

## 延髄孤束核における循環調節に及ぼす Rho/Rho-kinase 系の役割

伊藤 浩 司\*, 廣岡 良 隆\*  
下川 宏 明\*, 竹下 彰\*

### はじめに

低分子量 GTPase RhoA は, 細胞内で GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型の間を行き来し, 様々な細胞反応のスイッチとして働いている<sup>1,2)</sup>. RhoA とその標的蛋白の Rho-kinase は, アクチン細胞骨格の構成や血管平滑筋収縮などの様々な細胞機能に重要な役割をはたしていることが示されている<sup>3,4)</sup>.

最近, Rho-kinase の選択的阻害剤である Y-27632 が様々な高血圧モデルラットの血圧を著明に低下させることが報告され<sup>5)</sup>, その後, 高血圧モデルの血管において Rho-kinase 活性が亢進していることや<sup>6)</sup>, ヒト前腕血流測定研究においても Rho-kinase が末梢性高血圧機序に関与している可能性が報告された<sup>7)</sup>. 高血圧においては, 血管抵抗の増加, それを引き起こす過剰な血管収縮反応が重要な現象の一つである. 血管平滑筋収縮は細胞内カルシウム濃度および平滑筋細胞のカルシウム感受性によって制御されているが, Rho-kinase はカルシウム感受性を増強することによって血管収縮反応を生じ, 高血圧の病態に関与していると考えられている.

一方, この Rho/Rho-kinase 系は中枢神経系にも存在していることが知られている<sup>8,9)</sup>. *In vitro* の研究成績から中枢神経細胞における Rho/Rho-kinase 系は樹状突起スパインの形態変化<sup>10,11)</sup>, 神経リモデリング<sup>12)</sup>, 軸索の成長<sup>13)</sup>に関与することが示されている. これらの形態変化はアクチン構造の変化

を伴い, Rho/Rho-kinase 活性によって制御されている<sup>14)</sup>. 中枢神経系において樹状突起スパインは興奮性シナプスの後面を構成し, 最近, このスパインという構造が非常にダイナミックに変化し<sup>15)</sup>, シナプス伝達にも影響すること<sup>16)</sup>が示されている. また, 中枢神経細胞における Rho/Rho-kinase 系が神経伝達物質の放出にも関与することが報告されている<sup>17)</sup>. しかし, 中枢神経細胞における Rho/Rho-kinase 系と *in vivo* での生理機能との関係は不明である. 我々は, 先に述べた知見より Rho/Rho-kinase 系がシナプス伝達の形成, 維持に重要な役割を有する可能性を考え, 延髄心血管中枢のなかで, 興奮性アミノ酸であるグルタミン酸が主要な神経伝達物質である延髄孤束核 (NTS) での神経性血圧調節における Rho/Rho-kinase 系の役割を正常血圧および高血圧モデルラットを用いて検討した.

本稿では, 神経性血圧調節機序および中枢神経細胞における Rho/Rho-kinase 系の役割を概説し, 神経性血圧調節における Rho/Rho-kinase 系の役割を我々の研究より得られた成績を中心に述べる.

### 神経性血圧調節機序

急性の血圧調節機序として, 動脈圧受容器反射を中心とする神経性調節機序が重要であることは明らかである. 高血圧において, 動脈圧受容器反射はより高い血圧域へリセットされており, その感受性も低下しているとされている<sup>18)</sup>. しかし, その機序は明らかではない. 近年, 交感神経系による血圧調節の脳内経路の解明が進み, 動脈圧受容器から最初に入力を受ける延髄孤束核 (NTS), 尾側延髄腹外側野 (CVLM), 心血管中枢である頭側

