

原著

## Angiotensin II と物理的圧の接着因子発現に及ぼす協調作用 - 培養メサンジウム細胞での検討 -

荒井 充

### Synergistic Action of Angiotensin II and Transmural Pressure on Expressions of Adhesion Molecules in Cultured Rat Mesangial Cells

Mitsuru Arai (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

**Objective:** Mesangial cell dysfunction is produced in response to various stimuli. The role of both physical factors and humoral mediators in mesangial cell have been investigated, however, there are few studies examining the synergistic action of these factors. In the present study, to investigate the role adhesion molecules in the regulation of cellular function, we assessed the effect of pressure and angiotensin II in the production of endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) from cultured rat mesangial cells (RMC). Furthermore, the effect of antisense of E-selectin in the production of ET-1 and NO<sub>x</sub> in cultured RMC were examined. **Design and Methods:** Rat mesangial cells were harvested from Sprague Dawley (SD) rats. Rat mesangial cells were plated onto 75-cm<sup>2</sup> flasks. A pressure loading apparatus was set up by using compresses He gas. Transmural pressure (0, 50, 100 or 200 mmHg) was applied for 24 hours with angiotensin II ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$  M). Every 6 hours, cultured media was collected for measurements of ET-1 and NO<sub>x</sub>. The expression of eNOS-mRNA was measured by using RT-PCR. The expression of adhesion molecules (integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , VCAM1, E-selectin) in the cultured RCM were examined by using immunofluorescens method. The antisense of E-selection was added in the cultured RMC and measured the expression of ET-1 and NO<sub>x</sub>. Then angiotensin type I receptor blocker (CS866) was added onto cultured media. **Results:** Either transmural pressure or angiotensin II alone did not induce any significant changes in ET-1 concentration and expression of adhesion molecules. The expression of E-selectin appeared in RCM in accordance with the levels of transmural pressure and the concentrations of angiotensin II. Combined treatment with transmural pressure and angiotensin II produced a marked elevation of ET-1 and reduction of expression of eNOS-mRNA. Administration of antisense of E-selection in RCM induced the reduction of ET-1 accompanied with the suppression of the expression of E-selection. However there was no significant change in the expression of eNOS-mRNA. Incubation with CS866 in RMC, adhesion molecule of E-selectin disappeared accompanied with the reduction of ET-1. **Conclusions:** In conclusion, synergistic action of transmural pressure and renin-angiotensin system may induce the expression of adhesion molecule E-selection accompanied with the increase of ET-1 and reduction of NO in the cultured RMC. These findings suggest that RMC can produce E-selection in response to synergistic action of intraglomerular pressure and angiotensin II and resulted in nephrosclerosis. E-selection plays an important role in the regulation of the production of ET-1 in cultured media. On the contrary, NO production was not related to the expression of E-selection.

**Keywords:** hypertension, E-selection, adhesion molecule, endothelin-1 (ET-1), Nitric Oxide (NO)

*J Saitama Med School 2004;31:1-12*

(Received October 31, 2003)

緒言

埼玉医科大学腎臓内科学教室  
〔平成15年10月31日受付〕

生体内では、様々な物理的因子が心筋や血管平滑筋細胞の増殖、肥大、さらには腎臓においても糸球体メサンジウム細胞の増殖、肥大を引き起こしてることが報告されている<sup>1)</sup>。これらが糸球体の硬化

につながりやがて腎不全の進行という形で臨床上明確となる<sup>2)</sup>。生体内の物理的刺激として血圧の上昇や血流の増加がある<sup>3)</sup>。血管壁に対する圧力は血管へのシアストレス (shear stress), 伸展張力 (stretch pressure), あるいは壁貫通圧力 (transmural pressure) として作用する<sup>4)</sup>。これらの生体内の物理的刺激は, Renin-Angiotensin (R-A) 系や種々の血管作動物質, さらにサイトカインなどと協調して細胞機能の調節を行うことが報告されている<sup>5)</sup>。

一方最近, このような血圧の上昇に伴い糸球体硬化をおこしている腎臓には種々の接着因子が発現することが報告されている<sup>6)</sup>。接着因子の多くはI型の膜蛋白質で, N末端は細胞外, C末端は細胞内に存在する。その役割として細胞と細胞の接着や, 細胞と細胞外基質の接着に関与することが知られているが<sup>7)</sup>, それらが細胞内の機能調節への関与, さらに糸球体硬化病変の進展にどのように関与するかについては幾つかの報告<sup>8)</sup>があるが, 現在なおその詳細は明らかではない。

今回我々はR-A系の亢進と物理的圧の上昇がメサンジウム細胞にどのような影響を及ぼしているかを明らかにする目的で, 腎臓の培養メサンジウム細胞におけるAngiotensin IIと物理的圧の協調による接着因子の発現, それらと関連してメサンジウム細胞におけるエンドセリン-1 (以下ET-1と略す) および一酸化窒素 (以下NOと略す) 産生を検討した。

## 対象と方法

### 実験プロトコール

100-150 gの雄性Sprague Dawley (SD) ラット30匹の腎臓からメサンジウム細胞 (Rat mesangium cells, 以下RMCと略す) を単離し継代培養を行った。3-5継代のRMCを圧力釜 (Fig. 1) での加圧下 (0, 50, 100, 200 mmHg) に以下の実験を行った。まずRMCにおける接着因子の発現の, Angiotensin II (Sigma Co., St. Louis, USA) の濃度ならびに時間による変化を明らかにする目的で, RMCに対してAngiotensin II ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M) を添加し24時間培養した。6, 12, および24時間後に各培養条件下のRMCでの接着因子 endothelium (E)-selectin, Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , さらにvascular cell adhesion molecule (VCAM)-1の発現を蛍光抗体染色法で半定量測定を行い検討した。同時に培養液上清中のendothelin-1 (ET-1) の濃度とNOxの濃度を測定した。さらに培養12時間におけるRMC中のecNOS-mRNAの発現を半定量のReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (以下RT-PCRと略す) 法を用いて測定した。

次いでRMCに対してAngiotensin II ( $10^{-6}$  M) をAngiotensin Type I 受容体拮抗薬, CS-866 (三共株式会社, 東京, 日本) ( $10^{-4}$  M), を同時添加して培養12時間目におけるこれら接着因子の発現を同様に

検討した。さらにCS-866同時添加時の培養12時間における培養液上清中のendothelin-1 (ET-1) とNOxの濃度の測定, ecNOS-mRNAの発現を半定量RT-PCR法を用いて測定した。

さらにRMCに対してAngiotensin II ( $10^{-6}$ ) を添加すると同時に0.05  $\mu$ MのE-selectinに対するantisenseを含んだlipofectin (10  $\mu$ g/ml) を同時に培養液中に添加投与し, 6時間の培養実験を行った。この条件下でのE-selectinの発現と, 培養液中のET-1の濃度の変化につき検討を行った。

なお今回のAngiotensin Type I 受容体拮抗薬ならびにE-selectinに対するantisenseの投与実験に関しては, RMCにおけるE-selectinの発現が最も良好であったAngII  $10^{-6}$  M, 200 mmHgの加圧条件において行った。

