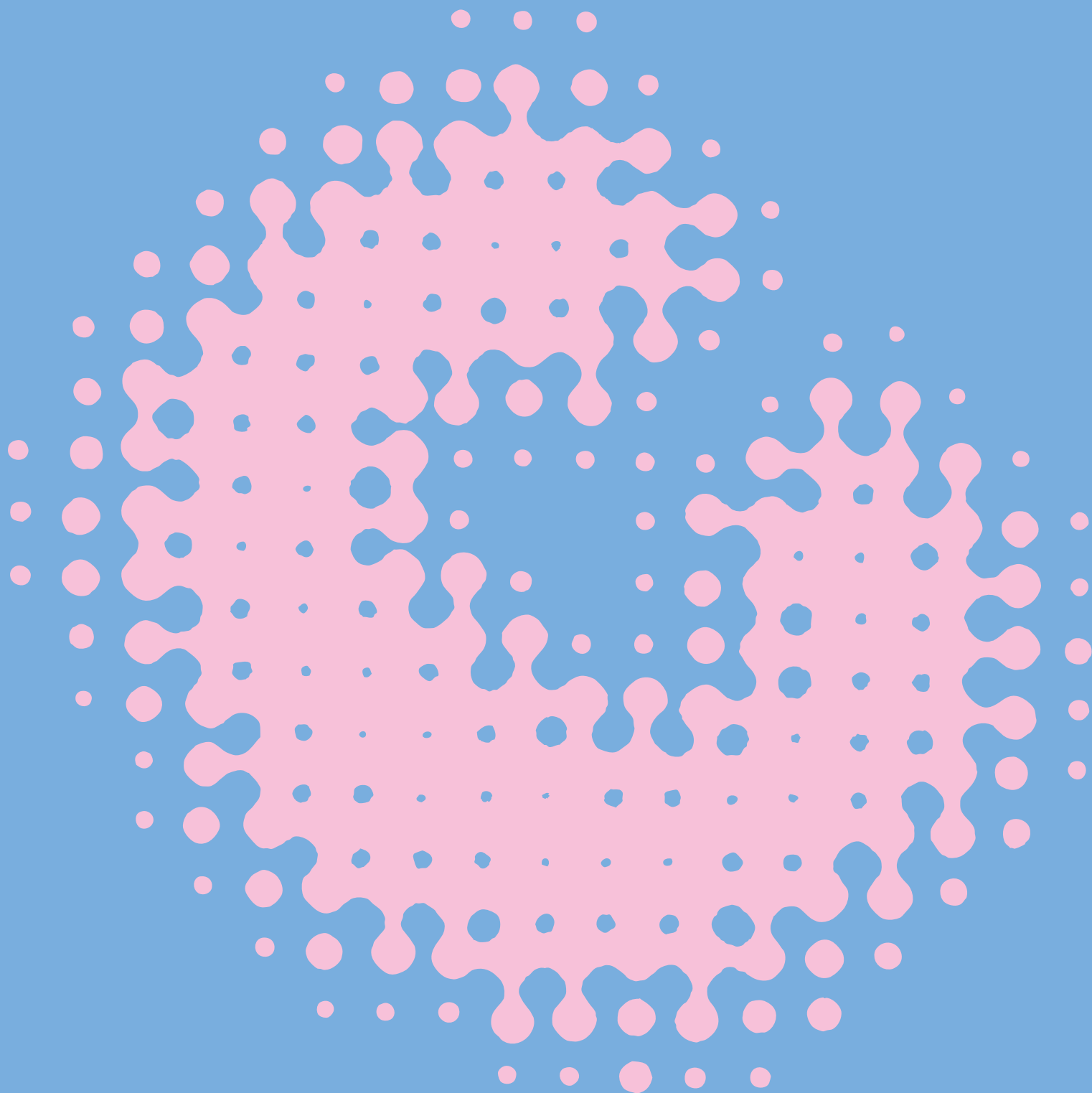


血管

VOL46No.3/2023
JAPANESE JOURNAL OF
CIRCULATION RESEARCH

日本心脈管作動物質学会



- ・ 編集長 西村有平（三重大学大学院医学系研究科統合薬理学）
- ・ 副編集長 筒井正人（琉球大学大学院医学研究科薬理学）
- ・ 副編集長 西山成（香川大学医学部薬理学）
- ・ 副編集長 福本義弘（久留米大学医学部内科学講座心臓・血管内科部門）

編集委員（五十音順）

池田康将，今村武史，岩本隆宏，上田陽一，佐田政隆，佐藤公雄，下川宏明，下澤達雄，
 新藤隆行，筒井正人，富田修平，中田徹男，錦見俊雄，西田基宏，西村有平，西山成，
 林登志雄，東幸仁，平田健一，平野勝也，福田昇，福本義弘，前村浩二，南野徹，
 宮内卓，茂木正樹，吉栖正典，吉村道博

学会案内

第53回 日本心脈管作動物質学会

認定循環器専門医研修単位対象学会
研修認定薬剤師制度認定対象集合研修(申請中)

『心脈管作動物質を再考する～過去、現在、未来～』

会 期：2024年2月9日(金)・10日(土)

会 場：**広仁会館** (広島大学霞キャンパス内)
〒734-8551 広島市南区霞1丁目2番3号

会 長：**東 幸仁**
(広島大学原爆放射線医科学研究所 再生医療開発研究分野)

事 務 局：広島大学原爆放射線医科学研究所 再生医療開発研究分野
担当：丸橋 達也
〒734-8553 広島市南区霞1丁目2番3号
TEL/FAX 082-257-5831

学会準備室：株式会社コンベンションリンケージ
〒604-8162 京都府京都市中京区烏丸通六角下ル七観音町634
TEL 075-231-6357 FAX 075-231-6354
Email: jscr53@c-linkage.co.jp

学会ホームページ：<https://www.c-linkage.co.jp/jscr53>

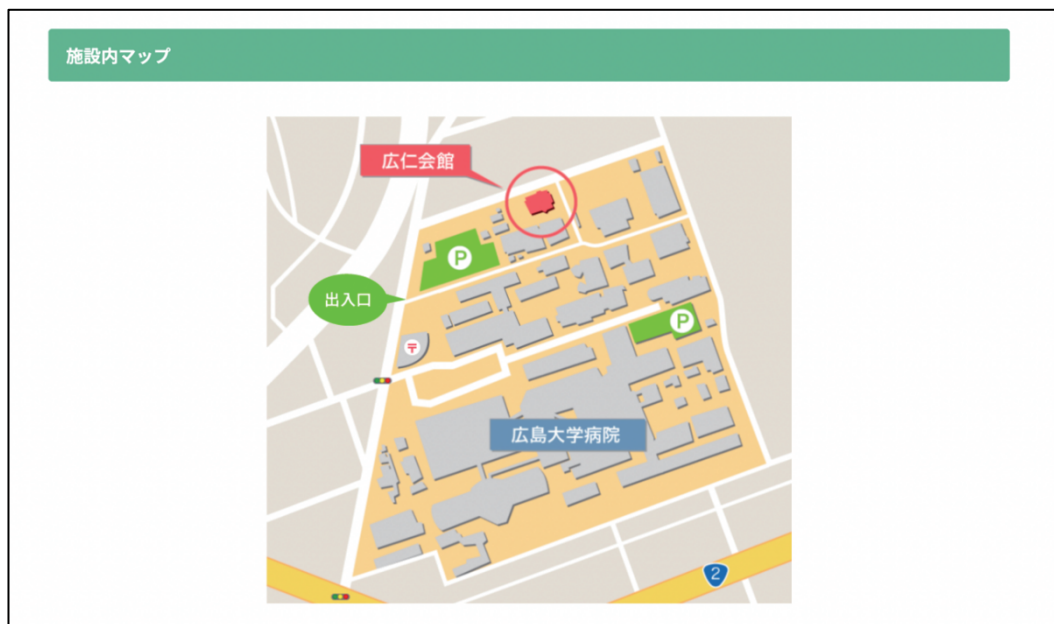
- 現地開催を予定しております。
- 事前参加登録制としております。ホームページからのご登録をお願いいたします。
- 学会ホームページにお知らせや最新の情報を掲載いたしますのでご覧ください。



↑ ↑ ↑
学会HPはこちら

※「会場アクセスマップ」次頁参照

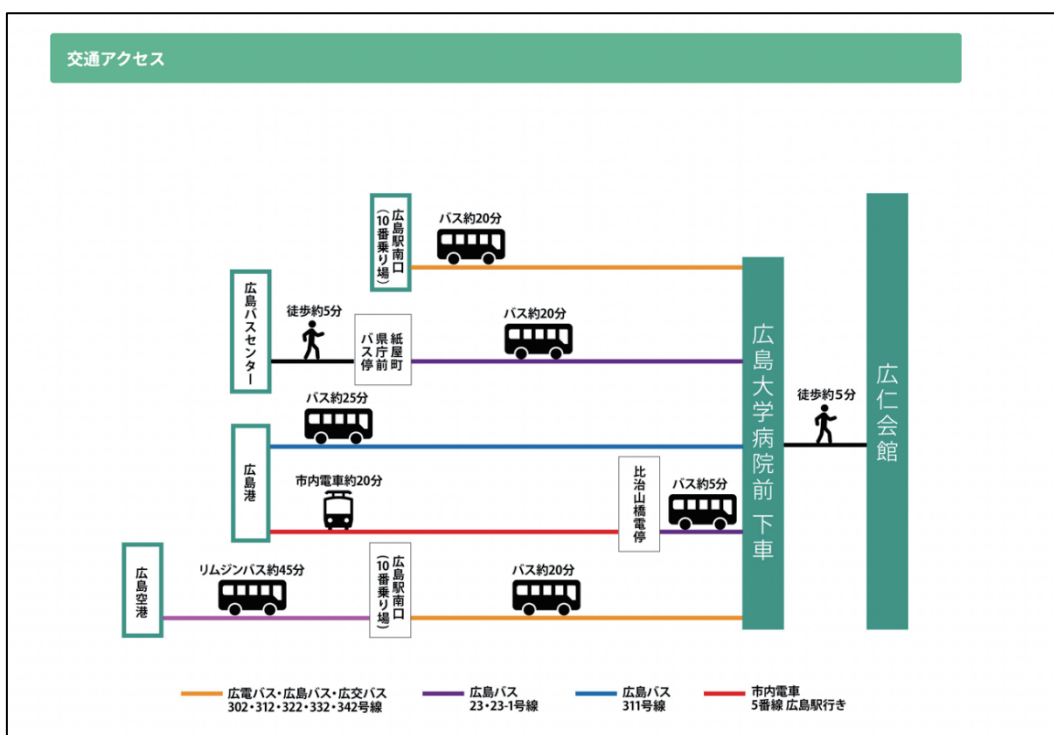
会場アクセスマップ



会場：広仁会館

〒734-8551 広島市南区霞1丁目2番3号

広島空港・広島駅・広島港からの所要時間



《日本心脈管作動物質学会の入会および各種届出について》

1. 年 会 費：5,000円
2. 会計年度：1月1日から12月31日まで。
3. 特 典：学会誌「血管」を年3回発行します。第1号は学会抄録号となります。
4. 総 会：年1回開催します。学会の演題申込者はすべて本会会員に限ります。
5. 入会手続き：学会入会希望者は、学会ホームページより入会申込書をダウンロードして必要事項を記入し、メールまたはFax(059-232-1765)で事務局まで送付ください。そして、下記ゆうちょ銀行口座あてに年会費5,000円をお振り込みください。
6. 学会誌送付先などに変更が生じた場合は、すみやかに事務局までお知らせください。

《振 込 先》

【ゆうちょ銀行からの振込口座】

振替口座：00900-8-49012

加入者名：日本心脈管作動物質学会

【その他の金融機関からの振込口座】

ゆうちょ銀行

店 番：099〈ゼロキュウキュウ店〉

預金種目：当座

口座番号：0049012

受取人名：ニホンシンミャクカンサドウブツツガッカイ

※送金手数料は入金者をご負担ください。

《「お知らせ」の掲載について》

本誌では、「血管」に関連した学会および学術集会（国内外、規模の大小は問いません。）の案内を、無料掲載いたします。ご希望の方は、締切日までに原稿を下記事務局へお送りください。（締切日等は事務局へご確認ください。）

事務局：〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174番地

三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野内

日本心脈管作動物質学会事務局

TEL 059-231-5411

FAX 059-232-1765

<http://plaza.umin.ac.jp/~jscri-society/>

E-mail: circ.res.japan@gmail.com

■巻頭総説

下垂体後葉ホルモンの新たな生理作用～遺伝子改変動物を用いた研究～

上田 陽一, 丸山 崇…………… 1

■巻頭総説

血管機能を診る：生理学的検査法から心脈管作動物質まで

東 幸仁…………… 7

■第52回日本心脈管作動物質学会 研究奨励賞受賞論文（総説）

末梢循環障害におけるTRPC6の生理的意義の解明と薬理的応用

加藤 百合, 富田-沼賀 拓郎, 島 内司, 西村 明幸, 西田 基宏 …… 17

■ *Distinguished Review*

- New Insights of Neurohypophysial Hormones – Transgenic Research in Rats –
UETA Yoichi, MARUYAMA Takashi 1

■ *Distinguished Review*

- Diagnosing Vascular Function: from Physiological Test to
Cardio-Vascular Functioning Substances
Yukihito Higashi 7

■ *Young Investigator Research Award (Review)*

- Physiological roles of TRPC6 in peripheral arterial disease
Yuri Kato, Takuro Tomita-Numaga, Tsukasa Shimauchi
Akiyuki Nishimura, Motohiro Nishida 17

●巻頭総説

巻 頭 総 説

下垂体後葉ホルモンの新たな生理作用 ～遺伝子改変動物を用いた研究～

上田 陽一^{1,2}、丸山 崇¹

¹産業医科大学医学部第1生理学、²産業医科大学学長研究室

和文抄録

下垂体後葉ホルモンであるバソプレシン・オキシトシンは、視床下部室傍核・視索上核の大細胞性神経分泌ニューロンで産生され、下垂体後葉に投射した神経終末から活動電位依存性に循環血液中に開口分泌される。それぞれの受容体（V1a, b, V2およびOTR）は7回膜貫通型受容体であり、Gタンパクと共役している。バソプレシンは、V1a受容体を介して血管収縮、V1b受容体を介して下垂体前葉からのACTH分泌、腎臓のV2受容体を介して水の再吸収（抗利尿）を引き起こす。一方、オキシトシンは、OTRを介して妊娠末期の子宮筋の収縮・分娩の促進、授乳期の乳腺平滑筋の収縮（射乳）を引き起こす。最近、バソプレシン・オキシトシン受容体が脳内にも広範に分布しており、概日リズム、愛情などの中枢作用にも関与することが注目されている。

私たちは、バソプレシン・オキシトシンを産生する神経分泌ニューロンを生細胞のまま同定するために蛍光タンパク遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットを作出した。また、それぞれのニューロンを特異的に活性化するためにDREADDsを応用したトランスジェニックラットも作出した。本稿では、これらのトランスジェニックラットを用いて得られた新知見を概説する。

1. はじめに

下垂体後葉ホルモンのバソプレシンとオキシトシンは、

9個のアミノ酸残基（1, 6番目のシ테인残基がジスルフィドS-S結合により環状構造を形成）からなるペプチドホルモンである。それぞれの遺伝子は、同じ染色体（ヒト第20染色体：20p13）に向かい合わせに位置しており、3つのエキソンと2つのイントロンから構成される遺伝子構造もよく似ている¹⁾。

バソプレシンおよびオキシトシンを産生する細胞は、視床下部室傍核（paraventricular nucleus：PVN）および視索上核（supraoptic nucleus：SON）に局在しており、細胞体の大きさから大細胞性神経分泌ニューロンと呼ばれている。これらのニューロンはその軸索を下垂体後葉に投射しており、活動電位依存的にバソプレシンもしくはオキシトシンを含有した分泌顆粒を循環血液中に開口放出する²⁾。