\*九州大学大学院医学系学部循環器内科

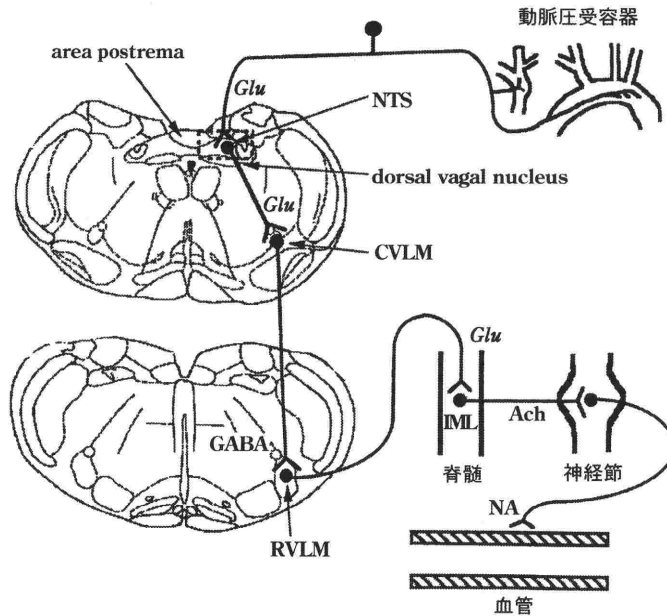


図1 動脈圧受容器反射を示す経路と主要神経伝達物質

area postrema: 最後野, NTS: 延髄孤束核, dorsal vagal nucleus: 迷走神経背側核, RVLM: 頭側延髄腹外側野, CVLM: 尾側延髄腹外側野, IML: 脊髄中間層細胞群, Glu: L-グルタミン酸, GABA:  $\gamma$ アミノ酪酸, Ach: アセチルコリン, NA: ノルアドレナリン

延髄腹外側野 (RVLM) を通じて、さらに脊髄にある交感神経節前神経細胞群 (IML) に投射し、末梢交感神経活動を規定していることが明らかとなった。また、NTS, CVLM における主要な神経伝達物質は興奮性アミノ酸であるグルタミン酸であり、RVLM においては抑制性アミノ酸である  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) である<sup>19,20)</sup> (図1)。高血圧において、交感神経活動の上昇は単に血圧の基礎値の上昇のみならず、食塩感受性の増加、ストレスに対する反応の増強など様々な影響を与える。近年の研究成績より、神経性調節機序の異常による高血圧の発症、進展に脳内レニン-アンジオテンシン系<sup>21,22)</sup>、一酸化窒素<sup>23,24,25)</sup>、ウアバイン様物質<sup>26)</sup>等の脳内物質の異常、あるいはそれらのレセプターの異常や神経細胞間のシナプス伝達の異常などが関与していると推測されている。

#### 中枢神経細胞における Rho/Rho-kinase 系の役割

神経細胞に、RhoA あるいは Rho-kinase 蛋白が存在することは数多く報告されている<sup>8,9)</sup>。その役割については、主に *in vitro* の研究成績から明らかとなってきている。神経細胞における Rho/Rho-

kinase 系はアクチン構造の変化を介して神経細胞の形態維持、変化に関与していることが示されている<sup>10~14)</sup>。ラットの海馬錐体細胞に活性型 RhoA (dominant active RhoA) を導入すると著明に樹状突起の分節が減少し、樹状突起の簡素化が生じ、Rho-kinase の特異的阻害剤である Y-27632 を添加すると、その活性型 RhoA による樹状突起の簡素化が抑制されることが示されている<sup>10)</sup>。また、最近 Rho family の活性を制御する GAP (GTPase-activating protein) のなかで、特に脳に豊富に存在する p250GAP の存在が報告された<sup>11)</sup>。この p250 GTPase は、神経細胞の中で特に NMDA レセプターの NR2B subunit および PSD-95 といわれる蛋白とともに、興奮性シナプスの後面を形成するスパインに局在することが示されている。そして、この p250GAP は、RhoA の活性を制御し、神経突起の進展、退縮に関与することも示されている。また、p250GAP は他の低分子量 G 蛋白である Cdc42 の活性も制御するが、RhoA と異なり Cdc42 の発現はスパイン (特に PSD: post synaptic density) 内にほとんど認められないことから、p250GAP を介したスパインの形態変化については RhoA が重要な役割

