

< 要旨 >

アルドステロン(Aldo)の催炎症作用に関与していると考えられるオステオポンチン(OPN)遺伝子の転写活性化機序について検討した。Aldo 刺激による OPN 遺伝子転写亢進はミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗剤によって有意に減弱したため MR を介していると考えられた。また転写開始部位の-1404 から存在する glucocorticoid response element (GRE) を欠損した promoter は Aldo による活性化能を失っていたことから、Aldo-MR 複合体は GRE へ結合し OPN 転写量を調節していると考えられた。

<序文>

脊椎動物（両生類）が海から陸上に進出した際に最も問題となったのが水分・塩分の保持だった。海中とは異なり陸上では水分・塩分を身体に保持する機構が必要となった。その一つがレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系である。両生類以降の脊椎動物は腎臓に傍糸球体装置を有する。そこでは血管極に接している遠位尿細管に緻密斑と呼ばれる特殊な上皮細胞が並んでいる。この上皮細胞は尿細管中のナトリウム濃度を鋭敏に感知しており、ナトリウム濃度が低下すると緻密斑に接する糸球体傍細胞を刺激しレニンを分泌させる。レニンは肝臓で生成されたアンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン(Ang) Iに変換し、Ang Iは肺や血管内皮細胞に多く存在する Ang 変換酵素によりさらに Ang II に活性化を受ける。Ang II はそれ自体細動脈の収縮をもたらし血圧を上昇させる他、副腎皮質球状層に作用しアルドステロン(Aldo)を分泌させる。ミネラルコルチコイドである Aldo は腎遠位尿細管細胞の管腔側に上皮ナトリウムチャネル(Epithelial Na Channel: ENaC)を増やしナトリウム再吸収を亢進させる。遠位尿細管でのナトリウム再吸収は個体への水分貯留をもたらす。この作用は生命の維持に極めて重要であるが、かえってその塩分保持能力が高血圧を始めとする様々な病態を引き起こす原因となる可能性がある。そのため Ang 変換酵素阻害薬や Ang II 受容体拮抗薬が高い臨床的意義をもっている。

Ang II は強力な血管収縮作用を有する他、血小板凝集・plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)抑制による血栓形成傾向^{1,2)}など様々な機序により高血圧・動脈硬化・心筋肥大・組織線維化などをもたらす生命予後を悪化させることが次々と報告された。Aldo は尿細管細胞の細胞質に存在するミネラルコルチコイド受容体(Mineralocorticoid Receptor, MR)と複合体を形成した後に核内へ移行し、ENaC 遺伝子の promoter 領域にある glucocorticoid response element (GRE)に結合して転写活性化をもたらす³⁾。近年臨床的に MR 拮抗薬である spironolactone や eplerenone が RALES 試験や EPHESUS 試験において心不全患者の生命予後改善効果をもたらすことが証明された^{4,5)}。その機序を解析する過程において、MR が遠位尿細管のみならず、血管平滑筋を含め心血管組織などの非上皮系組織にも広く分布し^{6,7)}、実は Aldo も Ang II と同様の作用を有し炎症惹起や組織線維化など直接心血管疾患の予後悪化に関与することが明らかになってきた (図 1)。

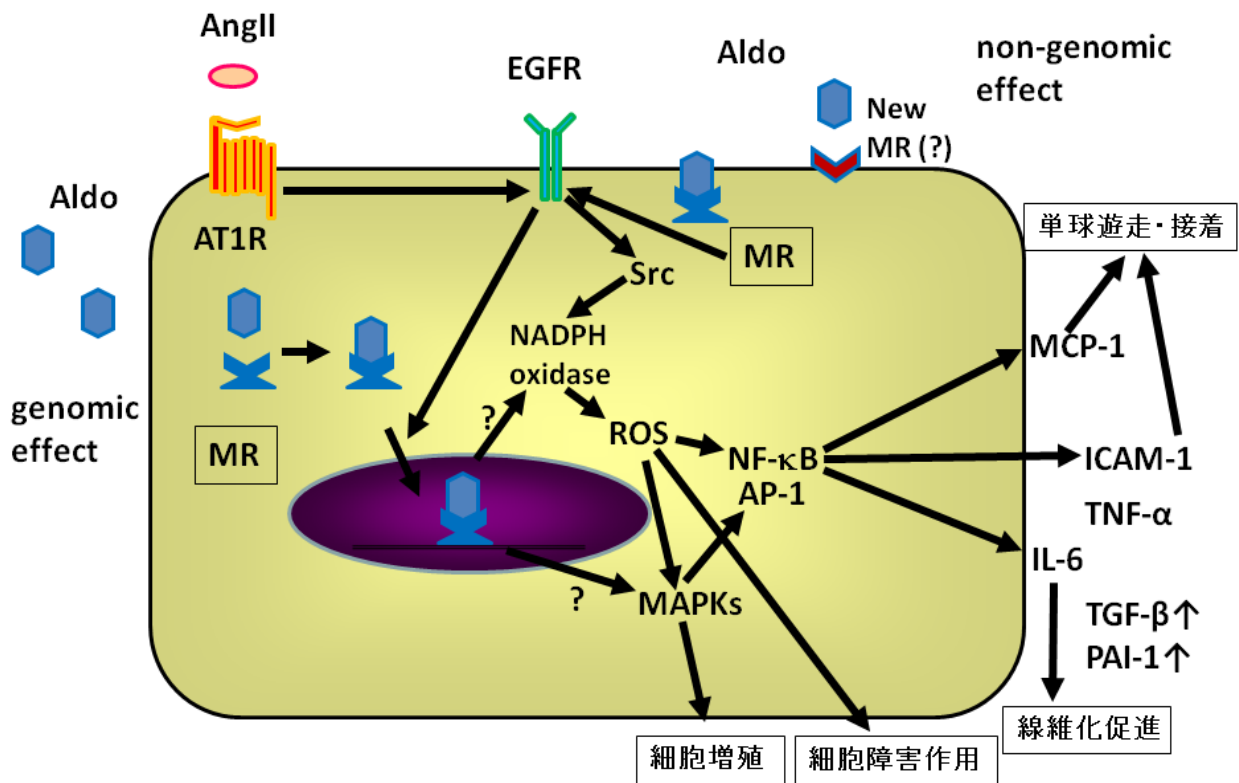


図1. 血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシンIIとアルドステロンの作用

アンジオテンシンII (AngII) とアルドステロン (Aldo) は共通の経路を介し細胞障害・線維化促進する。EGFR: epidermal growth factor receptor

Aldo が遠位尿細管以外で直接的作用をもたらすにはその標的細胞において MR が十分に発現していること以外に、グルコルチコイドとの関連が重要となる。MR は進化の過程でグルコルチコイド受容体(Glucocorticoid Receptor, GR)から分化したものと推察され⁸⁾、構造上 GR との類似性が高い(図 2)。ヒトの遺伝子配列ではリガンド結合ドメインで 57%の相同性が保たれており、DNA 結合ドメインにいたっては 94%もの相同性を有する。この事実からも予想される通り、Aldo-MR 複合体の標的遺伝子 promoter 領域における転写因子結合部位は GR と共通の GRE と呼ばれる配列であると考えられている。

- (A) **MR** KICLVCGDEASGCHYGVVTCGCKVFFKRAVEGQHNYLCAGRNDICIIDKI
GR KLCLVCSDEASGCHYGVLTGCKVFFKRAVEGQHNYLCAGRNDICIIDKI
- MR** RRKNCPACRLQKCLQAGM
GR RRKNCPACRYRKCLQAGM
- (B) **MR** TPSPVMVLENIEPEIVYAGYDSSKPDTAENLLSTLNRLAGKQMIQVVKWA
GR TPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWA
- MR** KVLPGFKNLPLEDQ I TL I QYSWMCL S SFALSWRSYKHTNSQFLYFAPDLV
GR KAIPGFRNLHLLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWSYRQSSANLLCFAPDLI
- MR** GLKSQAFEEMRTNYIKELRKMVTKCPNNSGQSWQRFYQLTKLLDSMHDL
GR GLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGNSSQNWQRFYQLTKLLDSMHEV
- MR** VSDLLEFCFYTFRESHALKVEFPAMLVEIISDQLPKVESGNAKPLYFHRK
GR VENLLNYCFQTFD-KT-SIEFPEMLAEIITNQIPKYSNGNIKKLLFHQK

図2.ヒトMR/GR蛋白構造

A: DNA結合ドメインにおけるアミノ酸配列の相同性。極めてよく保存されており、実際に目標DNA配列も共通であると考えられている(GRE)。
 B: リガンド結合ドメインにおけるアミノ酸配列の相同性。この差がリガンド結合能の差を生んでいる。

ヒトの生体内ではグルココルチコイドであるコルチゾールが Aldo の数百～数千倍の血中濃度を有しており、MR への親和性は両ホルモンではほぼ同等のため、生理的濃度のはるかに高いコルチゾール存在下では Aldo はその作用を発揮することができない。そこで腎尿細管を始めとする上皮系の Aldo 標的細胞では細胞内にグルココルチコイドを不活化する代謝酵素である 2 型 11 β 水酸化ステロイド脱水素酵素(11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 2, 11 β -HSD2)を発現させることで Aldo の単独作用を確保している (図 3)⁹⁾。

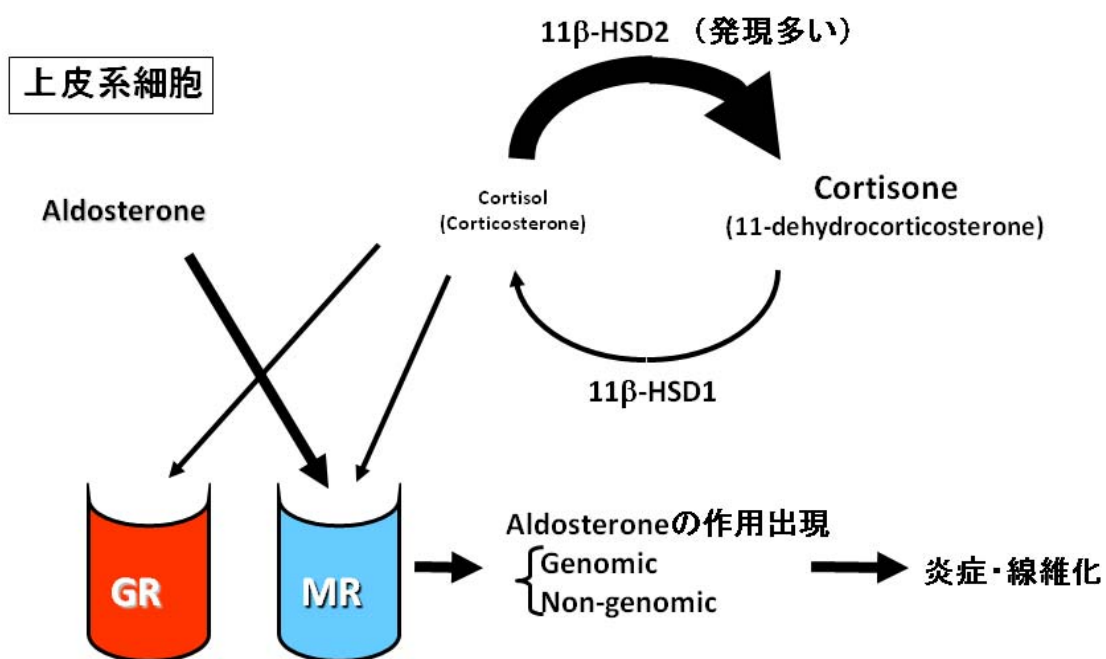


図3. 上皮系細胞におけるAldosterone作用出現機構

上皮細胞系においては11 β -HSD2が多く発現されており、cortisolからcortisoneへの不活化が行われることでAldo-MR複合体形成が担保されている。

前述の MR 阻害薬である spironolactone や eplerenone が心不全の予後を改善したことを契機^{4,5)}に Aldo の心血管系への悪影響、特に心臓・動脈において直接的に炎症や線維化を引き起こす機序が積極的に議論されている¹⁰⁾。これ

ら組織ではストレス下でさらに MR の発現が増強する¹¹⁾。ただし、心血管系においては 11 β -HSD2 の発現は非常に少なく (図 4)¹²⁾、このような環境下で Aldo が MR 依存性に直接作用を生じるためには何らかの分子機序の存在を考慮する必要がある。すなわち、①11 β -HSD2 以外の機序によるコルチゾール・コルチコステロン排除機構の存在、②MR に Aldo が結合した際にのみ MR 依存性転写が活性化される分子機構の存在¹³⁾、③Aldo の結合した MR のみで転写が誘導される標的遺伝子の存在、④細胞内 Aldo 産生による高濃度リガンドの存在、⑤Aldo 特異的な非ゲノム作用 (または受容体) の存在、などのメカニズムが推察される。

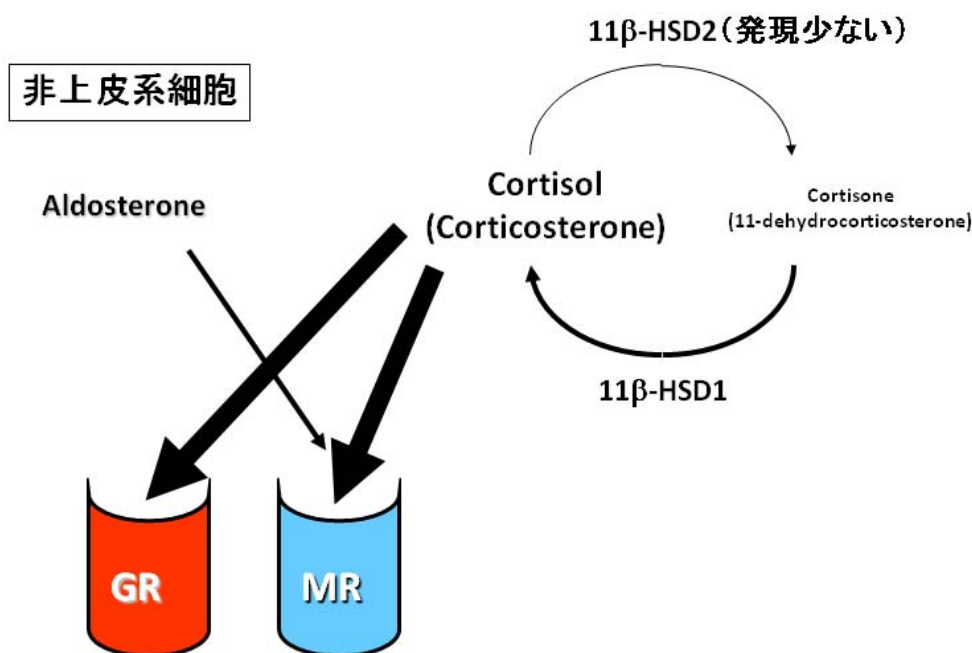


図4. 非上皮系細胞におけるCortisol/Aldosterone相互作用

Aldoの作用は高濃度に存在するcortisolに阻害される。
細胞内環境によってはcortisolがMRを活性化することも知られている。

Aldo を含めステロイドホルモンは通常、標的臓器細胞質内の受容体に結合

してその作用を発揮するため、少なくとも作用発現までには 30 分以上の時間を要する。この作用機序は遺伝子の転写活性上昇を介してもたらされるため「ゲノム作用(genomic または genotropic effect)」と呼ばれる³⁾。それに対して、Aldo 刺激においてはゲノム作用で説明できないような数分以内の短い時間経過で惹起される反応が各種細胞系で報告されている。これらの迅速な反応は遺伝子の転写活性上昇を介している時間がなく、また転写阻害薬の影響も受けないため、「非ゲノム(non-genomic または non-genotropic)作用」と呼ばれる¹⁴⁻²³⁾。Aldo の非ゲノム作用の中には MR 阻害薬で阻害を受けるものと受けないものが混在して報告されており、その細胞内機序には不明の点が多い。

