10) | 12.9±0.2 (n = 10) | 14.1±0.5 (n = 10) |
| MCT + DI | 189.2±4.6 ^{**} (n = 3) | 22.9±1.0 (n = 2) | 219.0±26.5 (n = 3) | 13.2±0.3 (n = 3) | 16.6±1.6 (n = 3) |

Cont: control group, MCT: MCT-injected group, BW: body weight, TL: tail length. ^{**}p<0.01 vs. Cont, [#]p<0.05 vs. MCT.

Table 2. E_{max} and pD_2 values of isolated intrapulmonary arteries from Cont, MCT and MCT + A-484954 groups.

| | Cont | MCT | MCT + A-484954 |
|---------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| ACh | | | |
| E_{max} (%) | 73.0±3.3 (n = 14) | 45.8±6.2 ^{**} (n = 9) | 48.0±6.6 ^{**} (n = 10) |
| pD_2 | 6.13±0.04 (n = 14) | 5.99±0.20 (n = 9) | 6.19±0.10 (n = 10) |
| SNP | | | |
| E_{max} (%) | 95.5±1.8 (n = 15) | 70.4±8.0 ^{**} (n = 8) | 68.6±6.5 ^{**} (n = 14) |
| pD_2 | 7.61±0.02 (n = 15) | 6.40±0.30 (n = 8) | 6.74±0.28 (n = 14) |

ACh: acetylcholine, SNP: sodium nitroprusside, E_{max} : maximal relaxation, pD_2 : $-\log EC_{50}$. ** $p < 0.01$ vs. Cont.

n represents the number of arterial rings.

Table 3. BW, systolic blood pressure (SBP) and tissue weight in 12-week-old Wistar Kyoto rats (WKY) and age-matched spontaneously hypertensive rats (SHR).

| | BW (g) | SBP (mmHg) | L-K/BW (mg/g) | R-K/BW (mg/g) | LV/BW (mg/g) |
|----------------|-------------------------|-------------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| WKY (n = 7) | 281.0±3.8 | 114.6±5.7 | 4.00±0.13 | 4.00±0.14 | 2.62±0.08 |
| SHR (n = 7) | 260.4±5.5 ^{**} | 179.3±2.8 ^{**} | 3.94±0.10 | 4.24±0.18 | 3.11±0.06 ^{**} |

L-K: left kidney, R-K: right kidney, LV: left ventricle.

^{**}p<0.01 vs. WKY.

Table 4. Changes in BW, LV weight and LV to BW ratio (LV/BW) in pressure overload- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model.

| | BW (g) | LV (mg) | LV/BW (mg/g) |
|--------------|-----------|--------------------------|-------------------------|
| SHAM (n = 8) | 21.7±1.1 | 76.8±2.6 | 3.52±0.07 |
| TAC (n = 8) | 22.8±0.9 | 97.5±5.3 ^{**} | 4.43±0.28 ^{**} |
| Cont (n = 8) | 228.0±3.4 | 545.1±10.7 | 2.39±0.04 |
| ISO (n = 8) | 233.4±1.8 | 717.1±17.0 ^{##} | 3.07±0.08 ^{##} |

SHAM: sham-operated group, TAC: transverse aortic constriction-operated group, Cont: saline-injected group, ISO: isoproterenol-injected group. **p<0.01 vs. SHAM, ##p<0.01 vs. Cont.

Table 5. Results of echocardiography in pressure overload-induced cardiac hypertrophy model.

| | IVSd (mm) | IVSs (mm) | LVIDd (mm) | LVIDs (mm) | LVPWd (mm) | LVPWs (mm) | FS (%) | HR (bpm) |
|-----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|-------------|
| SHAM (n = 6) | 1.03 ± 0.06 | 1.52 ± 0.13 | 2.22 ± 0.16 | 1.23 ± 0.08 | 1.18 ± 0.07 | 1.32 ± 0.10 | 48.4 ± 3.5 | 477 ± 22 |
| TAC (n = 8) | 1.07 ± 0.12 | 1.35 ± 0.11 | 2.80 ± 0.12* | 1.59 ± 0.13 | 1.46 ± 0.09* | 1.72 ± 0.10* | 43.5 ± 3.6 | 457 ± 25 |

IVSd/s: interventricular septal end diastole/end systole; LVIDd/s: left ventricular internal diameter end diastole/end systole; LVPWd/s: left ventricular posterior wall end diastole/end systole; FS: fractional shortening; HR: heart rate. *p<0.05 vs. SHAM.

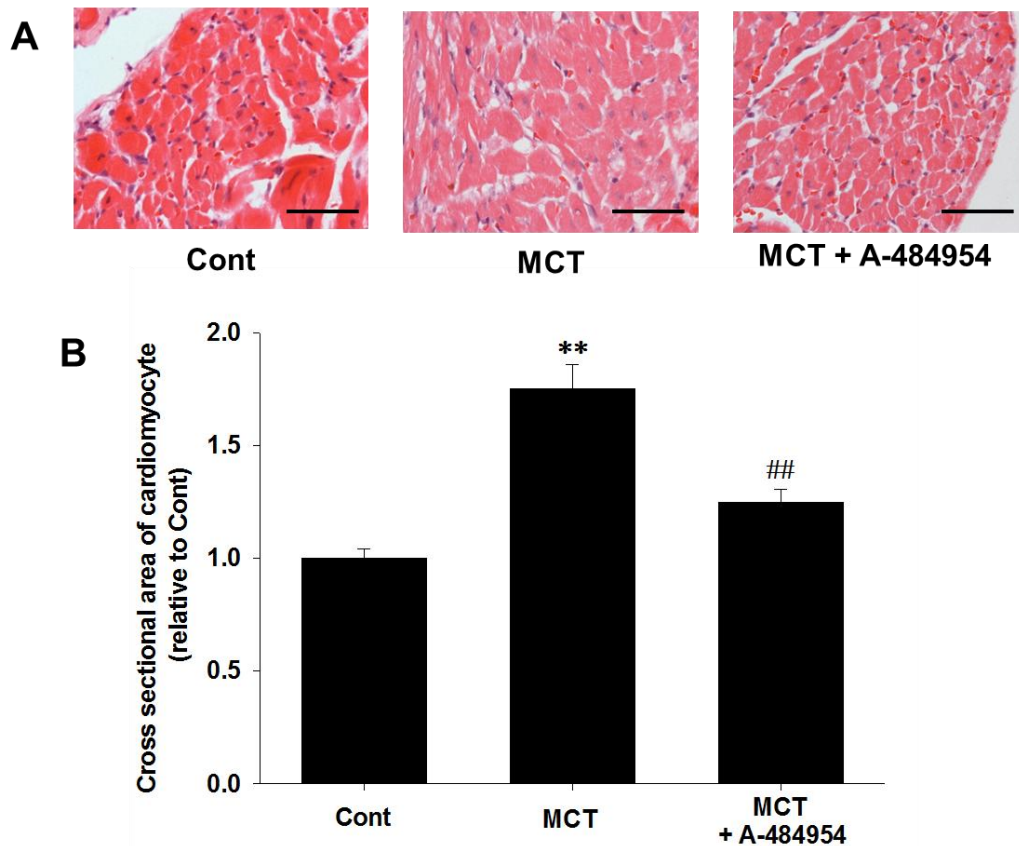


Fig. 1 Effects of A-484954 on monocrotaline (MCT)-induced right ventricular (RV) cardiomyocyte hypertrophy.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% calboxymethyl cellulose (CMC; MCT) or A-484954 (MCT + A-484954, 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, heart was harvested and right ventricle was isolated. (A) Representative hematoxylin and eosin (H&E) stained sections for RV cardiomyocytes were shown (n = 5-7). (B) Cross sectional area of cardiomyocyte was calculated and shown in the bar graph (relative to Cont, n = 5-7). **p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. MCT. Scale bar: 50 μ m.

