

総 説

心臓におけるプロスタノイドの保護的役割
— 受容体欠損マウスを用いた解析 —

原 明義

Protective Roles of the Prostanoids in the Heart: Studies Using Mice
Deficient in Prostanoid Receptors

Akiyoshi HARA

(Received November 20, 2016)

1. はじめに

プロスタノイドとは、アラキドン酸にシクロオキシゲナーゼ (COX) が作用することによって産生されるプロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) の総称である (Fig. 1). これらのプロスタノイドは、標的細胞表面にある各プロスタノイドに特異的な受容体を介して多彩な生理作用を発揮する. 現在, PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2 の受容体として, それぞれ DP, EP, FP, IP, TP が知られており, EP は EP_1 , EP_2 , EP_3 , EP_4 の4種類のサブタイプに分類されている. 心

血管系においても, 多種類のプロスタノイド受容体が, 心臓, 血管, 血小板などに多く発現しており, プロスタノイドは血圧, 血流量や血小板機能の調節に深く関与している.¹⁻³⁾ さらに, プロスタノイドは心筋の虚血障害, 心肥大や心線維化, 動脈硬化などの循環器障害の発症や制御に関与すると考えられている. しかし, プロスタノイド受容体に対する特異的なアゴニストやアンタゴニストはほとんどなく, プロスタノイドの有する生理的・病態生理的役割については不明な点が多く残されている. そこで我々は, プロスタノイド受容

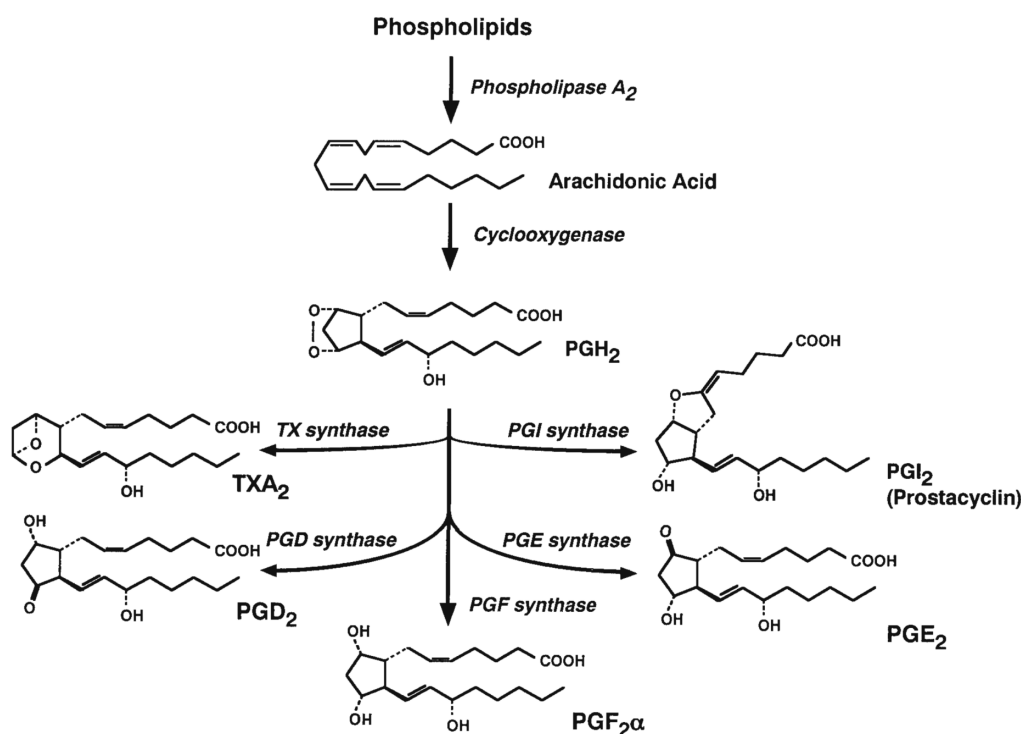


Fig. 1. Biosynthetic pathway of prostaglandin (PG)_{D2}, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , and thromboxane (TX)_{A2}.