バソプレシン受容体（V1a, bおよびV2）およびオキシトシン受容体（OTR）はともに7回膜貫通型受容体でGタンパク質と共役している^{3,4)}。V1a,b受容体はGqと共役しており、ホスホリパーゼC（PLC）を活性化後にホスホイノシトール2リン酸（PIP₂）からイノシトール3リン酸（IP₃）とジアシルグリセロール（DAG）が産生され、IP₃はその受容体を介して細胞内カルシウムイオンを増加させ、DAGはPKCを活性化することで生理作用を発揮する。一方、V2受容体はGsと共役しており、アデニル酸シクラーゼ（AC）を活性化してcAMPが産生されてPKAを活性化することで生理作用を発揮する。オキシトシン受容体はGq/11とGi/oと共役するものがあり、低濃度のオキシトシンではGq/11ファミリーが、比較的高濃度ではGi/oファミリーが活性化する。Gq/11共役型オキシトシン受容体では、PLC/IP₃-Ca²⁺/DAG-PKC系の活性化、Gi/o共役型オキシトシン受容体では、Gs共役型受容体を介したAC/cAMP-PKA系を抑制するように作用する。

¹産業医科大学医学部第1生理学、²産業医科大学学長研究室
（〒807-8555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1）

V1a受容体は血管平滑筋を収縮させて血圧上昇に作用し、V1b受容体は下垂体前葉からのACTH分泌を引き起こすことが知られている。V2受容体は、腎臓の集合管においてアクアポリン2を介して水の再吸収を促進する。オキシトシン受容体は、妊娠末期の子宮平滑筋に大量に発現しており分娩を促進する。授乳期には、乳腺平滑筋を収縮させて射乳を引き起こすことが知られている。

バソプレシンおよびオキシトシンのこれらの末梢作用はよく知られているが、バソプレシン・オキシトシン受容体が中枢神経系にも広く分布しており、近年、その中枢作用が注目されている⁵⁾。

2. バソプレシンニューロン・オキシトシンニューロンの可視化による同定

バソプレシンおよびオキシトシンを産生する神経分泌ニューロンの細胞体は、視床下部PVNおよびSONに局在しているが、その形態だけでは区別が困難である。解剖学的には、バソプレシンおよびオキシトシンに対する特異抗体を用いて免疫組織化学的染色法により同定することができるが生細胞ではできない。in vivoの動物実験では、血圧の上昇により神経活動が抑制されるニューロンをバソプレシンニューロン、コレスチキニンの末梢投

与により神経活動が増加するニューロンをオキシトシンニューロンと同定している⁶⁾。in vitroの脳スライス標本を用いた実験では、電気生理学的特性によりバソプレシンニューロンとオキシトシンニューロンの区別は可能であるが、電気生理学的手法の熟練技術が必要である^{7,8)}。

そこで、私たちは、バソプレシン遺伝子およびオキシトシン遺伝子に異なった蛍光色の蛍光タンパク遺伝子を挿入したトランスジェニック動物を作出することで、生細胞のまま蛍光タンパクの蛍光色によりバソプレシンニューロンおよびオキシトシンニューロンを蛍光顕微鏡下で容易に同定することを可能とした。

2-1. バソプレシン-eGFPトランスジェニックラットの作出

バソプレシン遺伝子に改変緑色蛍光タンパク(eGFP)遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットを作出した⁹⁾。このトランスジェニックラットでは、視床下部PVN、SONおよび概日リズムの中枢である視交叉上核(suprachiasmatic nucleus: SCN)¹⁰⁾に局在するニューロンの細胞体に鮮やかな緑色蛍光を観察することができた。PVNおよびSONにおける緑色蛍光強度は、in vivoにおいては脱水⁹⁾、食塩負荷¹¹⁾、容量減少¹²⁾、カイニン酸誘発けいれん¹³⁾、炎症・疼痛^{14,15)}などによ

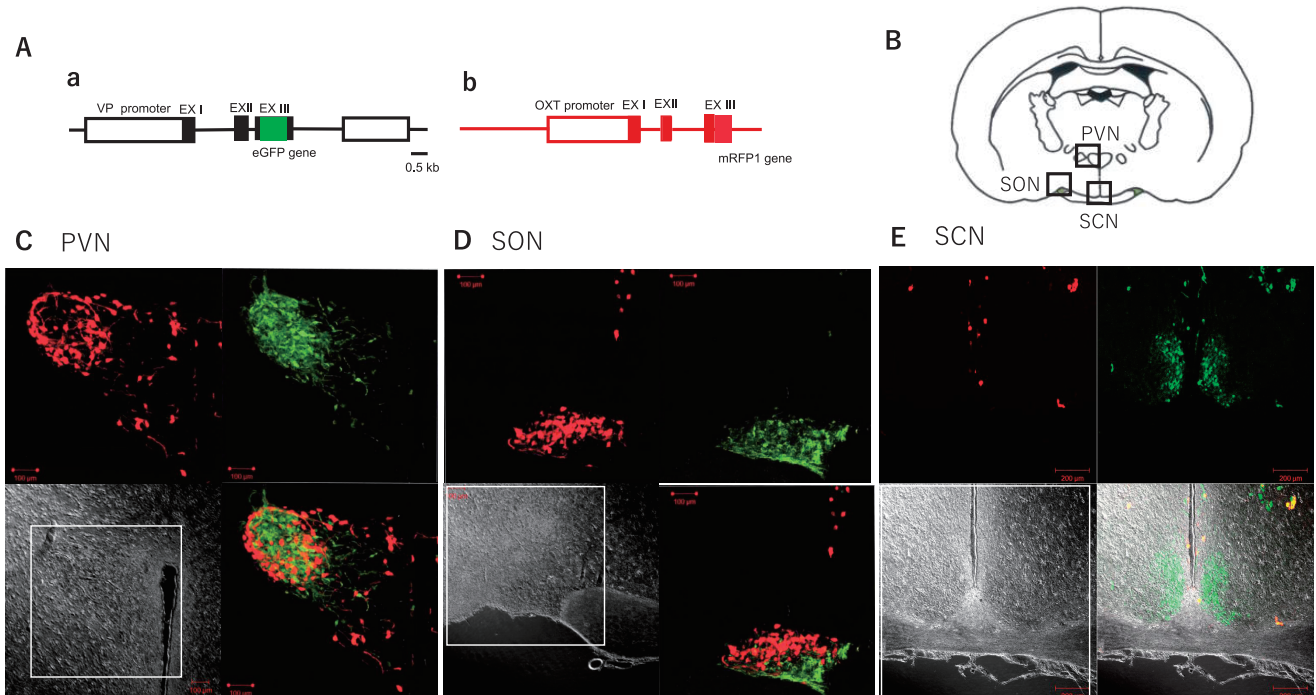


図1. バソプレシン-eGFPニューロンとオキシトシン-mRFP1ニューロンの同時可視化

A: バソプレシン遺伝子にeGFP遺伝子を挿入した融合遺伝子(a)とオキシトシン遺伝子にmRFP1遺伝子を挿入した融合遺伝子(b)の模式図を示す。
B: ラット脳の冠状断面における視床下部室傍核(PVN)、視索上核(SON)および視交叉上核(SCN)の位置を示す。
C, D, E: 暗視野切片(各パネルの左下)の□で囲んだPVN, SON, SCNの部位におけるバソプレシン-eGFPニューロン(各パネルの右上)とオキシトシン-mRFP1ニューロン(各パネルの左上)の分布と重ね合わせたイメージ画像(各パネルの右下)を示す。引用文献31 Figure 1より一部抜粋。

で著明に増加すること、in vitro実験においては脳スライス標本および単離標本において生細胞のまま緑色蛍光を指標に容易に同定でき、電気生理学実験（パッチクランプ法）^{16, 17)} やカルシウムイメージング解析^{18, 19)} に利用することができた。

2-2. オキシトシン-mRFP1トランスジェニックラットの作出

オキシトシン遺伝子に単量体赤色蛍光タンパク 1 (mRFP1) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットを作出した²⁰⁾。このトランスジェニックラットでは、視床下部PVNおよびSONに局在するニューロンの細胞体に鮮やかな赤色蛍光を観察することができた。

さらに、バソプレシン-eGFPトランスジェニックラットとオキシトシン-mRFP1トランスジェニックラットを交配することでダブルトランスジェニックラットを作出することができた²⁰⁾ (図1 参照)。in vitro実験において、このトランスジェニックラットのSONから同時にバソプレシン-eGFPニューロンとオキシトシン-mRFP1ニューロンを得ることができると、生理学的特性を容易に比較することができた^{21, 22)}。

また、in vivo実験においては、急性もしくは慢性の炎症・疼痛によりオキシトシン-mRFP1蛍光が著明に増加

すること^{23, 24)}、性周期およびエストロゲン依存的にオキシトシン-mRFP1ニューロンの赤色蛍光が変化する²⁵⁾ ことを見出すことができた。

3. バソプレシンニューロン・オキシトシンニューロンのDREADDsによる操作

近年、神経科学分野において光遺伝学 (optogenetics: オプトジェネティクス) および化学遺伝学 (chemogenetics: ケモジェネティクス) を用いてニューロン活動を人工的に操作することで神経回路や行動との関連などが次々と明らかになっている。化学遺伝学においては、DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) の略称) が汎用されている。

私たちは、バソプレシンニューロンおよびオキシトシンニューロンにclozapine-N-oxide (CNO) と特異的に反応する人工受容体 (hM3Dq) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を導入したトランスジェニックラットを作出した^{26, 27, 28, 29)}。これらのトランスジェニックラットでは、CNOの末梢（腹腔内もしくは皮下）投与により視床下部PVNおよびSONに局在するバソプレシンもしくはオキシトシンニューロンが活性化することを確認した (図2 参照)。

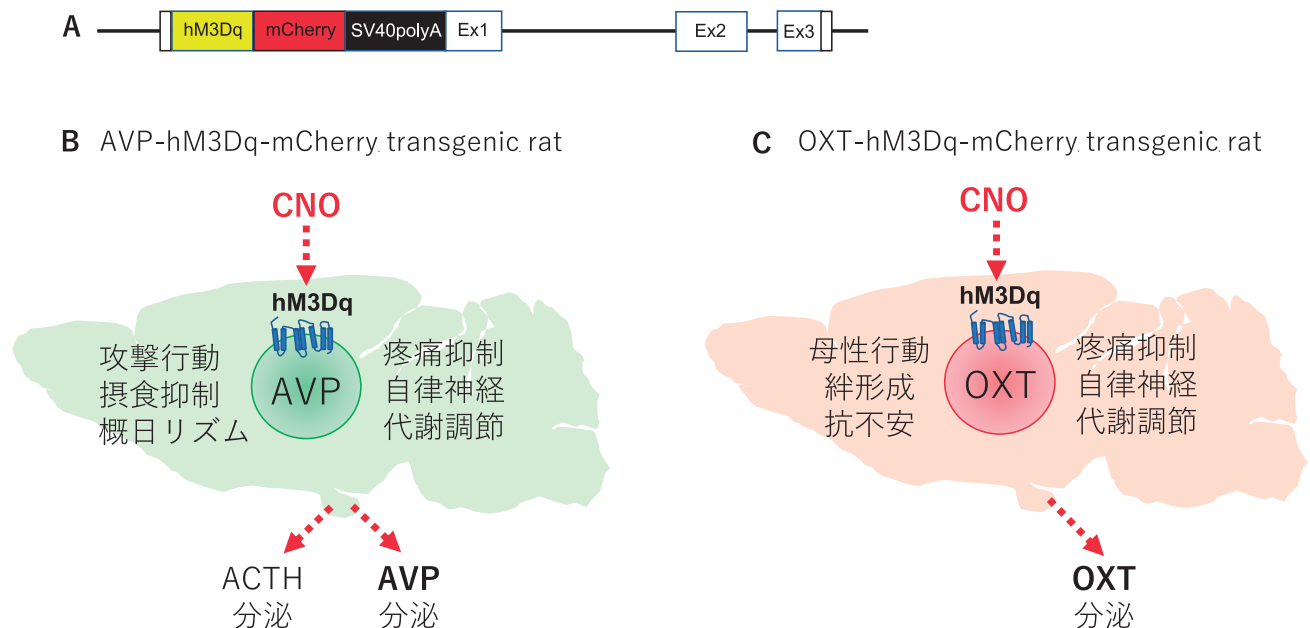


図2. バソプレシンニューロンおよびオキシトシンニューロンとDREADDs手法

A: バソプレシンもしくはオキシトシン遺伝子にhM3Dq遺伝子-mCherry遺伝子を挿入した融合遺伝子の模式図を示す。mCherryは赤色蛍光タンパクでありhM3Dq遺伝子が導入されたニューロンを可視化するために用いた。
B, C: バソプレシンニューロンもしくはオキシトシンニューロンにhM3Dq遺伝子が特異的に発現したトランスジェニックラットを用いてclozapine-N-oxide (CNO) を末梢投与した場合の生理作用について示す。

3-1. バソプレシン-hM3Dqトランスジェニックラット

このトランスジェニックラットは、CNOの末梢投与により2時間以上にわたり血中バソプレシン濃度が有意に増加した^{26, 27)}。

CNOの末梢投与により摂食および飲水が有意に抑制された。摂食抑制ペプチドとして同定されたネスファチン-1の抗体をCNO投与前に脳室内投与しておく、CNOによる摂食抑制作用が有意に減弱することから、CNO→バソプレシンニューロンの活性化→ネスファチン-1ニューロンの活性化→摂食抑制という神経回路の存在を明らかにすることができた²⁶⁾。なお、飲水の抑制は改善されなかったことから、別の神経回路の系であろう。また、慢性疼痛モデルである坐骨神経部分結紮後のラットにおいて、CNOを投与することでvon Frey testおよびHot Plate testを指標とした感覚過敏の状態が有意に改善することを証明できた²⁷⁾。

3-2. オキシトシン-hM3Dqトランスジェニックラット

このトランスジェニックラットは、CNOの末梢投与により3時間にわたり血中オキシトシン濃度が有意に増加した^{28, 29)}。

急性炎症モデル（ホルマリンテスト）および慢性疼痛モデル（坐骨神経部分結紮）のいずれにおいてもCNOを投与することでvon Frey testおよびHot Plate testを指標とした感覚過敏の状態が有意に改善した。興味深いことに、ホルマリンテストにおける足の腫脹がCNO投与により有意に抑制されること、この抑制には末梢で増加したオキシトシンが肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することによって生じていることが明らかとなった²⁸⁾。

また、線維筋痛症モデル（レセルピン投与）においてもCNOを末梢投与することでvon Frey testを指標とした感覚過敏の状態および強制水泳テストなどのうつ状態を検討する課題において有意に改善した²⁹⁾。

4. おわりに

バソプレシンニューロンからの細胞内記録に世界で初めて成功した³⁰⁾ 山下博初代教授（産業医科大学医学部第1生理学）がこの分野をトップランナーとして牽引してきた。山下教授から下垂体後葉ホルモン研究を引き継ぎ、遺伝子改変動物を用いたバソプレシン・オキシトシンニューロンの蛍光タンパクによる生細胞での同定、DREADDs手法を用いたニューロン活動の操作を行うこ

とができるようになった³¹⁾。

バソプレシン・オキシトシンは20世紀初頭にその存在が明らかとなった100年以上の歴史をもつペプチドホルモンであるが、いまなお新しい知見が見つかり、その中枢作用が多分野の研究者からも注目されている³²⁾。

5. 謝辞

2023年2月10～11日に北九州国際会議場にて第52回日本心脈管作動物質学会を大会長（上田陽一）、大会事務局長（丸山崇）としてお世話させていただきました。多くの皆様にご参加いただき、無事盛会のうちに終了しましたことに改めて御礼申し上げます。

6. 利益相反について

すべての著者は開示すべき利益相反はありません。

7. 引用文献

1. Young WS 3rd, Gainer H. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology* 2003 ; 78 : 185–203.
2. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 1980 ; 207 (4429) : 373–378.
3. Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroshima M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors : from molecules to physiological systems. *Physiological Reviews*. 2012 ; 92 (4) : 1813–1864.
4. Jurek B, Neumann ID. The Oxytocin Receptor : From Intracellular Signaling to Behavior. *Physiological Reviews*. 2018 ; 98 (3) : 1805–1908.
5. Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain : social neuropeptides for translational medicine. *Nature Review Neuroscience* 2011 ; 12 (9) : 524–538.
6. Ueta Y, Kannan H, Higuchi T, Negoro H, Yamashita H. CCK-8 excites oxytocin-secreting neurons in the paraventricular nucleus in rats-possible involvement of noradrenergic pathway. *Brain Research Bulletin* 1993 ; 32 (5) : 453–459.
7. Yamashita H, Inenaga K, Kawata M, Sano Y.