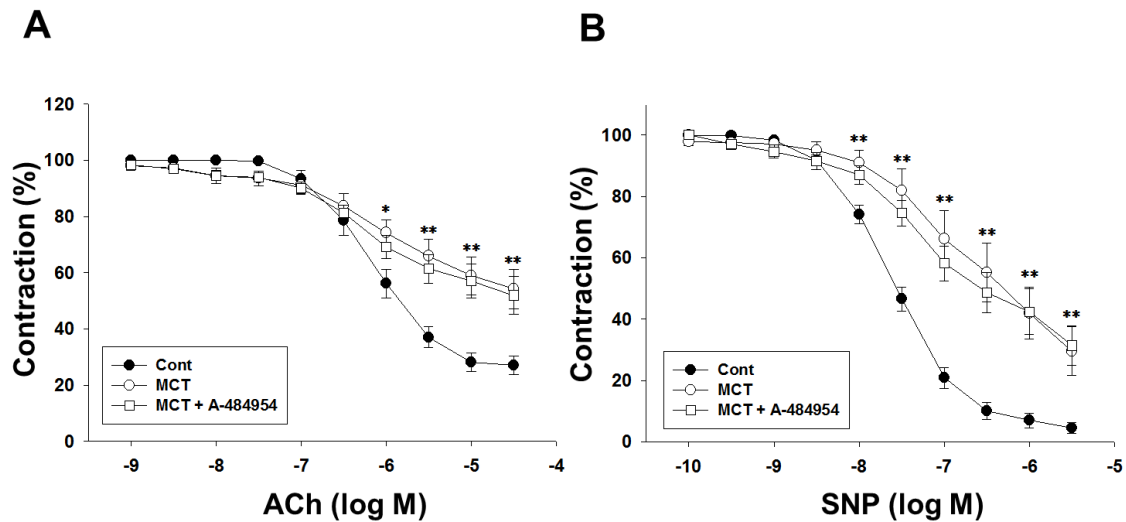


Fig. 2 Effects of A-484954 on MCT-induced impairment of endothelium-dependent and -independent relaxation mediated by acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP), respectively, in intrapulmonary arteries (IPAs) of rats.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% CMC (MCT) or A-484954 (MCT + A-484954; 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, IPAs (500-1,000 μm) were isolated and divided into two rings. Contraction was expressed as relative to the precontraction induced by 100 nM noradrenaline. ACh (1 nM to 30 μM , n = 9-14 rings; A) or SNP (100 pM to 3 μM , n = 8-15 rings; B) was cumulatively applied.

*p<0.05 vs. Cont; **p<0.01 vs. Cont.

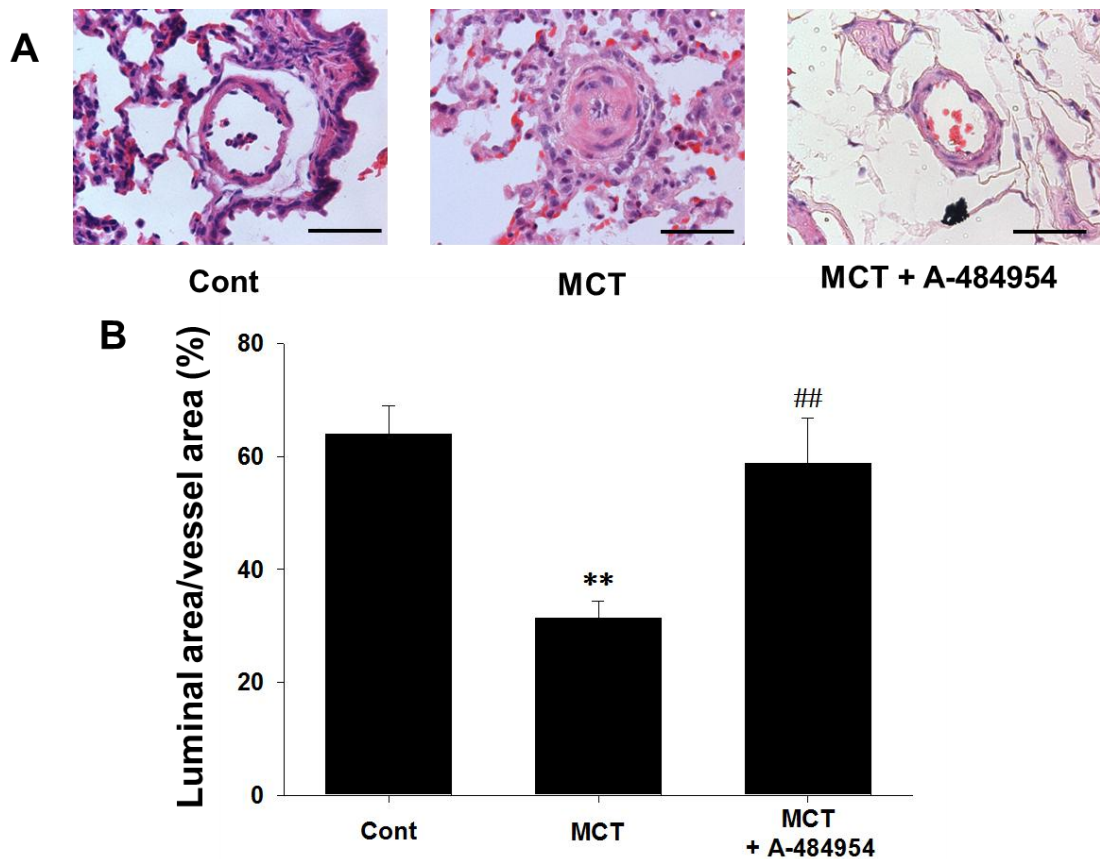


Fig. 3 Effects of A-484954 on MCT-induced IPAs hypertrophy.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% CMC (MCT) or A-484954 (MCT + A-484954; 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, lungs were harvested. (A) Representative H&E lung sections were shown (n = 9-10). (B) Luminal to vessel area ratio (%) of IPAs (diameter: 50-100 μ m) was calculated and shown in the bar graph (n = 9-10). **p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. MCT. Scale bar: 50 μ m.