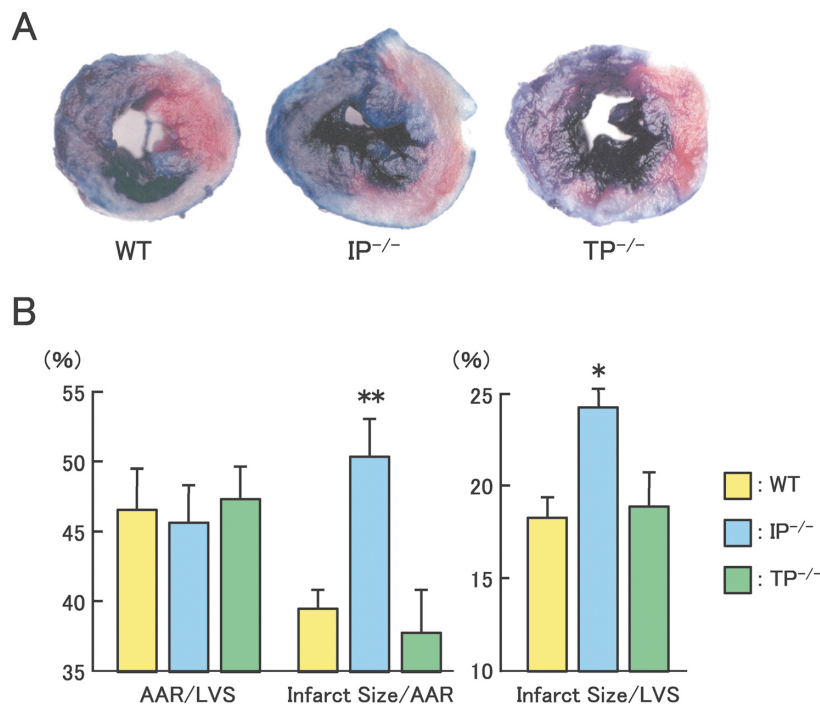


Fig. 2. Myocardial infarct size after coronary occlusion followed by reperfusion in wild-type (WT), IP^{-/-}, and TP^{-/-} mice.

A; Representative photomicrographs of section of LV from wild-type, IP^{-/-}, and TP^{-/-} mice after 1 hour of occlusion of the left anterior descending coronary artery followed by 24 hours of reperfusion. Tissue stained blue by Evans blue dye represents nonischemic area; tissue stained red by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) within ischemic area is still alive. Tissue not stained by either Evans blue dye or TTC appears pale to white and represents necrotic myocardium. B; The sizes of the ischemic region (area at risk), infarcted tissue, and the left ventricle, defined as AAR, infarct size, and LVS, respectively, were determined by digital planimetry using computer software (NIH Image). *P<0.05, **P<0.01 vs. wild-type group (n=10) (Ref. 13).

体を欠損するマウスを用いて、種々の循環器障害におけるプロスタノイドの役割について解析を行ってきた。この総説では、心筋の虚血-再灌流障害および圧負荷による心肥大形成におけるプロスタノイドの役割について、我々の知見を中心に概説する。

2. 心筋の虚血-再灌流障害におけるプロスタノイドの役割

心臓を養っている冠動脈が血栓などにより閉塞し冠血流が長時間途絶えると、再灌流を行っても心機能は回復せず心筋細胞の壊死を招く。この虚血-再灌流に伴う心筋壊死が、致死率の高い心筋梗塞の基本病態と考えられている。現在、わが国では、心筋梗塞を含めた心疾患が悪性新生物（がん）に次いで死因の第2位を占めており、より効果的な虚血性心疾患治療薬の開発が重要な課題となっている。

心筋が虚血に陥ると、PGI₂やTXA₂が産生・遊離することが知られている。⁴⁶⁾心臓にはこれらの受容体であるIPとTPが発現している^{1,7,8)}ことか

ら、PGI₂とTXA₂は心筋の虚血障害に何らかの役割を果たしている可能性が想定されてきた。事実、これらのプロスタノイドは、心血管系において多彩な生理作用を発現する。例えば、PGI₂はIPに作用し、血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、白血球粘着抑制作用を発現し、⁹⁻¹¹⁾TXA₂はTPに作用し、血管収縮作用、血小板凝集促進作用を示す。^{10,12)}したがって、虚血によって産生された内因性PGI₂は虚血心筋に対して保護的に作用し、逆に内因性TXA₂は障害的に作用する可能性がある。この可能性を明らかにするため、IP欠損およびTP欠損マウスを用いて、心筋の虚血-再灌流障害におけるPGI₂とTXA₂の役割を解析した。

始めに、in vivoにおいて、野生型、IP欠損およびTP欠損マウスの左冠動脈前下行枝を1時間結紮した後、再灌流を24時間行い心筋の梗塞サイズを計測した。その結果、虚血領域はこれらのマウス間で差はなかったが、梗塞サイズは野生型マウスに比較しIP欠損マウスで著明に高い値を示した。しかし、TP欠損マウスの梗塞サイズは野生型マウスと差を認めなかった (Fig. 2)。これらの事