- Phasically firing neurons in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus: immunocytochemical and electrophysiological studies. *Neuroscience Letters* 1983 ; 37 (1) : 87–92.
8. Armstrong WE, Foehring RC, Kirchner MK, Sladek CD. Electrophysiological properties of identified oxytocin and vasopressin neurons. *Journal of Neuroendocrinology*. 2019 ; 31 (3) : e12666.
 9. Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A, Murphy D. Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. *Endocrinology*. 2005 ; 146 (1) : 406–413.
 10. Maruyama T, Ohbuchi T, Fujihara H, Shibata M, Mori K, Murphy D, Dayanithi G, Ueta Y. Diurnal changes of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Peptides*. 2010 ; 31 (11) : 2089–2093.
 11. Fujio T, Fujihara H, Shibata M, Yamada S, Onaka T, Tanaka K, Morita H, Dayanithi G, Kawata M, Murphy D, Ueta Y. Exaggerated response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene to salt loading without disturbance of body fluid homeostasis in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 2006 ; 18 (10) : 776–785.
 12. Sanada K, Ueno H, Miyamoto T, Baba K, Tanaka K, Nishimura H, Nishimura K, Sonoda S, Yoshimura M, Maruyama T, Onaka T, Otsuji Y, Kataoka M, Ueta Y. AVP-eGFP was significantly upregulated by hypovolemia in the parvocellular division of the paraventricular nucleus in the transgenic rats. *American Journal of Physiology (Regul Integr Comp Physiol)* 2022 ; 322 (3) : R161–R169.
 13. Iwanaga M, Ohno M, Katoh A, Ohbuchi T, Ishikura T, Fujihara H, Nomura M, Hachisuka K, Ueta Y. Upregulation of arginine vasopressin synthesis in the rat hypothalamus after kainic acid-induced seizures. *Brain Research* 2011 ; 1424 : 1–8.
 14. Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Nakamura T, Ueta Y. Regulatory mechanism of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene expression in acute and chronic stress. *Peptides*. 2009 ; 30 (9) : 1763–1770.
 15. Ueta Y, Dayanithi G, Fujihara H. Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli : visualization in transgenic animal models. *Hormone and Behavior* 2011 ; 59 (2) : 221–226.
 16. Ohbuchi T, Sato K, Suzuki H, Okada Y, Dayanithi G, Murphy D, Ueta Y. Acid-sensing ion channels in rat hypothalamic vasopressin neurons of the supraoptic nucleus. *Journal of Physiology* 2010 ; 588 (Pt12) : 2147–2162.
 17. Sharma K, Haque M, Guidry R, Ueta Y, Teruyama R. Effect of dietary salt intake on epithelial Na⁺ channels (ENaC) in vasopressin magnocellular neurosecretory neurons in the rat supraoptic nucleus. *Journal of Physiology* 2017 ; 595 (17) : 5857–5874.
 18. Kortus S, Srinivasan C, Forostyak O, Ueta Y, Sykova E, Chvatal A, Zapotocky M, Verkhatsky A, Dayanithi G. Physiology of spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations in the isolated vasopressin and oxytocin neurones of the rat supraoptic nucleus. *Cell Calcium*. 2016 ; 59 (6) : 280–288.
 19. Dayanithi G, Forostyak O, Forostyak S, Kayano T, Ueta Y, Verkhatsky A. Vasopressin and oxytocin in sensory neurones : expression, exocytotic release and regulation by lactation. *Scientific Reports* 2018 ; 8 (1) : 13084.
 20. Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y. Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats. *Endocrinology*. 2011 ; 152 (7) : 2768–2774.
 21. Ohkubo J, Ohbuchi T, Yoshimura M, Maruyama T, Ishikura T, Matsuura T, Suzuki H, Ueta Y. Electrophysiological effects of kainic acid on vasopressin-enhanced green fluorescent protein and oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 neurones isolated from the supraoptic nucleus in transgenic rats. *Journal of Neuroendocrinology* 2014 ; 26 (1) : 43–51.
 22. Ohkubo J, Ohbuchi T, Yoshimura M, Maruyama T, Hashimoto H, Matsuura T, Suzuki H, Ueta Y. Differences in acid-induced currents between

- oxytocin-mRFP1 and vasopressin-eGFP neurons isolated from the supraoptic and paraventricular nuclei of transgenic rats. *Neuroscience Letters*. 2014 ; 583 : 1 – 5.
23. Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Yoshimura M, Motojima Y, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Ishikura T, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Onaka T, Sakai A, Ueta Y. Possible Involvement of the Rat Hypothalamo-Neurohypophysial/-Spinal Oxytocinergic Pathways in Acute Nociceptive Responses. *Journal of Neuroendocrinology* 2016 ; 28 (6). doi : 10.1111/jne.12396.
24. Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Ishikura T, Yoshimura M, Ohkubo JI, Maruyama T, Motojima Y, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y. Fluorescent Visualisation of Oxytocin in the Hypothalamo-neurohypophysial/-spinal Pathways After Chronic Inflammation in Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Transgenic Rats. *J Neuroendocrinol*. 2015 ; 27 (7) : 636 – 46. doi : 10.1111/jne.12290.
25. Nishimura K, Yoshino K, Ikeda N, Baba K, Sanada K, Akiyama Y, Nishimura H, Tanaka K, Sonoda S, Ueno H, Yoshimura M, Maruyama T, Hachisuga T, Ueta Y. Oestrogen-dependent hypothalamic oxytocin expression with changes in feeding and body weight in female rats. *Communications Biology*. 2022 ; 5 (1) : 912. doi : 10.1038/s42003-022-03889-6
26. Sanada K, Yoshimura M, Ikeda N, Baba K, Nishimura H, Nishimura K, Nonaka Y, Maruyama T, Miyamoto T, Mori M, Conway-Campbell B, Lightman S, Kataoka M, Ueta Y. Chemogenetic activation of endogenous arginine vasopressin exerts anorexigenic effects via central nesfatin-1 / NucB2 pathway. *Journal of Physiological Sciences* 2021 ; 71 (1) : 18. doi : 10.1186/s12576-021-00802-4.
27. Baba K, Kawasaki M, Nishimura H, Suzuki H, Matsuura T, Ikeda N, Fujitani T, Yamanaka Y, Tsukamoto M, Ohnishi H, Yoshimura M, Maruyama T, Sanada K, Sonoda S, Nishimura K, Tanaka K, Onaka T, Ueta Y, Sakai A. Upregulation of the hypothalamo-neurohypophysial system and activation of vasopressin neurones attenuates hyperalgesia in a neuropathic pain model rat. *Scientific Reports* 2022 ; 12 (1) : 13046. doi : 10.1038/s41598-022-17477-5.
28. Nishimura H, Yoshimura M, Shimizu M, Sanada K, Sonoda S, Nishimura K, Baba K, Ikeda N, Motojima Y, Maruyama T, Nonaka Y, Baba R, Onaka T, Horishita T, Morimoto H, Yoshida Y, Kawasaki M, Sakai A, Muratani M, Conway-Campbell B, Lightman S, Ueta Y. Endogenous oxytocin exerts anti-nociceptive and anti-inflammatory effects in rats. *Communications Biology* 2022 ; 5 (1) : 907. doi : 10.1038/s42003-022-03879-8.
29. Ikeda N, Kawasaki M, Baba K, Nishimura H, Fujitani T, Suzuki H, Matsuura T, Ohnishi H, Shimizu M, Sanada K, Nishimura K, Yoshimura M, Maruyama T, Conway-Campbell BL, Onaka T, Teranishi H, Hanada R, Ueta Y, Sakai A. Chemogenetic Activation of Oxytocin Neurons Improves Pain in a Reserpine-induced Fibromyalgia Rat Model. *Neuroscience*. 2023 ; 528 : 37 – 53. doi : 10.1016/j.neuroscience.2023.07.028.
30. Koizumi K, Yamashita H. Studies of antidromically identified neurosecretory cells of the hypothalamus by intracellular and extracellular recordings. *Journal of Physiology* 1972 ; 221 (3) : 683 – 705.
31. Ueta Y. Transgenic approaches to opening up new fields of vasopressin and oxytocin research. *Journal of Neuroendocrinology*. 2021 ; 33 (11) : e13055. doi : 10.1111/jne.13055.
32. Rigney N, de Vries GJ, Petrulis A, Young LJ. Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior : From Neuronal Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinology* 2022 ; 163 : 1 – 13.

●巻頭総説

巻 頭 総 説

血管機能を診る：生理学的検査法から 心脈管作動物質まで

東 幸仁

広島大学 原爆放射線医科学研究所 放射線災害医療研究部門 再生医療開発研究分野
広島大学病院 未来医療センター

I. はじめに

血管系（動脈、静脈）とリンパ系（リンパ管）よりなる脈管系は、生命維持に必要な多くの機能担っている。脈管系の内腔は、内層を形成する一層の血管内皮細胞で覆われており、平滑筋細胞より構成される中膜が血管内皮細胞を取り囲み、その外側に外膜が位置している。結合組織や細胞外基質により血管構造は強固なものとなっている。血管の3層構造は、血管自体の構造を支持するのみならず、血管の収縮、拡張といった機能の維持に働いている。古典的に、静脈系は、単なる容量血管とされているが、静脈自体も、多様な機能を有している可能性がある。

1980年に、血管内皮細胞より分泌産生される内皮依存性血管弛緩因子の発見、1987年に、EDRFの本体が一酸化窒素（NO）であると確認されて以来、血管内皮に関連する膨大な基礎的知見が集積されてきた。^{1,2} 1990年には、高血圧患者において、血管内皮機能が障害されていることが、生体で初めて報告された。³ 高血圧、脂質異常症、糖尿病、加齢、喫煙、肥満、閉経、運動不足といった危険因子により、血管機能が障害されることが明らかにされた。⁴ 血管機能は、動脈硬化の発症・維持・進展に重要な役割をはたしている。定常状態から、動脈硬化の進展程度、治療効果、さらに予後規定因子の評価として血管機能を正確に評価することは、非常に重要である。これまで、生体における血管機能を評価するための様々な試みがなされている。本稿では、生理学的手法を用い

た血管機能からサロゲートマーカーとしての各種脈管作動物質の評価に関する現状と今後の展望について概説したい。

II. 血管構造・機能

1) 動脈

a) 血管内皮細胞・血管内皮機能

血管内皮は血管の最も内層に位置しており、一層の細胞層より構成される。構造的には、血管内皮は、血管内腔と血管壁を隔てる障壁であるが、血管内皮から、NO、プロスタグランジン I_2 、C型ナトリウム利尿ペプチド、内皮由来血管過分極因子などの血管拡張因子、全く逆の作用を有するエンドセリン、アンジオテンシンII、プロスタグランジン H_2 、トロンボキサン A_2 などの血管収縮因子をはじめとした多くの生理活性物質が産生・分泌される。^{1,2} 中でも、NOは非常に重要な役割をはたしている。NOは、血管内皮細胞上の血流によるずり応力を感じ取るメカノセンサーの刺激や生理活性物質が受容体と結合することにより、内皮型NO合成酵素（eNOS）を活性化して、必須アミノ酸であるL-アルギニンから産生、分泌される。分泌されたガス体であるNOは、拡散により近傍の血管平滑筋細胞に伝わり、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）を活性化することで、細胞内cGMP量の増加を介して、血管平滑筋を弛緩させる。正常な血管内皮は、血管の拡張と収縮、血管平滑筋細胞の増殖と抗増殖、凝固と抗凝固作用、炎症と抗炎症作用、酸化と抗酸化作用を有しており、これらのバランスにより血管恒常性の維持に働いている。全身の血管内皮細胞を集めることができるかと仮定すると、総重量は肝臓に匹敵し、一面に敷き詰めることができれば、総面積はテニスコート6面分に、一列に繋げることができるとすれば10万Km、地球

2周半にも相当する。⁵

血管内皮機能障害は、動脈硬化発症の第一段階であり、動脈硬化を維持・進展させ、最終的に心血管イベントを惹起する。高血圧、糖尿病、脂質異常症、加齢、肥満、喫煙といった、所謂、冠危険因子や運動不足、閉経により血管内皮障害がもたらされる。⁴ 加齢は、血管内皮機能を規定する最も強力な規定因子である。血管内皮機能は、心血管病発症あるいは心血管イベント発症の独立した規定因子であることも明らかとなってきた。さらに、血管内皮機能は、動脈硬化の治療ターゲットとしても有用である。血管内皮機能異常は、薬物療法、補充療法、生活習慣の改善といった適切な介入により改善可能である。⁶⁻¹⁰ 血管内皮機能障害を改善することは、心血管イベント発症を抑制し、生命予後を改善することが期待されている。

血管内皮機能障害を惹起するメカニズムが解明され、様々なメカニズムが想定されている。⁵ 特に注目されてきたのは、NO自体の産生低下やNOの不活性化による生物学的活性の低下である。NO産生低下のメカニズムは、血管内皮細胞上の受容体異常、生理活性物質が受容体と結合した後の情報伝達系の異常、ずり応力の減弱や異常、ずり応力を感知する受容体異常、内皮型NO合成酵素の異常、NOの基質としてのL-アルギニンの不足が想定されている。動脈硬化発症初期には、血管内皮非依存性血管弛緩反応が障害されていないことより、血管平滑筋でのsGCの活性低下やPKG活性の低下の関与は否定的であるが、動脈硬化進展下においては、血管平滑筋での異常も考慮すべきである。NOの不活性化による血管内皮機能障害も重要である。レニン・アンジオテンシン系の活性化をはじめとした活性酸素産生増加に伴うNO捕捉が、NOを不活性化することが知られている。¹¹ さらに、活性酸素は、NOの不活性化のみならずNOと結合することにより、非常に強力な細胞毒性を有するペルオキシナイトライドに変換され、血管壁細胞の障害し、悪循環を形成して血管内皮細胞や血管平滑筋細胞におけるNOの生物学的活性の低下を生じる。酸化ストレス状態下では、血管内皮機能障害惹起するだけでなく、血管平滑筋増殖・肥大・アポトーシスを誘導し、血管のリモデリングをもたらす。血管構造自体の変化は、二次的に血管内皮機能障害に関与することが想定される。著者らは、腎血管性高血圧症において、レニン・アンジオテンシン系亢進に伴うNADPHオキシダーゼ活性化、さらに活性酸素過剰産生による血管内皮障害のプロセスが存在していることを報告した。¹² その他、血管内皮機能障害のメカニズムとして、内因性NO合成阻害物質の増加や各種内皮由来血管収縮物質の増加などにも関与していると考えられる。

b) 血管平滑筋細胞・血管平滑筋機能

血管平滑筋細胞は、血中あるいは血管内皮細胞より分泌・産生される血管作動性物質が受容体と結合することにより、あるいは機械的刺激により血管の収縮・拡張、構造変化を調節している。血管平滑筋細胞には、成熟した血管平滑筋細胞は収縮に特化した機能を有する収縮型と合成型を有している。正常な血管平滑筋細胞は、細胞外基質や細胞外基質分解酵素などを合成して血管の恒常性維持に働いているが、動脈硬化下においては、増殖因子・遊走因子を産生し自らを増殖・遊走させ、血管の構造変化（病的リモデリング）を進展させる。血管平滑筋細胞は、活性酸素や炎症といった外的刺激により形質転換して、動脈硬化の発症・維持・進展に直接関与するようになる。さらに、形質転換した血管平滑筋細胞は、動脈硬化と悪循環を形成する。

2) 静脈

静脈は、容量血管としての循環血液量を調節が主な生理学的役割である。脈管系は、外に閉ざされた閉鎖系であり、動脈系である心拍出量と静脈還流量により循環平衡を保っている。循環血液量の約75%は静脈系に保持されている。静脈は、平滑筋層が少ないため動脈に比し伸展性が大きい。静脈内圧は、伸展性が限界に達するまで、1 mmHg上昇するに従い血流量は約60%増加するため、内圧のわずかな変化が大きな循環血液量の変化をもたらす。静脈還流は、主に心臓のポンプ作用によりもたらされ、骨格筋自体の収縮による筋ポンプ作用、呼吸時の胸腔内圧上昇による呼吸ポンプ作用も静脈還流に関与している。静脈内圧や静脈還流の調節に心脈管作動性物質や神経伝達因子が関与していることも考えられるが、関与の程度は大きくないと推測される。

3) リンパ系

リンパ系（リンパ管）は、主に血漿蛋白量の制御や免疫系の調節機能を担っているが、心脈管作動性物質の輸送系としても重要な役割をはたしている。リンパ管もまた3層構造を有している。リンパ液は、その大半が毛細血管より漏出した間質液である。間質液量は、主に毛細血管内圧と血漿膠質浸透圧のバランスにより調整されている。ヒトのリンパ流量は、約3 L/日、リンパ管内圧は、0～4 mmHg程度と推測されている。詳細は不明であるが、リンパ管も、心脈管作動性物質によってリンパ流量や拡張・収縮が調節されていると考えられている。