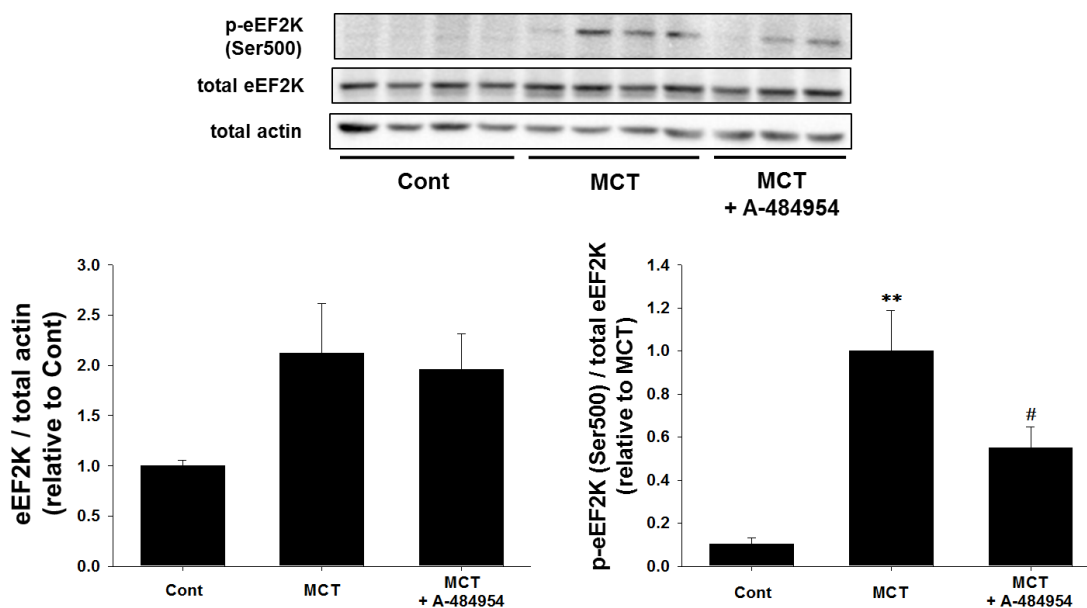


Fig. 4 Effects of A-484954 on MCT-induced increased expression and phosphorylation (at Ser500) of eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K) in the lung tissues.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% CMC (MCT) or A-484954 (MCT + A-484954; 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily. After 14 days, lungs were harvested and immediately frozen in -80°C . After extraction of protein, expression and phosphorylation (at Ser500) of eEF2K were determined by Western blotting. The results were shown as fold increase relative to control (expression) or MCT (phosphorylation) (n = 9-10). Equal protein loading was confirmed using total actin antibody. **p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. MCT.

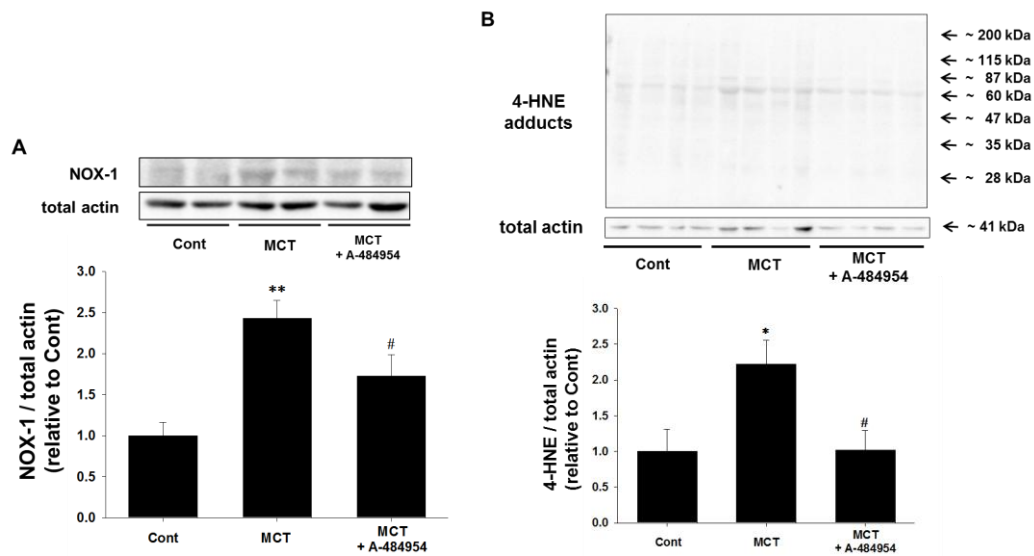


Fig. 5 Effects of A-484954 on MCT-induced increased expression of NADPH oxidase (NOX)-1 protein and reactive oxygen species (ROS) generation.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% CMC (MCT) or A-484954 (MCT + A-484954; 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily for 14 days. (A) Expression of NOX-1 protein (n = 9-10) in lung tissues was determined by Western blotting. (B) ROS generation (n = 4) in lung tissues was determined by Western blotting using 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) antibody. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody, and results were shown as fold increase relative to Control. *p<0.05 vs. Cont; **p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. MCT.

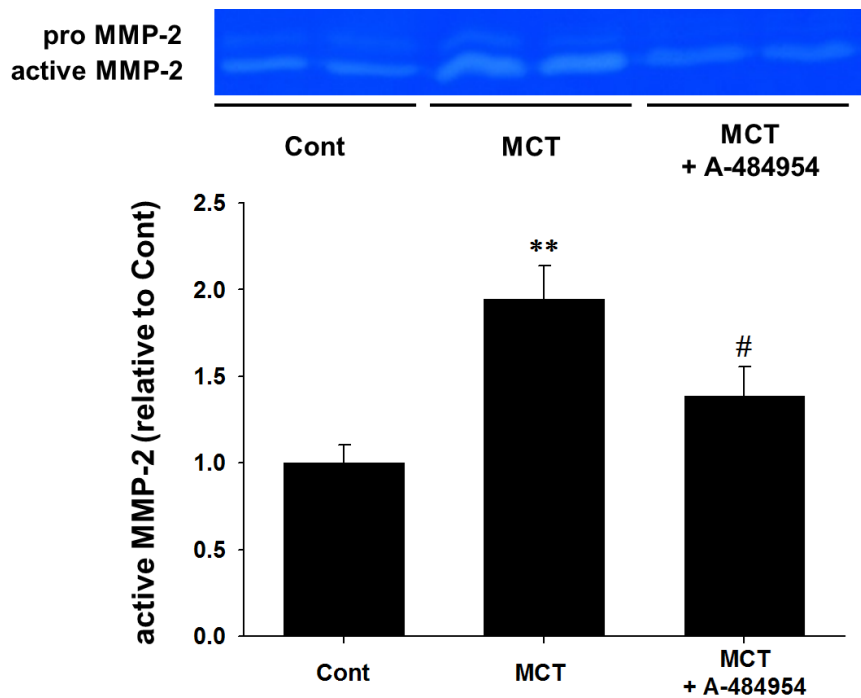


Fig. 6 Effects of A-484954 on MCT-induced activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in the lung tissues.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% CMC (MCT) or A-484954 (MCT + A-484954; 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily for 14 days. MMP-2 activity (n = 7-9) in the lung tissues was determined by a gelatin zymography, and results were shown as fold increase relative to Control. **p<0.01 vs. Cont; #p<0.05 vs. MCT.