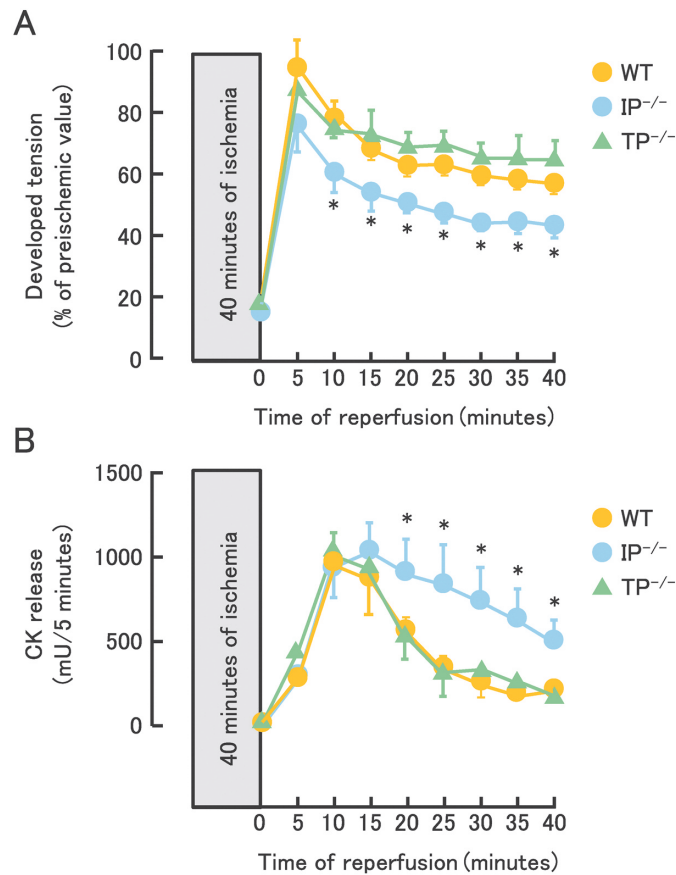


Fig. 3. Developed tension (A) and creatine kinase (CK) release into coronary flow (B) during post-ischemic reperfusion period in wild-type, IP^{-/-}, and TP^{-/-} mice.

Isolated hearts were perfused according to Langendorff technique and subjected to global ischemia for 40 minutes followed by 40 minutes of reperfusion. *P<0.05 vs. wild-type group (n=6-18) (Ref. 13).

実から、虚血によって産生された内因性 PGI₂ は心筋保護的に作用するが、内因性 TXA₂ は予想とは異なり、ほとんど心筋障害的に作用しないことが明らかとなった。¹³⁾

前述したように、PGI₂ は血小板凝集を抑制し、さらに内皮細胞への白血球の粘着を抑制する。血小板や白血球の活性化が、虚血心筋に対し障害的に作用することから、PGI₂ の虚血心筋保護効果には、血小板や白血球などの血液成分に対する作用が関与すると考えられてきた。^{14,15)} しかし、PGI₂ の虚血心筋保護作用に心臓への直接作用が関与するか否かは明らかでない。この点を明らかにするため、摘出灌流心臓を用いた ex vivo 実験系において、虚血-再灌流障害における PGI₂ の役割を解析した。IP 欠損マウスの心臓では、野生型マウスの心臓に比較し、虚血後再灌流時における心機能障害（発生張力の低下）が顕著にみられた。また、心筋からの酵素（クレアチンキナーゼ）逸脱量も有意に高い値を示した (Fig. 3) ことから、PGI₂ の

心臓に対する直接作用が、虚血心筋保護に関与することが明らかとなった。この直接作用の発現機序は不明な点が多いが、心筋のカルシウム活性化カリウムチャネルの開口が関与している可能性がある。¹³⁾

PGI₂ や TXA₂ と同様、心筋の虚血によって PGE₂ の産生・遊離が亢進する⁶⁾ ことから、PGE₂ も虚血-再灌流心筋において何らかの役割を演じている可能性がある。先に我々は、心筋梗塞モデルを用いた in vivo 実験系で、野生型マウスの梗塞サイズと比較し、EP₁ 欠損マウスと EP₂ 欠損マウスでは差を認めなかったが、EP₃ 欠損マウスの梗塞サイズは増大することを認めた。このことは、内因性 PGE₂ が EP₃ を介して虚血心筋保護効果を現すことを示唆する。¹⁶⁾ また、EP₃ アゴニストの外因性投与が、虚血-再灌流による心筋障害を減弱させることも報告されており、この保護作用にはプロテインキナーゼ C および ATP 感受性カリウムチャネルの開口が関与すると考えられている。¹⁷⁾

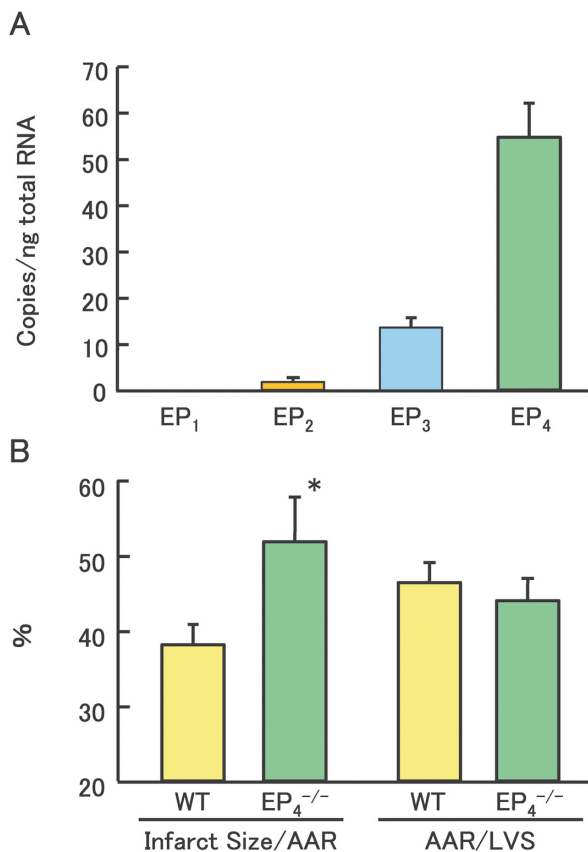


Fig. 4. Murine ventricle expresses mRNAs for EPs (A) and myocardial infarct size after coronary occlusion followed by reperfusion in wild-type and EP₄^{-/-} mice (B).

A; Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) showing expression levels of mRNAs for EP₂, EP₃, and EP₄ (n=3). B; Infarct size, AAR and LVS were determined according to the method described in the legend of Fig. 2. *P<0.05 vs. wild-type group (n=10) (Ref. 18).

EPサブタイプ mRNAの発現解析によれば、心臓ではEP₄ mRNAが最も多く発現していることから、PGE₂-EP₄系が虚血-再灌流障害に重要な役割を担っていることも想定される。このことを明らかにするために、まず、マウス左冠動脈前下行枝を1時間閉塞した後、24時間再灌流する心筋梗塞モデルを用いた解析を行った。その結果、虚血領域は両マウス間に差はなかったが、EP₄欠損マウスの梗塞サイズは野性型マウスに比較し有意に高い値を示した (Fig. 4)。また、摘出灌流心臓を用いた解析では、野性型マウスよりもEP₄欠損マウスで虚血-再灌流による心機能障害が顕著にみられ、さらに心筋からのクレアチンキナーゼ逸脱量が高値であった (Fig. 5)。これらの結果、虚血によって産生されたPGE₂は、EP₃だけでなくEP₄を介して虚血-再灌流障害から心筋を保護することが明らかとなった。¹⁸⁾

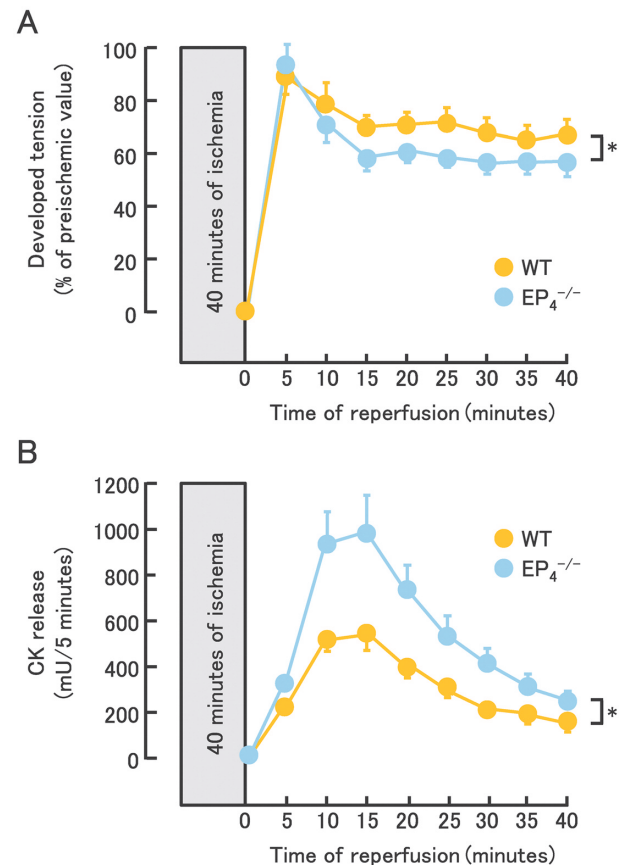


Fig. 5. Developed tension (A) and creatine kinase (CK) release into coronary flow (B) during post-ischemic reperfusion period in wild-type and EP₄^{-/-} mice.

Hearts isolated from wild-type and EP₄^{-/-} mice were perfused according to Langendorff technique and subjected to global ischemia for 40 minutes followed by 40 minutes of reperfusion. **P<0.05 vs. wild-type group (n=6-18) (Ref. 18).

次に、この虚血心筋保護作用が、心筋細胞と間質細胞 (非心筋細胞) のどちらに対する作用に起因するかを、培養細胞を用いて検討した。EP₄アゴニストであるAE1-329は、間質細胞の細胞内cAMPを濃度依存的かつ顕著に増加させたが、この作用はEP₄欠損マウス由来の間質細胞において消失した。一方、心筋細胞ではAE1-329による細胞内cAMPの上昇は軽度であったことから、PGE₂は主に間質細胞のEP₄を介して心筋保護作用を発揮することが示唆された。

さらに我々は、EP₄アゴニストである4819-CDのマウス心筋梗塞に対する効果を解析することにより、EP₄アゴニストの心筋梗塞治療薬としての可能性を検討した。その結果、冠動脈閉塞前に皮下投与された4819-CDは、心行動態にほとんど影響を及ぼすことなく梗塞サイズを縮小させた。さらに興味深いことに、4819-CDを冠動脈閉塞後

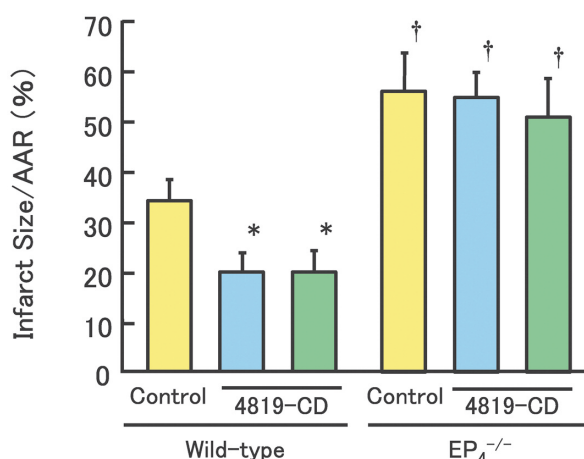


Fig. 6. Effects of 4819-CD, an EP₄ agonist, on myocardial infarct size after coronary occlusion followed by reperfusion in wild-type and EP₄^{-/-} mice.