Ⅲ. 血管機能測定

1) 血管内皮機能

これまで、生理学的手法を用いた血管内皮機能測定が報告されている。¹³Flow-mediated vasodilation (FMD) や指尖容積脈波測定 (Reactive hyperemia index: RHI) は、虚血後反応性充血による血流量や血管径で評価する方法であり、生理活性物質を投与して反応性を評価するプレチスモグラフィやフローワイヤーを用いた血流量測定や血管径測定がある。また、サロゲートマーカーとしての心脈管作動物質も期待されている。

a) ストレインゲージ式プレチスモグラフィ

残念なことに、血管内皮機能の標準的評価法がないのが現状である。これまで実施されてきた測定法の中でも、血管内皮機能の評価する上で、プレチスモグラフを用いたものが最も特異性が高いと考えられる。プレチスモグラフを用いての測定には、空気式、光電式、ストレインゲージ式の3方式があるが、血管内皮機能検査には、ストレインゲージ式プレチスモグラフが用いられている。一般的には、水銀を満たした細径のストレインゲージを四肢の測定部位に巻いて、測定部より近位でカフを閉めて静脈還流を停止させることで、測定部位では、動脈血の流入・流出のみとなる。動脈血流量の差異により四肢組織での容積変化がみられる。かかる組織容積変化が四肢測定部位での周径変化と比例することから、周径変化をストレインゲージ式プレチスモグラフで算出することにより血流量が測定可能となる。測定値は、絶対値として mL/min/組織100mL で得られる。NO 産生刺激物質あるいは L-NMMA などの NO 合成阻害薬といった心脈管作動物質を四肢の動脈に選択的に投与することにより、血流量変化を測定することで血管内皮機能の評価が可能となる。ストレインゲージ式プレチスモグラフを用いた測定は、測定部位、測定原理より骨格筋内の抵抗血管レベルでの血管内皮機能を反映していると考えられる。筆者らは、Hokanson 社の測定機器を基に、様々な測定補助デバイスを組み合わせてシステムを構築している。⁷同法は、各種心脈管作動物質を直接に動脈内に投与して評価するため、特異性は非常に高いが、細径ではあるが、カテーテルを四肢動脈に挿入することや検査時間が長時間となるため被検者への負担が大きくなるといったデメリットもある。簡便な方法として、非観血的に反応性充血後の血流量変化を測定する方法も取られているが、心脈管作動物質の直接動脈内投与法に比し、特異性は低下する。測定の標準化はされておらず、正常値の設定もなされていない。

b) FMD

FMD は、四肢の虚血反応性充血後の血管径変化を超音波を用いて測定することで評価する方法である。¹³FMD は、 $[(\text{駆血解除後の最大血管径} - \text{ベースライン血管径}) / \text{ベースライン血管径}] \times 100$ によって算出され、% 変化として得られる。通常の超音波装置でも測定可能であるが、FMD 測定専用機器も使用可能となっている。FMD は、測定部位、測定原理より、血管径が 2.5~5.5 mm 程度の導管血管レベルでの血管内皮機能を反映していると考えられる。簡便かつ非侵襲的で、検査時間も比較的短時間であり、被検者への負担も少ない。現在、FMD は、血管内皮機能評価法として最も広く汎用されている。しかし、FMD は、再現性の問題をはじめとして多くの課題、問題点が存在している。

四肢動脈駆血解除時のシェアストレスの増加が NO の産生増加を惹起しているが、最近、メカノセンサーとしての piezo1 が同定された。駆血解除直後から数十秒間の超急性期には、Ca-activated K チャンネルの解放に伴う Ca イオンの細胞内への流入による細胞内 Ca 濃度上昇が起こり、eNOS の活性化から NO 産生増加に至ると考えられる。¹⁴駆血解除後の分単位では、Ca 非依存性に Akt/PKB を介した eNOS のリン酸化による eNOS 活性化機構が働いていると考えられる。¹⁵前腕血流量は、駆血解除後 5~10 秒程度で最大に増加 (300%~600%) し、前腕血管径は、それに遅れて駆血解除 45~60 秒後に最大に増加 (5~15%) する。かかる現象は、生体においても、駆血解除による一過性のシェアストレスの増加が、NO を放出し、血管拡張に関与していることを強く示唆する。事実、この一連の反応において、NOS 合成阻害薬を前投与すると、血流量増加率は変化しないが、血管径増加が著明に抑制される。¹⁶NO 非依存性血管拡張に関しては、アデノシンや血管内皮依存性過分極因子などの関与が想定される。

これまで、いくつかの FMD 測定ガイドラインが提唱されているが、¹⁷⁻¹⁹FMD の測定方法の標準化や正常値の設定もされていない。FMD の正常値は、報告により 5%~15% であり、血管平滑筋機能 (内皮非依存性血管拡張反応) の指標であるニトログリセリン (NTG) による血管拡張の正常値も 7%~20% と大きなバラツキが認められる。FMD 測定の標準化により、治療効果の評価や病因・病態の解明、大規模臨床試験でのサロゲートエンドポイントとして利用が可能となってくる。加齢、収縮期血圧、肥満、男性、喫煙が FMD の低下因子であり、心拍数の増加は FMD の上昇因子である。²⁰これらの confounding factors は、FMD 測定の際、考慮されるべきである。FMD に最も影響を及ぼす因子は、ベースラインの血管径であ

る。FMD測定は、四肢において可能であるが、超音波の特性上、2.5mm以下の血管径では測定が困難になる。また、測定動脈の血管系が5.5mm以上である際も、FMD測定値の信頼性は高くない。できれば、血管内皮非依存性拡張反応を測定することが望ましい。NTG舌下投与による血管拡張能を血管内皮非依存性血管拡張反応として評価する。一般に使用されているNTGの容量は、一回あたり300～400 μ gであるが、この容量での血管拡張反応は15～20%であり、FMDの5～10%より大きい。この量のNTGは、血管平滑筋を大きく弛緩させるが、FMDのコントロールとして適切でない可能性が高い。健康人において、NTGの投与量は、FMDによる血管拡張反応と同等の反応となる量を使用することが望ましい。正確に血管平滑筋機能を評価するためには、NTGの容量反応曲線を求めて解析すべきである。さらに、通常容量のNTGは体血圧を低下させ、心拍数を増加させることで、血管拡張反応に影響することが懸念される。筆者らの検討では、NTG75 μ g舌下投与にて、FMDとほぼ同等の血管拡張が得られることを確認している。多くの研究では、血管平滑筋機能は変化しないという仮定のもと、血管内皮機能を測定しているが、血管内皮非依存性拡張反応が、治療介入等により変化した場合の評価は難しくなってくる。著者らは、FMDとNTGが同時に変化した際は、FMD/NTGを計算することにより評価している。²¹性周期に伴い血管内皮機能が変化することも知られている。FMDは、閉経前女性において、血中エストラジオールの濃度が高値である卵胞期と黄体期に、エストラジオールの濃度が低値である月経期より有意に高値となる。²²

FMDの測定において、全自動測定ではない限り、術者の技術に依存するところが大きいため、再現性の問題は、大きな課題の一つとなる。FMDのマニュアル測定では、安定して測定できるようになるためには100回以上の測定経験が必要で、技術維持のために年100回以上測定の必要であるとされている。¹⁷最近、血管不全学会より、ユネクス社の専用測定器での測定値を基に、測定法の標準化、正常値も設定されている。¹³

c) RHI

簡便な方法として、反応性充血後の指尖容積脈波を測定する方法も臨床応用されている。指尖容積脈波を測定する同法は指の皮膚組織の血管機能を反映していると考えられる。測定の際、交感神経活性の影響を強く受けることが懸念されるが、RHI測定に特化した機器の開発も行われている（Endo-PAT2000）。RHIは、反応性充血後の指尖細動脈の容積脈波を専用プローブにより測定する方法である。RHIが形成されるメカニズムの詳細は不明

であるが、NOがRHI形成の60%程度に関与しているとの報告もある。²³ RHI測定は、ほぼ全自動の測定系であるため、最も簡便であり、手技による差も少ない。血管不全学会より、イタマー社の専用測定器での測定値を基に、測定法の標準化、正常値も設定されている。¹³

d) その他

米国においては、心脈管作動物質を冠動脈内に直接投与して血管造影での血管径やフローワイヤーを用いての血流量の変化を測定することにより血管内皮機能を評価することを標準としている。ストレインゲージ式プレチスモグラフによる血流量測定やFMD、RHIを測定は、四肢動脈での血管内皮機能を測定することで全身の血管内皮機能の代用として使用されている。冠動脈に限らず、心脈管作動物質を直接に動脈内投与して血管径や血流量の変化を測定する方法は、非常に特異性が高い。ただし、動脈内にカテーテルを挿入することは、被験者に大きな負担を強いることが懸念される。腎動脈での血管機能も測定可能であるが、直接に腎動脈における血管反応性を検討した報告はない。心脈管作動物質を経静脈的に投与して、クリアランス法により血流量を測定することで腎での血管内皮機能としての代用がなされている。²⁴

2) 動脈スティフネス

動脈の硬さ（動脈スティフネス）を評価することは、動脈硬化の病態、成因、進展過程を解明し、治療戦略を立てる上で、非常に重要である。動脈スティフネスは、血管平滑筋量、弾性繊維量（エラスチン量）、カルシウムの沈着量や粥種の有無により規定される。臨床上、動脈スティフネスの評価として、pulse wave velocity (PWV)、cardio ankle vascular index (CAVI)、augmented index (AI)、ankle brachial index (ABI) やintima media thickness (IMT) が用いられている。

a) 脈波伝播速度 (PWV)

PWVとは、心臓から駆出された血液が動脈の脈動により末梢へと伝播する脈波が、動脈を伝わる速度である。PWVは、動脈上の2点間の距離（L）と、その間を伝わる脈波伝播時間（T）から算出される指標（ $PWV = L/T$ ）である。PWVは、動脈壁の硬さに比例することから、動脈スティフネスを反映している。欧米においては、PWVとして、頸動脈と大腿動脈の2点間から測定するcarotid-femoral PWV (cfPWV) が測定されている。測定原理より、測定部位は下行大動脈の不特定な一点から大腿動脈までであり、大動脈スティフネスを評価する検査のゴールドスタンダードである。我が国をはじ

めとしたアジア諸国では、上腕と足首の2点間で測定するbrachial-ankle PWV (baPWV) が、広く用いられている。同法は、大動脈のような弾性動脈での測定部位が少なく、下肢動脈のような筋性動脈部位で大半が測定されているということもあり、動脈スティフネスを正確に反映できているかの疑問は残っているが、cfPWVとbaPWVには、良好な相関が認められることも確認されている。

baPWVの基準値を明確に示した研究はないが、心血管イベントの予測等の指標から、動脈スティフネスの指標としては、1800 cm/sec程度が妥当と考えられている。²⁵ また、cfPWVにおいても、明確な基準値はないが、年齢、性別や血圧値ごとに、大まかな基準値の設定がなされており、動脈スティフネスの指標としては、1000 cm/sec程度と考えられている。特に、baPWV測定する際には注意点が必要ある。baPWVは、閉塞性動脈硬化症や大動脈弁狭窄症を合併する症例では低値となり、心房細動のような不整脈の合併例では精度が低下する。血管不全学会より、専用測定器での測定値を基に、測定法の標準化、正常値も設定されている。¹³

b) CAVI

CAVIは、baPWVが血圧の影響を強く受けることに對し、血圧に依存しない動脈スティフネスを測定するために開発された。CAVIは、stiffness parameter β 理論をもとに、Bramwell-Hillの式を応用することで動脈スティフネスを定量化したものである。CAVI算出の基本には、心臓と足首の2点間で測定されるPWVが用いられている。CAVI測定時には、baPWV同様に、閉塞性動脈硬化症、大動脈弁狭窄症・閉鎖不全症、不整脈の合併例では、測定精度が低下する。現在、CAVIを用いた大規模臨床試験も企画・進行しており、結果が待たれる。血管不全学会より、フクダ電子の専用測定器 (VaSera) での測定値を基に、測定法の標準化、正常値も設定されている。¹³

c) AI

AIは、心臓からの血液の駆出によって生じた駆動圧と、駆動圧波が心血管系を伝わり反射して戻ってきた反射圧波の比率である。AI算出に必要な中心動脈圧測定法には、カテーテルを用いた大動脈圧測定 (中心血圧AI) やトノメトリ法による頸動脈圧測定 (頸動脈AI) がある。簡便かつ非侵襲的な方法として橈骨動脈で記録した脈形から大動脈圧波形を推定し、AIを算出する方法 (橈骨動脈AI) が汎用されている。橈骨動脈AIと中心動脈AIに良好な相関があることも確認されている。

d) Stiffness β

Stiffness β は、頸動脈超音波エコーにより動脈の進展性を評価する方法であり、頸動脈の直径変化と血圧から算出される [$\beta = \ln (P/P) / (\Delta D/D)$]。式に示されているようにstiffness β は、動脈断面径と血圧変動による動脈断面径変化率である。血圧に影響されないといった利点はあるものの、測定には熟練した技術が必要であり、検査時間も長くなるため汎用性は高くない。また、Stiffness β は、測定系から、局所の動脈の硬さを反映していると考えられ、全身の動脈硬化の指標には適さない可能性がある。

e) ABI

ABIは、足首の収縮期血圧を上腕動脈の収縮期血圧で除することで算出される。通常、下肢の収縮期血圧は上肢よりも高値となるため、健常者のABIは1.0以上である。ABIは、末梢動脈疾患の診断指標としてだけでなく、心血管リスク評価指標として臨床的に有用である。測定法のゴールドスタンダードは、ドブラ法を用いた方法である。カフとドブラ聴診器を用いて、左右の足背動脈および後脛骨動脈と、両側の上腕動脈の収縮期血圧を測定する。米国心臓協会の診断基準では、0.9未満であれば動脈閉塞の疑いあり、0.8未満であれば動脈閉塞の可能性が高い、0.5~0.8であれば動脈閉塞が少なくとも一箇所ある、0.5未満であれば動脈閉塞が複数あるとしている。測定には、ドップラー法とオシロメトリック法が用いられている。ドップラー法は、個々の動脈で測定でき、低圧でも測定可能であるが、測定手技に熟練を要することや4箇所の血圧を別々に測定することによる時間的誤差を生じる可能性がある。最近、簡便にABIを測定できる機器が汎用されている。

f) IMT

血管超音波により、血管壁は内側より高エコー層、低エコー層、高エコー層の3層として観察でき、内腔側の高エコー層と低エコー層を合わせたものをIMTとしている。内頸動脈では、最大肥厚部とその中枢側1cm、遠位側1cmの3点を計測し、平均IMTとして算出している。内頸動脈IMTの正常値は設定されていないが、一般に、1.1mm未満を正常としている。IMTが1.1mmを越えると脳血管イベント発症率が上昇すること、1.6mm以上では、冠動脈イベント発症率が上昇することが知られている。²⁶ IMT測定時には、同時にプラークの有無、血流速度や血管狭窄度を観察できる。IMTは、下肢動脈や上肢動脈においても観察可能である。筆者らは、上腕動脈IMTが、動脈硬化の程度をよく反映すること、内頸動脈

IMTや血管内皮機能の指標であるFMDと相関することを確認した。²⁷IMT測定は、全身の動脈硬化の程度を反映していると考えられるが、IMT自体は、動脈硬化との直接の関連はない可能性も示唆されている。

3) バイオマーカーとしての心脈管作動物質

一般に、動脈硬化のサロゲートマーカーとして、冠危険因子や各種生理学的手法による血管機能の測定値が用いられている。血管機能のサロゲートマーカーとして、血中あるいは尿中のバイオマーカーを測定することが最も簡便で非侵襲的であるが、残念なことに評価に耐えうるだけのバイオマーカーが存在していないのが現状である。血管内皮機能に限ってみても、NOの代謝産物であるNO_x、あるいはcGMP、さらに血管内皮障害を反映する物質としてvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)、von Willebrand factor (vWF)などの濃度を測定することにより血管内皮機能の評価が試みられているが、直接にNO産生を反映していない可能性があること、測定精度等の様々な問題が存在している。これらバイオマーカーの測定は、生理学的手法を用いての血管機能評価法の補助的な位置付けと考えるべきである。バイオマーカーが、血管機能の指標として特異性が高ければ、血中や尿中濃度を測定することで評価可能となり被験者自体に大きなメリットがあり、大規模臨床試験やコホート研究での利用も可能となってくる。

a) 炎症バイオマーカー

C reactive protein(CRP)/high sensitivity CRP(hsCRP)