### RMCの採取と培養

RMCの採取および培養は既報の方法に基づき行った<sup>9)</sup>。以下に簡潔に概略を示す。100-150 gの雄性SDラット (SHR等疾患モデル共同研究会, 千葉県船橋市, 日本) の腎臓から無菌下に4°C下でステンレス製のメッシュを用いて糸球体を単離し, 2回洗浄後, type IV collagenase (Sigma Co., St. Louis, USA) で37°C, 30分消化して上皮細胞を除去した。このようにして得られたRMCをウシの皮膚由来I型コラーゲン (Collagen Corporation, Palo Alto, USA) でコーティングされた24枚のwell tissue culture plate上に播種し, 5% CO<sub>2</sub> 加空気下, 37°Cの条件下で継代維持し, 3-5継代の培養細胞を実験に用いた。RMCの培養液は, ITS (5 ml/mlのtransferrin, 5 mg/mlのbovine insulinと5 ng/mlのselenous acid) (Cosmo Bio, 東京, 日本), 2 mM/lのL-glutamine (Cosmo Bio, 東京, 日本), 100 U/mlのpenicillin, 100 mg/mlのstreptomycin, ならびに不活化fetal bovine serumを添加し20%濃度に調節した500 mlのRPMI1640 (大阪大学微生物研究所, 大阪, 日本) を使用した。実験終了時に24枚のプレートをHanks' solutionで洗浄した後, RMCを1% trypsin-EDTAにより分離させた。Well plate上への細胞は各wellごとに $1 \times 10^4$  cellとなる様に播種し, この細胞数は全実験を通じて一定数となるよう調節した。細胞数は細胞分離後にHemocytometer (Kayagaki Co., 東京, 日本) を用いて計測し, 4視野の平均を求めた。

### 圧力釜の設定

培養細胞加圧用の圧力釜は, 以下の様に設定をした。今回我々が設計し, 作成した加圧用の底面積75-cm<sup>2</sup>の圧力釜の設計図をFig. 1に示す。この圧力釜を使用して作成した実験用の回路図をFig. 2に示す。圧力釜はゴム製のキャップで完全に密閉状態とし, ヘリウムガス (He gas, 大和三機, 東京, 日本) を注入

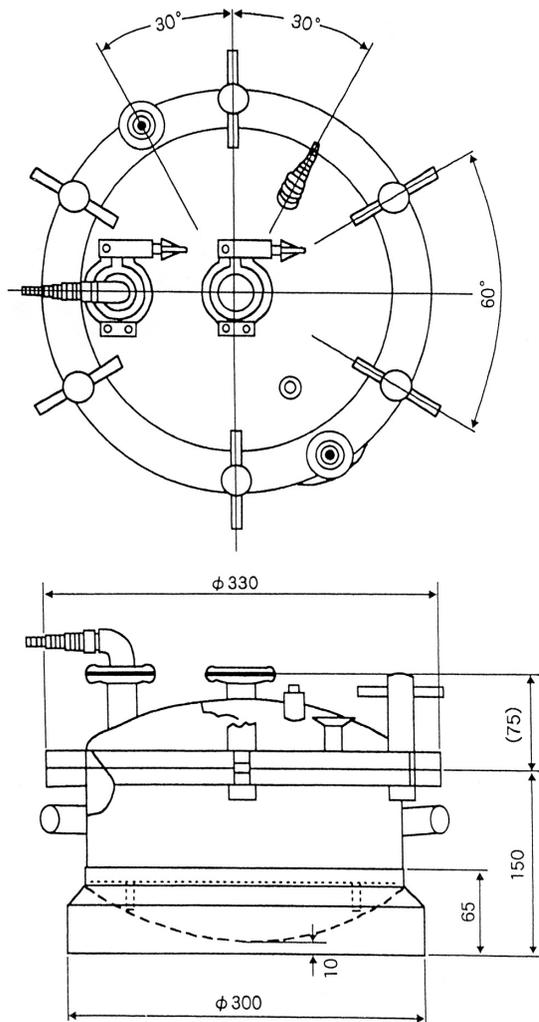


Fig. 1. Schema of an iron flask for pressure loading apparatus.

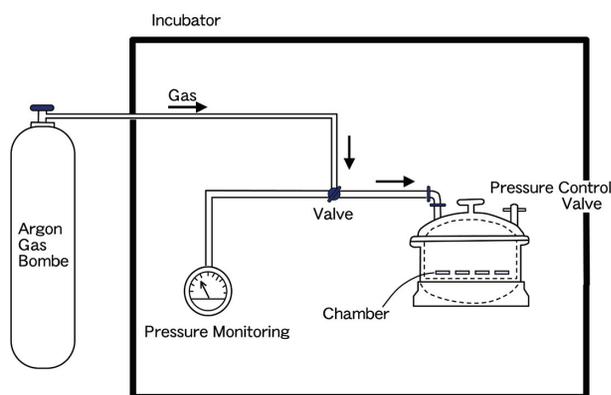


Fig. 2. Illustration of system of pressure loading apparatus. The flask was tightly sealed with a rubber cap and compressed helium (He) gas. The rubber cap was pierced by a needle connected to tubing attached to a three-way rotary valve, a syngmonometer and a pressure valve.

することにより内圧を上昇させた。圧力釜のふたには三股のロータリーバルブ (RT-N, 八光株式会社, 東京, 日本) を取り付けられた接続管 (extension tube: 61B, 八光株式会社, 東京, 日本) 用の孔があり, 一つは内圧測定のための血圧計 (三星医科器機, 東京, 日本) に, 一つはヘリウムガスボンベから加圧バルブ, 一つは排ガス用となっている。圧力釜は常に保温機内におき, 内部温度は常時 37°C とした。この場合圧力釜にヘリウムガスを注入する間に内部の空気がもれでることはないように, 内部の酸素, 窒素, ならびに二酸化炭素の占める圧はボイル-シャルルの法則に準じて外気と同じ一定の圧に維持した。

圧力釜には RMC を播種したコラーゲンコーティングの 24 枚の well plate を並べて, ふたをかぶせた後に, ゴム製のキャップで完全密閉した。ヘリウムガスで加圧 (0, 50, 100, 200 mmHg) し 3, 6, 12, 24 時間目に開放した。RMC は種々の薬剤を含む 1 ml の無血清培養液に入れて, 種々の加圧状態に設定した圧力釜内においた。実験終了時に細胞数を計測し, さらに細胞活性を trypan blue exclusion test を用いて確認し, 90% 以上の活性を有することを確認した。

#### 蛍光抗体法による各種接着因子の発現

培養細胞における接着因子として E-selectin, Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , VCAM-1 の発現を蛍光抗体染色法により検討した。E-selectin の一次抗体は monoclonal ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1, Genzyme Co., MA, USA) を用いた。1% BSA/PBS で終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  (1000 倍希釈) とし 20°C で 2 時間反応させた。VCAM-1 については monoclonal anti VCAM-1 (Genzyme Co., MA, USA) を用い, 1% BSA/PBS (Bovine Serum Albumin/Phosphate Buffer Solution) で終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  (1000 倍希釈) とし 20°C で 2 時間反応させた。さらに Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  に対する抗体として polyclonal anti Integrin  $\alpha 5$  (Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) を使用し, 1% BSA/PBS で終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  (1000 倍希釈) とし室温で 2 時間反応させた。2 次抗体は 1% BSA/PBS で 100 倍希釈した Mouse IgG に 33 倍希釈した horse serum を使用し, 30 分間インキュベートした。PBS にて洗浄したのち, 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /cold methanol で 30 分間インキュベートした後 PBS で洗浄し, それぞれ PBS で 50 倍希釈した Avidin-Biotin-HRP で遮光し 30 分間インキュベートした。Diaminobenzidine (DAB) solution で染色したのち, 7.4% formaldehyde で 20 分間固定し, 4% methyl green で核染した。接着因子の免疫組織染色の評価方法としては顕微鏡画像を computer に取り込み, 画像処理ソフト (Mac SCOPE, Ver. 2.5, Mitani Corp., Fukui, Japan) を用いて定量化した。各培養メサンジウム細胞ごとに定量化してまったく染まっていない細胞を 0 点, 非常に強く染

まっているものを4点とし、その間を1, 2および3点として、観察視野ごとに各細胞の点数をカウントして合計100の細胞をカウントし、その平均点を各群のスコアとして半定量的に評価をした。