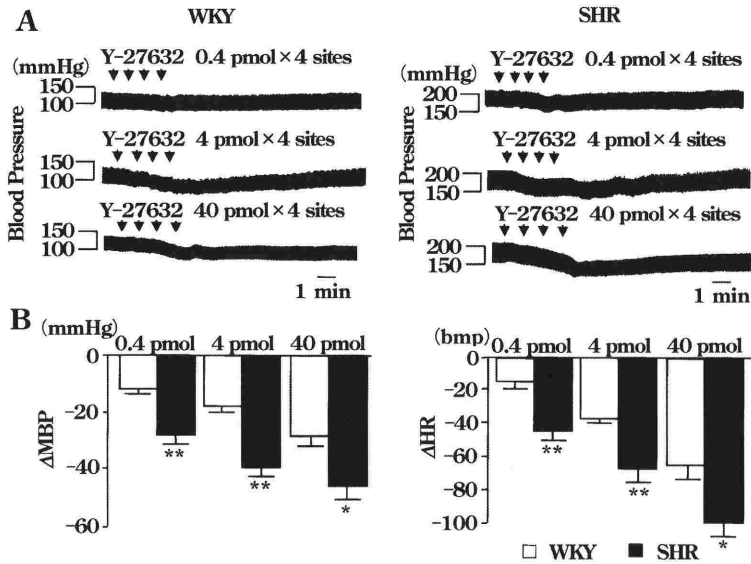


図2 Y-27632 微量投与による血圧, 心拍数の用量依存性変化 (Ito K et al, 2003<sup>30</sup>) より改変)

A : WKY ラット (左) および SHR (右) の両側 NTS (4 sites) への Y-27632 微量投与による血圧変化の実記録.

B : WKY ラット (open bar) および SHR (solid bar) の両側 NTS (4 sites) への Y-27632 微量投与による平均血圧, 心拍数の変化量 (n=5 for each, \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs WKY ラット).

を担っていると考えられる<sup>11)</sup>. このスパインは, 興奮性シナプスの後面を形成する構造であるが, このスパインの形態によってグルタミン酸に対する感受性が異なることも報告されている<sup>27)</sup>. したがって, 神経細胞における Rho/Rho-kinase 系が特に興奮性シナプスにおけるシナプス伝達になんらかの影響を及ぼしている可能性が考えられた. さらに, 海馬神経細胞をグルタミン酸あるいは電氣的に刺激することで, 1~2分をピークに Rho/Rho-kinase 系の活性化が生じることが示されているが<sup>28)</sup>, 別の報告では海馬神経細胞を NMDA で刺激すると急速にスパインの減少が認められることが示されている<sup>29)</sup>. これら二つの成績と今までの報告から, グルタミン酸刺激により Rho/Rho-kinase 系が活性化されることでスパインの減少が生じ, シナプス伝達に影響 (おそらく, シナプス伝達の抑制) を及ぼしている可能性があると考えられる. 逆に, Rho/Rho-kinase 系の活性が低下すると, スパインの増加が生じ, シナプス伝達の亢進が生じる可能性が示唆される.

### NTS での神経性血圧調節における Rho/Rho-kinase 系の役割

#### A. 麻酔下急性実験

まず, WKY ラット (16~20 週齢) を用い, 麻酔下に Rho-kinase の特異的阻害剤である Y-27632 (0.4, 4.0, 40 pmol/injection site) を両側 NTS へ計 4ヶ所に微量投与したところ, 用量依存性に血圧, 心拍数の減少を認めた (図2). また, 交感神経活動の関与を評価するため, 腎交感神経活動 (RSNA) の同時記録も行ったところ, Y-27632 (40 pmol/injection site) を両側 NTS へ計 2ヶ所微量投与することで, 血圧, 心拍数同様に RSNA も有意に低下した (図3). 次に, 高血圧モデルとして SHR (16~20 週齢) を用いて同様の実験を行った. 両側 NTS への Y-27632 微量投与で WKY ラット同様に用量依存性の血圧, 心拍数の低下および RSNA の低下を認めたが, その低下の程度は SHR において WKY ラットに比べ有意に大きかった (図2, 3). 以上の成績は, NTS における Rho/Rho-kinase 系が交感神経活動を介して血圧調節に関与し, さらに SHR における高血圧維持機構に一部関与する可能性を示唆するものであった<sup>30)</sup>.