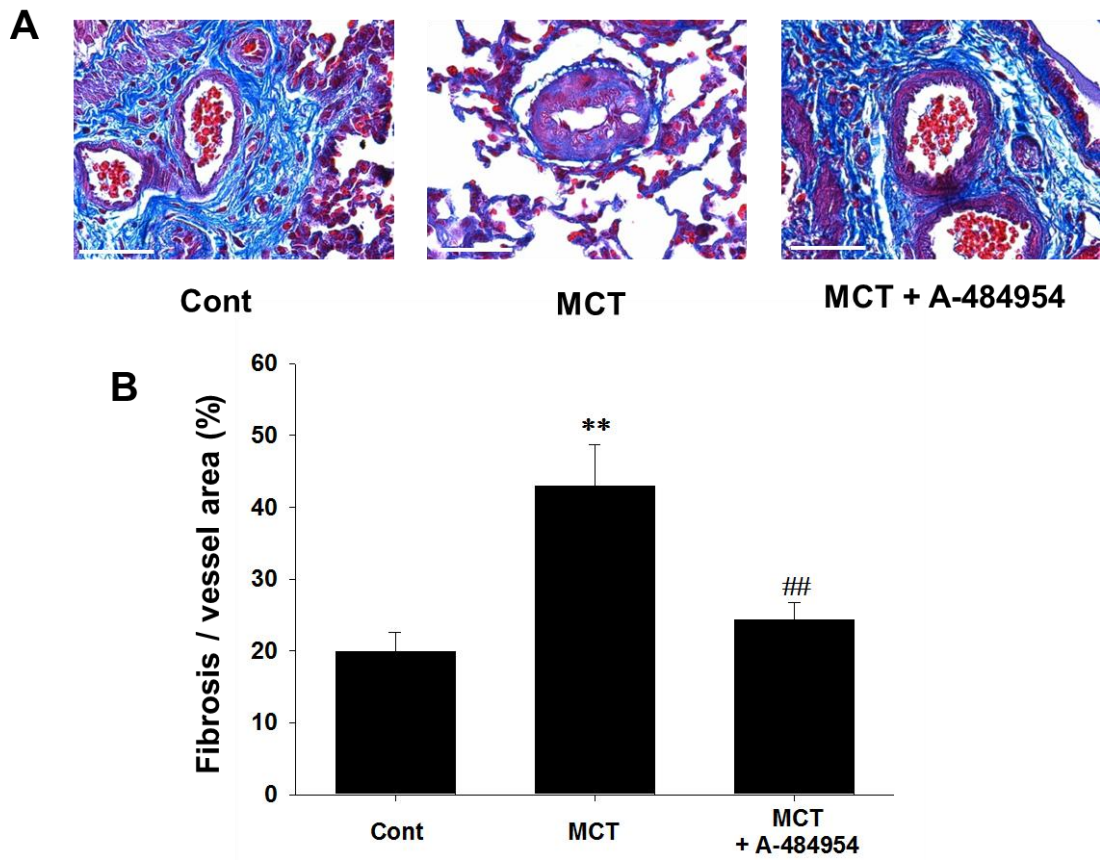


Fig. 7 Effects of A-484954 on MCT-induced IPA fibrosis.

After saline (Cont) or MCT (60 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats, 0.5% CMC (MCT) or A-484954 (MCT + A-484954; 2.5 mg/kg/day) was intraperitoneally treated daily for 14 days. (A) Representative azan stained lung sections were shown (n = 6). (B) The fibrotic area to vessel area ratio (%) of IPAs was calculated and shown in the bar graph (n = 6). **p<0.01 vs. Cont; ##p<0.01 vs. MCT. Scale bar: 50 μ m.

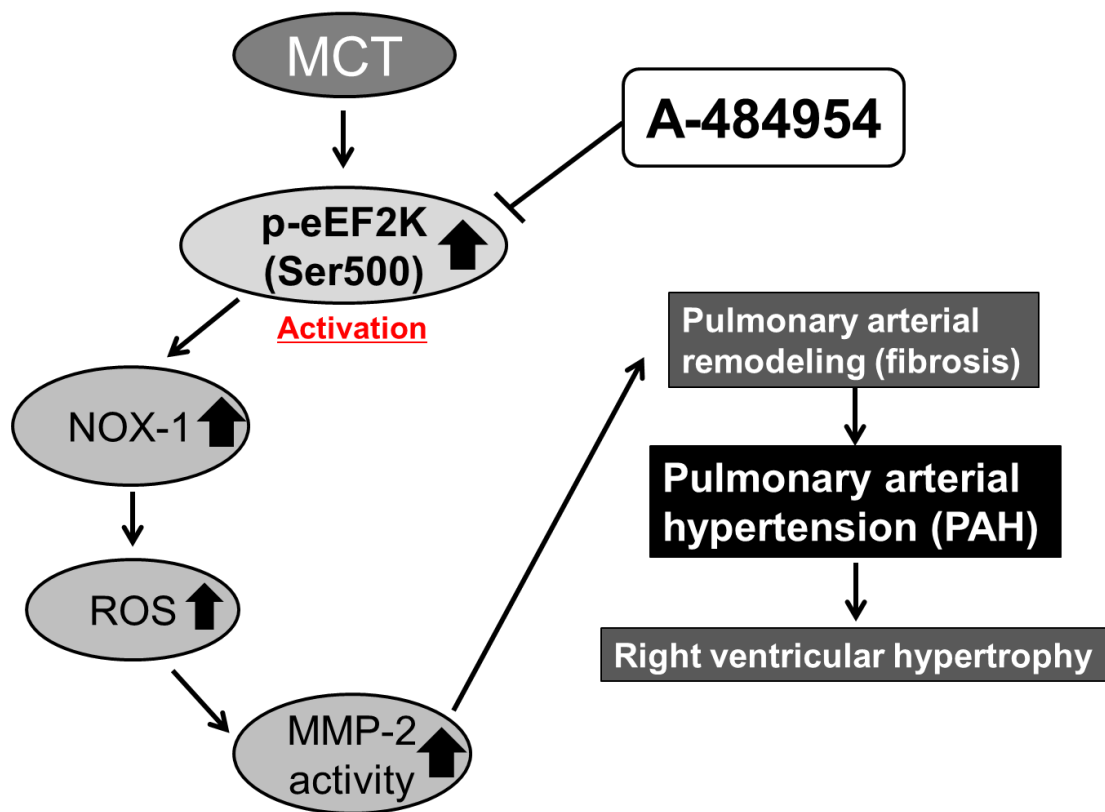


Fig. 8 Summary of the results in Chapter 1.

eEF2K mediates ROS production via upregulation of NOX-1 protein, which may lead to increased MMP-2 activity. ROS/MMP-2 may mediate increased PA pressure through PA hypertrophy and fibrosis, which results in RV hypertrophy. A-484954 can prevent these processes. This mechanism may be at least in part responsible for the pathogenesis of PAH.