#### **RMC上清中のエンドセリン-1濃度の測定**

加圧培養実験終了後培養上清を集めてチューブに入れ、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。エンドセリン濃度は sandwich-enzyme immunoassay kit (IBL 17121, Immuno Bio Laboratory) を用いて測定した。今回用いた測定においてエンドセリンの測定の intra-assay coefficient of variation は7.4%, 一方 inter-assay coefficient of variation は12.4%であった。

#### **RMC上清中のNitrite/nitrate産生量の測定**

加圧培養実験終了後培養上清を集めてチューブに入れ、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。RMCからの一酸化窒素(NO)産生量は一酸化窒素の酸化物である Nitrite/nitrate 産生量を既報の Griess 反応を用いた自動分析装置にて測定した。今回用いた測定において Nitrite/nitrate の intra-assay coefficient of variation は4.3%, 一方 inter-assay coefficient of variation は8.6%であった。

#### **RMCからのRNAの抽出**

RMCに3mlのTRIzol (GIBCO BRL, GRAND Island, NY, USA)を加えた。これを、ホモジナイザー、テフロンコッターを用いて均質化した。TRIzolの1/5量のクロロホルムを加え、よく攪拌した。5分間 $20^{\circ}\text{C}$ に放置後、4分間、 $4^{\circ}\text{C}$ 、3500 rpmで遠心分離し、上清を採取した。次に、採取した量と等量の phenol/chloroform/isoamylalcohol (PCL)を加え3分間、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15000 rpmで遠心分離し上清を採取した。そして、等量のイソプロパノールを加え、10分間、 $4^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpmで遠心分離し上清を捨て、よく乾燥させた。その後400  $\mu\text{l}$ の diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を加えよく攪拌し、それに1000  $\mu\text{l}$ のエチルアルコールを加え、更に、3MのNaOAcを40  $\mu\text{l}$ 加えエタノール沈殿を行った。次に、15000 rpmで遠心分離後、上清を捨て、さらに75%エタノールを加え15000 rpmで遠心分離した、その後、上清を捨て乾燥し、DEPC処理水を加え実験に用いた。

#### **RT-PCR法による検出**

逆転写酵素反応を用いて、あらかじめRNAを鋳型としたcDNAの合成反応を行い、それを鋳型として degenerate primer を用いたポリメラーゼ反応を GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Inc, MA, USA) を用いて行う。

DEPC処理水に溶かしたRNAのDNaseI処理を

行う。DNase I 10 $\times$ Buffer, DNase I amplification Grade (GIBCO BRL, GRAND Island, NY, USA)を加えて全量で10  $\mu\text{l}$ を $37^{\circ}\text{C}$ で15分間加温し、次に、それにEDTA 1  $\mu\text{l}$ 加え、さらに $70^{\circ}\text{C}$ 、15分間加温し、DNase Iの反応を停止する。これにOligo (dT) primer (GIBCO BRL, GRAND Island, NY, USA) 3  $\mu\text{l}$ 、5 $\times$ first Buffer 6  $\mu\text{l}$ 、DTT 3  $\mu\text{l}$ 、dNTP mixture (TAKARA, 東京) 6  $\mu\text{l}$ 、逆転写酵素である Super script II (GIBCO BRL, GRAND Island, NY, USA) 0.7  $\mu\text{l}$ を加え、 $42^{\circ}\text{C}$ 、60分で保温し、RT反応をさせる。このcDNA 1  $\mu\text{l}$ にDEPC処理水 32.5  $\mu\text{l}$ 、DMSO 5  $\mu\text{l}$ 、10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu\text{l}$ 、dNTP mixture 4  $\mu\text{l}$ 、Forward Primer (以下Fwと略す) 1  $\mu\text{l}$ 、Reverse Primer (以下Rvと略す) 1  $\mu\text{l}$ 、rTaq polymerase (TAKARA, 東京) 0.5  $\mu\text{l}$ を加えて全量で50  $\mu\text{l}$ とし、これを $94^{\circ}\text{C}$ で5分、さらに $94^{\circ}\text{C}$ で30秒、 $58^{\circ}\text{C}$ で1分、 $72^{\circ}\text{C}$ 2分を25 cycleという条件でPCR反応させる。1%アガロースゲルを作成し、100Vで30分間泳動後、エチジウムブロマイドで染色する。

#### **Primerの作成**

Primerの作成に関してecNOSのモチーフを保存している既知の塩基配列より、各々の部位が増幅するよう5'側と3'側に degenerate primer を設計した。ecNOS Primerの構造については、以下に示す通りである。

ecNOS primer,

Forward Primer (Fw):

5'-GCAGCATCACCTACGATAACC-3'

Reverse Primer (Rv):

5'-CTCAGTGATCTCCACGTTGG-3' (586bp)

#### **E-selectinのantisenseならびにsenseの作成**

E-selectinの既知の塩基配列より、5'側をtarget siteとする antisense oligonucleotide の設計を行った。今回の実験に使用したE-selectinに対する antisense ならびに sense の構造については以下の通りである。

E-selectin antisense

Sequense: TTCCCAGATGCACCTGTTT

MRNA target site 5'-UTR

E-selectin sense

Sequense: AAACAGGTGCAGCTGGGGAA

#### **統計**

データはすべて平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。統計解析は接着因子発現量、ET-1, Nitrite/nitrateの時間経過による発現の比較に関しては、Two-way analysis of variance (Two-way ANOVA)を用いて群間比較を

行った後、Scheffe's F テストを行った。また接着因子発現量、ET-1, Nitrite/nitrate については、One-way analysis of variance (One-way ANOVA) を用いた後 Scheffe's F を行い、統計上  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。RT-PCR で増幅された ecNOS mRNA の発現量の測定値は、film を透過型 scanner (GT-9600, EPSON, Nagano, Japan) で取り込み、各 band を NIH image (1.62, NIH Division of Computer Research and Technology, Bethesda, MD, USA) を用いて定量化した。この測定値を内部コントロールである GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の値で除して相対値として算出し、それらの値を記載した。これらの統計計算は Mackintosh の統計ソフト Stat View II を用いておこなった。