Aldo の催炎症作用を検討する上で、近年オステオポンチン(OPN)蛋白が注目されている。OPN は初め 1986 年に骨芽細胞において同定された糖蛋白質であり^{24,25)}、骨においてはその有機構造の一部となっている。300 アミノ酸程度からなり（マウス：297 アミノ酸残基、ヒト：314 アミノ酸残基）、蛋白翻訳直後は 33kDa 程度だが糖鎖やリン酸化の修飾を高度に受けるため通常 44kDa 付近に同定される。アスパラギン酸を高率に含むため高度に陰性帯電している。その後分泌型糖蛋白質としての性質も知られるようになり、細胞接着分子であるインテグリンとの結合部位である RGD 配列を有することなどに注目され、癌細胞の転移や自己免疫疾患との関連など多彩な作用が知られる。抗ヒトオステオポンチン抗体は関節リウマチなどの自己免疫疾患・炎症性疾患などを対象として臨床試験が進行中である²⁶⁾。カルシウム結合部位の他、トロンビ

ンや matrix metalloproteinases (MMPs)による cleavage site を有し (図 5)、トロンビンによる cleavage を受けた N 末端側 (C 末端がアルギニンで終わるため OPN-R と呼ばれる) においては RGD 配列 ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 8\beta 3$ との結合 epitope) や SVVYGLR 配列 ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ との結合 epitope) が蛋白質表面に出るようになり各種細胞との結合が容易となる^{27,28)}。これらインテグリンとの相互作用によって単球・マクロファージ遊走やマクロファージ・T 細胞からのサイトカイン産生を促進すると考えられている。このような作用は前述の Aldo の作用と共通している。

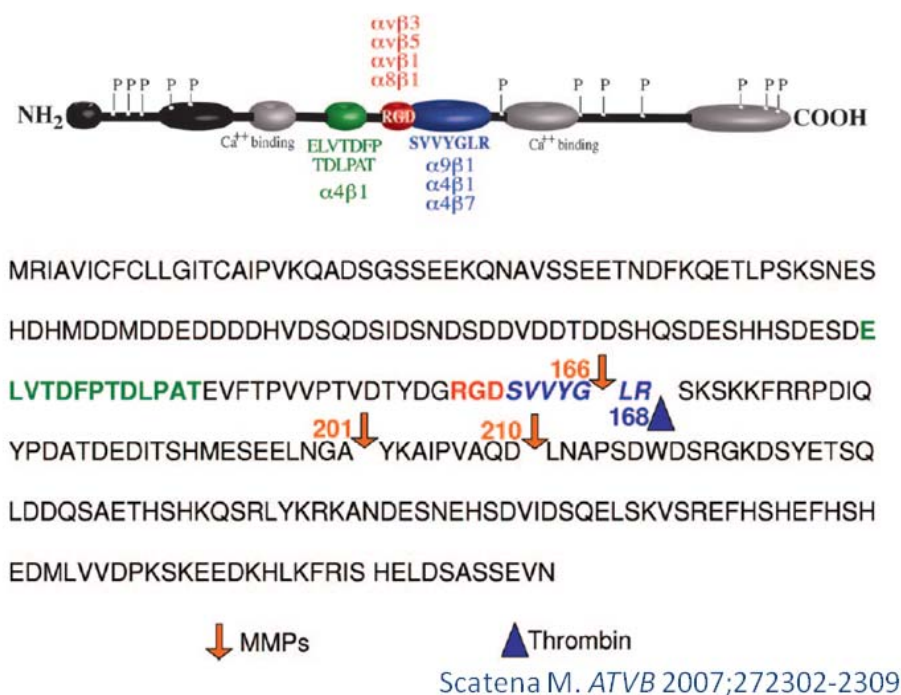


図5. ヒトオステオポンチン蛋白構造

アスパラギン酸を高率に含み、カルシウム結合部位の他、トロンビンやMMPsによる cleavage site を有する。トロンビンによる cleavage を受けた N 末端側 (OPN-R と呼ばれる) は各種インテグリンとの結合部位が蛋白質表面に出るようになる。

OPN は osteoblast などの骨関連細胞の他、線維芽細胞²⁹⁾、マクロファージ³⁰⁾、平滑筋細胞³¹⁾、筋芽細胞³²⁾、内皮細胞などで生合成されることが報告されて

いる。そのような中、動脈硬化巢近傍で OPN 濃度が上昇していることが知られるようになり^{33,34)}、その後 Aldo による刺激により腎尿細管細胞、腎メサンギウム細胞³⁵⁾、腎線維芽細胞³⁶⁾、血管内皮細胞での OPN 転写活性亢進が次々と報告されてきた。さらに原発性アルドステロン症患者においては本態性高血圧患者よりも OPN 血中濃度が有意に上昇していることが報告された³⁷⁾。以上より現在まで Aldo の血管炎症惹起作用・動脈硬化進展作用の一部は OPN を介している可能性が考えられている。

Aldo による催炎症作用の詳細な検討のためには、OPN 遺伝子転写活性亢進の細胞内機序が重要になってくるが、これまで催炎症の主要な標的細胞である血管平滑筋細胞に関して報告がなく、また分泌された OPN 蛋白そのものの血管平滑筋細胞に対する作用に関しても報告がない。これらの解析によりいまだ十分とは言えない血管平滑筋細胞に対する Aldo 作用の拮抗が可能となり、臨床的に高い抗動脈硬化作用をもたらす薬剤の開発が可能となる可能性がある。

< 目的 >

ラット血管平滑筋細胞(rVSMC)における Aldo 刺激による細胞内 OPN 転写活性化機序を検討する。また Aldo の催炎症作用機序としての非ゲノム作用について検討する。さらに OPN 蛋白の rVSMC に対する作用を検討する。

< 方法 >

実験動物を用いた実験はすべて東京大学の動物実験規約に則って実施した。

(rVSMC の培養)

6 週齢の雄 Wister ラットをオリエンタル酵母工業株式会社より購入し、搬入当日の内に大動脈平滑筋細胞を採取した。すなわちラットを 50mg/kg ネンブタール（大日本住友製薬）腹腔内投与により全身麻酔し、開腹下に腹部大動脈を離断し放血致死させ、即座に開胸し胸部大動脈分枝を切断しながら周囲組織から慎重に剥離し胸腹移行部までの大動脈を心臓と共に phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich 社)中に採取した。大動脈周囲の脂肪組織を剥離した後、上行大動脈を切断し心臓から大動脈を単離し、さらに長軸方向にマイクロ剪刀を用いて切り開き、滅菌綿棒を用いて内膜を除去した後、これを 2mm 幅に切ったものをコラーゲンコーティング付き 10cm 培養皿にて 20%(v/v) fetal bovine serum (FBS)入り Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma 社)中で 37℃で初代培養した³⁸⁾。2 代培養以降は 10%(v/v) FBS 入り DMEM を使用した。1 週間以内の継代培養を繰り返し、3 代培養から 6 代培養を実験に使用した。使用 24 時間前にそれぞれ実験目的に合わせて 10cm 培養皿、6 穴培養皿、96 穴培養皿に撒き、60-90%の confluency で実験を行った。

(Aldo 刺激による rVSMC での OPN 遺伝子転写活性評価)

OPN 遺伝子転写活性に対する Aldo 刺激の用量依存性を確認するため、24 時間 serum-free DMEM で前処置した rVSMC をそれぞれ 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M の濃度の Aldo (Sigma-Aldrich 社)で DMEM 中で 24 時間刺激した。また OPN 遺伝子転写活性に対する Aldo 刺激の時間依存性を確認するため、24 時間 serum-free DMEM で前処置した rVSMC を 10^{-6} M Aldo でそれぞれ 1.5 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間 DMEM 中で刺激した。control として非刺激 rVSMC を用いた。いずれも刺激後速やかに PBS で 2 回洗い、細胞を冷却下で培養皿から cell scraper を用いて物理的に剥離し、タカラバイオ株式会社製 Fastpure[®] RNA Kit を用いて total RNA を抽出した。OPN および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量を fluorescent SYBR green technology (LightCycler, Roche Molecular Biochemicals 社)を用いた quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction (quantitative real-time RT-PCR)により解析した。RT-PCR は Applied Biosystems 社製 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いた。GAPDH の cDNA を定量し対照として mRNA の半定量を行った。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

OPN (forward 5'-CCAGCACACAAGCAGACGTT-3',
reverse 5'-TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCAC-3')

GAPDH (forward 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',

reverse 5'-ACCACAGTCCATGCCATCCAC-3')

反応は 50℃ 30 分→95℃ 15 分の後、95℃ 15 秒→60℃ 1 分を 40cycles 繰り返した。

(エプレレノン(Eplr)による Aldo 刺激の OPN 転写活性化抑制)

選択的 MR 阻害薬である Eplr による OPN 転写活性化抑制効果確認のため、24 時間 serum-free DMEM で培養した rVSMC を 1 時間 10^{-5} M Eplr のみで前処理した後、24 時間 10^{-7} M Aldo で刺激した。対照として Aldo 非刺激 rVSMC および Eplr 前処理なしの Aldo 刺激 rVSMC を用いた。前項と同様に total RNA を抽出し、OPN および GAPDH の mRNA 発現量を quantitative real-time RT-PCR により評価した。

(promoter deletion assay)

OPN promoter 領域に存在する種々の転写因子結合部位のうち、Aldo 刺激からの転写活性化に寄与しているものを同定するため luciferase reporter assay の手法を用い、promoter deletion analysis を行った。すなわち Ridall らの報告³⁹⁾にある OPN gene 転写開始部位から -2284 までの全長 promoter 配列 (GenBankTM accession number AF017274、図 6) を rat genomic DNA から KOD FX DNA polymerase (東洋紡株式会社製)を用いて cloning した。

forward primer 5'-GGATGTCCTTCTCTGCTTTGCAGAACT-3'

reverse primer 5'-AGTCTCCTGCGGCAAGCATTCTC-3'

ampicillin 耐性遺伝子を有する pGL3-Basic Vector (Promega 社製) の firefly luciferase gene 上流に ligation し OPN promoter 配列を持つプラスミドを作成した (約 7000bp)。

```
1  ggatgtcctt ctctgtttt cagaactg cccagcacac agcgttcaa cctcaaggtt -2284 primer
61  gcagacactg aaagccggtg tgagttagg aagcagtcag tctgtcgac ctgggatcgc
121  tgaaggcatc aacagagcag gacaggggtg ctttggttct cagggtcctg gcctggctgc
181  caactgggtc attgctgaga aatacttct taatcagcat tctgggaaac ggggtgtata
241  cagcctctat cagaaagtct ttgaagcctt tgacggctgc ctgtcacctc tctagaaatg
301  ctgccaccgt gtggcactca ggggttaca agagtctgg aagggtcata tggttcagct GRE
361  ccgaggtggc gcagctccag caacatctac tctatacct ccataattcg tttgagtcg AP-1
421  ttctgtggg ctgagggtaa actgcagtga accctgtgga cagttcgtta ctttaggatt CREB
481  tgtggaattt ccctgcacag cgtgaaaaa aaactcatgt ggggtgcgtg cttaaagggc NF-kB
541  agaaagactt tttttttta ttaaaaaag aaataagaag cctgttttg caactttata
601  acttgttga tttatattcg atagtacag gtgtgtctt aataaagtgt gtaccaatga
661  cttcagagt aatagcacca atttacttag aatgcattca ccaagagata acccgaatgc
721  tccaaacagc tttgcactat tcagcctaac cctgaagaag attatttaac ctatatttat
781  atttaaaaca gaattttgta ggttgcaacg gatggctagt acaacaaagg ttgacttaa CREB/c-Jun
841  ttctaattc aattactgcg tgccctctac actgggtag taaggtaata agtctctgt CREB CRE-BP1 GRE
901  tctccatttc aggtaatgga agaaaggag taattgcagg gcaatactaa atatttaag
961  cagttgtctt cagctataat ttatccatt tgaatacttc tgaactattc agtaacgttt CREB -1300 primer CREB/c-Jun
1021  tgtaaagaca aatactaaaa cctgcttaag tagccaaact tatatttct aggaaataaa
1081  actcaaaaga agataattcg gtaataaag ttgtttctt aaagatattc agataccctt
1141  taacgtgtac accttaaaga tcgattcaa gacgttaca atcacggctc ctgtctcatg CREB/c-Jun
1201  ctgaagattt cattcagtaa cagttaatac acacgttctt taacatgtgg gggaggagg NF-kB C/EBPβ
1261  cattgcaaca cgtgagggtc tgttcactgt accaacgcta gctcattgtc ctgcagatag CREB
1321  gctaagcgac ttgtgaagg cccacagggc actgactgca gaaatctgaa aggcagctc CREB/c-Jun AP-1
1381  actcctgcag ttcccccgc cagcaggcat tcgggcctca ctcaagctgc ttcttccgc SP1 AP-1
1441  cggctctctc agaagcaacc accactctg ttctatgtgg ccattatagt ttagatagcg -795 primer
1501  cgagaaccat cacccccagc tccccatcag agcaatgagg ttctgtctc taaaggctcag CREB/c-Jun
1561  tggaggcacg agaggaattc agggctcact gtgtgtttgt gcagatggca catagcgcca AP-1/ER GRE
1621  tagttcgag tgtcaaaacc gaggtgttag tttgtttgc ttagttccga ggggttttgt
1681  ttcttttgtg agaaggtctc actctgttc ccatgtctc ctggaaacac gtacgtagcc GRE
1741  caggcta gcc tcaaaactca ggtgatctt tgaagcaca aactgagcca ctataccgta -536 primer GRE AP-1
1801  aacaaacctaa gctactgaat acaatggcaa aaaaaaaaaa agaggttctg aaatttgtg AP-1
1861  tgagacagcc gctttctagt cttctagtct tcagcaagtc tgagagaatc aaatggtgta GRE
1921  tccatgtgtc ctttatctgt aacttagata cgacaagagt ccatacctt cagttctatt CREB
1981  gatgttttc cactaattca gtaacaataa agaaaatctc ttccttctc tatgggtccc AP-1 GRE
2041  tgatgtctt ccagattctc aaatgcagtc tataaacgaa aagggtagtt aatgacattg CREB/c-Jun
2101  ttcataagta atgctttggt gtgtttcctt ctcttcttt tttttttta cgcacaaacc NF-kB
2161  agagtgggga gtgtaggagc aggtgggccc gccgtggcaa aaacctcatg acacatcact p300 -93 primer AP-1
2221  ccgctctctg gttggtggag accgtctgaa acagcgttta aattctgga ggtccgagcc Sp1 NF-kB
2281  accagcaga ggactgaagg agctaagcct cagcatcctt ggttttcag tctcctgcag reverse primer
2341  caagcattct cgagaagcca gccaaagtaa gctgcagtt aagcctgcag tgcccgtgag transcription starting location
2401  gccgcagttc tctggctga attc .....
```