Infarct size as a percentage of AAR is determined in the control group (■), the group injected with 4819-CD before ischemia (■), and the group injected with 4819-CD after ischemia (■). 4819-CD decreased infarct size in vivo in wild-type but not in EP₄^{-/-} mice. *P < 0.05 vs. control group. †P < 0.05 vs. wild-type group (n = 6–8) (Ref. 18).

に皮下投与した場合も、閉塞前投与と同程度に梗塞サイズを低下させた (Fig. 6)。また、これらの 4819-CD による虚血心筋保護作用は、EP₄ 欠損マウスにおいて消失した。これらの知見は、EP₄ アゴニストの心筋梗塞治療薬としての有用性を示唆する。EP₄ を介した心筋保護作用の発現機序については、血管拡張、好中球機能抑制、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) 産生抑制およびインターロイキン-10 (IL-10) の産生促進などが提唱されているが、詳細については不明な点が多く、今後更なる解析が必要と思われる。¹⁸⁾

従来、PGE₂ の細胞保護作用として胃粘膜上皮に対する保護作用がよく知られており、実際 PGE₂ 類縁物質 (PGE₁ 誘導体) であるミソプロストールが胃潰瘍の予防・治療に用いられている。また最近、脳虚血障害時に内因性 PGE₂ が EP₂ と EP₄ を介して神経保護的に作用することも報告されている。^{19,20)} 一方、今回の結果は、心臓の虚血-再灌流障害において、内因性 PGE₂ が EP₄ を介して心筋保護に働くことを明らかにするとともに、EP₄ アゴニストの心筋梗塞治療薬としての可能性を提示するものである。

3. 圧負荷心肥大における PGI₂ の役割

心肥大は、圧負荷や容量負荷に対する一種の適応現象であるが、長期的には心臓の拡張障害を招き心不全の原因となる。現在、高血圧症はわが国の成人に最も多くみられる疾患であり、その患者

数は約 4,000 万人以上にのぼるといわれている。今後、人口の高齢化などに伴って高血圧患者は一層増加することが予想されるだけに、心肥大の病態を解明し予防・治療法を確立することが必要と思われる。

これまでの報告によれば、心肥大を惹起・促進する内因性因子としてアンジオテンシン II やエンドセリン^{21,22)} などがある。また、心肥大抑制因子としてブラジキニンやナトリウム利尿ペプチド^{23,24)} などが提唱されている。近年、PGI₂ 受容体である IP が、血管や血小板だけでなく心筋細胞や心臓の間質細胞にも発現している^{7,25)} ことや、IP アゴニストであるベラプロストは、心臓線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生を抑制することが報告されている。²⁵⁾ したがって、心肥大の制御に内因性 PGI₂ が関与する可能性が考えられる。この点を明らかにするため、我々は IP 欠損マウスを用いて、圧負荷により惹起される心肥大形成における PGI₂ の役割を解析した。

野生型および IP 欠損マウスの胸部大動脈を慢性的に狭窄することにより、圧負荷心肥大モデルを作成した。両マウスの心重量/体重比は、狭窄 2 および 4 週間後に著しく増加したが、その値は野生型マウスに比較し IP 欠損マウスで有意に高かった (Fig. 7)。しかし、狭窄後の血圧および心拍数は、野生型と IP 欠損マウスのあいだに差を認めなかった。一方、非狭窄群の野生型と IP 欠損マウスとの間には、心重量/体重比、血圧および心拍数

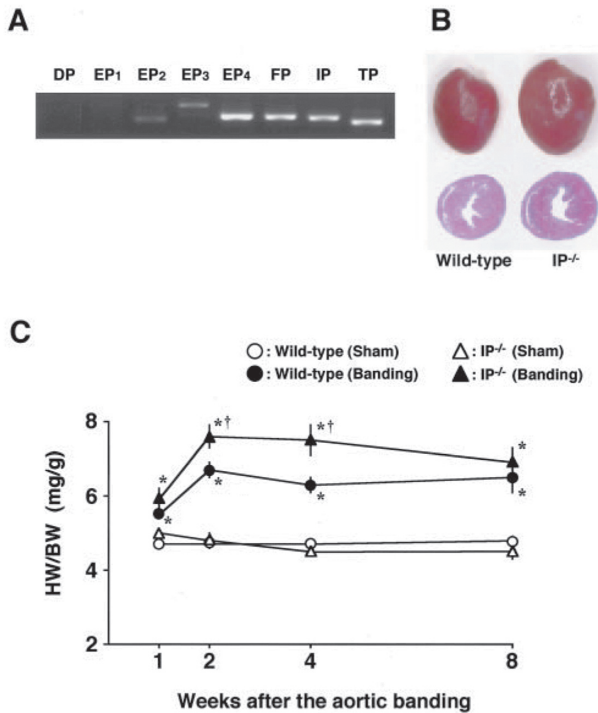


Fig. 7. Expression of mRNAs for prostanoid receptors in the heart and degree of cardiac hypertrophy induced by pressure overload in mice lacking prostanoid receptors individually.