## 成績

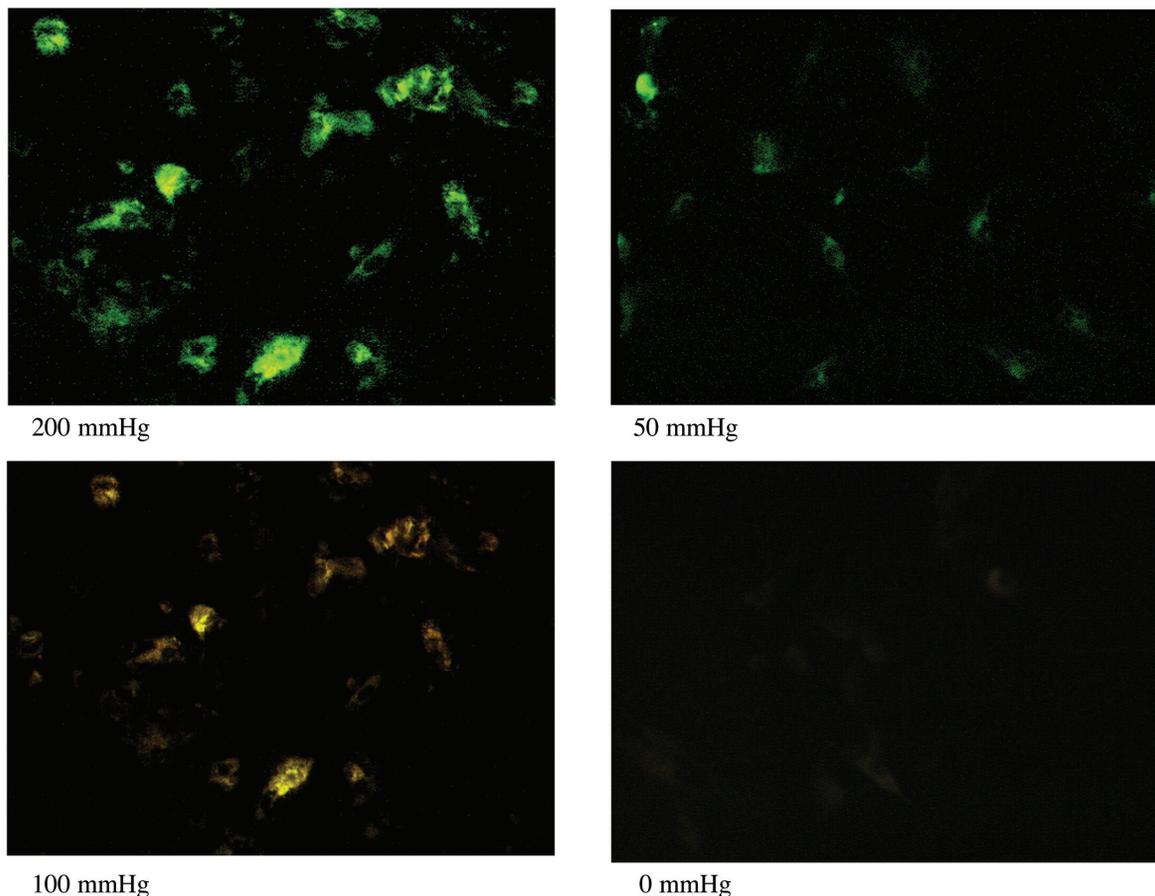
### (1) 物理的圧および Angiotensin II による接着因子 E-selectin の発現の経時的变化

RMC では Angiotensin II の添加、加圧下において細胞質に E-selectin の発現が見られた (Fig. 3)。また VCAM-1 ならびに Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  の明らかな発

現は見られなかった。RMC における E-selectin の発現は時間依存性に増加し、12 時間での発現のピークを認めた (Ang II  $10^{-6}$  M, P=200 mmHg: 6 hr  $1.8 \pm 0.2$ , 12 hr  $2.7 \pm 0.5$ , 24 hr  $2.2 \pm 0.3$ ) (Fig. 4)。この 12 時間目における E-selectin の発現に及ぼす Angiotensin II ならびに加圧の影響を検討した。E-selectin の発現は、Angiotensin II の濃度依存性に増加を認めた (P=200 mmHg:  $10^{-8}$  M  $1.3 \pm 0.2$ ,  $10^{-7}$  M  $2.2 \pm 0.3$ ,  $10^{-6}$  M  $2.7 \pm 0.5$ ) (Fig. 5)。さらにこの E-selectin の発現は、圧力釜内の加圧に従い有意な増加を認めた (Ang II  $10^{-6}$ : 50 mmHg  $0.7 \pm 0.2$ , 100 mmHg  $1.2 \pm 0.3$ , 200 mmHg  $2.7 \pm 0.5$ ) (Fig. 5)。以上の結果、RMC における E-selectin の発現が Ang II  $10^{-6}$  M, 200 mmHg の加圧において最も良好であったことからこの条件において以下の実験を行った。

### (2) 物理的圧および Angiotensin II による ET-1 の発現変化

RMC 上清中の ET-1 の濃度は Angiotensin II  $10^{-6}$  M 添加下、加圧 200 mmHg 下において時間依存性に増加を認めた (3 hr  $24 \pm 12$ , 6 hr  $40 \pm 14$ , 12 hr  $68 \pm 18$ , 24 hr



**Fig. 3.** Expressions of E-selectin in cultured rat mesangial cells. E-selectin was expressed in cultured rat mesangial cells accordance with the levels of transmembrane pressure and the concentrations of angiotensin II.

108±24 pg/ml/10<sup>4</sup>cells) (Fig. 6). また、この ET の発現は Ang II の非添加群 (-) と比較して Ang II 10<sup>-6</sup> の添加群 (+) では有意な増加を認めた (12 hr: Ang II (-) 25±6, Ang II (+) 68±18 pg/ml/10<sup>4</sup>cells) (Fig. 7). さらにこの ET の発現は加圧に伴い有意な増加を認めた (Ang II (+), 12 hr: P = 0 mmHg 26±10, P = 50 mmHg 36±12, P = 100 mmHg 44±12, P = 200 mmHg 68±18 pg/ml/10<sup>4</sup>cells) (Fig. 8).

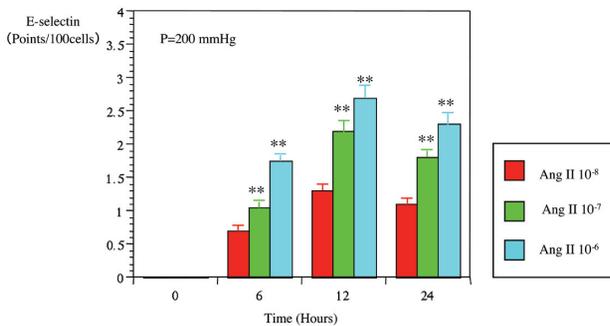
### (3) 物理的圧および Angiotensin II による NOx の発現変化

RMC 上清中の Nox の産生量は Angiotensin II の投与に伴い有意に増加した (P=0 mmHg, 12 hr: Control 162±46 vs. Ang II 10<sup>-6</sup>M 344±86 Nitrite/Nitrate pmol/10<sup>4</sup>cells) (Fig. 9). この Angiotensin II 投与に伴

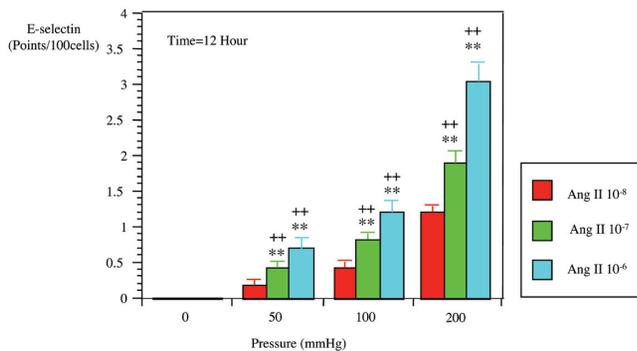
う NOx の産生増加は、加圧に伴い有意な産生の抑制を認めた (Ang II 10<sup>-6</sup>M, 12 hr: P=0mmHg 344±86, P = 50 mmHg 266±66, P = 100 mmHg 132±56, P = 200 mmHg 74±26 Nitrite/Nitrate pmol/10<sup>4</sup>cells) (Fig. 9).