図 6. rat osteopontin promoter 配列

GemBankTM AF017274 から引用。各転写因子結合と promoter deletion

assay に用いた primer (後述) の位置を示した。

引き続きこのプラスミドを鋳型とし、forward primer を promoter 領域のそれぞれ、

-1599 (5'-CTTAGAATGCATTCACCAAGAGATAACCCGA-3'),

-1300 (5'-CCCATTTGAATACCTCTGAACTATTCAGTAACG-3'),

-795 (5'-GTTTAGATAGCGCGAGAACCATCACC-3'),

-536 (5'-GCCTCAAACCTCACGGTGATCTTTT-3')

とした deleted promoter 配列を有するプラスミドを作成した。この計 5 種のプラスミドと対照の pGL3-Basic Vector をそれぞれ E.coli competent cell に形質転換を行い ampicillin を含む LB 寒天培地で一晚培養し、翌日単コロニーから ampicillin を含む LB 液体培地 3ml で一晚培養し、QIAGEN Miniprep Kit を使用しプラスミドを回収した。つまりアルカリ法の Birnboim & Doly による変法に基づいて粗精製したプラスミド DNA を、高塩濃度条件下でシリカゲルのカラムに吸着させた後、TE buffer (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA, pH8.0) で溶出し回収した。制限酵素 Kpn I と Xho I の double digestion 後に電気泳動し目的 promoter 遺伝子が組み込まれていることを確認したのち、それぞれを RV primer3 と GL primer2 を用い 5'側と 3'側から sequencing を行った。sequencing には Beckman Coulter 社製 CEQTM 8000 Genetic Analysis System を用いた。sequence に問題がないことを確認した後、それぞれの液体培地から LB 液体培地 200ml の大スケール培養を行い、QIAGEN Maxiprep Kit を使用しプラスミド DNA を精製した。

リポトランスフェクション法を応用した TransIT[®]-LT1 (Mirus 社) を用いて作成したプラスミド DNA を rVSMC に遺伝子導入した。luciferase assay は 1

穴当たりの細胞数にデータが左右される single assay ではなく、1 穴ごとに Renilla luciferase (rLuc)活性を対照とすることでよりデータの安定が得られる Dual-Glo[®] Luciferase Assay System を採用した。96 穴プレートで 10% FBS 入り DMEM 中に培養した rVSMC に、まずプロトコール推奨量に従い 1 穴あたり 92 μ l の medium に対し 0.28 μ l の TransIT[®]-LT1 reagent を入れ、細胞毒性のないことを確認した。次に 1ml DMEM に reagent 30 μ l を加え室温で 15 分 incubate の後、先に作成した plasmid DNA (6 種それぞれ) 10 μ g と control plasmid である pRL-SV40 vector (Promega 社) 10 μ g を加え室温でさらに 30 分 incubate し reagent とプラスミド DNA の複合体を形成した。96 穴プレートを 10% FBS 入り DMEM で新たに培地交換し、1 穴ずつに準備した reagent-DNA 複合体溶液を 10 μ l 加え、12 時間 37 $^{\circ}$ C で incubate ののち再度 10% FBS in DMEM に培地交換しさらに 12 時間 37 $^{\circ}$ C で incubate した。serum-free DMEM に培地交換し 24 時間培養ののち 10^{-7} M Aldo で 24 時間刺激した。Dual-glo[™] Luciferase Assay System を用い GLOMAX 96 Microplate Luminometer (Promega 社)によりそれぞれ firefly luciferase 活性および renilla luciferase 活性を測定した。

(転写因子結合部位欠損 promoter を含む plasmid DNA の作成)

転写因子結合部位の同定には TFSEARCH homepage を用いた⁴⁰⁾。転写因子結合部位欠損 plasmid DNA 作成には QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社)を用いた。目標とする範囲に存在する CREB(-1460 から -1453、

図 7A)、GRE(-1404 から -1386、図 7B)および GRE consensus 配列(-1394 から -1386、図 7C)を欠損した配列を有する primer を設計した。

-1599
cttagaatgcattcaccaagagataacccgaatgctccaaacagct
ttgcactattcagcctaaccctgaagaagattatttaattctatatttatat
ttaaaccagaattttgtagggtggcaacggatggctagtacaacaaa
ggttgacttaattctaatctcaattactgctgcctctcacactgggg ←CREB
atgtaaggtaataagtcctggttcctcatttcaggtaatggaagaaa ←GRE
ggaagtaattgcagggaataactaaatatttaagcagtttgcttcac
gtataatttatccatttgaatacctctgaactattcagtaacg
-1300

A. (primer without CREB)
ggctagtacaacaaagggt(CREB)ttctaatctcaattactgc

B. (primer without full GRE)
ctgggggatgtaagggt(GRE)atttcaggtaatggaag

C. (primer without GRE consensus)
gatgtaaggtaataagtcct(GRE)atttcaggtaatggaagaaag

図7. 転写因子結合部位欠損promoterの作成

promoter領域の-1599から-1300間にはCREBとGREが存在する
(下線はGREのコンセンサス配列)。これをそれぞれ完全に欠損した
primerをA, B, Cのように設計した。

-1599 までの promoter 配列を有する plasmid DNA を鋳型として *PfuTurbo* DNA polymerase (STRATAGENE 社)を用いて鎖伸長を行い、欠損部位以外は鋳型 plasmid DNA とまったく同じ配列の plasmid を作成した。すなわち 10ng の鋳型 plasmid DNA に対しそれぞれ 125ng の primer とその相補鎖を加え、dNTP mix の存在下で *PfuTurbo* DNA polymerase 2.5U で Thermal Cycler として GeneAmp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems 社)内で反応を行った。95℃ 30 秒の後、95℃ 30 秒→55℃ 1 分→68℃ 6 分を計 18 cycles 実施した。冷却の後、Dpn I 制限酵素を反応液に 10U 加え元の鋳型 plasmid DNA を切断した。この欠

損 plasmid DNA を用いて前項と同様に luciferase assay を行った。すなわち、rVSMC に transfection させ、24 時間の serum depletion の後 24 時間の 10^{-7} M Aldo 刺激を行い、Dual-gloTM Luciferase Assay System を用いて luciferase 活性を評価した。

(gel shift assay(EMSA)による転写因子結合部位の同定)

electrophoretic-mobility shift assay (EMSA, いわゆる gel shift assay)により核抽出物質の転写因子結合部位への結合を確認した。まず当該配列である GRE 配列を含む 25mer を相補鎖とともに作成し、5'側をビオチン化し probe とした (図 8A)。また GRE 配列のコンセンサス配列を変異させた 25mer の probe も同様に作成した (図 8B)。ビオチン化されていないものを cold probe とした (図 8C)。

A. biotinated GRE probe

5' Bio GGT**AATAAGTCCTGTGTTCTCCATT**

CCATTATTCAGGACACAAGAGGTAA 5'

B. mutated GRE probe

5' Bio GGT**AATAAGTC****CGGCACTAGCCATT**

CCATTATTCAGGGCGTGATCGGTAA 5'

C. cold GRE probe

5' GGT**AATAAGTCCTGTGTTCTCCATT**

CCATTATTCAGGACACAAGAGGTAA 5'

図8. electrophoretic-mobility shift assay probe作成

- A. 目標GRE配列を含む25merを作成し5'側をビオチン化した。
- B. GRE配列のコンセンサス配列を変異させたprobeを作成した。
- C. ビオチン化されていない目標配列を含む25merをcold probeとした。

次に Panomics' Nuclear Extraction Kit (Panomics 社)を用いて rVSMC の核抽出物を作成した。抽出前の処理としては以下の種類のものを準備した。反応には 6 穴培養皿を使用した。すべて刺激前には 24 時間の serum depletion を行った。

1. 刺激なし。
2. 24 時間 10^{-7} M Aldo 刺激。
3. 1 時間 10^{-5} M Eplr 前処置後 24 時間 10^{-7} M Aldo 刺激。
4. 24 時間 10^{-5} M Eplr 刺激のみ。
5. 24 時間 10^{-5} M corticosterone 刺激。

以下実験はすべて氷冷下で行った。10ml の PBS で洗浄後、protease inhibitor

および phosphates inhibitor を加えた Dithiothreitol 入り緩衝液 250 μ l を各 well に加え 10 分間氷上で攪拌した。cell scraper を用いて物理的に細胞を剥離し 1.5ml チューブに回収した。14,000rpm で 3 分間遠心ののち上澄みを廃棄し pellet を氷上に得た。再度 Dithiothreitol 入り緩衝液を各チューブに 60 μ l 加え、1 時間氷上で静置した。14,000rpm で 5 分間遠心ののち上澄みを核抽出分として回収した。

以上得た各種 probe および核抽出物質を用いて EMSA を実施した。gel は以下の組成の非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた。

- 1ml 10X TBE
- 4ml 30% Acrylamide/Bis
- 625 μ l 80% Glycerol
- 14.375ml sterile water
- 300 μ l 10% APS
- 20 μ l TEMED

以下 Panomics' EMSA Kit (non RI) を使用した。まず binding buffer 存在下で 4 μ g の各核抽出物と 1 μ g の poly d(I-C) を混和し室温で 5 分静置後各 probe を加え、15 $^{\circ}$ C で 30 分 incubate し転写因子と probe DNA の複合体を形成した。cold probe を用いた competition assay の際には、biotinated probe を加える前に cold probe を倍量加え室温で 5 分静置した後、biotinated probe を加え 15 $^{\circ}$ C 30 分 incubate した。supershift assay の際には biotinated probe を加えた後に

Santa-Cruz 社抗 MR 抗体(H-300X): sc-11412 または抗 GR 抗体(H-300X): sc-8992 を 20 μ g 加えさらに 15°C 30 分 incubate した。transfer membrane には Pail Biodyne B nylon membrane (Pail Industry 社)を用いた (これにより background を低く抑え感度を上げることができた)。0.5X TBE に予め浸した。泳動は全体的に冷却下で行った。マウント前の gel を 10 分間 120V で泳動し安定させた後、転写因子-probe DNA 複合体を含む溶液 10 μ l に対し 1 μ l の Loading Dye を加え gel にマウントし、120V で 120 分泳動を行った。gel に Pail Biodyne B nylon membrane でカバーし、濾紙ではさみ transfer 用のカセットにセットした。冷却下 300mA で 30 分間通電し transfer させた。カセットから membrane を取り出し、UV crosslinker で 3 分照射し固定を行った。コンテナ内で 1X blocking buffer 20ml に 15 分浸した。その内 1ml を 1.5ml エッペンドルフチューブに移し、20 μ l の Streptavidin-HRP を加えて 10 秒 vortex し、再びコンテナに戻した。室温でさらに 15 分振盪した。1X wash buffer 20ml で 8 分ずつ計 3 回洗い、1X detection buffer 20ml に浸し室温に 5 分静置した。排液後 substrate solution 2ml を membrane 表面にまんべんなく接するよう滴下し、室温で 5 分静置した。luminoimage analyzer として LAS-3000 System (FujiFilm)を用い蛍光撮影・測定を行った。

(OPN 遺伝子転写活性亢進に対する Aldo の非ゲノム作用関与の検討)

Aldo 刺激による OPN 遺伝子転写活性亢進において非ゲノム作用の関与があ

るかどうか以下の通り検討を行った。まず c-Src および extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化を検討した。6 穴培養皿にて 24 時間 serum-free 下で培養した rVSMC を Aldo 10^{-7} M でそれぞれ 10 分、20 分、30 分、60 分、120 分刺激した。control として非刺激 rVSMC を用いた。また c-Src の選択的阻害剤である PP2 を 10^{-5} M の濃度で 30 分間前処置後に同様の刺激を行った。それぞれ PBS で 2 回洗浄後、1.3 μ l の protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich 社)および phosphatase inhibitor cocktail (P2850, Sigma-Aldrich 社)を加えた 100 μ l の NP-40 lysis buffer (150mM sodium chloride, 1% NP-40, 50mM Tris(pH8.0))を加え、氷上で cell scraper を用い cell lysate を回収した。14,000rpm で 10 分間遠心し、上清を complete lysate とした。28 μ l を 1.5ml チューブに取り分け、7 μ l の 6x loading buffer を加え、90℃で 5 分 incubate し変性させた。ただちに氷上で冷却し 5-20%グラディエントゲル (SuperSepTMAce, Wako 社)の 1 well 当たり 15 μ l ずつマウントした。バンドがゲルに入るまで 30V の低電圧で通電した後 120V で電気泳動を行った。ゲルをガラス板から剝離し transfer 用カセットに membrane (ImmobilonTM-P, MILLIPORE 社)と接するようにはさみ、transfer buffer 内で 200mA で 90 分通電し membrane への transfer を行った。1x PBS 100mL に 10% tween20 2ml と skim milk 5g を加え blocking buffer ①とし、1 時間の blocking を行った。1x PBS 600ml に 10% tween20 12ml と skim milk 12g を加え blocking buffer ②とし、同 buffer 4ml に対してそれぞれ 4 μ l の一次抗体を加え 4℃で一晩振盪した。使用した一次抗体は以下の通り。Cell Signaling

社 Phospho-Src Family (Tyr416) Antibody (#2101, rabbit polyclonal IgG)、Cell Signaling 社 Src (36D10) Rabbit mAb (#2109, rabbit monoclonal IgG)、Cell Signaling 社 Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (#9101, rabbit polyclonal antibodies)。buffer ②50ml で 10 分間 x 3 回 blocking 後、buffer ②20ml にそれぞれの 2 次抗体 (Santa Cruz 社 donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020) または Cell Signaling 社 goat anti-rabbit IgG-HRP (#7074)) を 5 μ l 加え、1 時間振盪した。buffer ②50ml で 15 分間 x 2 回 blocking 後 1x PBS 300ml に 10% tween20 6ml を加え washing buffer とし 5 分間 x 3 回 wash した。AmershamTM ECLTM Reagents Western Blotting Detection (GE Healthcare 社)を用いて発色させ、luminoimage analyzer として LAS-3000 System (FujiFilm)を用い蛍光撮影・測定を行った。