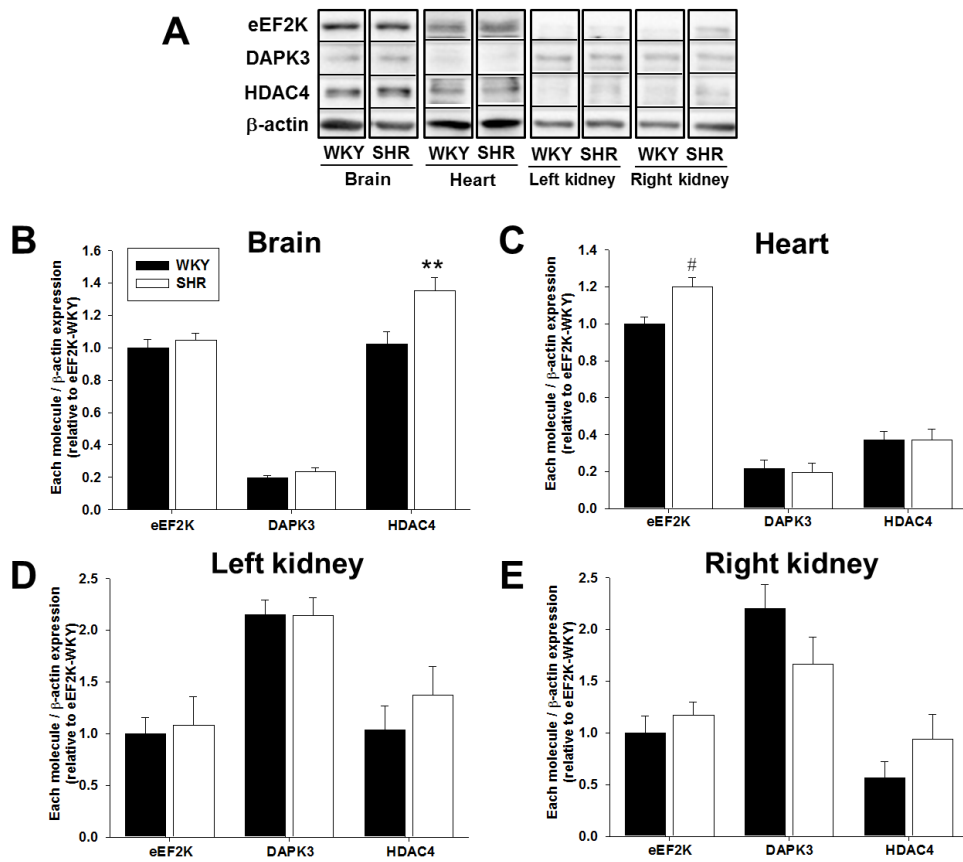


Fig. 9 Protein expression level of eEF2K, death-associated protein kinase (DAPK)3, and histone deacetylase (HDAC)4 in brain, left ventricles (LV) and kidney from WKY and SHR.

After brain (n = 5), LV (n = 7) and kidney (n = 7) were isolated from 12-week-old WKY and SHR, they were immediately frozen. After extraction of protein from each tissue, protein expression of eEF2K, DAPK3 and HDAC4 was determined by Western blotting. (A) Representative images were shown. (B to E) The bar graph for each tissue showed the protein expression as relative to each eEF2K in WKY. Equal protein loading was verified using β -actin antibody.

**p<0.01 vs. HDAC4 in WKY; #p<0.05 vs. eEF2K in WKY.

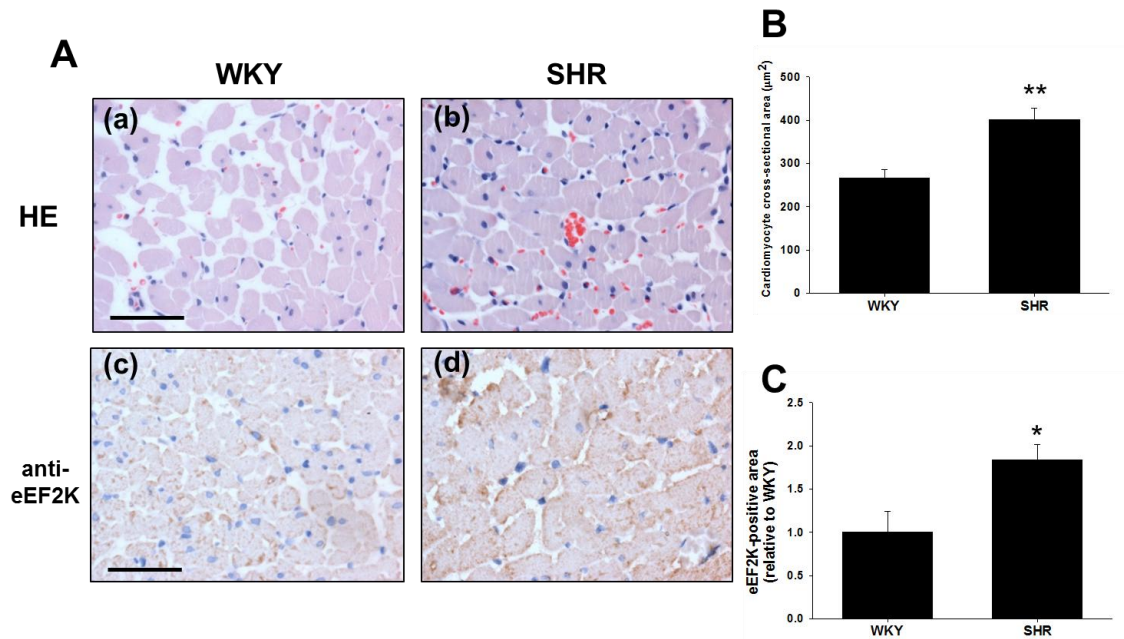


Fig. 10 Cardiomyocyte hypertrophy and eEF2K expression in LV from 12 week-old WKY and SHR.

LV tissues were isolated and fixed in 10% neutral buffered formalin, and thin paraffin sections (4 µm) were made. (A) Representative LV cross-sections stained with H&E (a: WKY, n = 5; b: SHR, n = 5) or immunostained with a specific antibody against eEF2K (c: WKY, n = 5; d: SHR, n = 5). In c) and d), nuclei were counter-stained with hematoxylin. (B) Cross-sectional area of cardiomyocyte (µm²) was calculated and shown in the bar graph (n = 5). (C) Ratio of eEF2K-positive to cardiomyocyte area was calculated and shown as relative to WKY (n = 5). *p<0.05 vs. WKY; **p<0.01 vs. WKY. Scale bar: 50 µm.