### (4) 物理的圧および Angiotensin II による ecNOS-mRNA の発現

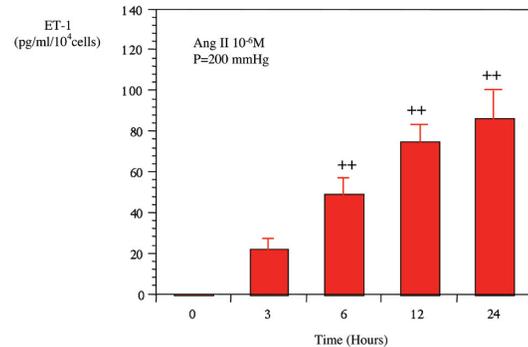
RMC における Angiotensin II 添加ならびに加圧に伴う ecNOS-mRNA の発現変化を半定量 RT-PCR 法を用いて検討した. いずれも 12 時間目の培養メサンジウム細胞における ecNOS-mRNA の産生量について半定量的に検討した. Angiotensin II 10<sup>-6</sup>M 添加下の RMC では加圧に伴い有意な ecNOS-mRNA の発現の抑制を認めた (Ang II 10<sup>-6</sup>M, 12 hr: P=0 mmHg 1.44±0.24, P = 50 mmHg 1.14±0.20, P = 100 mmHg 0.44±0.16,



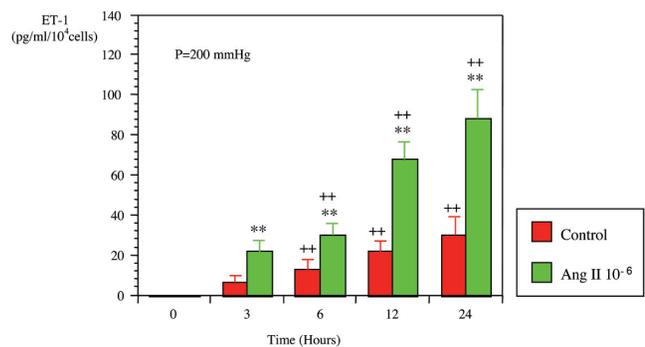
**Fig. 4.** Time course changes in expressions of E-selectin in cultured mesangial cells. Red bars indicate 10<sup>-8</sup> M of angiotensin II. Green bars indicate 10<sup>-7</sup> M of angiotensin II. And Blue bars indicate 10<sup>-6</sup> M of angiotensin II. Values are means±SEM. \*\*P<0.01 vs. Angiotensin II 10<sup>-8</sup> treated group. + P<0.05 ++P<0.01 vs. Time 0 in the same group.



**Fig. 5.** E-selectin appeared in accordance with the concentrations of angiotensin II and the levels of transmural pressure in cultured rat mesangial cells. Red bars indicate 10<sup>-8</sup> M of angiotensin II. Green bars indicate 10<sup>-7</sup> M of angiotensin II. And Blue bars indicate 10<sup>-6</sup> M of angiotensin II. Values are means±SEM. \*\*P<0.01 vs. Angiotensin II 10<sup>-8</sup> treated group. ++P<0.01 vs. Pressure 0 in the same group.

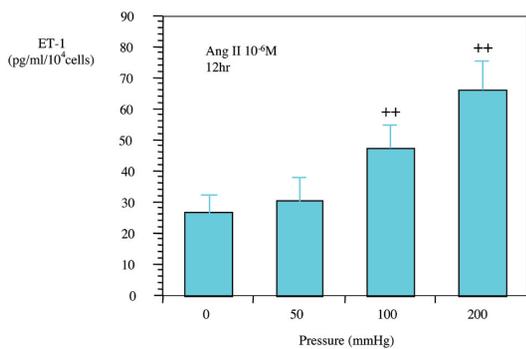


**Fig. 6.** Time course changes in the concentration of Endothelin-1 in cultured rat mesangial cells. Values are means±SEM. ++P<0.01 vs. Time 0 in the same group.

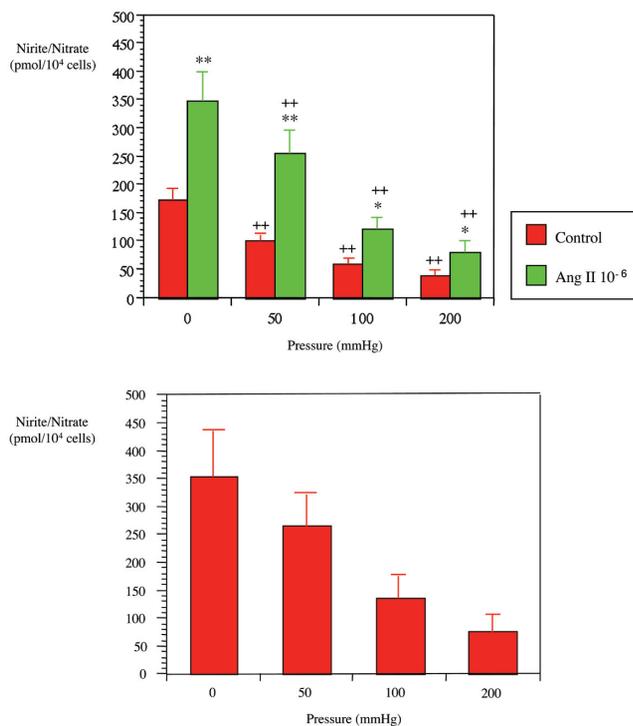


**Fig. 7.** Angiotensin II induced the elevation of the concentration of Endothelin-1 in cultured rat mesangial cells. Values are means±SEM. \*\*P<0.01 vs. Control (Angiotensin II (-)) group. ++P<0.01 vs. Time 0 in the same group.

P=200 mmHg  $0.28 \pm 0.08$ ) (Fig. 10). ecNOS-mRNA に対する Angiotensin II の影響を明らかにする目的で Angiotensin II  $10^{-6}M$  の添加下と非添加下における産生量の比較を行った。Angiotensin II の添加に伴い ecNOS-mRNA の産生は有意に増加し、その増加は加圧に伴い有意に抑制された。(P=0 mmHg, 12 hr : Ang II (-) $0.48 \pm 0.14$  vs. Ang II (+)  $1.50 \pm 0.24$ ) (Fig. 11).



**Fig. 8.** Transmural pressure increased the levels of Endothelin-1 in cultured rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM. ++P<0.01 vs. Pressure 0 mmHg in the same group.



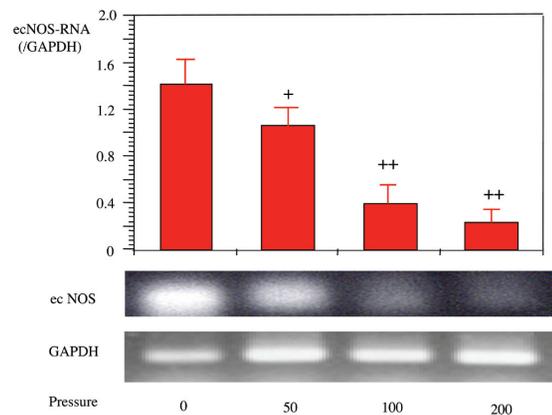
**Fig. 9.** Transmural pressure decreased nitrite/nitrate oxidized products of nitric oxide in cultured rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Control (Angiotensin II (-)) group. ++P<0.01 vs. Pressure 0 mmHg in the same group.

**(5) CS-866 の添加に伴う ET-1 ならびに ecNOS mRNA の発現変化**

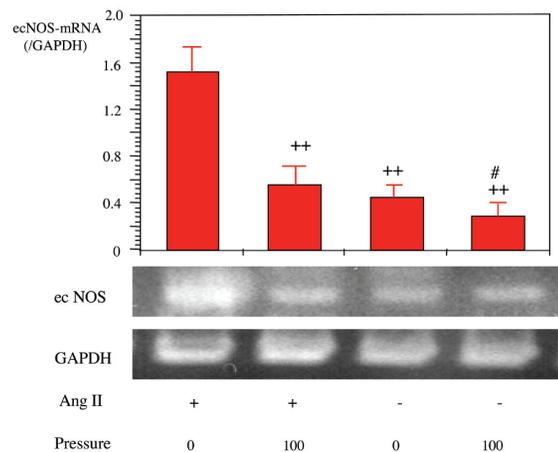
培養条件は Ang II  $10^{-6}M$ , P=200 mmHg の条件で行った。細胞培地上に CS-866  $10^{-4}M$  の添加により Angiotensin II 添加時の E-selectin の発現は有意に抑制された。さらに CS-866 のを同時添加することにより培養上清中の ET-1 濃度は有意に抑制された (Ang II  $10^{-6}M$ , 12 hr : Control  $72 \pm 10$  vs. CS866  $28 \pm 8$  pg/ml/ $10^4$  cells) (Fig. 12).