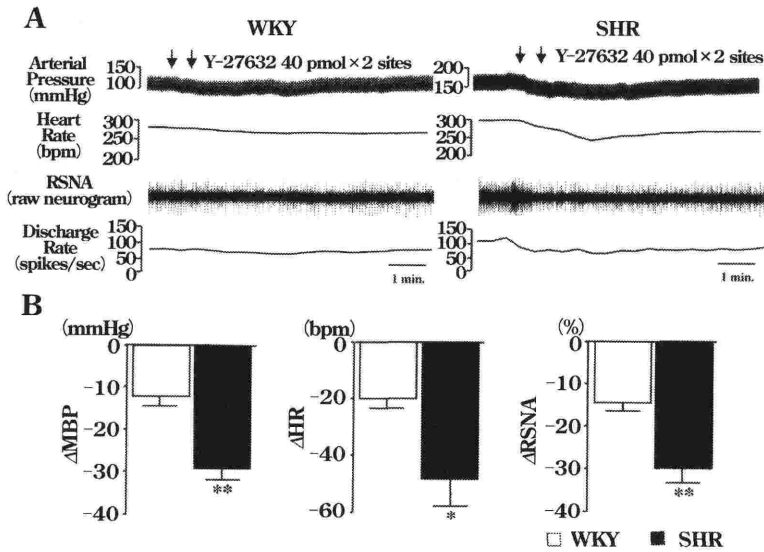


図3 NTS への Y-27632 微量投与による血圧, 心拍数, 腎交感神経活動抑制効果 (Ito K et al, 2003<sup>30</sup>) より改変)  
 A: WKY ラット(左)および SHR(右)の両側 NTS (2 sites) への Y-27632 微量投与による血圧, 心拍数, 腎交感神経活動変化の実記録.  
 B: WKY ラット (open bar) および SHR (solid bar) の両側 NTS (2 sites) への Y-27632 微量投与による平均血圧, 心拍数, 腎交感神経活動の変化量 (n=4 for each, \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs WKY ラット).

## B. 遺伝子導入実験

続いて我々は, 慢性的に NTS における Rho-kinase 活性を抑制した場合の効果を検討するため, アデノウイルスをベクターとして遺伝子導入実験を行った. Rho-kinase の dominant negative 変異体として Rho-kinase の Rho-binding domain (RB domain, DNRhoK) を用いた. 過剰発現した RB domain は, 内因性の Rho-kinase と活性型 RhoA の結合を競合的に阻害し, dominant negative 変異体として働く. 血圧, 心拍数の測定は, 腹部大動脈に植え込んだラジオテレメトリーシステム送信機を用いて, 無麻酔, 無拘束下に行った. 図4に示すように, WKY ラットおよび SHR ともに DNRhoK 導入後 5~7 日目をピークに血圧, 心拍数の著明な低下を認め, その低下の程度は急性実験同様に SHR において WKY ラットに比べ有意に大きかった ( $\Delta$ MBP:  $-52 \pm 3$  vs  $-33 \pm 4$  mmHg,  $P < 0.05$ ,  $\Delta$ HR:  $-161 \pm 6$  vs  $-120 \pm 13$  bpm,  $P < 0.05$ ). また, コントロールとして  $\beta$ -galactosidase を導入した群では血圧, 心拍数に変化を認めなかった. 遺伝子導入実験においては, 交感神経活動の指標として, 遺伝子導入前と導入 7 日目に 24 時間蓄尿による尿中ノルエピネフリン排泄量の測定を行った. DNRhoK 導入

後は, 導入前に比べて尿中ノルエピネフリン排泄量は有意に減少した. さらに, 遺伝子導入前における尿中ノルエピネフリン排泄量は, WKY ラットに比べて SHR で有意に大きく, DNRhoK 導入による減少の程度も WKY ラットに比べて SHR で有意に大きかった ( $-0.80 \pm 0.12$  vs  $-0.48 \pm 0.07$   $\mu$ g/day,  $P < 0.05$ ). 導入遺伝子のタグ蛋白である c-myc の発現は, 血圧変化の時間経過との一致を認め, さらに WKY ラットおよび SHR の発現の程度は同じであった. また, c-myc の免疫染色で, 導入遺伝子の NTS 局所での発現を確認した (図5). また, 導入した遺伝子 (DNRhoK) により, Rho-kinase 活性が抑制されるか否か確認するため, DNRhoK 導入後 7 日目に Rho-kinase の標的蛋白である ERM family (ezrin, radixin, moesin) と adducin のリン酸化 (p-ERM, p-adducin の発現) を, ウェスタンブロット法にて評価した. DNRhoK 導入により, WKY ラットおよび SHR ともに NTS における p-ERM, p-adducin の発現は有意に低下し, Rho-kinase 活性が抑制されたことを確認した. また, コントロール (無処置) 群において, p-ERM あるいは p-adducin の発現は WKY ラットに比べて SHR で有意に亢進しており, SHR の NTS において Rho-kinase