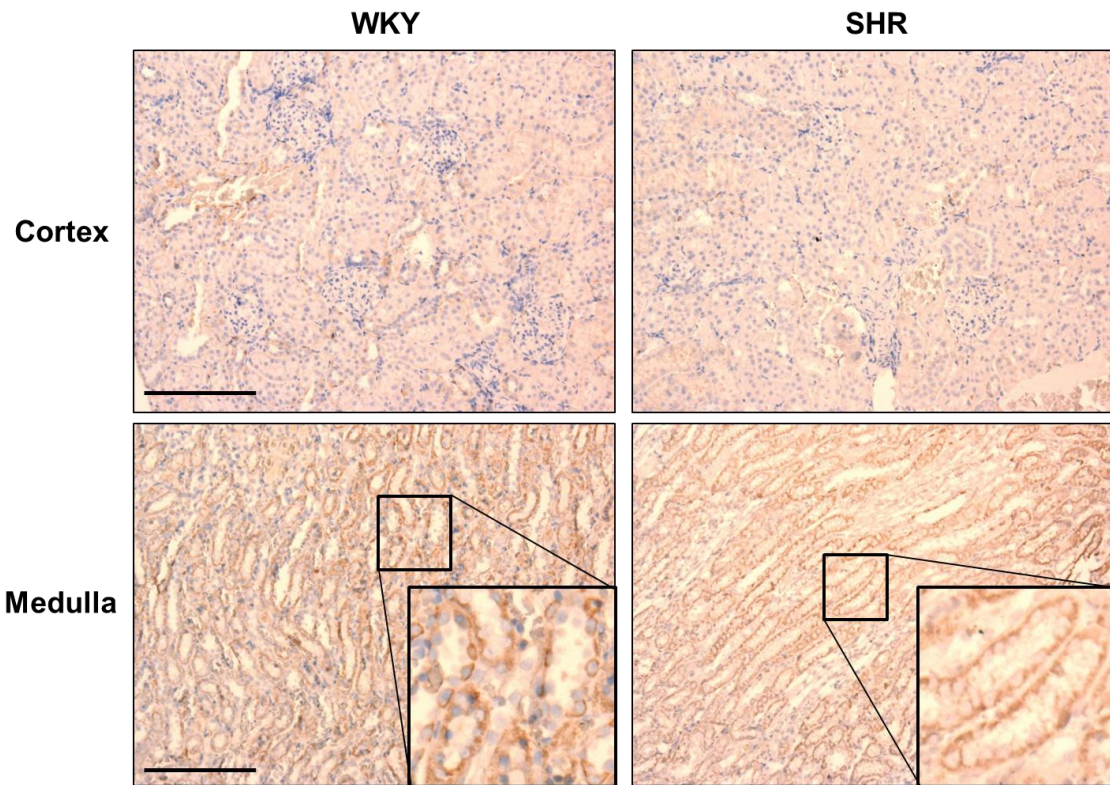


Fig. 11 Expression and localization of DAPK3 protein in left kidney from 12-week-old WKY and SHR.

Representative immunohistochemically stained sections of left kidney cortex (WKY: n = 5, SHR: n = 5) and medulla (WKY: n = 5, SHR: n = 5) with DAPK3 antibody were shown. Nuclei were counter-stained with hematoxylin. Scale bar: 50 μ m.

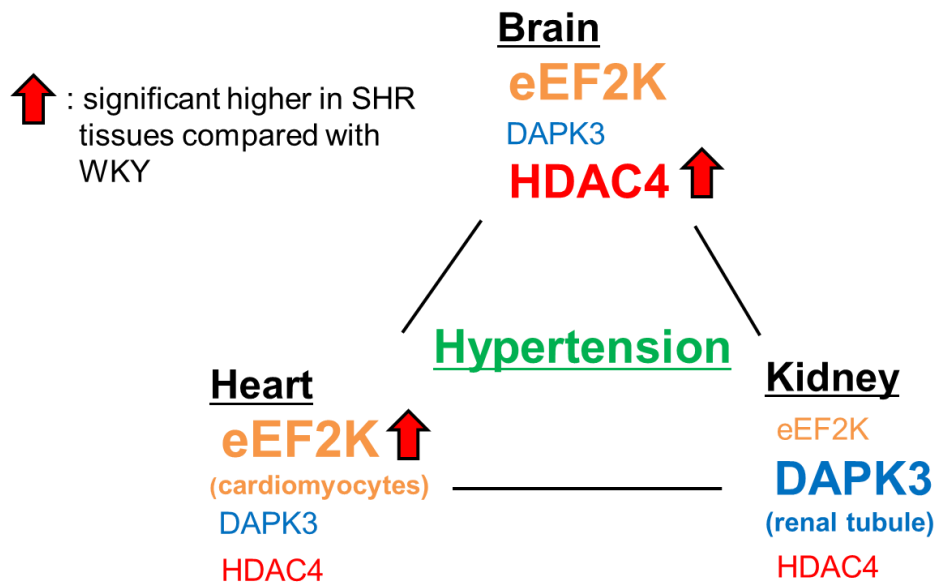


Fig. 12 Summary of the results in Chapter 2.

Protein expression of HDAC4/eEF2K, eEF2K and DAPK3 is relatively higher in rat brain, LV and kidney, respectively. In addition, HDAC4 protein in brain and eEF2K protein in LV were significantly higher in SHR than those in WKY. These results indicate that the increased HDAC4 in brain and the increased eEF2K in LV might be at least in part related to the pathogenesis of hypertension development in SHR.

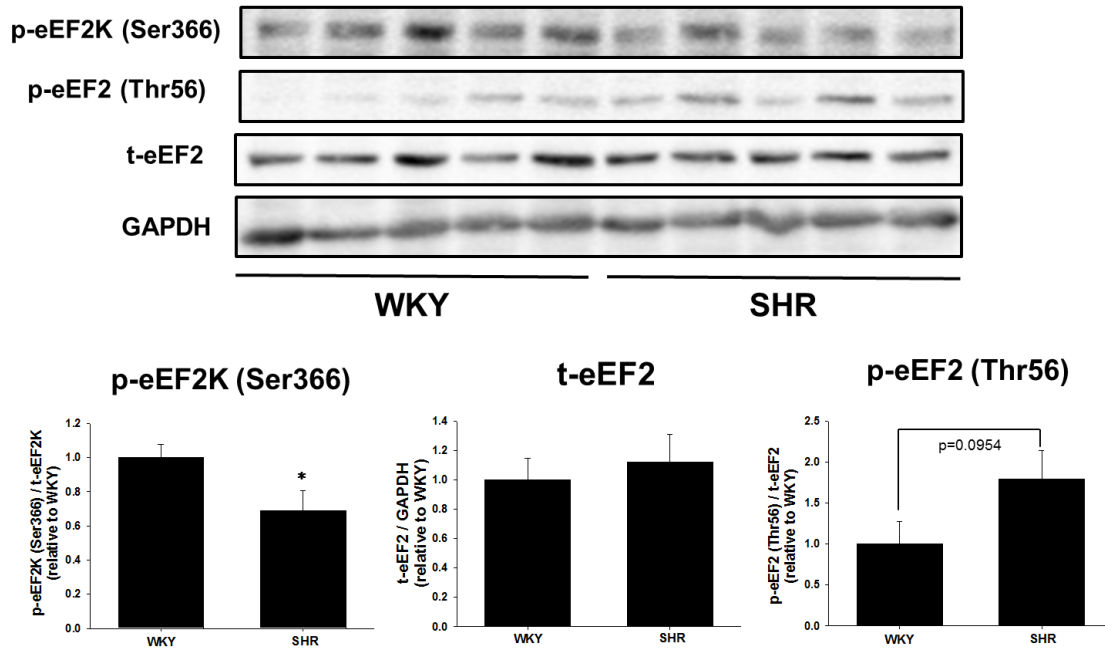


Fig. 13 Phosphorylation of eEF2K and eEF2 in LV from SHR.

After LV isolated from 12-week-old SHR and WKY were immediately frozen, the protein was extracted. Phosphorylation of eEF2K (p-eEF2K at Ser366; n = 7) and eEF2 (p-eEF2 at Thr56; n = 7) was determined by Western blotting. The results were shown as fold increase relative to WKY. p-eEF2K or p-eEF2 was normalized to total-eEF2K (t-eEF2K) or total-eEF2 (t-eEF2), respectively. t-eEF2 was normalized to GAPDH. *p<0.05 vs. WKY.