**(6) E-selectin に対する antisense の導入実験**

E-selectin の発現が, RMC からの血管作動物質の分泌に関与しているのかを明らかにする目的でメサン



**Fig. 10.** Transmural pressure decreased the expression of ecNOS-mRNA in cultured rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM. +P<0.05, ++P<0.01 vs. Pressure 0 mmHg in the same group.



**Fig. 11.** CS866 induced decreased the levels of Endothelin-1 in cultured rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM. +P<0.05, ++P<0.01 vs. Pressure 0 mmHg and Angiotensin II  $10^{-6}M$  group. #P<0.05 vs. Pressure 0 mmHg and Angiotensin II (-) group.

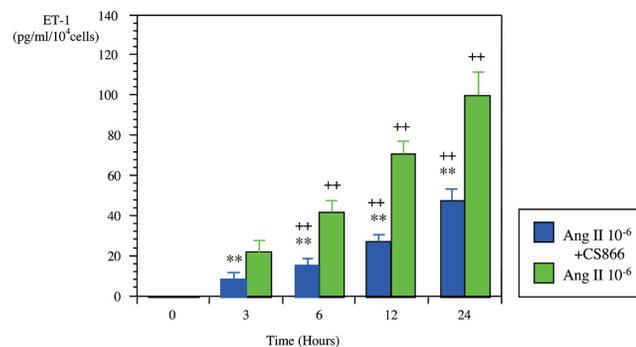
ジウウ細胞内へ E-selectin の antisense を導入した後、angiotensin II と圧の影響についての検討を行った。培養条件は Ang II  $10^{-6}$ M, P=200 mmHg の条件で行った。Antisense 導入群では、6 時間後において E-selectin の発現は認められなかった。一方対照の sense 投与群では E-selectin の発現が認められたことから、antisense の導入により E-selectin の発現抑制が確認された。さらに antisense の導入に伴い、培養液中の ET 濃度は有意な低下を認めた (Ang II  $10^{-6}$ M, P=200 mmHg : sense  $24 \pm 6$  vs. antisense  $14 \pm 4$  pg/ml/ $10^4$ cells) (Fig. 13)。また同時に行った、ecNOS-mRNA の発現は antisense の導入では有意な変化を示さなかった (Fig. 14)。

## 考 案

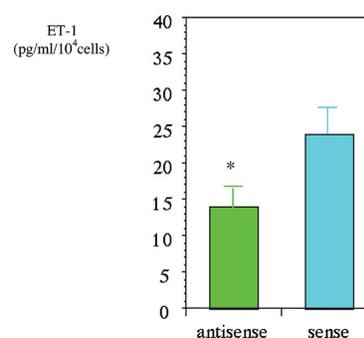
今回の我々の検討では、RMC で Angiotensin II の投与下で物理的加圧に伴い細胞質の接着因子である E-selectin の発現が認められた。この接着因子の発現に伴い、培養細胞上清中には ET-1 ならびに NOx の発現が見られた。この ET-1 の発現は加圧に伴い増加し、一方 NOx は加圧に伴い抑制された。この加圧に伴う E-selectin の発現、ET-1 の増加は Angiotensin II 受容体拮抗薬の投与で有意に抑制された。一方 RMC 中の E-selectin に対する antisense の導入により E-selectin の発現を抑制した結果、ET-1 濃度の有意な減少が認められたが、ecNOS-mRNA の有意な発現変化は見られなかった。以上の結果から、RMC では Angiotensin II の存在と直接の加圧が協調して作用し E-selectin が誘導されること、さらにその E-selectin の発現変化に伴い ET-1 の産生誘導が生じていることが明らかとなった。一方 Angiotensin II は ecNOS-mRNA を発現させ NO の産生を増加させるが、加圧は NO の産生を抑制することから、この NO の発現調節には E-selectin は関与していないことが明らかとなった。

今回の我々の結果では、糸球体内の RMC に対して R-A 系の亢進と物理的圧の上昇が直接に影響し様々な変化を引き起こしている可能性が示唆された。このような物理的圧と R-A 系が協調して細胞における血管作動物質の発現調節に影響をおよぼしていることはこれまでも血管内皮細胞において報告されている<sup>10,11)</sup>。今回の我々の RMC での実験結果は、これらの血管内皮細胞の結果と一致するものであった。血管内腔の圧の上昇が血管の変化を引き起こすことはよく知られており、その血圧上昇の血管壁に対する圧力は血管へのシェアストレス (shear stress)、伸展張力 (stretch pressure)、あるいは壁貫通圧力 (transmural pressure) として作用する<sup>12-14)</sup>。シェアストレスは血流によるずり応力と理解されている。これまでの報告では、シェアストレスは内皮細胞の G 蛋白を活性

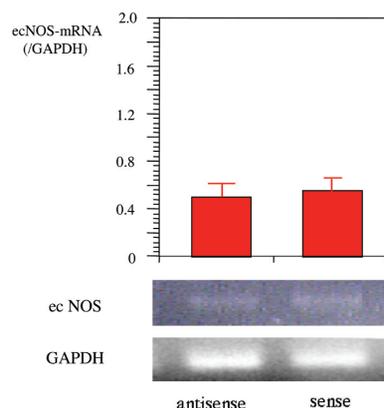
化し細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度を増加させる。ついで  $Ca^{2+}$ /calmodulin 複合体が細胞内のカベオラに結合している ecNOS を活性化して NO の産生を増加させる<sup>15)</sup>。また、内皮細胞にシェアストレスを作用させるとシェ



**Fig. 12.** Time course changes in concentrations of Endothelin-1 in CS866 treated and CS866 untreated rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01 vs. CS866 untreated group. ++P<0.01 vs. Time 0 in the same group.



**Fig. 13.** Expression in concentrations of Endothelin-1 in antisense and sense treated rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01 vs. sense treated group.



**Fig. 14.** Expression of ecNOS-mRNA in antisense and sense treated rat mesangial cells. Values are means  $\pm$  SEM.

アストレスと時間に依存して ecNOS-mRNA が増加することが報告されている<sup>16)</sup>。シェアストレスの ET 産生に及ぼす影響では軽度の負荷であれば増加し、長時間の強度の負荷では減少することが報告されている<sup>17)</sup>。また、ET 変換酵素の mRNA 産生はシェアストレスの強さに応じて減少することが報告されている<sup>17)</sup>。一方シェアストレスとは異なり、血圧の上昇に伴う血管壁への伸展張力と壁貫通圧力は、血管壁の緊張を高める方向に作用することが報告されている。菱川らは、ヒトの培養内皮細胞における ET の産生が加圧によって増加し、一方 NOx の産生は加圧によって抑制されることを報告している<sup>10,11)</sup>。これら培養細胞での NOx の産生抑制と ET の産生亢進が生態での腎糸球体障害の進展機序に関与しているかが重要な点である。これまでに、ET-1 や NO が、糸球体硬化の進展に強く関与していることは多数の動物実験において報告されている。2K1C 腎血管性高血圧犬に対して一酸化窒素 (NO) を阻害することによって、非狭窄腎において糸球体硬化が進展すること<sup>18,19)</sup>、また 2K1C 腎血管性高血圧犬では R-A 系の亢進が腎臓における NO の産生亢進をもたらす糸球体硬化の進行を抑制することが報告されている<sup>20,21)</sup>。またラットにおいても、NO の産生抑制が糸球体硬化をもたらすことが報告されている<sup>22,23)</sup>。一方 ET の産生亢進が糸球体硬化を進展させること<sup>24,25)</sup>。さらに NO と ET の糸球体硬化病変の進展における連関についても知られている<sup>26,27)</sup>。NO の産生抑制下の腎臓の線維化進展に ET-1 の発現が関与しており<sup>26)</sup>、ET(A) 受容体の拮抗薬が糸球体硬化の進展を抑制するとの報告も見られる<sup>27)</sup>。これらの結果は、実際の臨床現場における糸球体硬化の進展に NO の抑制と ET-1 の産生亢進が関与していること、その原因として血圧の上昇と R-A 系の亢進が強く関与していることを示すものと思われた。