A; Expressions of mRNAs for prostanoid receptors were determined in cardiac ventricles of wild-type mice by RT-PCR. B; Representative photographs of whole heart isolated from wildtype and IP^{-/-} mice at 2 weeks of aortic banding and corresponding midtransverse sections stained with hematoxylin and eosin. C; Ratios of wet weight of the heart (HW) and body weight (BW) at 1, 2, 4, and 8 weeks after aortic banding in wild-type and IP^{-/-} mice. *P<0.05 vs. corresponding sham-operated mice; †P<0.05 vs. aortic-banded wild-type mice (n=4-7) (Ref. 26).

に差を認めなかった。これらの結果から、圧負荷によって産生された内因性 PGI₂ は IP を介して心肥大を抑制すること、また、PGI₂ のこの作用は血行動態の変化を介するものではないことが示唆された。²⁶⁾

IP は心筋細胞や心臓の間質細胞に発現している^{7,24)} ことから、PGI₂ はこれらの細胞に作用して圧負荷による心肥大形成を抑制した可能性がある。そこで次に、心臓の組織標本を作製し、左心室筋細胞の横断面積を計測した。さらに、間質と冠血管周囲の線維化の程度を解析した。野生型および IP 欠損マウスの心筋細胞断面積は、大動脈狭窄により増加したが、その程度は野生型マウスよりも IP 欠損マウスにおいて高値であった (Fig. 8)。同様に、大動脈狭窄による間質と冠血管周囲の線維化も、野生型マウスより IP 欠損マウスにおいて顕著であった (Fig. 9)。これらの結果、PGI₂-IP 系は圧負

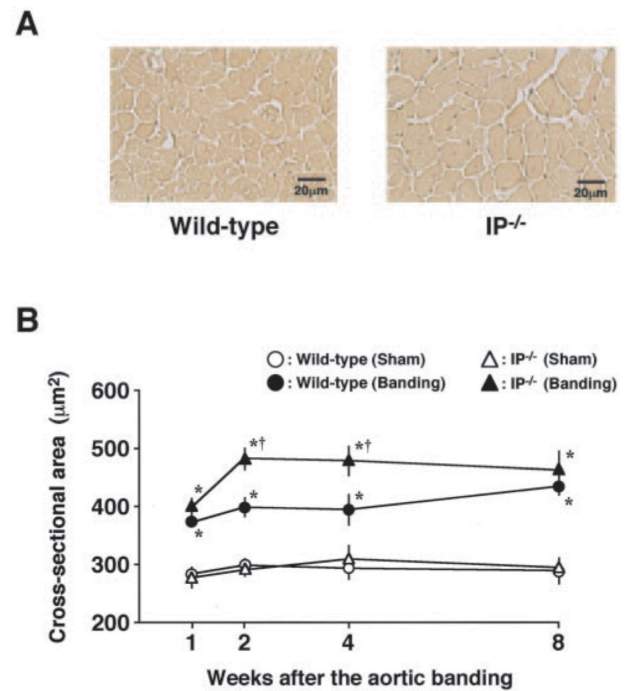


Fig. 8. Cardiomyocyte hypertrophy induced by pressure overload in wild-type and IP^{-/-} mice.

A; Histological manifestation of cardiomyocytes at 2 weeks after aortic banding. Magnification ×300. B; Cross-sectional area of cardiomyocytes was measured at 1, 2, 4, and 8 weeks after aortic banding. *P<0.05 vs. corresponding sham-operated mice; †P<0.05 vs. aortic-banded wild-type mice (n=4-9) (Ref. 26).

荷による心筋細胞肥大と心線維化の両方を抑制することが明らかとなった。また、心肥大のマーカー遺伝子として知られている心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide; ANP) の発現も、野生型マウスで上昇が見られない早期に、IP 欠損マウスで有意に亢進した。この結果は、PGI₂-IP 系が心肥大関連遺伝子の発現制御にも関わることを意味する。一方、培養細胞を用いた解析では、IP アゴニストであるシカプロストが血小板由来成長因子 (PDGF) による非心筋細胞の増殖を有意に抑制した。しかし、シカプロストは主要な心肥大因子であるカルジオトロフィンによる心筋細胞肥大を抑制しなかった。この結果と一致して、シカプロストは非心筋細胞の cAMP 濃度を著明に増加させたが、心筋細胞の cAMP 濃度に対してはわずかに増加させたに過ぎなかった (Fig. 10)。これらの結果、PGI₂ の心肥大抑制作用は心筋細胞に