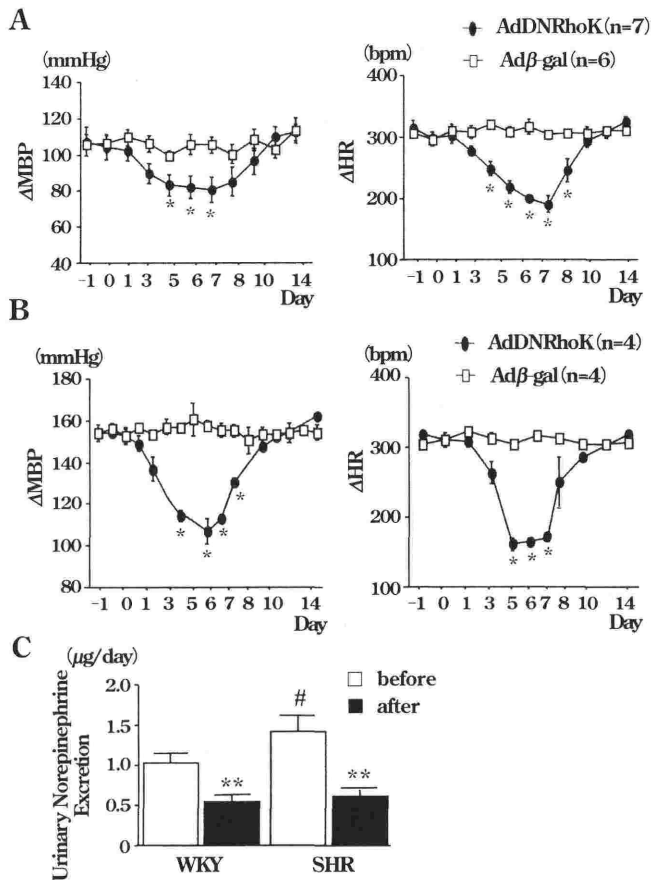


図4 NTS への AdDNRhoK 導入 (Ito K et al, 2003<sup>30</sup>) より改変

A : WKY ラットの NTS への AdDNRhoK および Adβ-gal 導入前後の平均血圧, 心拍数の経時的変化 (Adβ-gal n=6, AdDNRhoK n=7, \*P<0.05 vs Adβ-gal).  
 B : SHR の NTS への AdDNRhoK および Adβ-gal 導入前後の平均血圧, 心拍数の経時的変化 (Adβ-gal n=4, AdDNRhoK n=4, \*P<0.05 vs Adβ-gal).  
 C : WKY ラットおよび SHR の NTS への AdDNRhoK 導入前 (open bar), 導入後 (solid bar) の 24 時間蓄尿による尿中ノルエピネフリン排泄量 (n=6 for WKY ラット, n=4 for SHR, \*\*P<0.01 vs before, and #P<0.05 vs WKY ラット).

系の活性が亢進していることが示唆された(図6).

今回, 我々は, ベクターとしてアデノウイルスを用いているため, 感染による炎症性変化の影響を検討する必要があった. 我々の教室では, 今回用いたアデノウイルスをベクターとする遺伝子導入技術を確立しており, 以前の報告により β-galactosidase 導入群と eNOS 導入群で, 炎症のマーカーとして ED-1 陽性細胞の出現に差がないことを確認している. さらに, β-galactosidase 導入群では, 血圧, 心拍数に変化を及ぼさなかったことから, DNRhoK 導入群での血圧, 心拍数の低下がアデノウイルス導入による炎症性変化に伴う非特

異的反応ではないことを示唆する. 以上の成績は, 急性実験同様に NTS における Rho-kinase が正常血圧モデルにおいて, 交感神経活動を介した血圧維持機構に関与していること, さらに SHR における交感神経活動亢進およびそれに伴う血圧上昇機序に一部関与することを示唆するものである<sup>30</sup>.