今回の結果で見られた RMC での E-selectin の発現は、糸球体血圧の上昇が、RMC において E-selectin を中心とした接着因子の発現をもたらしていることを示しているものと思われた。以前我々も、2腎1クリップ腎血管性高血圧ラットの非狭窄腎の糸球体に E-selectin が発現し、一方の狭窄腎には発現しなかったことを報告した<sup>28)</sup>。この結果は全身血圧が圧負荷として直接影響する可能性のある非狭窄腎において接着因子が発現し、一方血流が低下し糸球体内圧の低下が推測される狭窄腎には発現しないことから、今回の我々の結果と一致するものであった。

近年腎臓疾患と接着因子である selectin の関与については幾つかの報告が見られる。Roy-Chaudhury らは、間質の線維化と伴って尿細管間質に ICAM-1, VCAM-1, ならびに P-selectin, E-selectin の発現が見られることを報告している<sup>29)</sup>。Takei らは、IgA 腎症患者の腎生検標本を用いて L-selectin が間質の浸潤細胞に

多数発現し、血清中の可溶性の L-selectin と間質への浸潤細胞の程度が相関することを示している<sup>30)</sup>。近年 selectin と腎臓疾患の関連は遺伝的な面からも検討されている。Iida らは single-nucleotide polymorphisms (SNPs) を用いた解析を行い、selectin の遺伝子と IgA 腎症が強く関与していることを報告している<sup>31)</sup>。その他にも IgA 腎症の最も重要な増悪因子として高血圧が知られているが、高血圧患者において血管内皮に E-selectin 発現<sup>32)</sup>、さらに血液中に可溶性の E-selectin が検出され、高血圧患者ではそれが増加することが報告されている<sup>33)</sup>。今回の我々の結果では Angiotensin II と加圧の刺激によって RMC に E-selectin が発現し、血圧上昇に伴う糸球体病変の進展に接着因子が関与している可能性を示唆するものと思われた。

この検討での RMC における E-selectin の発現変化は、ET-1 の発現や ecNOS-mRNA の抑制変化と一致した変化であった。この細胞表面における接着因子が種々の細胞の膜表面への接着に関与していることは知られているが、NO や ET の発現に関与しているかについては不明である。今回我々は、この RMC における E-selectin の発現が細胞内機能調節に関与しているか否かを明らかにする目的で、RMC に E-selectin に対する antisense を導入し、E-selectin の発現を抑制した状況下において ET の発現と ecNOS-mRNA の発現に影響を与えるかを検討した。その結果 antisense の導入により、ET の発現は有意に抑制された。この結果は E-selectin が ET の産生調節に強く関与していることを明らかにするものであり、接着因子が細胞内機能調節に関与している可能性を示唆するものであった。一方 ecNOS-mRNA の発現には全く影響しなかったことは、E-selectin は NO の産生調節には関与していないことを示し、加圧が ET 産生亢進を誘導するシグナル伝達経路とは異なる伝達経路によって NO の産生調節が行われている可能性を示すものと考えられた。

今回の検討から、接着因子である E-selectin は細胞内機能調節に関与している可能性が示唆された。接着因子は細胞膜表面に発現する蛋白であり、細胞接着に重要な役割を果たしている<sup>33)</sup>が、近年細胞内へのシグナル伝達機能に関与していることが報告されている<sup>34,35)</sup>。特に Integrin は、細胞内シグナル伝達機構である ERK (External Related Protein Kinase や JNK (N-terminal Jun Kinase) / STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) を活性化して、細胞増殖や分化、さらにアポトーシス等の細胞の機能発現に重要な役割を担っている<sup>36,37)</sup>。これまでに E-selectin と JNK などの細胞内情報伝達系の関与は不明とされていたが、Lysiak らは精巣の虚血再灌流時に JNK の活性化が生じ、その結果 E-selectin の発現が生じることを報告した<sup>38)</sup>。また近年 ERK と E-selectin の連関

も報告されている<sup>39)</sup>。JAK/STAT 経路の活性化が AT1 受容体を介した Angiotensin II の作用として存在することは、血管平滑筋や心筋細胞、心筋繊維芽細胞などで報告されている<sup>40)</sup>。これらの結果から、E-selectin は JNK や ERK などの細胞内情報伝達系に参与し、Angiotensin II による ET の発現調節に参与している可能性が考えられた。しかし接着因子の細胞機能調節への関与は極めて重要な点であり、今後さらなる検討が必要と思われる。

今回の実験では Angiotensin II の非存在下と比較して、存在下では物理的加圧に依存して著明に E-selectin の発現が著明に増加すること、さらに ET-1 の発現誘導と ecNOS-mRNA の発現抑制が生じることが明らかとなった。以上の結果は Angiotensin II と物理的圧の協調作用の重要性を示唆するものと思われる。この点を明らかにする目的で、ARB である CS-866 の E-selectin ならびに NO, ET 発現への影響につき検討を行った。その結果、物理的圧の存在下において CS-866 の投与は接着因子の発現を抑制し、さらに ET-1 の産生を抑制した。一方 ecNOS-mRNA の発現は有意に増加した。以上の結果は、これらの発現誘導はいずれも Angiotensin II Type I 受容体を介した反応であり、物理的圧と Angiotensin II の協調作用が重要であり、Angiotensin II の非存在下においては E-selectin 発現や ET の発現が著明に抑制されることが示された。このような Angiotensin II と物理的圧の協調作用によって細胞の機能調節がなされており、そのために糸球体硬化などの腎臓障害も相乗作用として進展するものと思われる。この結果は臨床の現場において腎臓障害の進展予防では血圧を下げるばかりでなく、積極的に R-A 系阻害薬を使用すべきとする近年の治療指針と一致するものと思われる。

## まとめ

- 1) ラット培養メサンジウム細胞では Angiotensin II の投与と加圧に伴い細胞質に接着因子である E-selectin の発現が見られた。
- 2) この接着因子の発現は、Angiotensin II の非存在下では発現せず、Angiotensin II の濃度に依存して増加した。また非加圧下では発現せず、加圧に依存して発現の増加を認めた。
- 3) この接着因子の発現に伴い、培養細胞上清中には ET-1 ならびに NOx の発現が見られた。この ET-1 の発現は加圧に伴い増加し、一方 NOx は加圧に伴い抑制された。
- 4) 培養細胞において ecNOS-mRNA の発現は、Angiotensin II の投与に伴い増加し、一方加圧に伴い有意な抑制を認めた。
- 5) この加圧および Angiotensin II の添加に伴う E-selectin の発現、ET-1 の増加は Angiotensin II

の受容体拮抗薬 CS-866 の投与に伴い有意に抑制された。

- 6) ET-1 の発現は E-selectin の antisense を導入した培養メサンジウム細胞では有意に抑制された。一方 ecNOS-mRNA の発現に影響を及ぼさなかった。
- 7) 以上の結果からメサンジウム細胞を中心に糸球体における NO の産生抑制と ET-1 の産生亢進が糸球体内圧の上昇と、R-A 系の亢進の協調作用により生じていること、さらに ET の産生調節に接着因子の E-selectin が参与していることが明らかとなった。