(PP2 を用いた OPN 遺伝子発現の抑制)

6 穴培養皿に培養した rVSMC を 24 時間 serum depletion を行った後、30 分の 10^{-5} M PP2 による前処置を行い 10^{-7} M Aldo で 2 時間刺激した。これを前述の方法と同様に NP-40 lysis buffer で蛋白回収し Western blot 法による評価を行った。抗体として、Santa Cruz 社抗 Actin 抗体 (I-19) (sc-1616, goat polyclonal affinity purified antibody)と免疫生物研究所抗 osteopontin 抗体 (No.18628, rabbit IgG)を用いた。

(OPN siRNA を用いた OPN 遺伝子発現の抑制)

OPN の rVSMC に対する生理活性を追及するため、OPN small interfering RNA (siRNA)を用いて発現抑制を試みた。siRNA は Dharmacon 社(Lafayette, CO)、ON-TARGETplus™ Duplex SPP1 #J-090453-9,10,11,12 の 4 種類を購入した。標的配列は以下の通り設計されている。

#J-09045309-9: 5'-GGAUGAACCAAGCGUGGAA-3'

#J-09045309-10: 5'-GCACACAAGCAGACGUUUU-3'

#J-09045309-11: 5'-GUAAGGAAGAUGAUAGGUA-3'

#J-09045309-12: 5'-CAGUCGGAUGCGAUCGAUA-3'

control として同じく Dharmacon 社の Non-Targeting siRNA を購入した。double stranded RNA の rVSMC への導入は Mirus 社(Madison, WI)の TransIT-siQUEST®を用いた。すなわち、TransIT-siQUEST 2.5μl と 30pmol の siRNA を serum-free DMEM 中で混和したものを 6 穴培養皿に培養した rVSMC に加え 24 時間 37℃で培養し transfection を行った。24 時間 serum depletion した後 10^{-7} M Aldo で 24 時間刺激した。あとは前項と同様に quantitative real-time RT-PCR 法により評価を行った。なお使用した primer は前項と同様、

OPN (forward 5'-CCAGCACACAAGCAGACGTT-3',

reverse 5'-TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCAC-3')

GAPDH (forward 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',

reverse 5'-ACCACAGTCCATGCCATCCAC-3')

である。

(OPN 蛋白の rVSMC への作用の検討)

現在まで rat OPN は市販されていない。前出の FastPure® Kit (タカラバイオ社)を用いて rVSMC から total RNA を抽出した。抽出 RNA を Omniscript (QIAGEN 社)を用いて逆転写し cDNA とした。これを template として、rat OPN mRNA 全長配列 (GenBankTM accession number AB001382, 図 9) の合成を行った。すなわち、cDNA を template とし、OPN 遺伝子の primer として次のものを用い、*Pfu turbo* を加え PCR を行った。5'側に HA タグ配列をつないだ後 pcDNA3zeo(+)ベクターに組み入れたプラスミドを作成した。プラスミドの PCR には次の primer を使用した。

sense 5'-GAGTTTGGCAGCTCAGAGGAGAA-3'

antisense 5'-TTAATTGACCTCAGAAGATGAACTCTCTAATTC-3'

Jin らの方法⁴¹⁾により東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻微生物学研究室において麴菌に遺伝子導入し、1週間 5×DPY 培養液(10% dextrin, 5% polypeptone, 2.5% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, and 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH 8.0)中で培養し、4日間 37℃振盪培養の後、培養上清を回収した。

- A. 1 atgagactgg cagtggtttg cttttcctg ttcggccttg cctcctgtct cccggtgaaa
 61 gtggctgagt ttggcagctc ggaggagaag gcgcattaca gcaaactc agatgctgta
 121 gccacttgcc tgaagcctga cccatctcag aagcagaatc tttagcccc acagaattct
 181 gtgtcctctg aagaaacgga tgactttaag caagaaactc ttccaagcaa ctccaatgaa
 241 agccatgacc acatggacga tgatgacgac gacgatgacg atggagacca tgacagagc
 301 gaggattctg tgaactcggg tgaatctgac gaatctcacc attccgata atctgatgag
 361 tccttcactg ccagcacaca agcagacgtt ttgactcaa tcgccccac agtcgatgc
 421 cctgacggcc gaggtgtag ctggcttat ggactgaggt caaagtcag gagtttccct
 481 gtttctgatg aacagtatcc cgatgccaca gatgaggacc tcacctccg catgaagagc
 541 caggagtccg atgaggctct caaggtcacc ccagttgcc agcgtctgag cgtgccctct
 601 gatcaggaca gcaacgggaa gaccagccat gactcaagtc agctggatga accaagcgtg
 661 gaaacacaca gccctggagca gtccaaggag tataagcaga gggccagcca cgagagcact
 721 gagcagtcgg atgcgatga tagtccgag aagccggatg caatcgatag tgcggagcgg
 781 tcggatgcta tcgacagta ggcgagttcc aaagccagcc tggaaatca gagccagcag
 841 ttccacagcc atgaggacaa gctagtcta gaccctaaga gtaaggaga tgataggat
 901 ctgaattcc gcatttcca tgaattagag agttcatctt ctgaggtaa ttaa
- B. MRLAVVCFCLFGLASCLPVKVAEFGSSEKAHYSKHSDAVATWL
 KPDPQKQNLAPQNSVSSEETDDFKQETLPSNSNESHDMDDDDDDDDGDHAESED
 SVNSDESDESHSDESDESFTASTQADVLTPIAPTVDVPDGRGDSLAYGLRSKRSFP
 VSDEQYPDATDEDLTSRMKSQESDEALKVIPVAQRLSVPDQDSNGKTSHESSQLDEP
 SVETHSLEQSKYKQRASHESTEQSDAIDSAEKPAIDSAERSDAIDSQASSKASLEH
 QSHEFHSHEDKLVDPKSKEDDRYLKFRISHELESSSEVN"

図9. rat osteopontin cDNAおよびアミノ酸配列

- A. cDNA配列(GenBank™ AB001382)。
 B. 翻訳されたアミノ酸配列。

次に Anti-HA Affinity Matrix (Cat. No. 11 815 016 001, Roche 社)を使用して培養上清から HA タグ付き OPN を精製した。すなわち、2.5ml のシリンジのインジェクター部分を抜きカラムとして倒立させ、脱脂綿を詰めた上によく混和した Anti-HA Affinity Matrix 1ml を静かにマウントした。出口には 25G 針をつけ流出速度の調整を行った。10ml の Equilibration buffer (20 mM Tris, pH 7.5; 0.1 M NaCl; 0.1 mM EDTA)で平衡化を行った。先の培養上清 10ml をカラムに load した。20ml の Wash buffer (20 mM Tris, pH 7.5; 0.1 M NaCl; 0.1 mM EDTA; 0.05% Tween 20)でカラムを洗浄した後、一旦出口をふさぎ、1ml の Elution buffer (Equilibration buffer に 1mg/ml の濃度となるように HA peptide (Cat.No. 21156, AnaSpec 社)を溶解したもの)を加え 37℃で 15 分間 incubate した後 buffer

を回収した。これを 3 回繰り返し、計 3ml の溶出液を得た。前述と同様の Western blotting analysis により蛋白構造の解析および定量を行った。抗体として免疫生物研究所抗 osteopontin 抗体 (No.18628, rabbit IgG)および Santa Cruz Biotechnology 社抗 HA-probe (12CA5)抗体 (sc-57592, mouse IgG)を用いた。

次にこの得られた OPN 溶出液を用いて rVSMC の刺激を行った。すなわち 6 穴培養皿に培養した rVSMC を 24 時間 serum depletion した後 OPN 溶出液で 24 時間刺激した。あとは前項と同様に Western blot 法により評価を行った。

(統計解析)

統計解析には SPSS version 17.0 (SPSS 社, Chicago, IL)を用いた。平均値間の有意差検定を行っているものは 4 回の平均を用いており、値は $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表した。2 群比較には Mann-Whitney 法を用いた。3 群以上の多群検定には Kruskal-Wallis 法、多重比較には Steel 法および Steel-Dwass 法を用いた。 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありと判断した。

< 結果 >

(Aldo 刺激による rVSMC での OPN 遺伝子転写活性評価)

rVSMC に対する 24 時間の Aldo 刺激は用量依存的に OPN 遺伝子転写活性を亢進させた (図 10)。最大 10^{-6}M で 2.41 ± 0.34 倍 ($p=0.016$ vs. control) の亢進を認めた。

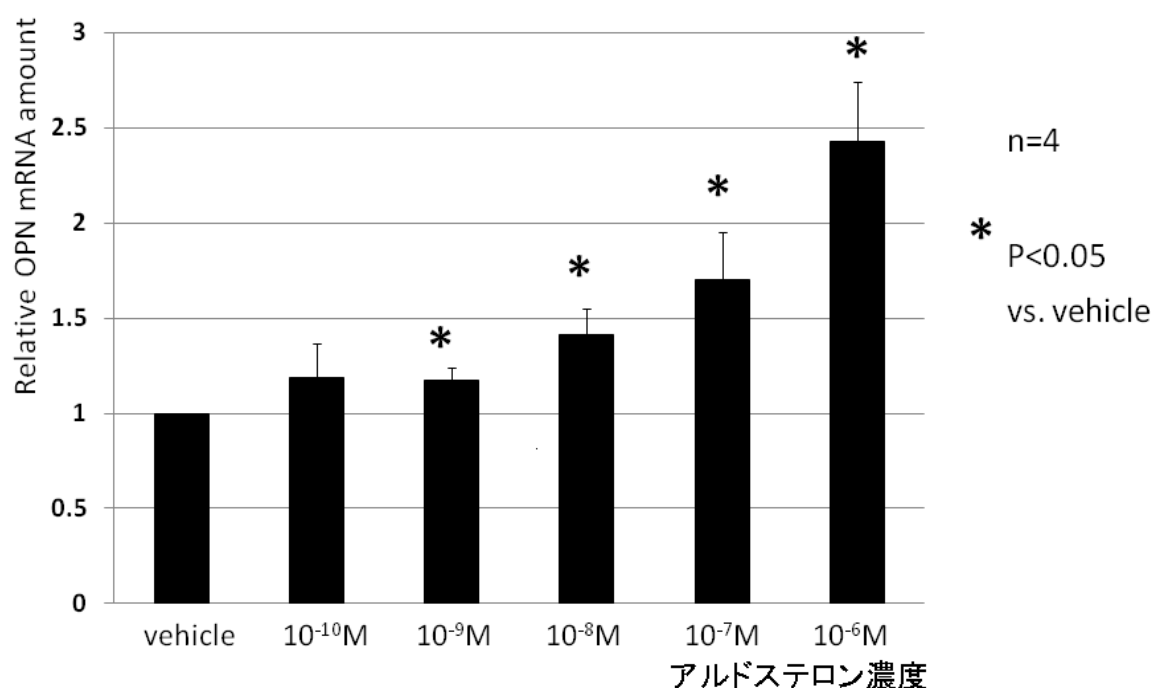


図10. アルドステロン刺激濃度とオステオポンチン遺伝子転写活性の関係

controlに比して 10^{-9}M 刺激から有意の上昇を認め、
活性化の程度は容量依存的であった。

また 10^{-6} M Aldo による 24 時間までの刺激では OPN 遺伝子転写活性は時間依存的に増加した(図 11)。最大は 24 時間で 2.50 ± 0.19 倍まで増加した($p=0.004$ vs. control)。

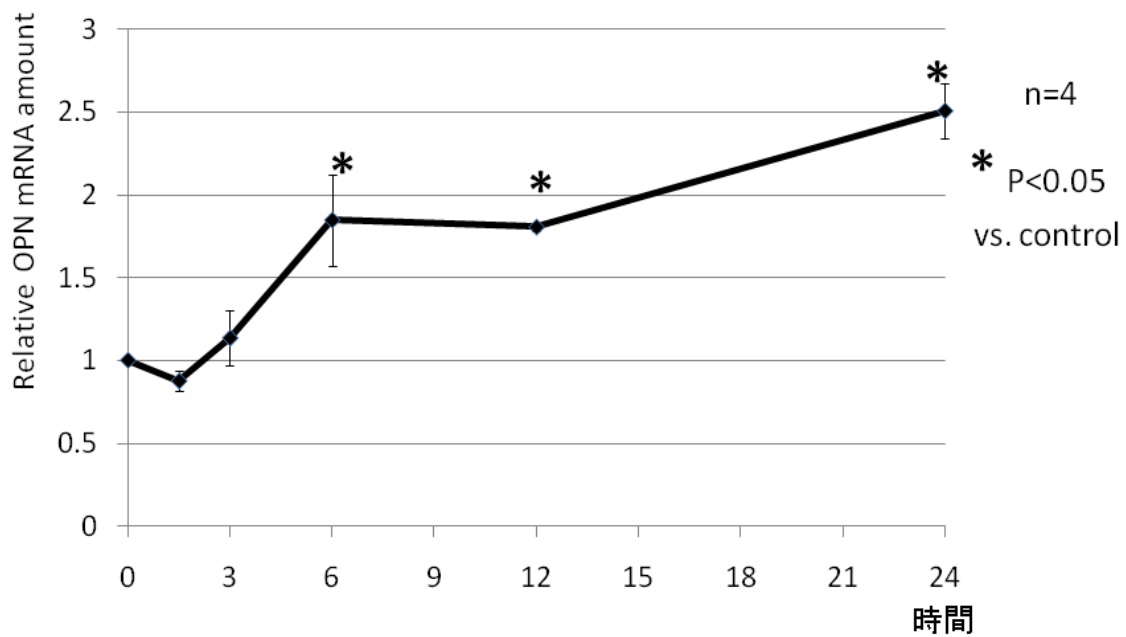


図11. アルドステロン刺激時間とオステオポンチン遺伝子転写活性の関係

刺激濃度は 10^{-6} M。controlに比して6時間刺激から有意の上昇を認め、活性化の程度は時間依存的であった。

Aldo による OPN 遺伝子転写活性化は選択的 MR 受容体拮抗剤であるエプレレノン添加によって有意に減弱した(図 12, n.s. vs. control)。