**C. NTS における Rho/Rho-kinase 活性**

今回, 我々は RhoA の活性に関しては, RhoA の膜分画へのトランスロケーションで評価した. RhoA の膜分画での発現は, WKY ラットに比べて SHR で有意な増加を認め, また細胞質分画ではむしろ WKY ラットで発現の増加を認めたことから,

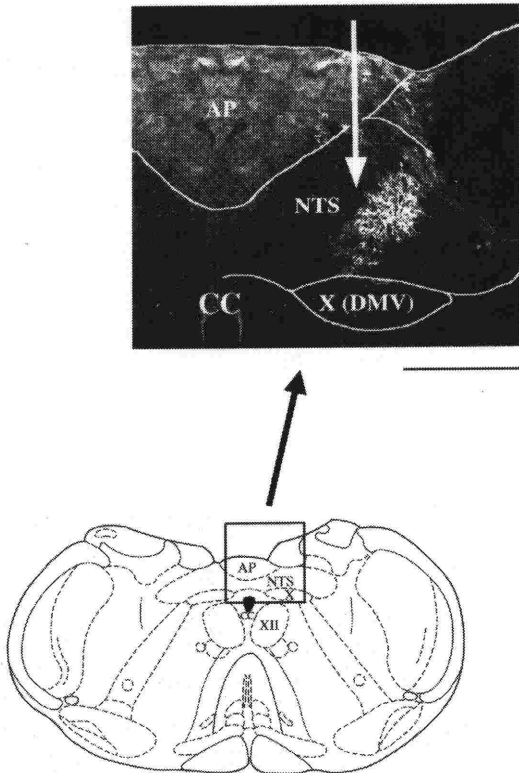


図5 AdDNRhoK導入ラットの脳幹スライスを抗c-myc抗体で染色したスライス標本(Ito K et al, 2003<sup>30</sup>より改変)

NTS局所で導入遺伝子の発現が認められる。白線の矢印が遺伝子導入部位を示す。AP: 最後野, DMV: 迷走神経背側核, CC: 中心管, X: 迷走神経核, XII: 舌下神経核。Barは、1.0mmを示す。

SHRにおいてRhoAの活性が亢進していることを確認した(図7A)。またRho-kinaseについては、その蛋白発現自体はWKYラットとSHRで同程度であったが(図7B)、標的蛋白であるERM familyのリン酸化がWKYラットに比べてSHRで有意に増加していることから、その活性はSHRで亢進していることを確認した<sup>30)</sup>(図7C)。

#### D. まとめ

以上、本研究の成績より、NTSにおけるRho-kinase活性を抑制することで血圧、心拍数、交感神経活動の低下を生じること、さらにNTSにおけるRho/Rho-kinase系の活性が、SHRにおいてWKYラットに比べて亢進していることが明らかとなった<sup>30)</sup>。

#### 今後の展望

本実験においては、NTSにおけるRho/Rho-kinase系の活性が交感神経活動を介して血圧を変化させる機序の解明には至っていない。RhoAを抑制することで、eNOSの発現が増加するという報告もあり<sup>31)</sup>、本研究の成績にNOSのアップレギュレーションが関与する可能性も考えられたが、DNRhoK導入により、eNOS, nNOSともにむしろその発現は抑制されていた<sup>30)</sup>(図8)。したがって、NTSにおけるRho/Rho-kinase系を抑制することにより、NOSのアップレギュレーション以外の、何か別の機序で血圧低下が生じ、その代償としてNOS