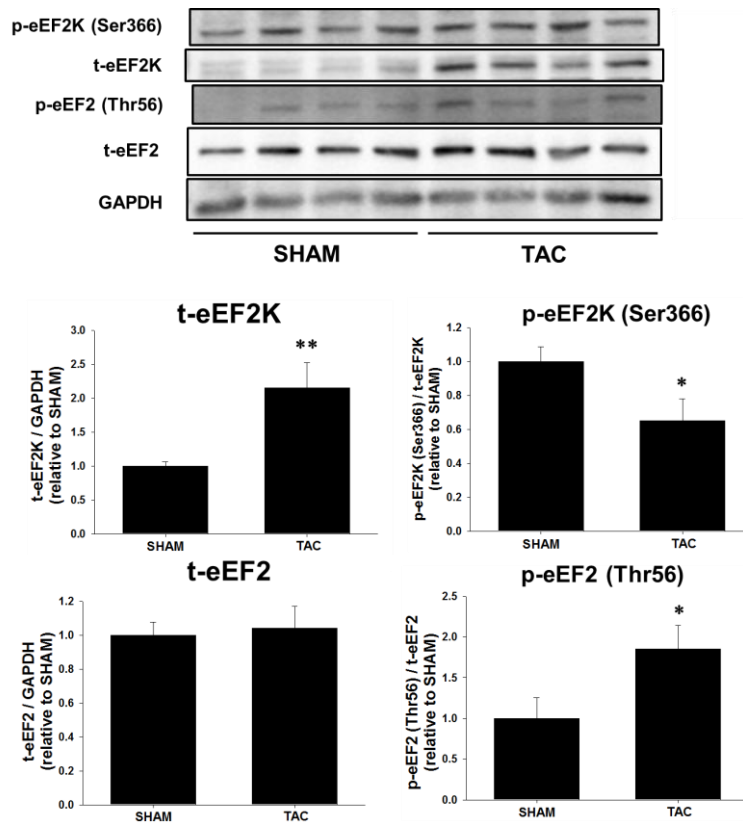


Fig. 14 Expression and phosphorylation of eEF2K and eEF2 in LV from pressure overload-induced cardiac hypertrophy model mice.

Transverse aortic constriction (TAC) or SHAM operation was performed in C57BL/6NJc1 mice. After 3 days from the operation, LV were isolated and immediately frozen. After extraction of protein, t-eEF2K (n = 8), p-eEF2K at Ser366 (n = 8), t-eEF2 (n = 8) and p-eEF2 at Thr56 (n = 8) were determined by Western blotting. The results were shown as fold increase relative to SHAM. p-eEF2K or p-eEF2 was normalized to t-eEF2K or t-eEF2, respectively. t-eEF2K and t-eEF2 were normalized to GAPDH.

*p<0.05 vs. SHAM; **p<0.01 vs. SHAM.

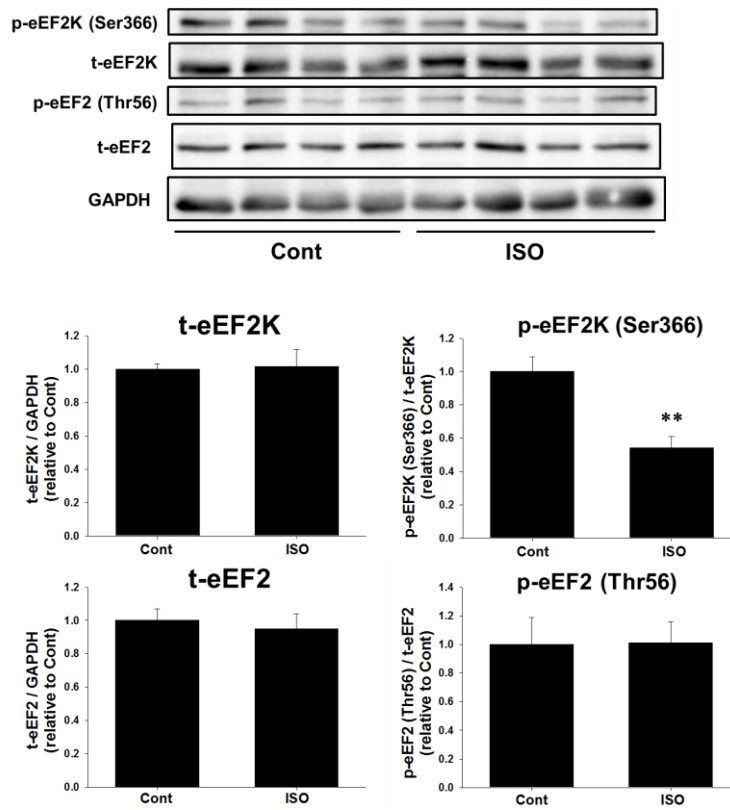


Fig. 15 Expression and phosphorylation of eEF2K and eEF2 in LV from isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model rats.

Isoproterenol (5 mg/kg; ISO group) or saline (Cont group) was subcutaneously injected to rats daily. After 1 week, LV were isolated and immediately frozen. After extraction of protein, t-eEF2K (n = 6), p-eEF2K at Ser366 (n = 6), t-eEF2 (n = 6) and p-eEF2 at Thr56 (n = 6) were determined by Western blotting. The results were shown as fold increases relative to Cont. p-eEF2K or p-eEF2 was normalized to t-eEF2K or t-eEF2, respectively. t-eEF2K and t-eEF2 were normalized to GAPDH. **p < 0.01 vs. Cont.

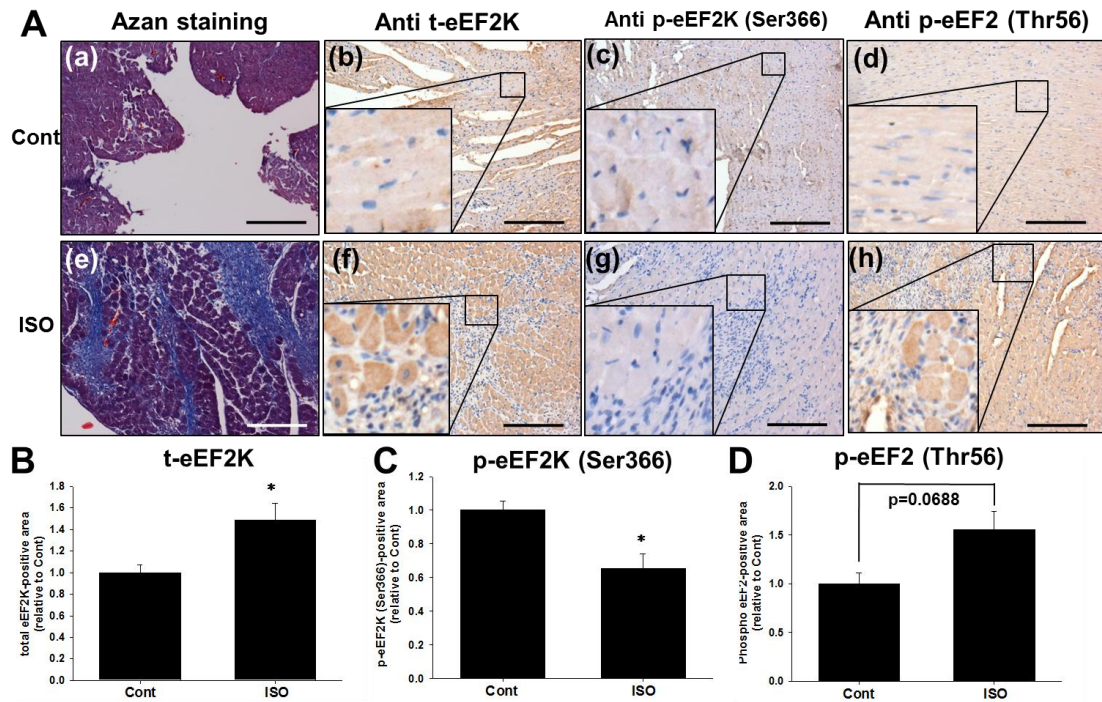


Fig. 16 Expression and phosphorylation of eEF2K (Ser366) and eEF2 (Thr56) in isoproterenol-induced hypertrophied cardiomyocytes.