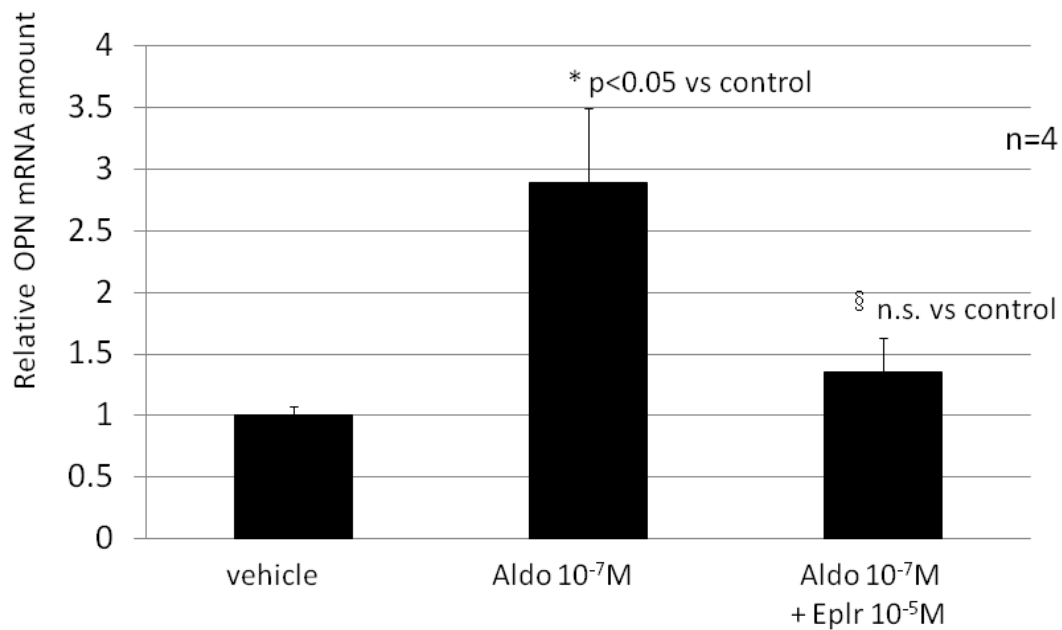


図12. エプレレノンによるアルドステロン刺激の抑制

エプレレノン $10^{-5}M$ による前処置はアルドステロン $10^{-7}M$ 刺激によるオステオポンチン遺伝子転写活性化を完全に抑制した。

(Aldo 刺激による OPN 遺伝子転写活性亢進に関与する OPN promoter 領域の転写調節因子結合部位の同定)

10^{-7} M Aldo 刺激による各種の長さの OPN promoter 領域を有するプラスミド DNA を transfection させた rVSMC の luciferase assay を行ったところ、-1599 までの欠損 promoter は完全長 promoter と同等の活性化を認めたが(1.83 ± 0.55 倍、 $p=0.019$)、-1300 より短い deleted promoter では有意な活性化はみられなかった (図 13)。

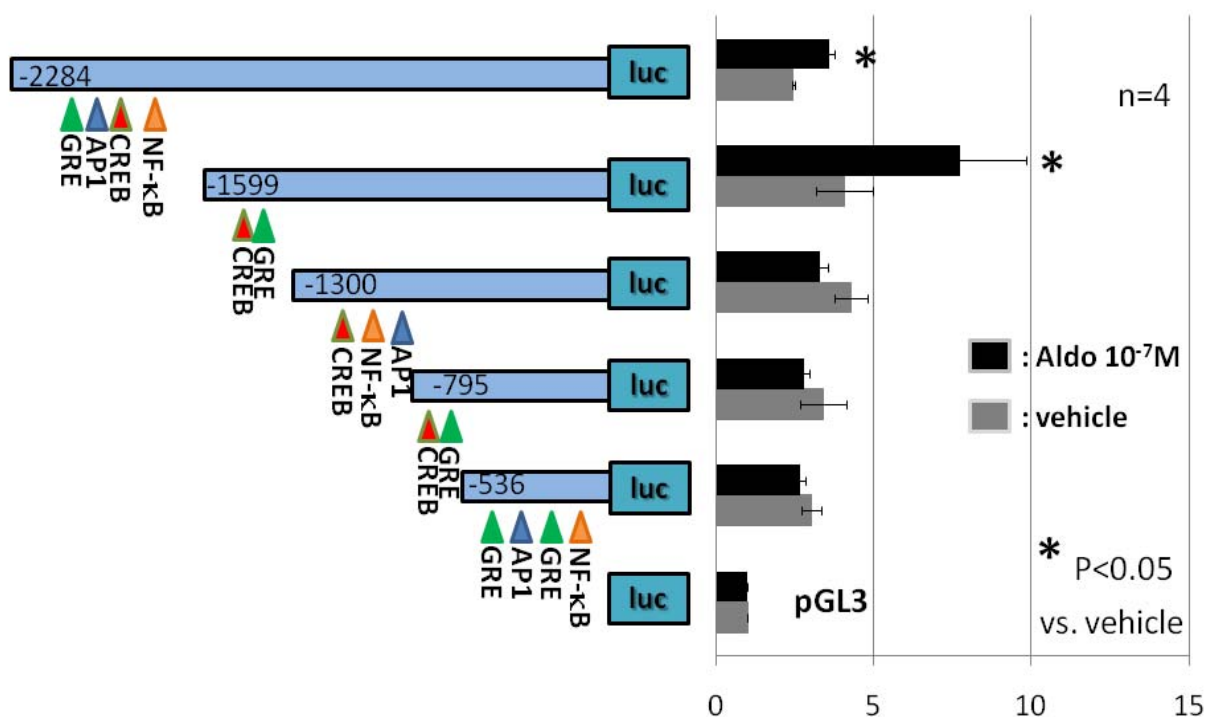


図13. deletion promoter assay

deletion promoter assayにおいては、-1599bpまでのdeletionでは Aldo 刺激による活性化能が保たれていたが、-1300bpより短い promoter は活性化能を失っていた。

転写因子結合部位として-1404 から-1386 に Aldo-MR 複合体が結合することが知られている GRE があり、その GRE を完全に欠損した promoter では Aldo 刺激による活性化はみられず、さらに GRE のコンセンサス配列のみ欠損した promoter も同様に活性化能を失っていた。同範囲内には他の転写因子結合部位として-1460 から-1453 に CREB site が存在するが、CREB を欠損しても活性化は抑制されなかった (図 14)。

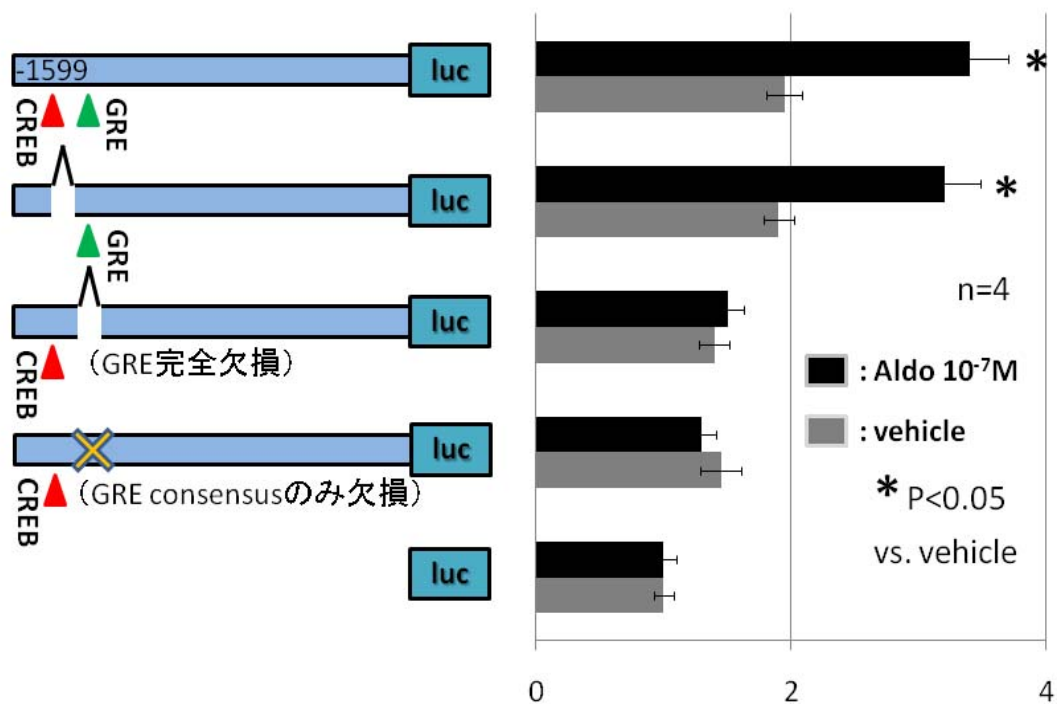


図14. 転写因子結合部位欠損promoterのluciferase assay

CREBを欠損したpromoterはAldo刺激による活性化能が保たれていたが、GREを欠損したpromoterは活性化能を失っていた。

(gel shift assay(EMSA)による転写因子結合部位の同定)

前項にて同定された GRE への Aldo-MR 複合体の結合を確認するため EMSA を行った。10⁻⁷M Aldo により 24 時間刺激を行った後の核抽出物と当該 GRE 配列を有する probe と複合体を形成させると、非刺激のものに比し複合体バンドの増強が認められた。配列特異性を確認するために cold probe を用いて competition assay を行ったところ、バンドの減弱を認めた (図 15)。

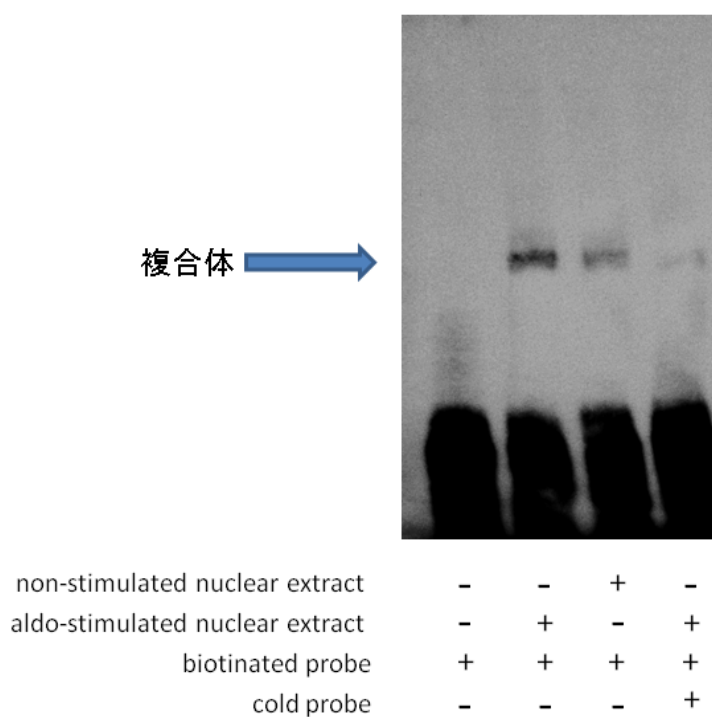


図15. アルドステロン刺激後核抽出物を用いたEMSAおよび competition assay

アルドステロン刺激後核抽出物はGRE probeとの結合が増強され、また2倍のcold probeを加えたcompetition assayでは結合が減弱した。

GRE のコンセンサス配列 (TGTTCT) を変異させた probe を用いると複合体バンドは減弱した (図 16)。

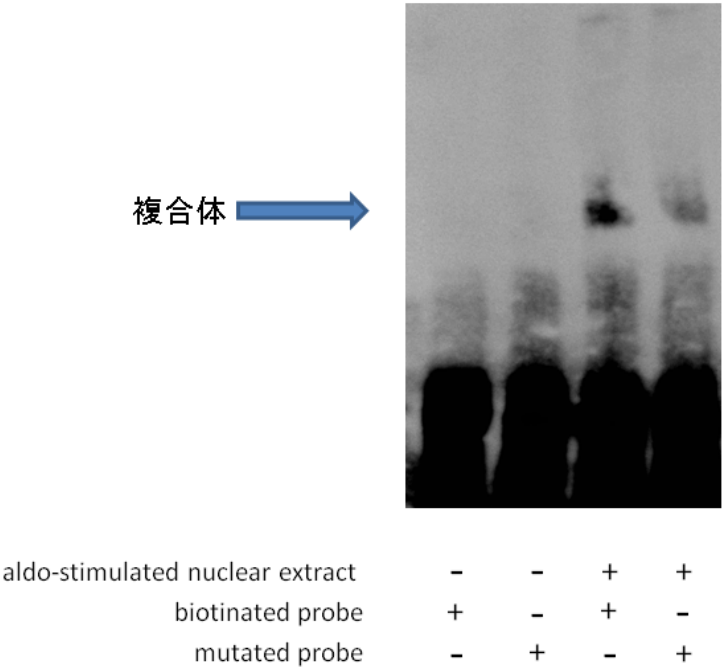


図16. mutationを加えたprobeを用いたEMSA

GREのコンセンサス配列にmutationを加えたprobeでは複合体バンドは減弱した。

10⁻⁷M Aldo24 時間刺激の前に 1 時間の 10⁻⁵M Eplr 前処置を行うとバンドの減弱を認めた。またげっ歯類の主な glucocorticoid である corticosterone での 24 時間刺激 (10⁻⁵M) では複合体バンドの増強は起こらなかった (図 17)。