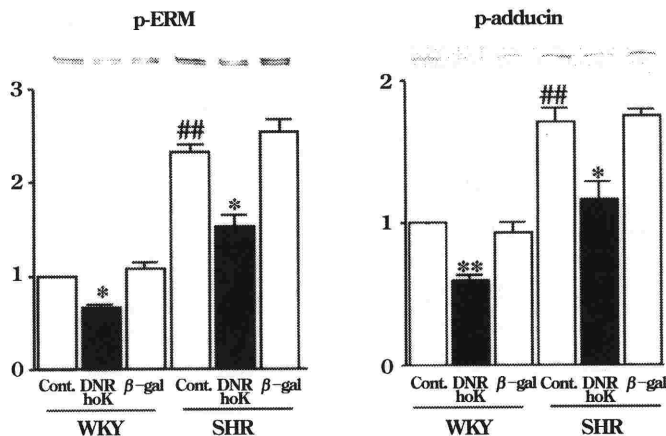


図6 遺伝子導入前後でのNTSにおけるRho-kinaseの標的蛋白であるERM及びadducinのリン酸化(p-ERM, p-adducin)を定量化したWestern blottingの結果(Ito K et al, 2003<sup>30</sup>より改変)

グラフは、コントロールのWKYラットの発現レベルを1として比較した(n=3 for each, \*P<0.05 and \*\*P<0.01 vs Adβ-gal or control; ##P<0.01 vs WKYラット)。

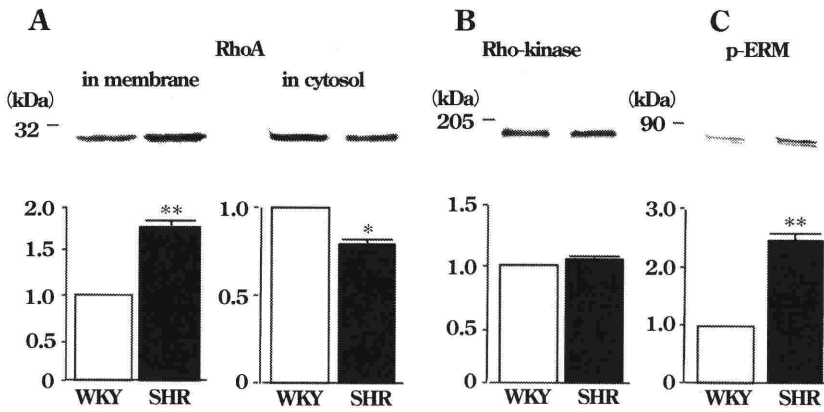


図7 NTSにおける RhoA, Rho-kinase, p-ERM の発現 (Ito K et al, 2003<sup>30</sup>) より改変)

グラフは、コントロールの WKY ラットの発現レベルを 1 として比較した。

A : NTS における膜分画 RhoA (左) および細胞質分画 RhoA (右) の Western blotting の結果 (n=3, \*P<0.05 and \*\*P<0.01 vs WKY ラット)。

B : NTS における Rho-kinase 蛋白の Western blotting の結果 (n=3 for each)。

C : NTS における p-ERM の Western blotting の結果 (n=3, \*\*P<0.01 vs WKY ラット)。

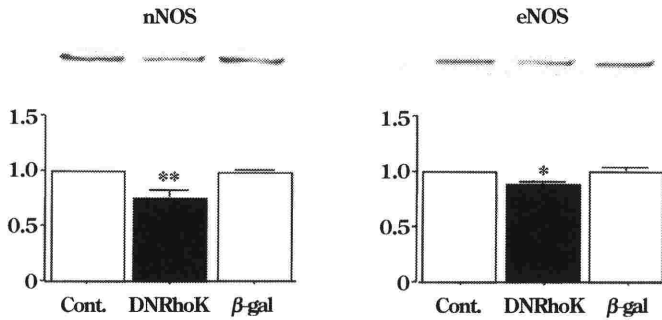


図8 遺伝子導入前後での WKY ラットの NTS を含む脳幹における nNOS (左) および eNOS (右) の発現

(Ito K et al, 2003<sup>30</sup>) より改変)

グラフはコントロール群の発現レベルを 1 として比較した (n=4 for each, \*P<0.05 and \*\*P<0.01 vs Adβ-gal or control)。