CRPは、主に、炎症性サイトカインによって肝臓で産生されるが、マクロファージや血管平滑筋細胞においても局所にも産生される。炎症の指標として最も汎用されているのはCRPである。近年、心血管イベント発症予測のバイオマーカーとしてhsCRPの有用性も確立されている。しかし、CRPあるいはhsCRP自体が、独立した予後規定因子となり得るかに関しては、否定的な見解が多い。測定法が標準化されているために、国際共同研究等で使用できる利点もある。

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6は、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、血管内皮細胞、脂肪細胞など多くの細胞より産生される炎症性サイトカインであり、受容体への結合を介して非常に多面的な作用を有している。IL-6は、血管内皮細胞におけるICAM-1の発現誘導を増加させ、マクロファ-

ジを刺激してmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の産生に働き、CRPの誘導因子として作用し、炎症により惹起されるアミロイドAアミロイドーシスに關与するserum amyloid A誘導増強、さらに好中球の機能、遊走能を増強させることで、炎症の維持・進展に強く関与している。実際、狭心症患者で、IL-6値が高値であること、IL-6値が心血管イベント発症に關連することも報告されている。^{28,29}IL-6以外にも、IL-8は、主に好中球の活性化や遊走能増強作用を有しており、IL-18は、主に活性化マクロファージで産生され、ガンマ型インターフェロンの産生誘導を介して、活性酸素やTNF- α の産生を惹起して血管障害に關与している。

Pentraxin 3 (PTX3)

PTX3は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、白血球、やマクロファージなどで発現し、炎症刺激下に発現が増強する急性炎症性タンパクである。不安定狭心症の患者で、PTX3の血中濃度が上昇していることが知られており、特に冠動脈での不安定プラーク形成に重要な役割をはたしていると考えられている。³⁰PTX3濃度が心血管イベント発症に關連しているとのメタ解析もある。不安定狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患のマーカーとして期待される。

b) 酸化ストレスバイオマーカー／脂質性バイオマーカー

残念ながら、特異的な酸化ストレスバイオマーカーが存在していないのが現状である。したがって、血管機能の評価に特化したバイオマーカーもない。ただ、これまでの酸化ストレスバイオマーカー確立のために、多くの試みがなされている。スピントラップ法による活性酸素種の直接測定、抗酸化機構を構成するスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性を評価するためのMn-SOD活性の測定、カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定、抗酸化物質であるグルタチオン、ビリルビン(間接ビリルビン)やビタミンC、Eの血中濃度測定、さらに、活性酸素の反応物質や代謝物質の測定として、DNA損傷過程で生成される8-ヒドロキシデオキシグアノシン、グアノシンのニトロ化修飾核酸である8-ニトログアノシン、DNA塩基損傷部位であるAP site、アラキドン酸カスケードの代謝物質であるF2-イソプロスタン、脂質バイオマーカーとして捉えても良いが、酸化LDL、酸化LDL受容体LOX-1、マロンジアルデヒド修飾LDL、ミエロペルオキシデースに過酸化脂質の濃度測定が可能である。NO自体も分類上は、活性酸素種である。各種測定酸化ストレスマーカーと動脈硬化や血管機能との関連も報告されているが、心血管イベントの発症や長

期予後を予測するマーカーとなり得るかどうかは、今後の研究に期待される。

c) 代謝性バイオマーカー

アディポネクチン

アディポネクチンは、脂肪細胞より分泌される生理活性物質であり、善玉アディポサイトカインと称される。通常、アディポネクチンは、各臓器でのAMP-activated protein kinaseとperoxisome proliferator-activated receptor α を活性化させ、脂肪酸の燃焼やグルコースの取り込みを亢進させ、抗動脈硬化作用およびインスリン感受性亢進作用を有する。アディポネクチンは、血管内皮細胞におけるNOの生物学的活性の上昇や抗炎症作用、心筋保護作用を有している。血中アディポネクチン濃度は、内臓脂肪量の増加、糖尿病、冠動脈疾患において低下していることが報告されている。^{31, 32}

終末糖化産物(advanced glycation end products: AGEs)/AGEs受容体 (RAGEs)

AGEsは、血管内皮細胞膜上に存在するRAGEと結合することにより、NADPHオキシダーゼを活性化し、活性酸素を産生させる。活性酸素は、NOと非常に高い結合親和性を有しており、NOの不活性化に寄与する。さらに、産生された活性酸素はNOと結合することにより非常に強い細胞毒性を有するペルオキシナイトライトに変換される。また、AGEsが直接にeNOSの活性を低下させる可能性もある。これまで、血中AGEs濃度が、2型糖尿病患者で高値であること、心血管イベント発症の独立予測因子であること、baPWVと相関し、FMDと逆相関が認められることが報告されている。^{33, 34} AGEs増加を伴う心血管疾患と酸化ストレス、慢性炎症の存在は悪循環を形成し、血管内皮機能障害から動脈硬化の維持・進展につながると考えられる。

d) 血管内皮機能バイオマーカー

前述のバイオマーカーは、全て、血管内皮機能バイオマーカーと言っても過言ではない。重複しない形で、血管内皮機能バイオマーカーの可能性に関して記載したい。

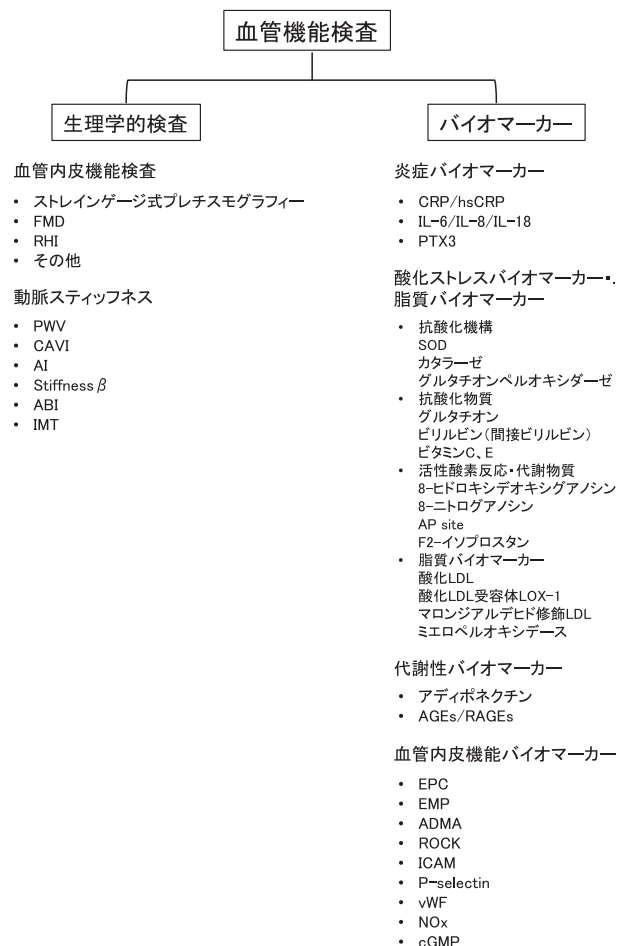
血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC)

骨髄より動員されたEPCの分化・増殖により血管新生が生じることが明らかとなってきた。EPCは障害された血管の再内皮化にも重要な役割をはたしている。血中のEPC数やコロニー形成能が、血管内皮機能と相関することや心血管イベント発症の規定因子となり得ることも示唆されている。^{35, 36} EPC数は、フローサイトメトリーによ

り測定可能である。細胞数だけではなく、細胞遊走能や細胞増殖能といった細胞機能を評価することも重要であり、測定も可能である。EPC数や機能の測定は血管内皮機能評価のバイオマーカーとして有望であると考えられるが、手技が複雑であり、簡便性の面から、測定法の改良、開発が待たれる。

Endothelial microparticles (EMP)

マイクロパーティクルは、各種サイトカイン刺激による細胞の活性化、シェアストレスや低酸素などの生理学的刺激やアポトーシスにより血管内皮細胞、血小板や白血球などから血中に放出される。血管内皮細胞より放出されるものをEMPと総称している。心血管合併症を有する患者において、EMPの血中濃度が上昇していることが知られている。³⁷ EMP自体が直接に、eNOS/NO経路の障害を介して、NO産生を減少させることが想定されている。EMPは、フローサイトメトリーにより測定されるが、これまた手技が煩雑で、簡便な測定はできていない。



図説. 血管機能評価法：生理学的検査とバイオマーカー

内因性NO合成阻害物質（ADMA）

ADMAは、アルギニンを基質として産生されるアルギニン誘導体のひとつである。ADMAは、L-アルギニンアナログであるためeNOSに対する拮抗阻害作用を有する。血中ADMA濃度が、冠動脈疾患や冠危険因子有する群において上昇していることや血管内皮機能障害の程度と逆相関していることも報告されている。³⁸これらの結果より、ADMAは、eNOS阻害作用により血管内皮機能低下に関与していることが示唆される。ADMAは、HPLC法でもELISA法でも比較的簡便に測定可能である。

Rho-associated kinase（ROCK）

ROCKは、血管において、血管平滑筋細胞のCa感受性亢進による血管トーンの上昇、細胞接着、細胞増殖、血管リモデリングに関与している。ROCKの活性化は、eNOS mRNAの安定化を阻害し、Aktのリン酸化を抑制することによりeNOS活性化を抑制することで、血管内皮機能障害に関与としている。³⁹臨床的には、ROCK活性は、ROCK阻害薬の動脈内投与による血管径や血流量変化を測定することで評価されてきたが、被験者への侵襲性が高いため、白血球でのmyosin-binding subunitのリン酸化とtotal myosin-binding subunitの比をWestern blotにより測定することも可能である。⁴⁰同法により、被験者の負担は大幅に軽減されるが、それでも簡便で正確な検査とは言いがたい。

可溶性ICAM-1（sICAM-1）、可溶性P-selectin（sP-selectin）

ICAM-1は、血管内皮細胞上に発現する接着因子であり、白血球上に発現する接着分子をリガンドにして結合し、白血球の血管内皮細胞への接着を介添える。P-selectinは、血小板膜表面上に発現する接着因子であり、血小板と白血球間において細胞相互作用をもたらす。sICAM-1やsP-selectinなどの可溶性接着分子が、急性冠動脈疾患において増加していることが報告されている。⁴¹

vWF

vWFは、巨核球と血管内皮細胞から産生され、血管損傷部位で、血小板凝集・粘着による血栓の形成、凝固第VIII因子の安定化に大きな役割をはたしているタンパク質である。vWF濃度は、動脈血栓症や急性冠動脈症候群で上昇することが示されているが、播種性血管内凝固症候群や血栓性血小板減少性紫斑病、運動やストレスなどでも上昇する。⁴²

IV. おわりに

高血圧、脂質異常症、糖尿病といった病態、肥満、喫煙、加齢、運動不足、閉経などの危険因子から動脈硬化の発症抑制、心血管イベント発症の予防、さらに治療戦略を立てる上でも血管機能を正確に評価することは重要である。より簡便で、非侵襲的で、再現性が良く、正確な血管機能評価法を手にした。2013年に、我が国を含めた国際的な取り組みとして、生理学的手法を用いた血管機能測定法の標準化を含めた血管機能測定ガイドラインの策定がなされたが、ガイドラインの改訂、バイオマーカーでの検討を含めた内容のブラッシュアップが必要である。血管機能評価に関する更なる知見の集積が待たれる。

REFERENCES

1. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension*. 1989 ; 13 : 658 – 667.
2. Lucher TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Am J Hypertens*. 1990 ; 3 : 317 – 330.
3. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990 ; 323 : 22 – 27.
4. Higashi Y, Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacology and Therapeutics*. 2004;102: 87 – 96.
5. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Oxidative stress and endothelial function in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009 ; 73 : 411 – 418.
6. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;2222 – 2229.
7. Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, Yoshimizu A, Saki N, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects-role of endothelium-derived nitric oxide-. *Circulation*. 1999 ; 100 : 1194 – 1202.
8. Sanada M, Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kodama I, Tsuda M, Nagai N, Ohama K. Relationship

- between the angiotensin-converting enzyme genotype and forearm vasodilation response to estrogen replacement therapy in postmenopausal. *J Am Coll Cardiol*. 2001 ; 37 : 1529–1535.
9. Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, Johnson A, Cronin J, Baron AD. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation*. 1997 ; 96 : 3287-3293.
 10. Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes. *Hypertension*. 1992 ; 20 : 253–263.
 11. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2002 ; 87 : 840–844.
 12. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 2002 ; 346 : 1954–1962.
 13. Tanaka A, Tomiyama H, Maruhashi T, Matsuzawa Y, Miyoshi T, Kabutoya T, Kario K, Sugiyama S, Munakata M, Uto H, Higashi Y, Inoue T, Node K. Physiological diagnosis criteria for vascular failure. *Hypertension*. 2018 ; 72 : 1060–1071.
 14. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Hemodynamic shear stress activates a K⁺ current in endothelial cells. *Nature* 1998 ; 331 : 168–170.
 15. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996 ; 79 : 984–991.
 16. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, Deanfield JE, MacAllister RJ. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo : relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2001 ; 88 : 145–151.
 17. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R ; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery : a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002 ; 39 : 257–65.
 18. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ ; Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I : Methodological issues for assessment in the different vascular beds : a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 ; 23 : 7–17.
 19. 松岡 秀洋、他. 心血管病サロゲートマーカーとしてのflow-mediated vasodilation測定とその標準化案. *臨床薬理*2007 ; 38 : 305.
 20. Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasan RS, Keaney JF Jr, Lehman BT, Fan S, O'Syriuk E, Vita JA. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community : The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004 ; 109 : 613–619.
 21. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Sasaki S, Hara K, Matsuura H, Goto C, Oshima T, Chayama K. Excess norepinephrine impairs both endothelium-dependent and -independent vasodilation in patients with pheochromocytoma : a comparison before and after adrenalectomy. *Hypertension*. 2002 ; 39 : 513–518.
 22. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995 ; 92 : 3431–3435.
 23. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol*. 2006 ; 101 : 545–548.
 24. Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Watanabe M, Matsuura H, Kajiya G. Effects of L-arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension. *Hypertension*. 1995;25: 898–902.
 25. Ninomiya T, Kojima I, Doi Y, Fukuhara M, Hirakawa Y, Hata J, Kitazono T, Kiyohara Y. Brachial-ankle pulse wave velocity predicts the development of cardiovascular disease in a general Japanese population : the Hisayama Study, *Journal of hypertension*. 2013 ; 31 : 477–483.

26. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Savage PJ, Borhani NO, Kittner SJ, Tracy R, Gardin JM, Price TR, Furberg CD. Thickening of the carotid wall. A marker for atherosclerosis in the elderly? Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *Stroke*. 1996 ; 27 : 224–231.
27. Iwamoto Y, Maruhashi T, Fujii Y, Idei N, Fujimura N, Shinsuke M, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Higashi Y. Intima-media thickness of brachial artery, endothelial function, and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 ; 32 : 2295–2303.
28. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995 ; 92 : 748–755.
29. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation : Part I. *Circulation*. 2003 ; 108 : 1917–1923.
30. Matsuura Y, Hatakeyama K, Imamura T, Tsuruda T, Shibata Y, Kodama T, et al. Different distribution of pentraxin 3 and C-reactive protein in coronary atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb*. 2012 ; 19 : 837–845.
31. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension*. 2003 ; 42 : 231–234.
32. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama*. 2004 ; 291 : 1730–1737.
33. Kilhøvd BK, Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Torjesen PA, Hanssen KF, Laakso M. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes : a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*. 2007 ; 50 : 1409–1417.
34. Kajikawa M, Nakashima A, Fujimura N, Maruhashi T, Iwamoto Y, Iwamoto A, Matsumoto T, Oda N, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Goto C, Aibara Y, Noma K, Takeuchi M, Yamagishi S, Higashi Y. Ratio of serum levels of AGEs to soluble form of RAGE is a predictor of endothelial function. *Diabetes Care*. 2015 ; 38 : 119–125.
35. Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Wacławski MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003 ; 348 : 593–600.
36. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005 ; 353 : 999–1007.
37. Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005 ; 16 : 3381–3388.
38. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) : a novel risk factor for endothelial dysfunction : its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 ; 98 : 1842–1847.
39. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 ; 290 : C661–C668.
40. Noma K, Goto C, Nishioka K, Jitsuiki D, Umemura T, Ueda K, Kimura M, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, Liao JK, Higashi Y. Roles of ROCK and oxidative stress in the pathogenesis of aortic stiffness. *J Am Coll Cardiol*. 2007 ; 49 : 698–705.
41. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993 ; 171 : 223–229.
42. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease : the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 1997 ; 96 : 1102–1108.