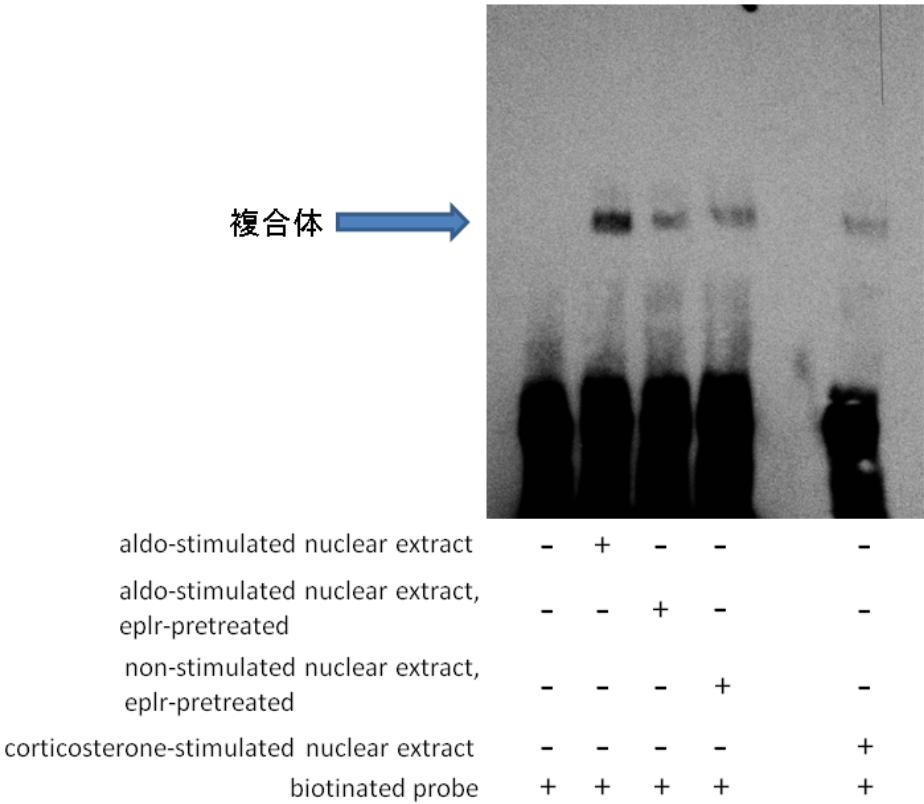


図17. エプレレノン前処置およびコルチコステロン刺激でのEMSA

エプレレノンでの前処置は複合体バンドを減弱した。
コルチコステロン刺激ではバンドの増強は認められなかった。

抗 MR 抗体を加えて複合体を形成させるとバンドは super shift した。抗 GR 抗体では super shift は認めなかった（図 18）。

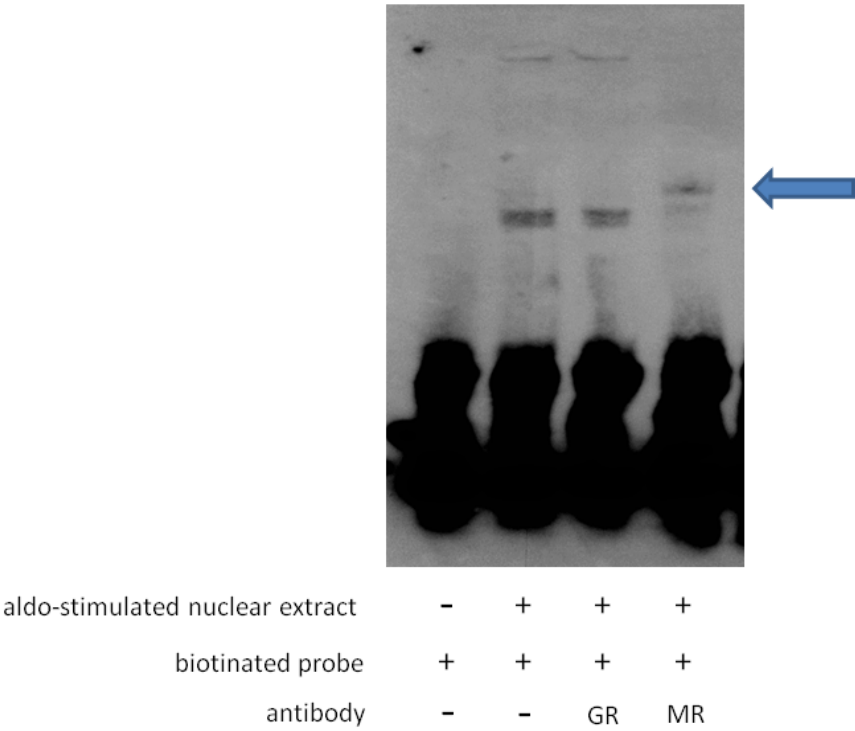


図18. super shift assay

抗MR抗体により複合体バンドはsupershiftした(矢印)。
抗GR抗体ではshiftingは起こらなかった。

(OPN 遺伝子転写活性亢進に対する Aldo の非ゲノム作用関与の検討)

Aldo 短時間刺激による c-Src および ERK1/2 のリン酸化においては、10 分からすでにともにリン酸化を認め、30 分程度で一旦減弱した後、再びリン酸化亢進を認め、時間経過としては二峰性を示した (図 19)。

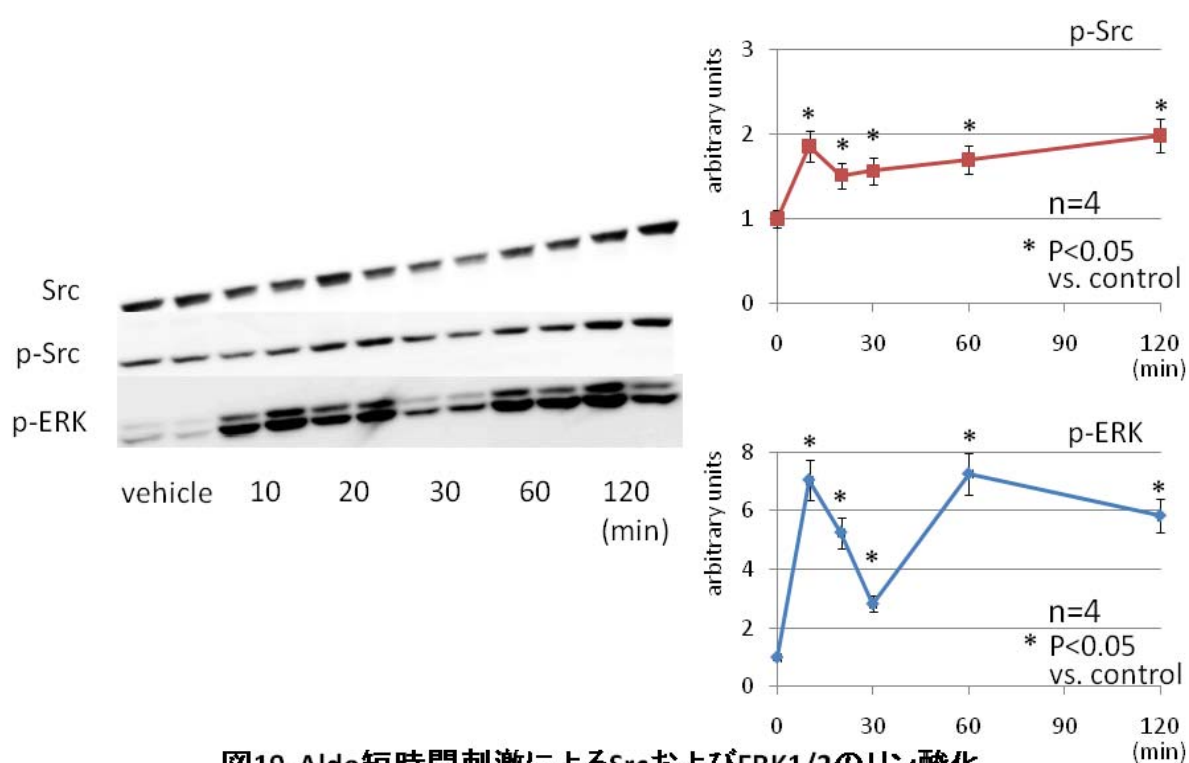


図19. Aldo短時間刺激によるSrcおよびERK1/2のリン酸化

Src、ERK1/2とも10分からリン酸化が認められた。

また **c-Src** の選択的阻害薬である **PP2** による前処置によって、**c-Src**, **ERK1/2** ともリン酸化が著明に阻害された（図 20）。

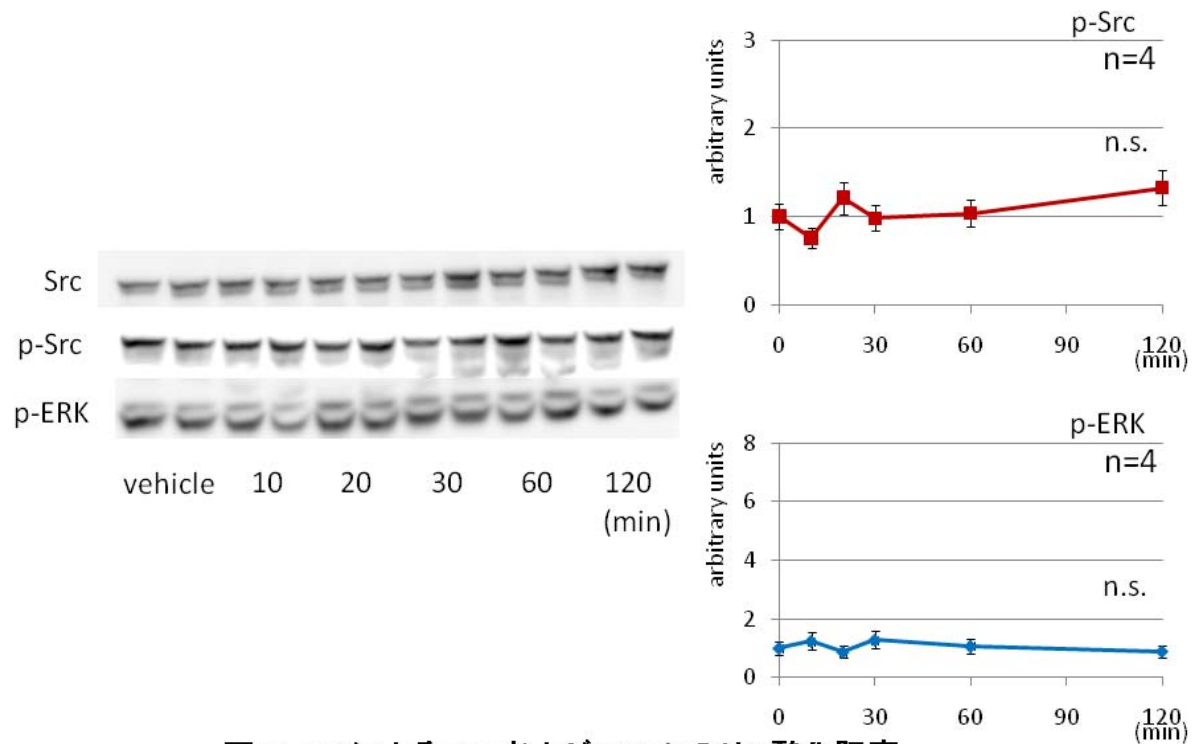


図20. PP2によるc-SrcおよびERK1/2のリン酸化阻害

PP2はc-Src、ERK1/2ともリン酸化を著明に阻害した。

(PP2 を用いた OPN 遺伝子発現の抑制)

OPN は 10^{-7} M Aldo 2 時間刺激でも発現増加傾向を認め、これは c-Src の選択的阻害剤である PP2 による前処置で阻害を受けた (図 21)。

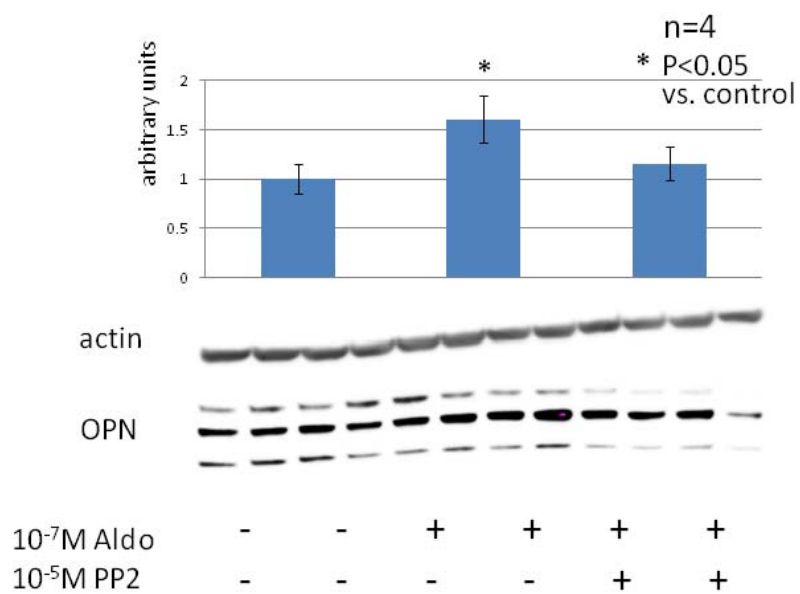


図21. PP2によるOPN遺伝子発現抑制

Aldo 2時間刺激でのOPN蛋白産生はPP2前処置により抑制された。

(OPN siRNA を用いた OPN 遺伝子発現の抑制)

まず 3 種類の siRNA の抑制効率を比較するため rVSMC にそれぞれ transfection 後、非刺激で OPN の mRNA 量を rt-PCR により比較した (図 22)。

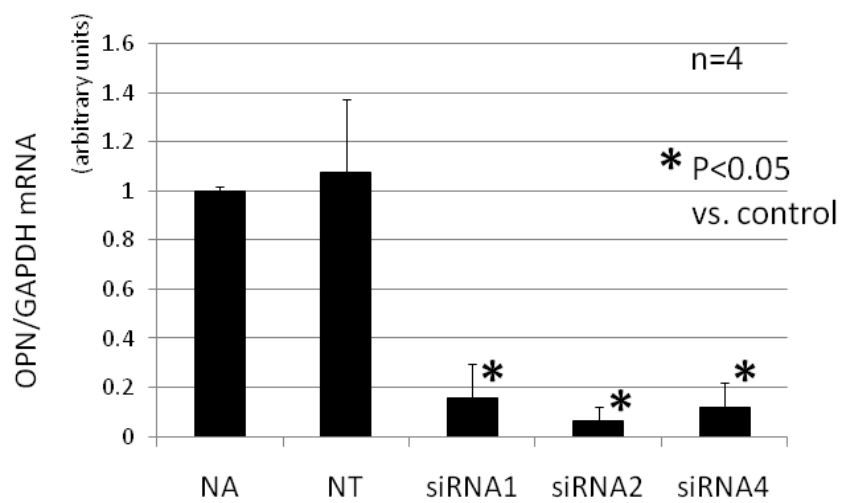


図22. siRNAによるOPN遺伝子抑制

NA: siRNA(-), NT: non-targeting siRNA。

siRNAによる有意のOPN mRNA減少が認められた。

3 種のうち siRNA No.2 が最も良く抑制したため、この siRNA を transfection した rVSMC を用いて 10^{-7} M Aldo 24 時間刺激での OPN 転写活性上昇を確認した。図 23 の通り Aldo による刺激がない場合は OPN mRNA の有意の抑制を認めたが、Aldo 刺激後には有意の抑制を認めなかった。同時に MCP-1 転写活性亢進に対する影響を確認したが、Aldo による活性亢進に関して siRNA の存在は特に抑制を認めなかった。

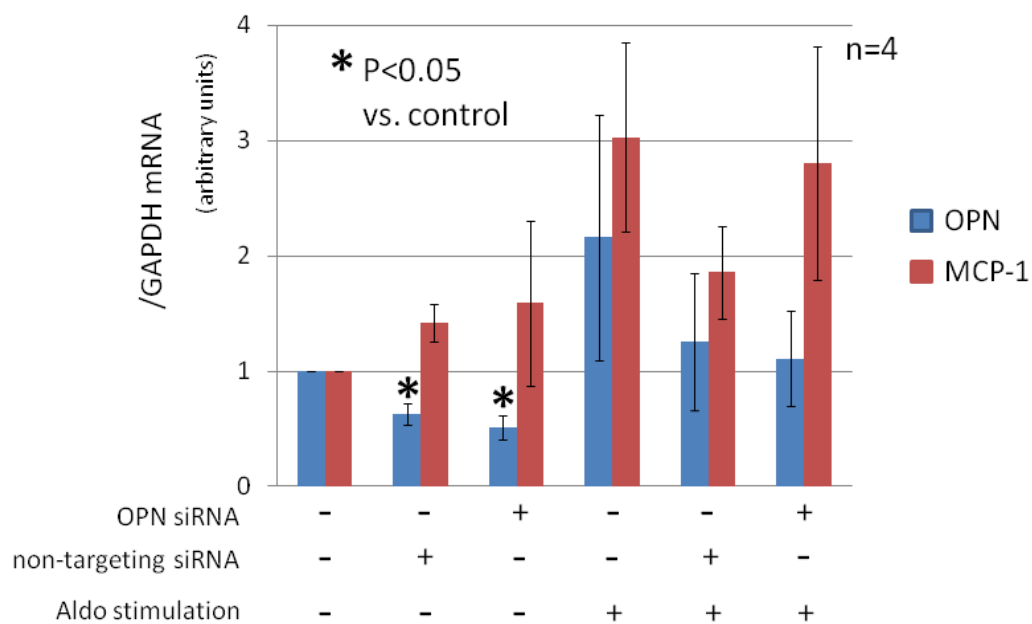


図23. siRNAによるOPN遺伝子抑制(Aldo刺激後)