## 結 論

圧力釜を用いた直接の物理的加圧実験により、ラット培養メサンジウム細胞では Angiotensin II の投与と加圧に伴い細胞質に接着因子である E-selectin の発現が見られた。この接着因子の発現に伴い、培養細胞上清中には ET-1 ならびに NOx の発現が見られた。この ET-1 の発現は加圧に伴い増加し、一方 NOx は加圧に伴い抑制された。また ecNOS-mRNA の発現も加圧に伴い抑制された。この加圧に伴う E-selectin の発現、ET-1 の増加は Angiotensin II の受容体拮抗薬の投与に伴い有意に抑制された。一方ラット培養メサンジウム細胞への E-selectin に対する antisense の導入により E-selectin の発現を抑制した結果、ET-1 濃度の有意な減少が認められた。また antisense の導入では ecNOS-mRNA の有意な発現変化は見られなかった。

以上の結果から、メサンジウム細胞では Angiotensin II の存在と直接の加圧が協調して作用し E-selectin を誘導すること、さらにその E-selectin の発現変化に伴い ET-1 の産生誘導が生じていることが明らかとなった。一方 Angiotensin II は ecNOS-mRNA を発現させ NO の産生を増加させるが加圧は NO の産生を抑制すること、この NO の発現調節には E-selectin は参与していないことが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜りました埼玉医科大学腎臓内科学講座教授鈴木洋通教授に深謝いたします。また直接御指導頂きました同教室中元秀友助教授に深謝いたします。また、本研究に対して多大な御協力、御助言を賜りました研究室各位に感謝申し上げます。

なお、この論文の要旨は第 71 回日本内分泌学会総会 (1998 年、福岡)、第 3 回 Vascular Medicine 学会 (1998 年、神戸)、第 21 回日本高血圧学会総会 (1998 年、広島)、第 2 回心血管内分泌学会 (1998 年、京都)、第 4 回 Vascular Medicine 学会 (1999 年、大阪) において発表した。

## 引用文献

- 1) Riser BL, Cortes P, Yee J. Modelling the effects of vascular stress in mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:43-7.
- 2) Johnson RJ. Have we ignored the role of oncotic pressure in the pathogenesis of glomerulosclerosis? *Am J Kidney Dis* 1997;29:147-52.
- 3) Luscher TF, Dohi Y, Tschudi M. Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;19(suppl 5):S34-42.
- 4) Chien S, Li S, Shyy YJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* 1998;31:162-9.
- 5) Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int* 2000; 57(suppl 75):S7-14.
- 6) Mai M, Hilgers KF, Geiger H. Experimental studies on the role of intracellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in hypertensive nephrosclerosis. *Hypertension* 1996; 28:973-9.
- 7) 石川春律, 村上 徹, 土方貴雄. 細胞間接着装置. 坂倉照好. 細胞接着のしくみと疾患. 東京: 羊土社; 1998. p. 10-9.
- 8) Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:586-90.
- 9) Kikkawa R, Umemura K, Haneda M, Arimura T, Ebata K, Shigeta Y. Evidence for existence of polyol pathway in cultured rat mesangial cells. *Diabetes* 36: 1987;240-3.
- 10) Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Pressure enhances endothelin-1 release from cultured human endothelial cells. *Hypertension* 1995;25:449-52.
- 11) Hishikawa K, Nakai T, Suzuki H, Saruta T, Kato R. Transmural pressure inhibits nitric oxide release from human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1992; 215:329-31.
- 12) Tarbell JM, Demaio L, Zaw MM. Effect of pressure on hydraulic conductivity of endothelial monolayers: role of endothelial cleft shear stress. *J Appl Physiol* 1999;87:261-8.
- 13) Sipkema P, van der Linden PJ, Westerhof N, Yin FC. Effect of cyclic axial stretch of rat arteries on endothelial cytoskeletal morphology and vascular reactivity. *J Biomech* 2003;36:653-9.
- 14) Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 1998;83:334-41.
- 15) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H1145-9.
- 16) Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;100: 2146-52.
- 17) Masatsugu K, Itoh H, Chun TH, Ogawa Y, Tamura N, Yamashita J, et al. Physiologic shear stress suppresses endothelin-converting enzyme-1 expression in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31(Suppl 1):S42-5.
- 18) Nakamoto H, Ferrario CM, Buckalew VM, Suzuki H. Role of nitric oxide in the evolution of renal ischemia in two-kidney, one-clip renovascular hypertension. *Hypertens Res* 1998;21:267-77.
- 19) Nakamoto H, Ferrario CM, Fuller SB, Robaczewski DL, Winicov E, Dean RH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide interaction in renovascular hypertension. *Hypertension* 1995;25(part2):796-802.
- 20) Sigmon DH, Beierwaltes WH. Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. *Hypertension* 1993;22:237-42.
- 21) Sigmon DH, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension* 1998;31: 649-56.
- 22) Ono H, Ono Y, Takanohashi A, Matsuoka H, Frohlich ED. Apoptosis and glomerular injury after prolonged nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001;38:1300-6.
- 23) Akuzawa N, Nakamura T, Kurashina T, Saito Y, Hoshino J, Sakamoto H, et al. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. *Am J Hypertens* 1998;11: 697-707.
- 24) Lariviere R, Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:607-21.
- 25) Tharaux PL, Chatziantoniou C, Casellas D, Fouassier L, Ardaillou R, Dussaule JC. Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis

- during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation* 1999;99:2185-91.
- 26) Tharaux PL, Chatziantoniou C, Casellas D, Fouassier L, Ardailou R, Dussaule JC. Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephrosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation* 1999;99:2185-91.
- 27) Nakamura T, Kurashina T, Saito Y, Sumino H, Akuzawa N, Aizawa H, et al. ET(A) receptor antagonist ameliorates nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rat by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertens Res* 1998;21:251-7.
- 28) 中元秀友, 荒井 充, 石田祐二, 今井比呂恵, 山内康弘, 鈴木洋通. 圧は接着因子を介して腎臓の機能調節に関与している *Ther Res* 2001;22:1298-303.
- 29) Roy-Chaudhury P, Wu B, King G, Campbell M, Meclod AM, Haites NE, et al. Adhesion molecule interactions in human glomerulonephritis: importance of tubulointerstitium. *Kidney Int* 1996;48:127-34.
- 30) Takei T, Nitta K, Uchida K, Yumura W, Nihei H. Serum levels of soluble L-selectin and interstitial changes in patients with IgA nephropathy. *J Tokyo Wom Med Univ* 2003;73:71-7.
- 31) Iida A, Nakamura Y. High-resolution SNP map in the 55+kb region containing the selectin gene family on chromosome 1q24-q25. *J Hum Genet* 2003;43:150-4.
- 32) Malmqvist K, Wallen HN, Held C, Kahan T. Soluble cell adhesion molecules in hypertensive concentric left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 2002;20:1563-9.
- 33) Anderson JM, Balda MS, Fanning AS. The structure and regulation of tight junction. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:1777-88.
- 34) Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-9.
- 35) Parsons JT. Integrin-mediated signaling-regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:146-52.
- 36) Whltlock BB, Gardal S, Fadok V, Bratton D, Henson PM. Differential roles for alpha (M) beta (2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *J Cell Biol* 2000;151:1305-20.
- 37) Schlaepfer DD, Hauck DR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:435-78.
- 38) Lysiak JJ, Nguyen QA, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol Reprod* 2003;69:202-10.
- 39) Jozsef L, Khreiss T, Fournier A, Chan JS, Filep JG. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol* 2002;135:1167-74.
- 40) Kodama H, Fukuda K, Pan J, Makino S, Sano M, Takahashi T, et al. Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocyte. *Circ Res* 1998;82:244-50.