総説

末梢循環障害におけるTRPC 6の
生理的意義の解明と薬理的応用¹加藤 百合、²富田一沼賀 拓郎、^{1,2}島内 司、²西村 明幸、^{1,2}西田 基宏¹九州大学大学院 薬学研究院 生理学分野²自然科学研究機構生理学研究所(生命創成探究センター) 心循環シグナル研究部門

はじめに

本稿では、受容体駆動型カチオンチャネルであるTRPC 6チャネルの末梢循環障害における生理的役割とその治療標的としての有用性について概説する。

1. 末梢循環障害とTRPC 6チャネル

末梢循環障害とは、アテローム性動脈硬化症後の末梢血管の進行性閉塞などによって誘発される先進国における主な死亡原因の1つである¹。血管閉塞後には血流回復のために、既存の毛細血管や虚血組織の動脈からの血管新生や血管平滑筋細胞による毛細血管の被覆(毛細血管化)、および側副動脈の成熟(動脈新生)といった固有のメカニズムを持っている²⁻⁴。これまで、血管内皮細胞成長因子(VGEF:vascular endothelial growth factor)による血管新生の促進や、単球走化性タンパク質による炎症反応を促進するメカニズムが多く研究されてきたが、これらの成長因子およびケモカイン受容体は虚血後7日以内に発現が低下することが報告されていた^{4,5}。さらに、虚血後の末梢組織における血流回復と毛細血管の密度増加が相関していないことから^{6,7}、血流回復には血管新生よりも血管成熟が重要である可能性が高いと考えられた⁸。

その中で、我々は血管の主要な構成成分である血管平滑筋細胞に着目した。血管平滑筋は、血圧調節や血流など血管の恒常性の維持に重要な役割を果たしている⁸。

さらに、血管環境の変化に応じて血管平滑筋細胞は増殖能の高い増殖型と収縮能の高い収縮型に表現型を変化させる⁹⁻¹¹。この表現型の切り替えは、アテローム性動脈硬化症や血管形成術後の再狭窄など血管障害でよく観察される。血管平滑筋細胞の分化は、血管内皮細胞によって調節される。血管内皮細胞は、血管平滑筋細胞の増殖および分化のために、血小板由来成長因子(PDGF:platelet-derived growth factor)やトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β :Transforming growth factor- β)を分泌する⁸。さらに、一酸化窒素(NO)、プロスタグランジンI₂(PGI₂)、内皮由来過分極因子(EDHF:endothelium-derived relaxing factor)などの血管内皮由来の血管弛緩因子は虚血肢における側副動脈の発達に関与すると報告されていた¹²⁻¹⁴。しかし、これらが血管平滑筋細胞にどのように影響するかは不明であった。

Transient receptor potential (TRP)チャネルファミリーは、ショウジョウバエにおいて最初に発見された脊椎動物のカチオン輸送を担うチャネルである^{15,16}。感覚(痛みや熱)、免疫応答、血液循環など多くの生体機能への関与が報告されている¹⁷⁻¹⁹。TRPC(Transient receptor potential canonical)ファミリーはTRPC 1~C 7の7つのサブタイプで構成されており、このうちTRPC 6はホスホリパーゼCの下流で活性化されるジアシルグリセロール(DG)感受性の非選択的カチオンチャネルである²⁰(図1)。TRPC 6は脳や肺、心臓や血管など平滑筋細胞を多く持つ組織への発現が報告されており、血管内皮細胞の透過性、肺高血圧症などの心循環シグナルの制御に重要な役割を担っている²¹。

シロスタゾールは、間欠性跛行を伴う末梢動脈疾患(PAD:peripheral arterial disease)患者に臨床的に使用されるPDE 3阻害剤で、抗血小板作用や血管拡張作用

¹九州大学大学院薬学研究院 生理学分野
(〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1)

²自然科学研究機構生理学研究所(生命創成探究センター)
心循環シグナル研究部門

を示すことが知られている²²⁻²⁴。シロスタゾールは増殖因子の放出やNO合成酵素（eNOS）活性を増加させることにより血管新生を促進することが報告されているが²³⁻²⁵、これまで、虚血後の血流回復をシロスタゾールがどのように促進するのかは不明なままであった。我々は、シロスタゾールがTRPC 6の69番目のスレオニン残基（Thr69）のプロテインキナーゼA（PKA）によるリン酸化によりTRPC 6チャネル活性を抑制することで、血管平滑筋細胞を収縮型にシフトさせることを発見した（図

2）²⁶。以前の研究から、Thr69のリン酸化がTRPC 6チャネル活性を負に調節し、血管平滑筋細胞においてアンジオテンシンⅡ受容体活性化によるCa²⁺依存性応答を阻害することが知られている²⁷。これらの結果から、TRPC 6の活性調節が末梢循環障害へ寄与することが強く示唆されている。そこで、我々はTRPC 6欠損マウスを用いて、末梢循環障害とTRPC 6の関係を明らかにすることにした。

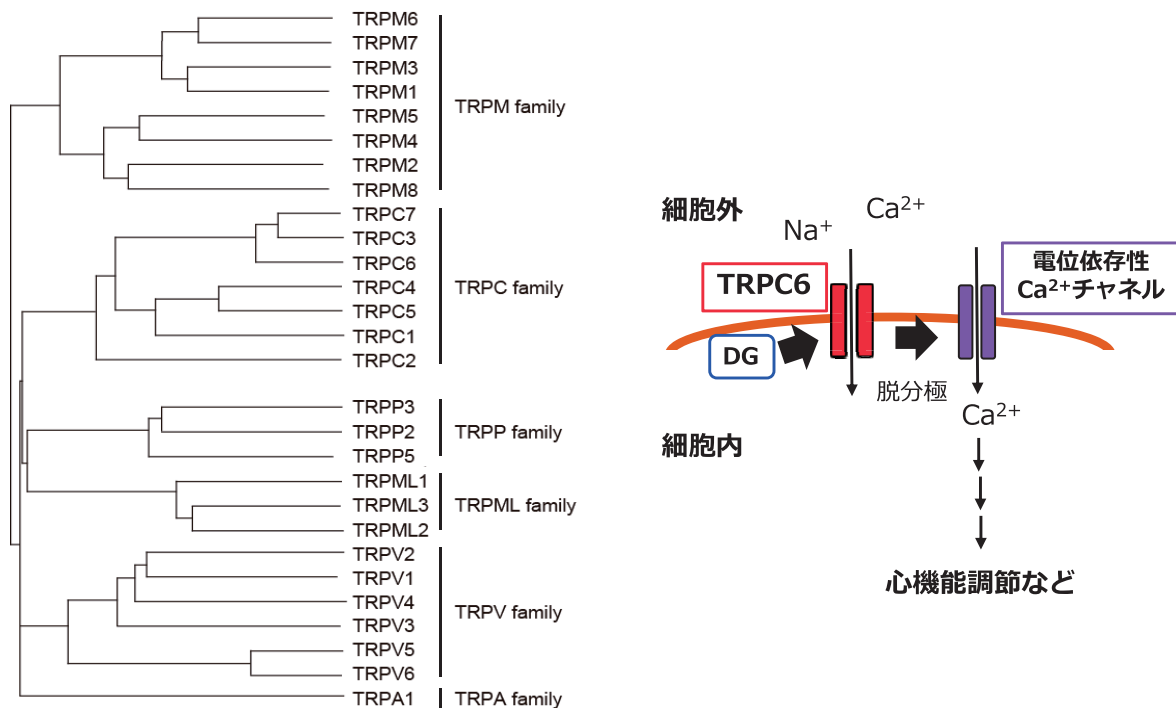


図1. TRPファミリーとTRPC 6活性化機構

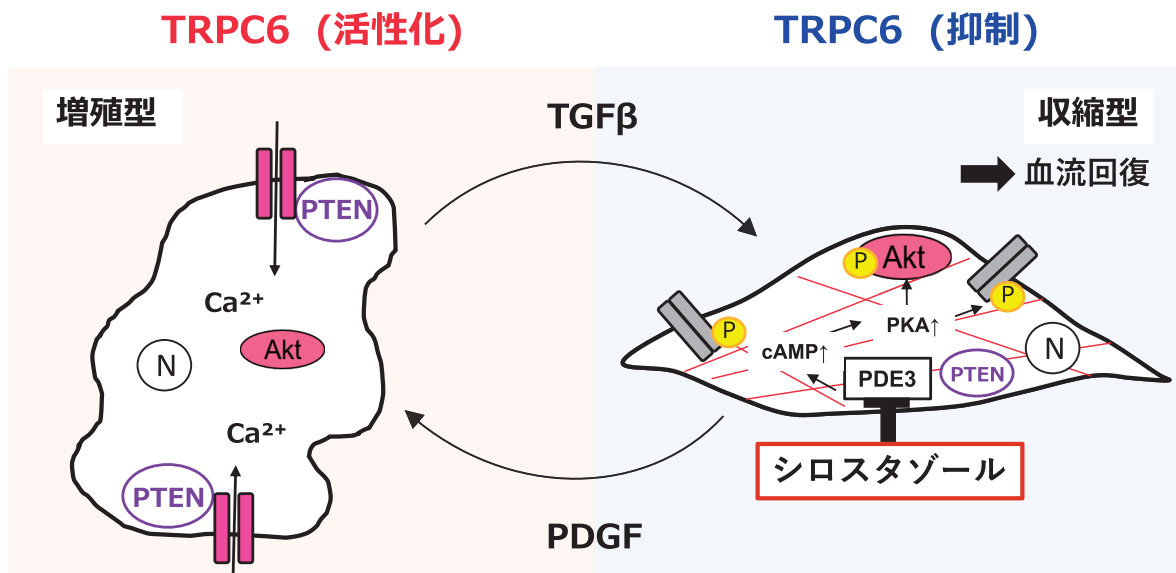


図2. TRPC 6活性制御による血管平滑筋細胞の表現型スイッチングとシロスタゾールの作用機序

2. TRPC 6 チャンネル阻害と虚血後の血流回復

左大腿動脈を結紮して下肢虚血 (PAD) モデルマウスを作製し、虚血肢、非虚血肢の血流をドップラー血流計で評価した²⁸ (図3)。野生型マウスにおいて、虚血処置14日後に虚血肢でTRPCファミリーのうち唯一TRPC 6のmRNA発現量が増加していた。さらに、TRPC 6欠損マウスにPAD処置をすると、野生型マウスと比較してTRPC 6欠損マウスの虚血肢では血管成熟マーカーである α -SMA陽性の血管数増加や血管径が増大し、血流回復が有意に亢進していた (図3)。これらの結果は、TRPC 6 チャンネルの抑制がPAD処置後、新たに形成された血管の成熟を促進していることを示唆している。

血管成熟には壁面せん断応力による血管内皮細胞の活性化が重要な役割を果たす。せん断応力によって内皮細胞から放出される代表的な血管弛緩因子であるNOとPGI₂は、血管成熟へ関与する^{12, 13, 29}。プロテインキナーゼG (PKG) のNO依存的な活性化やPKAのPGI₂依存的な活性化を介したTRPC 6のThr69リン酸化により、チャンネル活性が負に制御される^{27, 30, 31}。以上のことから、TRPC 6抑制による虚血後の血管成熟に血管内皮細胞の関与も推測されたため、これを検証した。PAD処置後にNOS阻害剤であるL-NAMEを野生型マウスに投与すると、血流の回復が大幅に減少したが、TRPC 6欠損マウスではL-NAMEの効果は見られなかった。PGI₂受容体の阻害剤であるCAY-10441投与においても、野生型マウスでは処置後の血流回復を減少させたが、TRPC 6欠損マウスでは減少しなかった。これらの結果は、TRPC 6抑制による虚血後の血管成熟がNOおよびPGI₂非依存的に起こることを示唆している。さらに、TRPC 6阻害が虚血後の内皮機能を増強するかどうか検討した。野生型マウ

ス腓腹筋においてeNOSおよびPGI₂シンターゼの発現量を調べたところ、PAD処置7日後に一時的に増加したが、処置21日後には通常値まで戻っていた。一方、TRPC 6欠損マウス腓腹筋において、PAD処置14日および21日後でもeNOSおよびPGI₂シンターゼの発現量は高いまま維持された。これらの結果から、TRPC 6の抑制が内皮機能を維持し、虚血後の血管成熟を促進すると推測される。

3. 血管平滑筋細胞におけるTRPC 6 チャンネル

これまでの検討から血管平滑筋細胞に発現しているTRPC 6が、虚血後の血流回復レベルを決定する重要な調節因子の1つである可能性が考えられた。そこで、TRPC 6欠損マウスの血管平滑筋にTRPC 6を特異的に発現させたマウスを作製し、虚血後の血流回復効果を検討した。血管平滑筋への特異的発現にはACTA 2プロモーターを使用した。ACTA 2プロモーター駆動の野生型TRPC 6遺伝子カセットをTRPC 6欠損マウスに導入しTRPC 6 KO/ACTA 2-TRPC 6 (WT) を作製した。KO/ACTA 2-TRPC 6 (WT) マウスは、TRPC 6欠損マウスと比較してPAD処置後の血流回復が著しく減少していた。この結果は、血管平滑筋細胞に発現しているTRPC 6チャンネルの活性調節が虚血後の血流回復の重要な決定要因の1つであることを示している。

シロスタゾールを実際に野生型マウスに前投与しPAD処置した結果、血管の分化マーカーであるCD31陽性の血管数だけでなく、 α -SMA陽性の血管数も増加し、血流回復が大幅に改善された。PAD処置したマウスの腓腹筋のTRPC 6のThr69リン酸化レベルをTRPC 6リン酸化特異的抗体を使用して解析した結果、野生型マウスにおいてPAD処置7日後で一時的に増加し、21日後には通常レベルに戻っていた。一方で、シロスタゾールを投与すると虚血後21日後でもTRPC 6のリン酸化を維持していた。TRPC 6欠損マウスにシロスタゾールを投与しても、コントロール群と比較して虚血後の血流回復に効果は観察されなかったが、KO/ACTA2-TRPC 6 (WT) マウスに投与すると血流回復を有意に促進し、 α -SMA陽性の血管数増加や血管径が増大していた。さらに、TRPC 6のThr69をアラニンに置換した変異体 (T69A) を血管平滑筋特異的に発現させたKO/ACTA 2-TRPC 6 (T69A) マウスを作製し、このマウスにシロスタゾールを投与しても血流回復に影響を与えなかった。以上のことから、シロスタゾールは血管平滑筋細胞に発現しているTRPC 6のThr69リン酸化依存的にチャンネル活性を抑制することで血管新生と血管成熟の両方を増進させ、虚血処置後の血流回復を促進することが明らかになった。

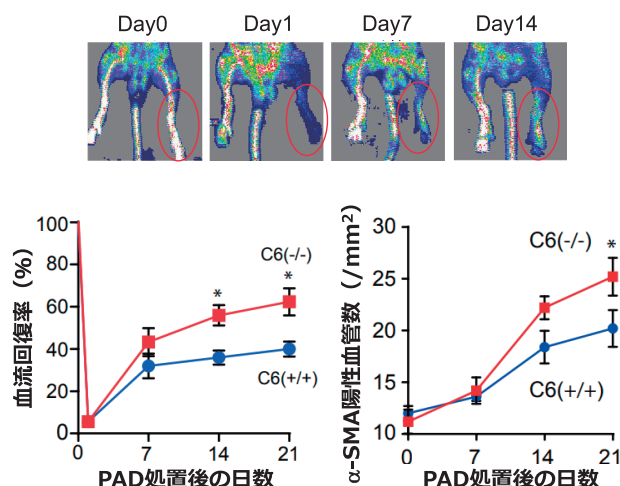


図3. PAD処置後のマウス下肢の血流回復

処置前をDay 0として、処置1, 7, 14日後の血流をドップラー計を用いて測定した。赤丸で囲んでいる左後肢を処置した。

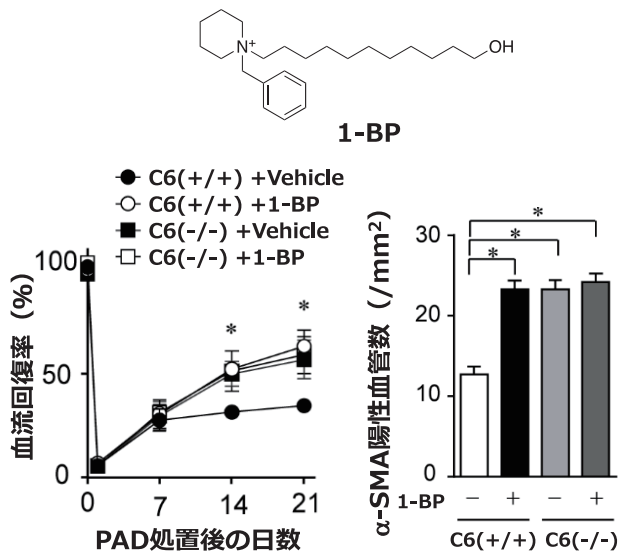


図4. TRPC6 阻害剤 (1-BP) におけるPAD処置後の血流回復効果

4. TRPC6 阻害剤 (1-BP) の末梢循環障害における治療効果

シロスタゾールは間欠性跛行に対して効果が得られている唯一の治療薬である一方で、PDE 3 阻害作用を持つためうっ血性心不全など重度な心不全がある末梢動脈疾患患者には使用禁忌である。そこで、幅広く使用できるシード化合物を見つけるために新たなTRPC 6 阻害剤の探索を行った³²。TRPC 6 阻害が血管平滑筋細胞の分化を促進することに着目し、ファーストスクリーニングとしてTRPC 6 を介したCa²⁺流入阻害を、セカンドスクリーニングとしてラット大動脈平滑筋細胞を用