Isoproterenol (5 mg/kg; ISO) or saline (Cont) was subcutaneously injected to rats daily. After 1 week, LV were isolated and the paraffin sections were made. (A) Representative azan-stained LV sections (a: Cont, n = 6; e: ISO, n = 6) and immuno-stained sections using specific antibody against t-eEF2K (b: Cont, n = 4; f: ISO, n = 4), p-eEF2K (Ser366) (c: Cont, n = 3; g: ISO, n = 4) or p-eEF2 (Thr56) (d: Cont, n = 3; h: ISO, n = 4). (B) t-eEF2K-, (C) p-eEF2K (Ser366)- or (D) p-eEF2 (Thr56)-positive area to cross-sectional cardiomyocyte area ratio was calculated. The results were shown as fold increase relative to Cont. * $p < 0.05$ vs. Cont. Scale bar: 200 μm .

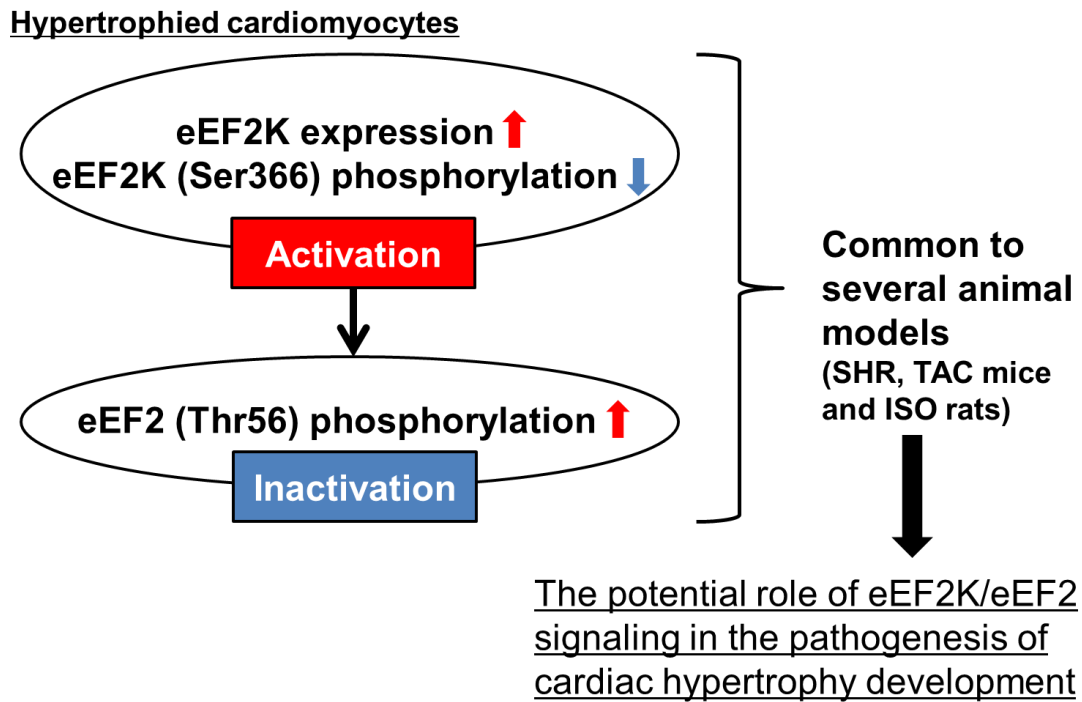


Fig. 17 Summary of the results in Chapter 3.

The increased expression and the decreased phosphorylation (at Ser366) of eEF2K and the increased phosphorylation of eEF2 (at Thr56) in hypertrophied LV were common to several animal models, namely SHR as well as pressure overload- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. These results suggest the potential role of eEF2K/eEF2 signaling in the pathogenesis of cardiac hypertrophy development.

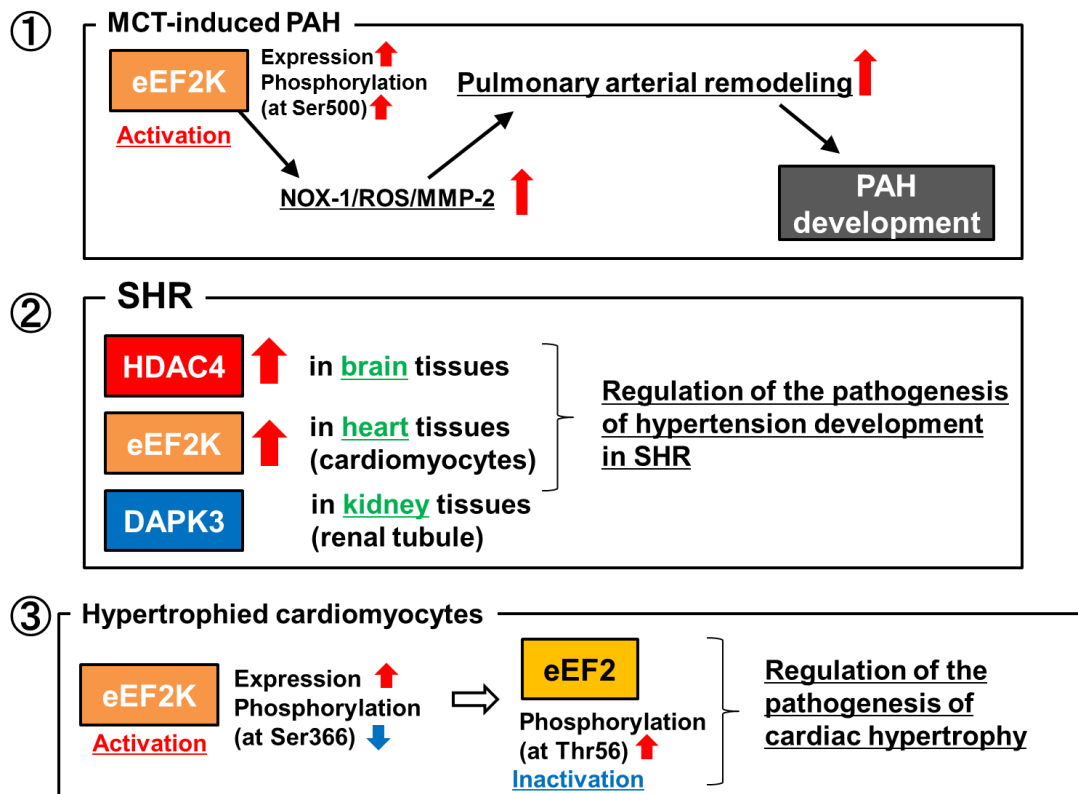


Fig. 18 Summary of the present study.

The results of Chapter 1 suggest that eEF2K mediates development of other hypertension than essential hypertension. The results of Chapter 2 and 3 indicate that CaM-related proteins including HDAC4, eEF2K and DAPK3 may control the pathogenesis of hypertension development and its complications through regulating functions of not only blood vessels, but also several tissues such as brain, heart and kidney.