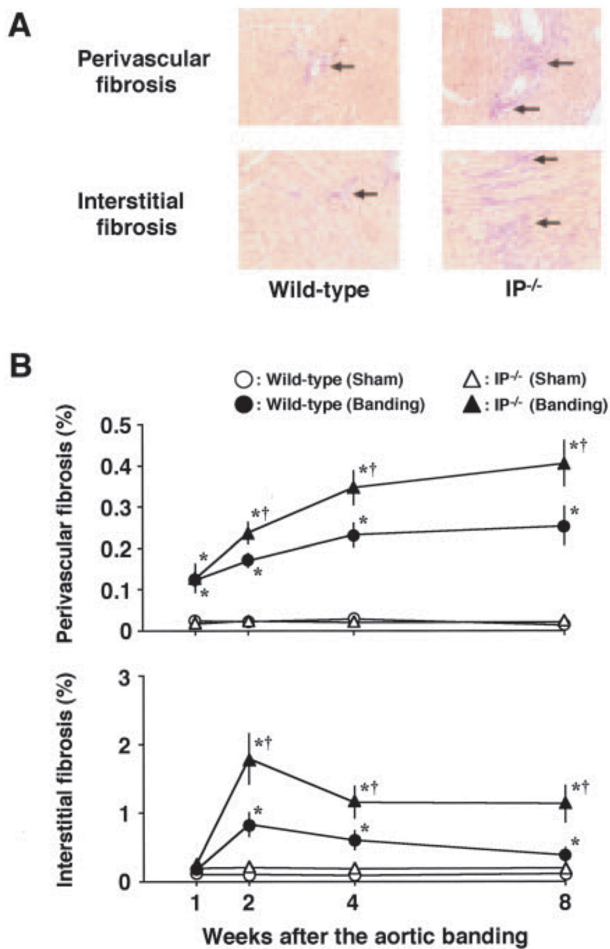


Fig. 9. Cardiac fibrosis induced by pressure overload in wildtype and IP^{-/-} mice.

A; Histological manifestation of van Gieson-stained interstitial and perivascular fibrosis in sections of cardiac ventricles at 2 weeks after aortic banding. Arrows indicate fibrotic area. Magnification ×20. B; Ratios of area of perivascular (top) and of interstitial (bottom) fibrosis to total cardiac area at 1, 2, 4, and 8 weeks after aortic banding were presented. *P<0.05 vs corresponding sham-operated mice; †P<0.05 vs aortic-banded wild-type mice (n=4-10) (Ref. 26).

対する直接作用ではなく、主に非心筋細胞に対する間接作用に由来すると考えられた。²⁶⁾

マウスの心臓には IP 以外に EP₂, EP₃, EP₄, FP および TP が多く発現している。そこで、これらのプロスタノイド受容体欠損マウスの胸部大動脈を狭窄し、心肥大の程度を解析したが、EP₂, EP₃, EP₄, FP および TP 受容体欠損マウスの心重量/体重比は、いずれも野生型マウスと差を認めなかった。したがって、PGI₂ とは異なり、PGE₂, PGF_{2α} および TXA₂ は圧負荷による心肥大形成に大きな役割を演じていないと考えられる。²⁶⁾ 一方、心筋梗塞後の心筋細胞肥大と心線維化に、PGE₂-EP₄ 系が促進的に作用することが報告されており、²⁷⁾ 心筋リモデリングにおけるプロスタノイドの役割が明らかになりつつある。

従来、PGI₂ は強力な血管拡張作用をもつ薬物の代表とされてきた。実際、PGI₂ 誘導体のベラプロストは、閉塞性動脈硬化症や肺高血圧症の治療薬として臨床使用されている。一方、今回の結果は、IP アゴニストが血管拡張作用以外に心臓に直接作用して心肥大抑制作用を現すことを示唆するものであり、圧負荷に伴う肥大性心疾患の治療薬としての可能性をも示唆している。

4. おわりに

従来、プロスタノイドは炎症性メディエーターとして知られていた。しかし、各々のプロスタノイド受容体欠損マウスの作出・解析が進むにつれて、プロスタノイドの新たな病態生理的役割が明らかとなってきた。本稿では、心筋の虚血-再灌流障害および圧負荷による心肥大形成におけるプロスタノイドの役割に関して、我々の研究成果を中心に述べてきた。これらの知見から、IP アゴニ

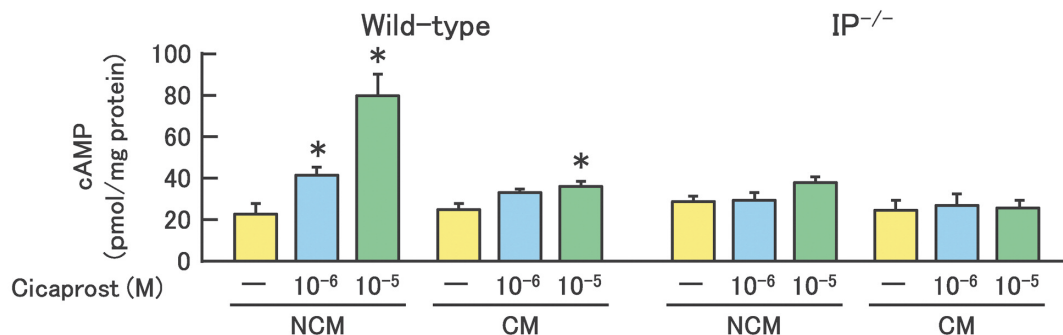


Fig. 10. Effects of cicaprost, an IP agonist, on the levels of intracellular cAMP ([cAMP]i) in noncardiomyocytes (NCM) and cardiomyocytes (CM) from wild-type and IP^{-/-} mice.

These cells were incubated with vehicle or cicaprost (10⁻⁶ or 10⁻⁵ mol/L). Isoproterenol (10⁻⁷ mol/L) increased [cAMP]i to 1115.0 ± 37.9 pmol/mg protein in cardiomyocytes. *P<0.05 vs control group (n=4-5) (Ref. 26).