いて平滑筋細胞の分化状態を指標に検討した。その結果、1-BP (1-Benzyl-1-(11-hydroxyundecyl)piperidin-1-ium chloride) を同定した (図4)。PAD処置をした野生型マウスとTRPC 6 欠損マウスに1-BPを投与した結果、TRPC 6 欠損マウスでは1-BPを投与してもPAD処置後の血流回復には影響を及ぼさなかった (図4)。一方で、PAD処置した野生型マウスに1-BPを投与すると、TRPC 6 欠損マウスに匹敵するレベルまで有意に血流回復が促進した (図4)。TRPC 6 のThr69リン酸化レベルを検討した結果、1-BPを投与してもコントロール群と差が見られなかったことから、1-BPはシロスタゾールとは異なるメカニズムで作用していることが明らかになった。さらに、虚血処置により萎縮した腓腹筋の1細胞あたりの面積も、1-BP投与により萎縮が改善されていた。既知のTRPC 6 阻害剤であるpyrazole-2をマウスに投与しても虚血後の血流回復の促進効果は得られるが、興味深いことに1-BPを投与することで血流回復だけではなく、虚血処置21日後、28日後での歩行量も大幅に上昇した。これらの結果から、1-BPはTRPC 6 阻害を介して血流を回復し、歩行能も改善させることが明らかになった。

5. 血管内皮機能障害時における血管平滑筋TRPC 6 阻害作用

末梢動脈疾患患者において、動脈硬化、加齢など様々な複合的な要因により血管内皮機能が既に障害を受けていることもある。そこで、1-BPによるTRPC 6 阻害を介した血流回復効果における内皮機能の関与を調べるために、内皮機能障害モデルとしてlow density lipoprotein

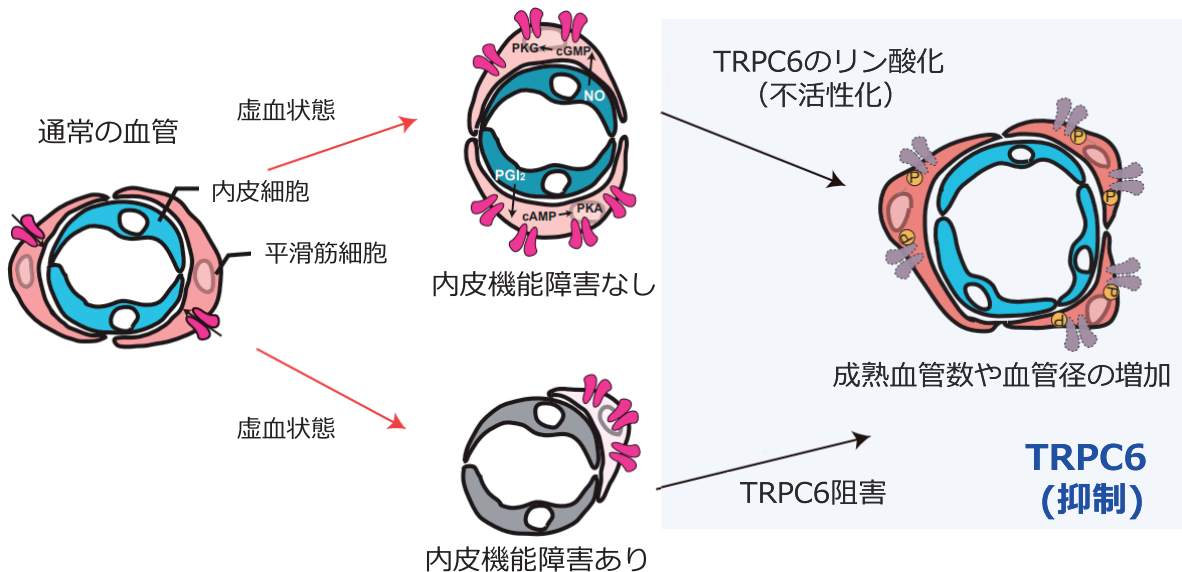


図5. 末梢循環障害におけるTRPC6の役割

receptor (LDLr) 欠損マウスを使用し検証した。LDLr 欠損マウスと野生型マウスに高脂肪食を1か月間与えた後、虚血処置を行った。高脂肪食を与えたLDLr欠損マウスは、アセチルコリンによる内皮依存的な血管の弛緩が野生型マウスより弱いこと、つまり内皮機能障害が生じていることを確認した。PAD処置後、LDLr欠損マウスでは血流回復が大幅に減少したが、1-BPによって回復した。さらに、虚血肢の成熟血管数は、1-BPを投与した野生型マウスおよびLDLr欠損マウスの両群で有意に増加した。以上のことから、1-BPが内皮機能障害モデルにおいても、TRPC6 阻害を介して血管成熟を促進し、血流を改善することを示している。

6. さいごに

我々は血管平滑筋に発現するTRPC6に着目し、TRPC6チャネル阻害が内皮機能障害に依存せず虚血後の血流回復を促進することを明らかにした(図5)。血管内皮機能障害は、加齢、高血圧、高血糖、動脈硬化など様々な環境要因によって引き起こされる。しかしながら、TRPC6チャネル阻害による血流回復効果はこれらの影響を受けづらいため、今後は幅広い末梢循環障害に対してTRPC6が有効な治療標的として期待される。

7. 謝辞

この度は第52回日本心脈管作動物質学会において研究奨励賞に選出いただき、心より御礼申し上げます。本稿を執筆する機会を与えて頂きました心脈管作動物質学会にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

1. Bonaca, M. P.; Hamburg, N. M.; Creager, M. A., Contemporary Medical Management of Peripheral Artery Disease. *Circulation research* 2021, 128 (12), 1868–1884.
2. Schaper, W., Collateral circulation: past and present. *Basic research in cardiology* 2009, 104 (1), 5–21.
3. Faber, J. E.; Chilian, W. M.; Deindl, E.; van Royen, N.; Simons, M., A brief etymology of the collateral circulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2014, 34 (9), 1854–9.
4. Haas, T. L.; Lloyd, P. G.; Yang, H. T.; Terjung, R. L., Exercise training and peripheral arterial disease. *Comprehensive Physiology* 2012, 2 (4), 2933–3017.
5. Fung, E.; Helisch, A., Macrophages in collateral arteriogenesis. *Frontiers in physiology* 2012, 3, 353.
6. Couffignal, T.; Silver, M.; Zheng, L. P.; Kearney, M.; Witzensbichler, B.; Isner, J. M., Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998, 152 (6), 1667–79.
7. Sullivan, C. J.; Doetschman, T.; Hoying, J. B., Targeted disruption of the Fgf2 gene does not affect vascular growth in the mouse ischemic hindlimb. *J Appl Physiol* (1985) 2002, 93 (6), 2009–17.
8. LeBlanc, A. J.; Krishnan, L.; Sullivan, C. J.; Williams, S. K.; Hoying, J. B., Microvascular repair: post-angiogenesis vascular dynamics. *Microcirculation* 2012, 19 (8), 676–95.
9. Bennett, M. R.; Sinha, S.; Owens, G. K., Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research* 2016, 118 (4), 692–702.
10. Davis-Dusenbery, B. N.; Wu, C.; Hata, A., Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011, 31 (11), 2370–7.
11. Frisantiene, A.; Philippova, M.; Erne, P.; Resink, T. J., Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular signalling* 2018, 52, 48–64.
12. Otsuka, H.; Akashi, H.; Murohara, T.; Okazaki, T.; Shintani, S.; Tayama, K.; Sasaki, K.; Imaizumi, T.; Aoyagi, S., The prostacyclin analog beraprost sodium augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by autologous bone marrow cells. *Annals of vascular surgery* 2006, 20 (5), 646–52.
13. Park, B.; Hoffman, A.; Yang, Y.; Yan, J.; Tie, G.; Bagshahi, H.; Nowicki, P. T.; Messina, L. M., Endothelial nitric oxide synthase affects both early and late collateral arterial adaptation and blood flow recovery after induction of hind limb ischemia in mice. *Journal of vascular surgery* 2010, 51 (1), 165–73.
14. Troidl, C.; Nef, H.; Voss, S.; Schilp, A.; Kostin, S.; Troidl, K.; Szardien, S.; Rolf, A.; Schmitz-Rixen, T.; Schaper, W.; Hamm, C. W.; Elsässer, A.; Möllmann, H., Calcium-dependent signalling is essential during collateral growth in the pig hind limb-ischemia model. *J Mol Cell Cardiol* 2010, 49 (1), 142–51.
15. Minke, B., The history of the Drosophila TRP

- channel : the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* 2010, 24 (4), 216 – 33.
16. Ramsey, I. S. ; Delling, M. ; Clapham, D. E., An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006, 68, 619 – 47.
17. Clapham, D. E., TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003, 426 (6966), 517 – 24.
18. Parenti, A. ; De Logu, F. ; Geppetti, P. ; Benemei, S., What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *British journal of pharmacology* 2016, 173 (6), 953 – 69.
19. Inoue, R. ; Jensen, L. J. ; Shi, J. ; Morita, H. ; Nishida, M. ; Honda, A. ; Ito, Y., Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circulation research* 2006, 99 (2), 119 – 31.
20. Nishida, M. ; Tanaka, T. ; Mangmool, S. ; Nishiyama, K. ; Nishimura, A., Canonical Transient Receptor Potential Channels and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity. *J Lipid Atheroscler* 2020, 9 (1), 124 – 139.
21. Smith, K. A. ; Voiriot, G. ; Tang, H. ; Fraidenburg, D. R. ; Song, S. ; Yamamura, H. ; Yamamura, A. ; Guo, Q. ; Wan, J. ; Pohl, N. M. ; Tauseef, M. ; Bodmer, R. ; Ocorr, K. ; Thistlethwaite, P. A. ; Haddad, G. G. ; Powell, F. L. ; Makino, A. ; Mehta, D. ; Yuan, J. X., Notch Activation of Ca (2+) Signaling in the Development of Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015, 53 (3), 355 – 67.
22. Kherallah, R. Y. ; Khawaja, M. ; Olson, M. ; Angiolillo, D. ; Birnbaum, Y., Cilostazol : a Review of Basic Mechanisms and Clinical Uses. *Cardiovascular drugs and therapy* 2021.
23. Biscetti, F. ; Pecorini, G. ; Arena, V. ; Stigliano, E. ; Angelini, F. ; Ghirlanda, G. ; Ferraccioli, G. ; Flex, A., Cilostazol improves the response to ischemia in diabetic mice by a mechanism dependent on PPARgamma. *Molecular and cellular endocrinology* 2013, 381 (1 – 2), 80 – 7.
24. Biscetti, F. ; Pecorini, G. ; Straface, G. ; Arena, V. ; Stigliano, E. ; Rutella, S. ; Locatelli, F. ; Angelini, F. ; Ghirlanda, G. ; Flex, A., Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *International journal of cardiology* 2013, 167 (3), 910 – 6.
25. Hori, A. ; Shibata, R. ; Morisaki, K. ; Murohara, T. ; Komori, K., Cilostazol stimulates revascularisation in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2012, 43 (1), 62 – 5.
26. Numaga-Tomita, T. ; Shimauchi, T. ; Oda, S. ; Tanaka, T. ; Nishiyama, K. ; Nishimura, A. ; Birnbaumer, L. ; Mori, Y. ; Nishida, M., TRPC 6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential-dependent coupling with PTEN. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019, 33 (9), 9785 – 9796.
27. Nishioka, K. ; Nishida, M. ; Ariyoshi, M. ; Jian, Z. ; Saiki, S. ; Hirano, M. ; Nakaya, M. ; Sato, Y. ; Kita, S. ; Iwamoto, T. ; Hirano, K. ; Inoue, R. ; Kurose, H., Cilostazol suppresses angiotensin II-induced vasoconstriction via protein kinase A-mediated phosphorylation of the transient receptor potential canonical 6 channel. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011, 31 (10), 2278 – 86.
28. Numaga-Tomita, T. ; Shimauchi, T. ; Kato, Y. ; Nishiyama, K. ; Nishimura, A. ; Sakata, K. ; Inada, H. ; Kita, S. ; Iwamoto, T. ; Nabekura, J. ; Birnbaumer, L. ; Mori, Y. ; Nishida, M., Inhibition of TRPC 6 promotes capillary arterIALIZATION during post-ischemic blood flow recovery. *British journal of pharmacology* 2022.
29. Waldron, G. J. ; Cole, W. C., Activation of vascular smooth muscle K+ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 1999, 26 (2), 180 – 4.
30. Shen, B. ; Kwan, H. Y. ; Ma, X. ; Wong, C. O. ; Du, J. ; Huang, Y. ; Yao, X., cAMP activates TRPC 6 channels via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B(PKB)-mitogen-activated protein kinase kinase(MEK)-ERK 1 / 2 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 2011, 286 (22), 19439 – 45.
31. Takahashi, S. ; Lin, H. ; Geshi, N. ; Mori, Y. ; Kawarabayashi, Y. ; Takami, N. ; Mori, M. X. ; Honda, A. ; Inoue, R., Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC 6. *The Journal of physiology* 2008, 586 (17), 4209 – 23.
32. Shimauchi, T. ; Numaga-Tomita, T. ; Kato, Y. ;

Morimoto, H.; Sakata, K.; Matsukane, R.; Nishimura, A. ; Nishiyama, K. ; Shibuta, A. ; Horiuchi, Y. ; Kurose, H. ; Kim, S. G. ; Urano, Y. ; Ohshima, T. ; Nishida, M., A TRPC 3 / 6 Channel Inhibitor Promotes Arteriogenesis after Hind-Limb Ischemia. *Cells* 2022, 11 (13).