Aldo刺激後にはsiRNAによる有意のOPN mRNA減少は認められなかった。
MCP-1 mRNAに関しても有意の減少は認めなかった。

(OPN 蛋白の rVSMC への作用の検討)

まず溶出液の Western blot 法により蛋白構造を確認した。図 24 の通り抗 OPN 抗体によるバンドに一致して抗 HA 抗体によるバンドを認め、N 末端に HA タグの付いた OPN 蛋白が得られたことが確認できた。

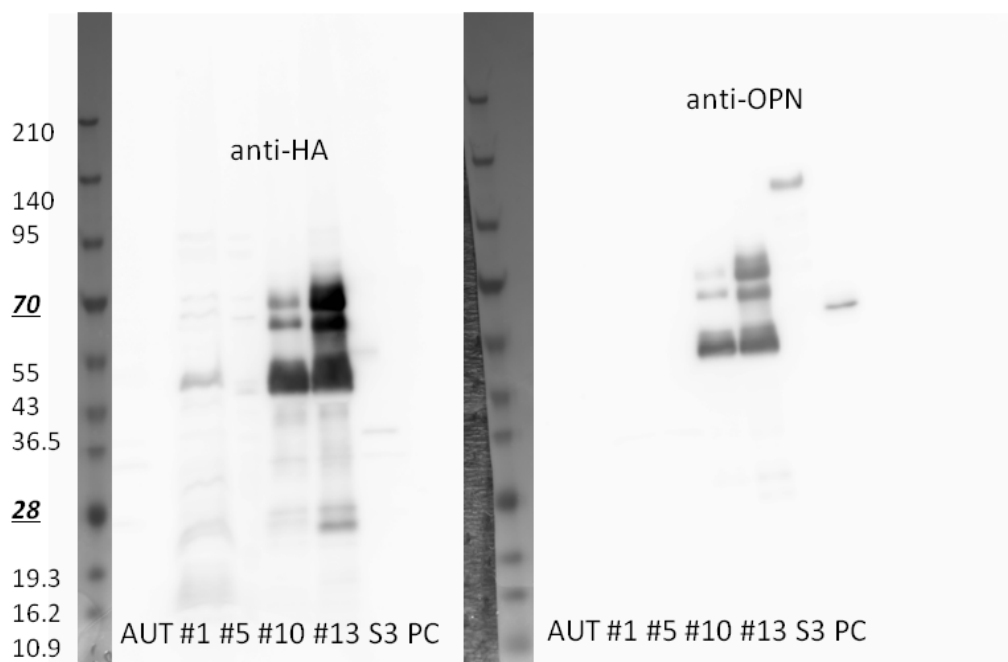


図24. HAタグ付きOPN蛋白のWestern blotting

溶出液#10および#13でHA/OPNとも同位置にバンドを認めた。

AUT: negative control, S3: HAタグなしOPN, PC: positive control

次に上記溶出液#13 を用いて rVSMC の刺激実験を行ったところ、c-Src のリン酸化を認めた（図 25）。

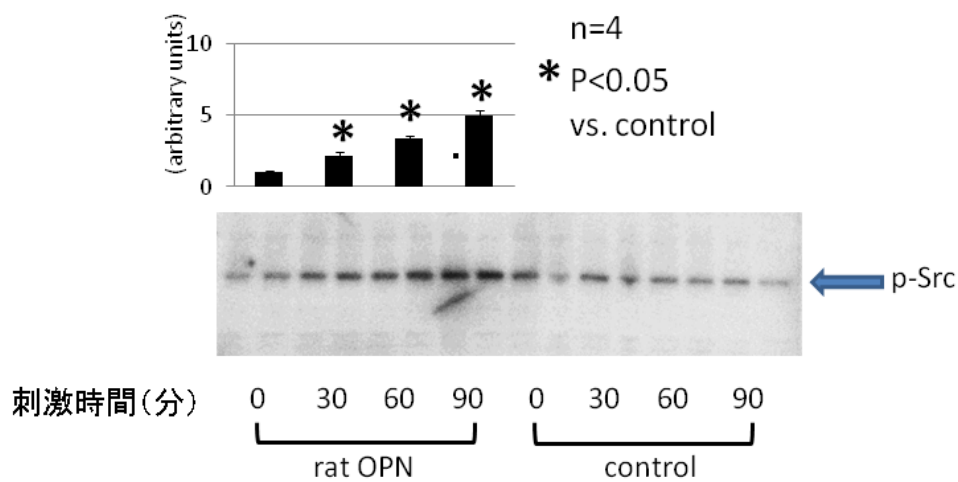


図25. rat OPN蛋白によるrVSMC刺激

c-Srcの時間依存的なリン酸化が30分から認められた。

< 考察 >

Aldo の心血管系に対する影響として、遠位腎尿細管での作用からもたらされるナトリウム貯留・血圧上昇³⁾が早くから知られていたが、1988年に Kornel⁴²⁾が初めて血管に MR が発現し血圧調整に関与していることを報告して以来、近年 Aldo が直接血管炎症・心筋線維化を惹起するという報告が蓄積している^{6,7,43,44)}。MR 受容体拮抗薬である spironolactone や eplerenone の予後改善効果^{4,5)}の一部はそのような炎症・線維化の軽減によると推察されている。

OPN はヒト大動脈石灰化部位³³⁾、ヒト冠動脈プラーク内⁴⁵⁾、肥満⁴⁶⁾などの各種炎症亢進病態で産生が増加している。また OPN 欠損マウスでは線維化・動脈硬化性変化が起こりにくくなることが報告されている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。原発性アルドステロン症患者では同程度の高血圧を呈する本態性高血圧症患者と比較して臓器障害が進みやすい。原発性アルドステロン症患者では OPN 血漿濃度上昇が報告されており³⁷⁾、Aldo の臓器障害発生における OPN の重要性がここでも示唆される。

本研究において、rVSMC に対して Aldo 刺激を行うと OPN 遺伝子転写活性は用量依存性・時間依存性に亢進した。これは他の各種細胞系での報告、具体的には腎メサンギウム細胞³⁵⁾、腎線維芽細胞³⁶⁾、血管内皮細胞⁵⁰⁾での Aldo 刺激に対する OPN 遺伝子の反応と一致した。時間依存性に関しては、本研究結果のような単調増加ではなく 6 時間前後のところに一旦ピークを形成する 2

峰性増加の報告もある³⁶⁾。ヒトにおける安静時血漿 Aldo の基準値は 3.6-24.0ng/dl であり、Aldo の分子量が 360.44g/mol なので $1.0\sim 6.7\times 10^{-10}\text{M}$ となる。今回用量依存性に関しては 10^{-9}M から統計学的に有意の上昇を認め始めていることを考慮すると、正常上限以上の濃度の Aldo が存在すると OPN は転写亢進が始まることを意味しており、臨床的意義と一致している。また心筋や血管を含む一部の組織では局所性レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の存在により、全身を循環している濃度の Aldo 以外に、組織 Aldo と呼ばれる局所的な Aldo 産生が報告されている^{51,52)}。その場合 autocrine/paracrine 的に細胞は血漿濃度以上の高濃度 Aldo にさらされることになり、本研究で使用した 10^{-7}M , 10^{-6}M といった高濃度も (Aldo の実験として一般的であるという以外にも) 非生理的ではない可能性がある。

近年細胞内情報伝達経路の機序解析が盛んになっており、2000 年頃より各種刺激による OPN 転写活性亢進に関して転写因子の解析が行われている。数ある転写因子の中で OPN 転写活性亢進に関しては最終的に AP-1, NF- κ B の関与を報告するものが多い⁵³⁻⁵⁶⁾ (表 1)。Aldo 刺激に関する報告は少ないが、Irita ら³⁶⁾はラット腎線維芽細胞に対する Aldo 刺激においてやはり AP-1, NF- κ B の関与を報告している (表 1)。

表1. 各種刺激におけるオステオポンチン遺伝子転写活性化経路

刺激	細胞系	推定されている経路	文献(年)
high glucose	rat VSMC	PKC	53 (2000)
FGF	rat VSMC	Src/MEK/MAPK	54 (2002)
UTP	rat VSMC	ERK→AP-1, PKC→NF-κB	55 (2006)
angiotensin II	rat VSMC	G _{q/11} , Ras, ERK, Src, Ets-1	56 (2008)
aldosterone	rat renal fibroblast	AP-1, NF-κB	36 (2008)

VSMC: vascular smooth muscle cell, PKC: protein kinase C, FGF: fibroblast growth factor, ERK: extracellular signal-related kinase, MAPK: mitogen-activated protein kinase, MEK: MAPK/ERK kinase, UTP: uridine triphosphate, AP-1: activating protein-1, NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

本研究においては Aldo が動脈硬化をもたらす上での重要標的器官と言える VSMC での検討を行ったが、これまでの解析結果と異なり、Aldo-MR 複合体形成、さらには転写因子結合部位として GRE を介するゲノム作用が重要であることを証明した。現在まで OPN 遺伝子転写活性調節において唯一 GRE に言及があるのが腎メサンギウム細胞における Gauer ら(2008)の報告であるが³⁵⁾、その報告で採用されている転写開始部位から-2000 付近の GRE はいわゆるコンセンサス配列が保たれていない”incomplete(報告本文中からの引用)”なものであった。それに対し今回関与が証明された-1404 の GRE はコンセンサス配列が完全に保たれており、またそのコンセンサス配列のみを変異しても Aldo による活性化が消失する、もしくは EMSA において DNA との複合体形成能が

低下することを証明しており、より関与が理解されやすいと考える。ただし本研究においてはクロマチン免疫沈降（chromatin immunoprecipitation、ChIP）による endogenous DNA との結合は確認しておらず、今後の課題と言える。

前述の通り MR と GR は非常に似た遺伝子配列・蛋白構造を有する⁸⁾。Aldo は選択的に MR に結合することが知られているが、活性型グルココルチコイド、すなわちヒトにおけるコルチゾールやげっ歯類におけるコルチコステロンは GR のみならず、MR にも Aldo と同程度の親和性を持って結合する。一般的にグルココルチコイドは Aldo より血中濃度が数百から数千倍高い。コルチゾールは基準値が 4.4~21.1 μ g/dl で分子量が 362.465g/mol なので $1.2\sim5.8\times10^{-7}$ M に相当し、前述の Aldo より $10^2\sim10^3$ 倍高濃度である。げっ歯類においてもコルチコステロンと Aldo の間に同様の濃度差が存在する。両者の MR 親和性が同等であることを考慮すると、rVSMC において Aldo が特異的作用を維持するためには腎尿細管細胞と同様のグルココルチコイド排除機構、つまり 11 β -HSD2 の発現等、何らかの特別な機構が必要となる。心血管系においては 11 β -HSD2 の発現は少ないが¹²⁾、Farman ら⁵⁷⁾は Aldo-MR 結合体はコルチゾール-MR 結合体より安定しており、遺伝子転写を活性化する作用は Aldo の方が約 100 倍高いことを報告している。本研究における検討では、 10^{-5} M と比較的高濃度のコルチコステロンによる刺激でも EMSA における MR-DNA 複合体形成の増強は起こらなかった。また super shift assay では抗 MR 抗体のみが super shift を引き起こし、抗 GR 抗体にはそのような変化が認められなかつ

た。この結果を踏まえると、rVSMCにおける OPN 遺伝子活性化機構にコルチコステロンの関与は少なく、その機序としては、①GR ではなく MR を介している、②コルチコステロンが MR と複合体を形成してもコルチコステロン-MR 複合体は当該 GRE との結合能は低い、③コルチコステロンが GR と複合体を形成してもコルチコステロン-GR 複合体の当該 GRE との結合能は低い、④ rVSMC においても 11 β -HSD2 等のコルチコステロン不活化機構が十分に働いておりコルチコステロンは MR/GR と複合体を形成できない、といった機序が考えられた。

ここまでは OPN 転写活性亢進に対する Aldo のゲノム作用を中心に考えてきたが、前述の通り多くの細胞系において Aldo の非ゲノム作用が報告されているため¹⁴⁻²³⁾、rVSMC においても Aldo の作用に何らかの修飾をもたらしている可能性があると考え、より短時間での作用検出を行った。そうしたところ 10 分から c-Src および ERK1/2 のリン酸化亢進が認められ、30 分で一旦減弱したものの再び 60 分以降リン酸化亢進が認められた。これらの亢進は c-Src の選択的阻害剤である PP2 によって完全に抑制された。Callera らは spontaneously hypertensive rat の VSMC で同様の刺激実験を行っている¹⁵⁾。ここでは 10 分前後からのリン酸化亢進を認めたが、30 分での減弱および 60 分からの再亢進は認められなかった。今回 OPN 蛋白そのものにも c-Src のリン酸化能があることを示されたが（図 25）、蛋白レベルでの OPN 産生亢進は図 21 の通り Aldo 2 時間刺激からすでに認められており、Aldo 刺激開始後 60 分

からの c-Src リン酸化再亢進に関しては OPN 蛋白の autocrine/paracrine 的作用である可能性も考えられた。

OPN の炎症惹起に対する作用を検討するため siRNA による OPN mRNA のノックダウンを行った。Aldo 非刺激下に baseline として存在する OPN mRNA に関しては良く抑制できたが (図 22)、Aldo 刺激後に転写亢進された OPN mRNA に関しては有意の抑制ができなかった (図 23)。Yin ら⁵⁸⁾は human VSMC において OPN siRNA transfection により Ang II により惹起される炎症性マーカー、具体的には NF- κ B, AP-1, IL-6, IL-1 β の活性化が抑制されたと報告している。Yin らの結果と一致して一般的に siRNA の効果は transfection 後に培養・刺激を行っても 1 週間程度は残存していると報告されているが、今回の結果は培養・細胞分裂により相対的に siRNA 濃度が希薄になり mRNA 抑制に不十分となってしまった可能性などが考えられた。また、同時に炎症性マーカーとして MCP-1 転写活性亢進に対する OPN siRNA の影響を観察したが、こちらにも有意の抑制は見られなかった。