ストは虚血性・肥大性心疾患の治療に応用され、EP₃とEP₄アゴニストは虚血性心疾患の治療に応用できる可能性があると考えられる。一方、一部の選択的COX-2阻害薬は心血管イベントを増加させることが指摘されている。この事実は、プロスタノイドの心血管系における多様な役割を併せ考えると、非選択的にプロスタノイド産生を抑制するCOX阻害薬の限界を示すとともに、個々のプロスタノイド受容体を標的とした新薬開発の重要性を示唆している。

REFERENCES

- 1) Coleman R.A., Smith W.L., Narumiya S., *Pharmacol. Rev.*, **46**, 205–229 (1994).
- 2) Ushikubi F., Hirata M., Narumiya S., *J. Lipid. Mediat.*, **12**, 343–359 (1995).
- 3) Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F., *Physiol. Rev.*, **79**, 1193–1226 (1999).
- 4) Coker S.J., Parratt J.R., Ledingham I.M., Zeitlin I.J., *Nature*, **291**, 323–324 (1981).
- 5) Engels W., Van Bilsen M., De Groot M.J., Lemmens P.J., Willemsen P.H., Reneman R.S., Van der Vusse G.J., *Am. J. Physiol.*, **258**, H1865–H1871 (1990).
- 6) Bouchard J.F., Lamontagne D., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **34**, 755–763 (1999).
- 7) Lerner R.W., Lopaschuk G.D., Catena R.C., Olley P.M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1105**, 189–192 (1992).
- 8) Bowling N., Dube G.P., Kurtz W.L., Brune K.A., Saussy D.L. Jr., Dorn G.W.2nd, Mais D.E., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **26**, 915–923 (1994).
- 9) Jackson W.F., Konig A., Dambacher T., Busse R., *Am. J. Physiol.*, **264**, H238–H243 (1993).
- 10) Ushikubi F., Hirata M., Narumiya S., “Hand Book of Experimental Pharmacology, Vol.126 Platelets and Their Factors,” eds. by von Bruchhausen F, Walter U., Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- 11) Wise H., Jones R.L., *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 581–587 (1994).
- 12) Yanagisawa A., Smith J.A., Brezinski M.E., Lefler A.M., *Eur. J. Pharmacol.*, **133**, 89–96 (1987).
- 13) Xiao C.Y., Hara A., Yuhki K., Fujino T., Ma H., Okada Y., Takahata O., Yamada T., Murata T., Narumiya S., Ushikubi F., *Circulation*, **104**, 2210–2215 (2001).
- 14) Schrör K., Addicks K., Darius H., Ohlendorf R., Rosen P., *Thromb. Res.*, **21**, 175–180 (1981).
- 15) Simpson P.J., Mitsos S.E., Ventura A., Gallagher K.P., Fantone J.C., Abrams G.D., Schork M.A., Lucchesi B.R., *Am. Heart J.*, **113**, 129–137 (1987).
- 16) Hara A., Xiao C.Y., Yuhki K., Fujino T., Narumiya S., Ushikubi F., *Pharmacologist*, **44** Suppl 1, A12 (2002).
- 17) Zacharowski K., Olbrich A., Otto M., Hafner G., Thiemermann C., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 849–858 (1999).
- 18) Xiao C.Y., Yuhki K., Hara A., Fujino T., Kuriyama S., Yamada T., Takayama K., Takahata O., Karibe H., Taniguchi T., Narumiya S., Ushikubi F., *Circulation*, **109**, 2462–2468 (2004).
- 19) McCullough L., Wu L., Haughey N., Liang X., Hand T., Wang Q., Breyer R.M., Andreasson K., *J. Neurosci.*, **24**, 257–268 (2004).
- 20) Liang X., Lin L., Woodling N.S., Wang Q., Anacker C., Pan T., Merchant M., Andreasson K., *J. Clin. Invest.*, **121**, 4362–4371 (2011).
- 21) Baker K.M., Chernin M.I., Wixson S.K., Aceto J.F., *Am. J. Physiol.*, **259**, H324–H332 (1990).
- 22) Ito H., *Life Sci.*, **61**, 585–593 (1997).
- 23) Emanuelli C., Maestri R., Corradi D., Marchione R., Minasi A., Tozzi M.G., Salis M.B., Straino S., Capogrossi M.C., Olivetti G., Madeddu P., *Circulation*, **100**, 2359–2365 (1999).
- 24) Oliver P.M., Fox J.E., Kim R., Rockman H.A., Kim H.S., Reddick R.L., Pandey K.N., Milgram S.L., Smithies O., Maeda N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14730–14735 (1997).
- 25) Yu H., Gallagher A.M., Garfin P.M., Printz M.P., *Hypertension*, **30**, 1047–1053 (1997).
- 26) Hara A., Yuhki K., Fujino T., Yamada T., Takayama K., Kuriyama S., Takahata O., Karibe H., Okada Y., Xiao C.Y., Ma H., Narumiya S., Ushikubi F., *Circulation*, **112**, 84–92 (2005).
- 27) Qian J.Y., Harding P., Liu Y., Shesely E., Yang X.P., LaPointe M.C., *Hypertension*, **51**, 560–566 (2008).