日本心脈管作動物質学会 学会誌「血管」投稿規定

投稿論文は、その内容が未投稿・未掲載であって、独創的な知見を含むものに限ります。

すべての著者は原稿の内容を理解していること、投稿について同意していることが必要です。なお、日本心脈管作動物質学会の会員以外からの投稿も受け付けます。

I. 論文種別

巻頭総説、総説、一般論文、若手研究者による最新海外情報、世界の研究室便り（留学先の研究室報告）を受け付けます。

用語は日本語とします。

1. 総説

(1) 投稿による総説：著者の関与する研究についての最近の成果をまとめたもので、主題が明確な論文。

(2) 招待による総説：理事、評議員、編集委員が執筆、推薦、依頼する論文。

2. 一般論文

著者の原著であり、独創的研究で得られた有意義な新知見を含む論文。

II. 原稿様式・記載方法

1. タイトルページ

論文タイトル、著者名、責任著者情報（名前、所属機関、住所、電話番号、Fax番号、E-mailアドレス）を和文と英文で記載して下さい。

2. 内容

心脈管作動物質に関連した内容でお書き下さい。

3. 原稿様式

- すでに公表された図表・文章を再利用するときは、転載元の出版社等から許諾を取って下さい。図表の再利用は説明文中に明記し、文章の再利用はフットノートに明記して下さい。図表を改変して用いるときは説明文中に「改変」と断り、その出典元を明記して下さい。
- 字数は、巻頭総説、総説、および一般論文は全角16,000字程度、若手研究者による最新海外情報は全角8,000字程度、世界の研究室便りは全角8,000字程度を大まかな目安として執筆して下さい。
- 原稿は、本文と表はWordファイルで、図はPowerPointファイルで作成して下さい。
- 字体はMS明朝などの明朝体を用いて下さい。
- 本文中の項目は次のランクづけをお願いします。

I. ……左右中央（2行ドリ）、太字

1) ……左寄せ（1行ドリ）

a) ……左寄せ（1行ドリ）

- 原稿は、楷書、横書き、ひらがな、新かなづかい、口語体、当用漢字を用い、正確に句読点をつけ、句読点、かっこは1字を要し、改行の際は冒頭を1字分あけて下さい。
- 外国語で一般に日本語化しているものは、カタカナを用いても結構です。
- 数字はアラビア数字を用い、度量衡の単位は、mm, cm, ml, dl, μ g, g, kg, N/10などと記して下さい。

- 次の漢字はかな表示にして下さい。

勿論，唯，夫々，及び，各々，並び，殆ど，但し，併せる，全て，更に，為，何故，於いて，就く，我々，若，其，出来，共，所，事，誤，即ち，様

4. 引用文献及び注記

- 引用文献は雑誌掲載論文，書籍，単行本，インターネット，技術報告，特許，講演等とします。引用文献は主なものに限って掲載して下さい。
- 引用文献の出現順に通し番号を付け，番号順に並べてREFERENCESとして論文末尾に一覧表示して下さい。
- 本文中の引用箇所の右肩に番号を付して下さい。例「○○○1～2），○○○1～5）」
- 引用文献の記載には，著者名は全員を記し，first及び middle nameのイニシャルを記載して下さい。
- 過去の「血管」掲載論文の様式を参考にして下さい。

Ⅲ. 費用

1. 投稿手数料 無料
2. 掲載料 無料
3. 原稿料 なし
4. 別刷料 無料（50部を贈呈）※追加増刷の場合は，別途費用がかかります。

Ⅳ. その他

1. 著作権
 - 本誌に掲載された論文，抄録，記事等の著作権は日本心脈管作動物質学会に帰属します。
 - 本会は，これら著作権の全部または一部を，本会のホームページ，本会が認めたネットワーク媒体，その他の媒体において掲載し，出版することができます（電子出版を含む）。
2. 査読により論文の改訂をお願いすることがあります。

（施行 2018年12月 4 日）

日本心脈管作動物質学会会則

第1章 総 則

第1条 本会は日本心脈管作動物質学会（Japanese Society for Circulation Research）と称する。

第2条 本会の事務局は、三重県津市江戸橋2丁目174番地、三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野内に置く。

第2章 目的および事業

第3条 本会は心脈管作動物質に関する研究の発展を図り、会員相互の連絡および関連機関との連絡を保ち、広く知識の交流を求めることを持つて目的とする。

第4条 本会は前条の目的を達成するために次の事業を行う。

1. 学術講演会、学会等の開催
2. 会誌および図書の発行
3. 研究、調査および教育
4. 関係学術団体との連絡および調整
5. 心脈管作動物質に関する国際交流
6. その他本会の目的達成に必要な事業

第3章 会 員

第5条 本会員は本会目的達成に協力するもので次の通りとする。

1. 正会員
2. 賛助会員
3. 名誉会員

第6条 正会員の会費は年額5,000円とする。

第7条 賛助会員は本会の目的に賛同し、かつ事業を維持するための会費年額100,000円（一口）以上を納める団体または個人とする。
賛助会員には次の権利がある。

- （賛助会員の権利）
1. 総会での傍聴を認めること。
 2. 本会の発行する学会誌の配布をうけること。
 3. 年1回の学会年会に無料で参加できること。（年会前に招待状送付）

第8条 名誉会員は理事会で推薦し、評議員会の議決を経て総会で承認する。名誉会員は会費免除とする（年会参加費は免除しない）。

第9条 本会に入会を希望するものは、所定の手続きを経て、会費を添えて本会事務局に申し込むものとする。原則として2年間会費を滞納したものは退会とみなす。

第4章 役員および評議員

第10条 本会は次の役員を置く。

1. 会長 1名
2. 理事 若干名（うち理事長1名）
3. 会計監事 若干名

第11条 会長は理事会の推薦により、評議員会の議決を経て選ばれ、総会の承認を得るものとする。会長は総会を主宰する。

第12条 理事会は会長を補佐して会務を執行し、庶務、会計その他の業務を分担する。理事長は理事会の互選により選出され、本会の運営を統括する。

第13条 会計監事は評議員より選出する。会計監事は会

計監査を行う。

第14条 本会には、評議員をおく。評議員は正会員中より選出し、理事会の推薦を経て評議員会で議決し、総会の承認を得るものとする。理事長がこれを委嘱する。評議員は評議員会を組織し、本会に関する重要事項を審議する。

第15条 編集委員は機関誌“血管”（Japanese Journal of Circulation Research）を編集し、本会の学術活動に関する連絡を行う。なお、編集に関する事項は、事務局にて決定する。

第16条 役員の任期は会長は1年、理事長、理事、会計監事および編集委員は2年とする。ただし再任は妨げない。

第17条 役員は次の事項に該当するときはその資格を失う。

1. 定期評議員会時に満65歳を過ぎていた場合（ただし、本人の希望があれば、定期評議員会時に満70歳を過ぎていた場合まで延長できるものとする）
2. 3年間連続で、役員会等を正当な理由なくして欠席した場合

第5章 会 議

第18条 理事会は少なくとも年1回理事長が招集し、議長は理事長がこれに当たる。

第19条 総会および評議員会は毎年1回これを開き、次の議事を行う。

1. 会務の報告
2. 会則の変更
3. その他必要と認める事項

第20条 臨時の総会、評議員会は理事会の議決があった時これを開く。

第6章 会 計

第21条 本会の事業年度は毎年1月1日より始まり、12月31日に終わる。

第22条 本会の会計は会費、各種補助金及び寄付金をもって充てる。

第7章 年 会

第23条 年会は、毎年1回、会長が主催して開催する。年会の運営は、理事会がこれを会長に委託する。年会の主題および演題の選定・採択は、会長が裁量する。

年会に演題を提出する場合、筆頭著者は本会の会員でなければならない。

ただし、海外所属の外国人および日本人や会長が特別に認める者はこの限りではない。

会長は翌年の理事会で収支報告を行う。

年会では研究奨励賞を規定し、その細則は別に定める。

理事会は、年会の下部組織として、若手研究者の育成を目的とした「若手研究セミナー」を開くことができ、その規則は別に定める。

その他、理事会が必要と認めたときは、臨時の年会を開くことができる。

日本心脈管作動物質学会研究奨励賞に関する細則

制 定：平成13年2月13日

改訂1：平成27年2月6日

A. 研究奨励賞の目的と名称

次世代の心脈管作動物質研究を担う研究者の育成と学会の活性化をめざし、年次会における若手研究者の研究発表を顕彰する。名称を、「日本心脈管作動物質学会研究奨励賞」とする。各年次会において本名称を統一して用いることとする。

B. 募集と選考の方法

1. 応募資格は、学会開催年で満40歳未満の本学会会員とする。
2. 応募者は、年次会の演題登録時に演題登録・抄録用紙に本賞に応募する旨を記入して申請する。
3. 応募者多数の場合は書類審査による予備選考を行うことができる。
4. 応募者は学会において口述あるいはポスター発表を行う。
5. 選考は選考委員会により行う。選考委員長は年次会長が担当し、数名の選考委員を委嘱する。
6. 選考委員は、担当する候補演題すべてについてその発表時に在席し、別項F（評価の基準と方法）に定める評価基準に基づいて評点を付ける。但し、選考委員と同じ講座、教室、研究室などに所属する応募者については評価しない。
7. 評価の集計は学会事務局により行い、選考委員会を非公開にて開催し、受賞者決定に関わる協議を行う。
8. 受賞者の選考は、選考委員の評点の合計点あるいは平均点をもって判断する。同点の場合には、順位点や各項目の点を参考にし、選考委員会で審議する。
9. 年次会長の定めるところにより、若干名を研究奨励賞として選出する。

C. 研究奨励賞受賞者の発表、顕彰

1. 選考委員会は受賞者を決定し、年次会後「血管」誌上に発表する。
2. 受賞者には賞状と副賞を授与する。賞状は学会理事長と年次会長の連名で授与する。副賞は学会本部経費より支出する。
3. 受賞者は受賞研究内容を「血管」誌上に原著論文または総説として掲載する。

D. その他

1. 本研究奨励賞の実施の判断も含め、項目B（募集と選考の方法募集）および項目F（評価の基準と方法）の要領は、年次会長の裁量に委ねる。
2. 本細則に定める事項およびその他研究奨励賞に関して協議が必要な事項が生じた場合は、理事会、評議員会の審議を経て、総会で議論し変更、追加できるものとする。

E. 補足

1. 次世代の心脈管作動物質研究を担う研究者の育成と学会の活性化をめざし、若手研究者の研究発表を顕彰するために、平成13年2月13日開催の総会において本細則が制定された。
2. 伝統ある学会賞として一貫した実施を図るために、平成27年2月6日開催の総会において本細則が改定された。

F. 評価の基準と方法

選考委員は、発表演題の提示する内容と関連する質疑応答を中心に下記の項目について評価する。下記項目の配点を明示した評価表を事前に選考委員に配布し、各応募者に対し、評価点と順位点をつける。

【評価点】(30点満点)

① 研究の質(10点満点：1点刻みで評価する)

研究内容の質の高さを評価する。研究目的から結論に至るまで論理的な解析方法に基づき質の高い結論を導き出しているもの。

② 研究の独創性(5点満点：1点刻みで評価する)

研究課題、研究方法において、着想や展開にオリジナリティーや工夫等が認められるかを評価の対象とする。

③ 研究の将来性・発展性(5点満点：1点刻みで評価する)

研究の将来性・発展性の高さを評価する。

④ プレゼンテーション能力(10点満点：1点刻みで評価する)

以下の点を中心に評価する。

- 目的、方法、結果、結論は明示されているか。
- 全体的な構成は適切か。
- 図や表は適切に作成されているか。
- 自立的に研究ができていると思われるか。
- 演者による説明は分かり易く適切か。
- 質疑／応答は適切になされたか。
- 発表態度は好感が持てたか。

【順位点】

各選考委員において、評価点の高い順に順位点を1点から順につける。評価点の同点者には順位点で優劣をつける。

日本心脈管作動物質学会 若手研究セミナー細則

制定：令和5年2月10日

(若手研究セミナーの開催)

第1条

日本心脈管作動物質学会は、会則第4条第6項による「若手研究セミナー」を開催する。

(若手研究セミナーの主宰)

第2条

若手研究セミナーの開催にあたっては、若手研究セミナー会長を置き、会長がその独自性を生かしながら主宰する。会長は理事会にて選任する。

(開催日程・場所の決定)

第3条

若手研究セミナーの開催日程・場所（会場）は、開催年の半年前までに会長が決定し、理事会に報告するが、後述する参加費を考慮して会場を決定する。

(運営体制)

第4条

理事会は、会長がセミナーの企画・運営を円滑に行うことができるように支援する。

(予算)

第5条

会長は、セミナー予算を作成し、事業計画とともに理事会の承認を得る。

(参加費)

第5条

参加は学会員に限り、参加費は無料とする。非学会員が応募する場合は5,000円を支払い、学会員として入会を申し込むこととする。

(会長代行)

第8条

会長に事故があるときまたは欠けたときは、理事長と理事が協力してその職務を代行する。

(筆頭演者)

第9条

発表の筆頭演者は若手正会員である必要がある。若手の年齢制限は45歳以下とする。

(事業の変更)

第10条

会長は、会期の変更など事業に大きく変更が生じる場合には、速やかに理事会に報告する。

(報告)

第11条

会長はセミナー終了後、事業概要及び収支に関して、原則として翌年の理事会に報告する。

(規程の変更)

第12条

この規程の変更は、理事会の決議を経て行うものとする。

(その他)

第13条

その他必要な事項は、理事会の決定による。

日本心脈管作動物質学会役員

名誉会員

岩尾 洋 中川 雅夫 平田 恭信 平田 結喜緒
田中 利男 玉置 俊晃 日高 弘義

理事長

福本 義弘

理事

池田 康将 今村 武史 岩本 隆宏 上田 陽一
佐田 政隆 佐藤 公雄 下川 宏明 下澤 達雄
新藤 隆行 筒井 正人 富田 修平 西田 基宏
西村 有平 西山 圭樹 東福 幸仁 平田 健一
平野 勝也 深木 正樹 山本 義弘 前村 浩二
南野 徹 茂木 正樹 山本 義弘 吉栖 正典

監事

中神 啓徳 三 明 淳一郎

評議員 〈基礎〉

青木 浩樹 五十嵐 淳介 五十嵐 友紀 池田 康将
石井 邦明 石澤 有紀 今西 正樹 今村 武史
岩本 隆宏 上田 陽一 大喜多 倫久 岡本 貴隆
神吉 昭子 金井 徳真 坂上 栗久 新藤 隆憲
菅原 明愛 高土 浩一郎 筒井 正啓 武田 留彦
田中 修平 中田 徹男 中山 勝也 中野 間大
富田 基宏 西村 裕一 西平 野勝 野三 明淳
西萩 正樹 服部 望月 吉栖 正典 三 明 淳一郎

〈臨床〉

赤澤 宏一 浅原 哲子 石澤 啓介 石田 明夫
川辺 淳太郎 岸 拓弥 喜瀬 勇也 神戸 茂雄
古波 健太郎 斎藤 能彦 佐々木 健一郎 佐々木 享
佐田 政隆 佐藤 公雄 佐藤 大樹 島袋 充生
下川 宏明 下澤 達雄 添木 孝一 田原 宣広
長田 太助 錦見 俊雄 野出 圭一 榎垣 實男
東田 幸仁 平福 本義 深藤 田内 福前 大浩
福田 昇男 福南 本一 藤宮 吉栖 福室 原村
丸山 本 山 本 一 吉 栖 正 典 吉 栖 正 典
森 本 聡 山 本 一 吉 栖 正 典 吉 栖 正 典

(五十音順)

会長

第1回研究会 横山 育三
第2回研究会 藤原 元始
第3回研究会 岳中 典男
第4回研究会 毛利 喜久男
第5回研究会 藤原 元始
第6回研究会 岳中 典男
第7回研究会 山本 国太郎
第8回研究会 毛利 喜久男
第9回研究会 土屋 雅晴
第10回研究会 横山 育三
第11回研究会 日高 弘義
第12回研究会 三島 好雄
第13回研究会 東 健彦
第14回研究会 恒川 謙吾
第15回研究会 戸田 昇
第16回学会 塩野 谷恵彦
第17回学会 野々村 禎昭
第18回学会 河合 忠一
第19回学会 平 則夫
第20回学会 杉本 恒明
第21回学会 安孫子 保治
第22回学会 外山 淳俊
第23回学会 千葉 茂夫
第24回学会 中川 雅夫
第25回学会 室田 誠逸
第26回学会 猿田 享男
第27回学会 矢崎 義雄
第28回学会 田中 利男
第29回学会 竹下 彰
第30回学会 岩尾 洋
第31回学会 平田 結喜緒
第32回学会 荻原 俊男
第33回学会 藤田 敏郎
第34回学会 辻本 豪三
第35回学会 松岡 博昭
第36回学会 玉置 俊晃
第37回学会 下川 宏明
第38回学会 川崎 博己
第39回学会 伊藤 正明
第40回学会 西山 成
第41回学会 伊藤 宏
第42回学会 吉栖 正典
第43回学会 平田 健一
第44回学会 平野 勝也
第45回学会 佐田 政隆
第46回学会 筒井 正人
第47回学会 前村 浩二
第48回学会 服部 裕一
第49回学会 福本 義弘
第50回学会 新藤 隆行
第51回学会 南野 徹
第52回学会 上田 陽一
第53回学会 東 幸仁

事務局

〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174番地
三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野内
TEL：059-231-5411 FAX：059-232-1765

日本心脈管作動物質学会誌
血管 第46巻 3号

2023年11月26日発行

発行 日本心脈管作動物質学会

〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174番地
三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野内
TEL 059-231-5411 FAX 059-232-1765
<https://plaza.umin.ac.jp/~jsr-society/>
E-mail : circ.res.japan@gmail.com

印刷所 合資会社 黒川印刷
〒514-0008 三重県津市上浜町2-11