OPN の炎症惹起・動脈硬化への関与に関しては、これまでのところ(i)OPN をノックアウト・ノックダウンすると刺激に対する炎症性マーカーの活性化が抑制される^{26,48,49,58)}、もしくは(ii)炎症部位もしくは炎症病態で OPN 産生が亢進している^{29-31,33-37,45,46,50)}、といういずれも間接的な報告に終始しており、OPN 蛋白そのものが直接的にどのように炎症を惹起するかということについての議論は少ない。OPN 蛋白の作用については癌の転移メカニズムもしくは

自己免疫疾患での関与に関する研究が先行している。Chellaiah ら⁵⁹⁾は human melanoma cell において OPN が転移への関与が知られる $\alpha v \beta 3$ integrin を介して用量依存性に pp60c-src を活性化していることを報告している。本研究においては rat OPN 蛋白が c-Src をリン酸化することを示した。c-Src の活性化が高血圧などの病態における血管傷害に重要であることは繰り返し報告されており⁶⁰⁻⁶⁶⁾、OPN 蛋白の催炎症作用は少なくとも一部は c-Src を介していることが今回示された。OPN からの c-Src リン酸化がどのような OPN 受容体を介しているかについてはさらなる研究が待たれるが、やはり何らかの integrin を介している可能性が高い。

本研究では Aldo の催炎症作用の細胞内機序として MR との結合、Aldo-MR 複合体の核内への移行、GRE を介する OPN 転写亢進、c-Src/ERK リン酸化を介する非ゲノム作用の存在、OPN 蛋白そのものの c-Src リン酸化などが示された。以上の結果をまとめると図 26 のようになる。今後 in vivo における OPN 蛋白の動脈硬化促進作用の証明や、抗 OPN 抗体・OPN siRNA による抗動脈硬化作用の証明などが期待される。

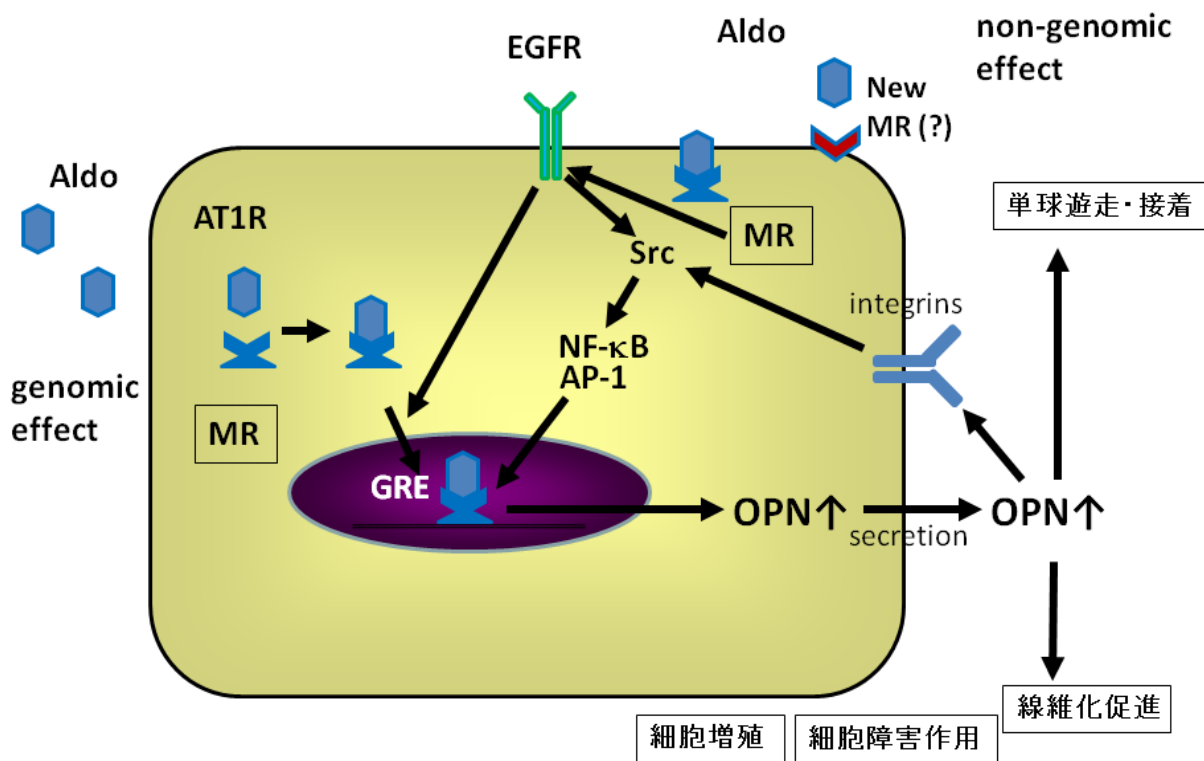


図26. 血管平滑筋細胞におけるアルドステロンとオステオポンチンの作用

< 結論 >

Aldo による OPN 遺伝子転写活性亢進は用量依存的・時間依存的であった。時間依存性は 24 時間にかけて単調増加であり、非ゲノム作用を示唆するような短時間の活性化は認めなかった。エプレレノン は Aldo による活性化をよく抑制し、機序として MR を介していることが示唆された。Aldo-MR 複合体は -1404 に存在する特定の GRE に結合し活性亢進をもたらすことが示唆された。抗 MR 抗体による super shift が認められ、GRE 配列への結合は MR が直接関与していることが示された。rVSMC における Aldo による非ゲノム作用では c-Src および ERK1/2 のリン酸化が 10-20 分および 60 分以降に認められ c-Src 系の関与が示された。60 分以降の活性化に関しては Aldo 刺激による産生 OPN 蛋白自身の autocrine/paracrine 作用によるものの関与の可能性が考えられた。

< 謝 辞 >

本研究を行うに当たり麹菌による蛋白合成に関して東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻微生物学研究室北本勝ひこ教授ならびに丸山潤一助教に多大なるご協力を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

< 参考文献 >

- 1) Skurk T, Lee YM, Hauner H. Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. *Hypertension* 37: 1336–1340, 2001.
- 2) Gesualdo L, Ranieri E, Monno R. Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 56: 461–470, 1999.
- 3) Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ, Thomas CP. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol Endocrinol.* 15:575-88, 2001
- 4) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med.* 341:709-717, 1999.
- 5) Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N*

Engl J Med. 348: 1309-1321, 2003.

6) Pascual-Le Tellec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* 19: 2211-2221, 2005.

7) Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension.* 46:1227-1235, 2005

8) Bridgham JT, Carroll SM, Thornton JW. Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science.* 312:97-101, 2006

9) Krozowski Z. The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. *Mol Cell Endocrinol.* 151:121-127, 1999

10) Rocha R, Stier CT Jr. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol Metab.* 12:308-314, 2001.

11) Yoshida M, Ma J, Tomita T, Morikawa N, Tanaka N, Masamura K, Kawai Y, Miyamori I. Mineralocorticoid receptor is overexpressed in cardiomyocytes of patients with congestive heart failure. *Congest Heart Fail.* 11:12-16, 2005

12) Cai TQ, Wong B, Mundt SS, Thieringer R, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A. Induction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 77:117-122, 2001.

13) Kitagawa H, Yanagisawa J, Fuse H, Ogawa S, Yogiashi Y, Okuno A, Nagasawa

H, Nakajima T, Matsumoto T, Kato S. Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol.* 22:3698-3706, 2002.

14) Grossmann C, Gekle M. Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *Steroids.* 73:973-978, 2008.

15) Callera GE, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, He Y, Schiffrin EL, Touyz RM. c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneous hypertensive rats. *Hypertension.* 46:1032-1038, 2005.

16) Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M. Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: Subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 204:475-481, 1994.

17) Christ M, Meyer C, Sippel K, Wehling M. Rapid aldosterone signaling in vascular smooth-muscle cells - Involvement of phospholipase-C, diacylglycerol and protein-kinase-C- α . *Biochem Biophys Res Commun.* 213:123-129, 1995.

18) Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K, Wehling M. Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 25:117-123, 1995.

19) Alzamora R, Michea L, Marusic ET. Role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase

in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension*. 35:1099-1104, 2000.

20) Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: Short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation*. 108:2400-2406, 2003.

21) Alzamora R, Marusic ET, Gonzalez M, Michea L. Nongenomic Effect of aldosterone on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology*. 144:1266-1272, 2003.

22) Christ M, Günther A, Heck M, Schmidt BM, Falkenstein E, Wehling M. Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 99:1485-1491, 1999.

23) Zhou ZH, Bubien JK. Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281:C1118-C1130, 2001.

24) Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*. 232:715-724, 1985.

25) Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res*. 23:123-136, 1989.

26) Yamamoto N, Nakashima T, Torikai M, Naruse T, Morimoto J, Kon S, Sakai F, Uede T. Successful treatment of collagen-induced arthritis in non-human primates

by chimeric anti-osteopontin antibody. *Int Immunopharmacol.* 7:1460-70, 2007.

27) Laffon A, García-Vicuña R, Humbría A, Postigo AA, Corbí AL, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 88: 546–552, 1991.

28) Seiffge D. Protective effects of monoclonal antibody to VLA-4 on leukocyte adhesion and course of disease in adjuvant arthritis in rats. *J Rheumatol.* 23: 2086–2091, 1996.

29) Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates angiotensin II-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest.* 98: 2218–2227, 1996.

30) Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol.* 145:1450–1462, 1994.

31) Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S, Hirokawa K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin Invest.* 92: 2814–2820, 1993.

32) Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Tudor EM, Pike RN, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: Association with muscle regeneration

and regulation of myoblast function in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:2303–2314, 2008.

33) Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S. Expression of Osteopontin mRNA by Macrophages in Atherosclerotic Plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol.* 143:1003-1008, 1993.

34) Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 760:109-126, 1995.

35) Gauer S, Hauser IA, Obermüller N, Holzmann Y, Geiger H, Goppelt-Struebe M. Synergistic induction of osteopontin by aldosterone and inflammatory cytokines in mesangial cells. *J Cell Biochem.* 103:615-623, 2008

36) Irita J, Okura T, Kurata M, Miyosh Ki, Fukuoka T, Higaki J. Osteopontin in rat renal fibroblasts. *Hypertension.* 51:507-513, 2008.

37) Irita J, Okura T, Manabe S, Kurata M, Miyoshi K, Watanabe S, Fukuoka T, Higaki J. Plasma osteopontin levels are higher in patients with primary aldosteronism than in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 19:293–297, 2006.

38) Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. Role of janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II and platelet-derived growth

factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 272:24684-24690, 1997.

39) Ridall AL, Daane EL, Dickinson DP, Butler WT. Characterization of the rat osteopontin gene. Evidence for two vitamin D response elements. *Ann N Y Acad Sci.* 760:59-66, 1995

40) <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

41) Jin FJ, Watanabe T, Juvvadi PR, Maruyama J, Arioka M, Kitamoto K. Double disruption of the proteinase genes, tppA and pepE, increases the production level of human lysozyme by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:1059-68, 2007.

42) Kornel L, Rafelson ME Jr, Hayashi T, Kanamarlapudi N, Anderson KM. Arterial receptors for adrenal steroids and transport of electrolytes in vascular smooth muscle. *Clin Physiol Biochem.* 6:188-200, 1988.

43) Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int.* 63:1791-1800, 2003.

44) Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H1802-H1810, 2002.

45) O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM,

Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb.* 14:1648-1656, 1994.

46) Gomez-Ambrosi J, Catalán V, Ramírez B, Rodríguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Frühbeck G. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrin Metab.* 92:3719-3727, 2007.

47) Duvall CL, Weiss D, Robinson ST, Alameddine FM, Guldberg RE, Taylor WR. The role of osteopontin in recovery from hind limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:290-295, 2008.

48) Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, Arias-Magallona S, Fishbein MC, Blaschke F, Kintscher U, Graf K, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest.* 112:1318-1331, 2003.

49) Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, Akino M, Sugawara T, Morimoto J, Kimura C, Kon S, Denhardt D, Kitabatake A, Uede T. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1029-1034, 2003.

50) Sugiyama T, Yoshimoto T, Hirono Y, Suzuki N, Sakurada M, Tsuchiya K, Minami I, Iwashima F, Sakai H, Tateno T, Sato R, Hirata Y. Aldosterone increases

osteopontin gene expression in rat endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 336:163-167, 2005.

51) Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T, Ogawa H, Kugiyama K, Harada E, Nakayama M, Nakamura S, Ito T, Shimasaki Y, Saito Y, Nakao K. Aldosterone production is activated in failing ventricle in Humans. *Circulation.* 103:72-77, 2001.

52) Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Furukawa K, Miyamori I, Mabuchi H. Effects of high sodium intake on cardiovascular aldosterone synthesis in stroke-prone spontaneously hypertensive Rats. *J Hypertens.* 19:635-639, 2001.

53) Takemoto M, Yokote K, Yamazaki M, Ridall AL, Butler WT, Matsumoto T, Tamura K, Saito Y, Mori S. Enhanced expression of osteopontin by high glucose. *Ann N Y Acad Sci.* 902:357-363, 2000.

54) Li G, Oparil S, Kelpke SS, Chen Y, Thompson JA. Fibroblast growth factor Rrceptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. *Circulation.* 106:854-859, 2002.

55) Renault MA, Jalvy S, Potier M, Belloc I, Genot E, Dekker LV, Desgranges C, Gadeau AP. UTP induces osteopontin expression through a coordinate action of NFκB, activator protein-1, and upstream stimulatory factor in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 280:2708-2713, 2008.

- 56) Abe K, Nakashima H, Ishida M, Miho N, Sawano M, Soe NN, Kurabayashi M, Chayama K, Yoshizumi M, Ishida T. Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves G_{q/11}, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens Res.* 31:987-998, 2008.
- 57) Farman N, Rafestin-Obin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280(2):F181-F192, 2001.
- 58) Yin BL, Hao H, Wang YY, Jiang YJ, Xue S. Downregulating osteopontin reduces angiotensin II-induced inflammatory activation in vascular smooth muscle cells. *Inflamm Res.* 58: 67-73, 2009.
- 59) Chellaiah M, Fitzgerald C, Filardo EJ, Cheresch DA, Hruska KA. Osteopontin activation of c-src in human melanoma cells requires the cytoplasmic domain of the integrin alpha v-subunit. *Endocrinology.* 137: 2432-2440, 1996.
- 60) Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension.* 45: 773–739, 2005.
- 61) Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 12: 165–174, 2003.
- 62) Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 981–987, 2003.

- 63) Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 91: 406–413, 2002.
- 64) Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal–regulated kinase 1/2– dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension*. 38: 56–64, 2001.
- 65) Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 39: 479–485, 2002.
- 66) Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, Rajapurohitam V, Schiffrin EL. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca^{2+} signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 19: 441– 449, 2001.