の発現が抑制されたと考えられた。現在までに、*in vitro* での実験によって明らかとされている神経細胞における Rho-kinase の役割から、以下の3つの可能性が考えられる。第一に、前半で述べたように Rho/Rho-kinase 系の活性変化による神経細胞の形態が変化すること、特に興奮性のシナプス後面を形成するスパインの形態変化によるグルタミン酸感受性の変化の可能性が考えられる。第二に、Rho/Rho-kinase は angiotensin II などの血管作動物質によって活性化されることが報告されている<sup>32)</sup>。脳内 angiotensin II は、中枢性血圧上昇機序に関与することが示されていることから、レニン-アンジオテンシン系との関連の可能性が考えられる。第三に、Rho/Rho-kinase 系抑制により神経伝達物

質の放出促進が生じている可能性が考えられる。しかし、現段階ではいずれも推測であり、NTS における Rho/Rho-kinase 系の活性が交感神経活動を介して血圧を変化させる機序の解明のためには、更なる研究の進行が必要である。

現在、我々は SHR と異なる高血圧モデルとして慢性的一酸化窒素合成阻害モデル (L-NAME ラット) を用いて同様の実験を行っている。血管あるいは心筋においては L-NAME 投与で Rho/Rho-kinase 系の活性化が生じることがすでに報告されている<sup>33,34)</sup>、現在までの我々の成績から NTS においても同様な傾向を認め、Y-27632 の両側 NTS 投与による降圧反応は、L-NAME 投与群で非投与群に比べ有意に大きいものであった。この成績は、NTS



における Rho/Rho-kinase 系の活性化が SHR に特異的な現象ではなく、高血圧モデル一般に見られるものである可能性を示唆するとともに、先に示した DNRhoK 導入群における降圧反応が NOS のアップレギュレーションによるものではないことを示唆する成績を支持するものである。

さらに、NTS における Rho/Rho-kinase 系の活性が交感神経活動を介して血圧を変化させる機序に迫るため、NTS における Rho/Rho-kinase 系の抑制が、動脈圧受容器反射に及ぼす影響、またグルタミン酸に対する反応に与える影響を検討中である。

### おわりに

現在、わが国では虚血性心疾患や心不全、脳卒中、それに伴う突然死の頻度が増加しており、これらの疾患に対する治療法の確立、及びその発症リスクを軽減しうる予防法の確立も急務である。近年、これらの疾患の発症、あるいはその予後を規定する因子に交感神経活動の亢進が関与していることが明らかとなり、さらに交感神経活動亢進の原因として中枢神経系の重要性が認識されるようになってきた。これまでの研究で、NTS において Rho/Rho-kinase 系が交感神経活性活動を介して血圧調節に関与すること、また、SHR の血圧上昇、交感神経活動亢進の機序に NTS における Rho/Rho-kinase 系の亢進が関与していることが明らかとなった。現在、Rho-kinase をターゲットとした薬剤は注射薬ではすでに臨床応用され、経口剤も治験中である。したがって、以上の点が明らかとなれば中枢における Rho-kinase が今後の治療(薬)の新たなターゲットとなる可能性が期待される。

### 文 献

- 1) Etienne-Manneville S, Hall A: RhoGTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629-35.
- 2) Barandier C, Ming XF, Yang Z: Small G proteins as novel therapeutic targets in cardiovascular medicine. *News Physiol Sci* 2003; 18: 18-22.
- 3) Laufs U, Liao JK: Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 2000; 87: 526-8.
- 4) Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, et al: Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 12257-60.
- 5) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389: 990-4.
- 6) Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, et al: Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 2001; 15: 1062-4.
- 7) Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, et al: Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 2001; 38: 1307-10.
- 8) Hashimoto R, Nakamura Y, Kosako H, et al: Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 575-9.
- 9) Olenik C, Barth H, Just I, et al: Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 52: 263-9.
- 10) Nakayama AY, Harms MB, Luo L: Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 5329-38.
- 11) Nakazawa T, Watabe AM, Tezuka T, et al: p250GAP, a novel brain-enriched GTPase-activating protein for Rho family GTPases, is involved in the N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2921-34.
- 12) Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, et al: Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160 ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol* 1998; 141: 1625-36.
- 13) Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, et al: A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 2000; 26: 431-41.
- 14) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, et al: Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999; 285: 895-8.
- 15) Fischer M, Kaech S, Knutti D, et al: Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 1998; 20: 847-54.
- 16) Engert F, Bonhoeffer T: Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 1999; 399: 66-70.
- 17) Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, et al: Ga12 and Ga13 inhibit Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis through Rho/Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Neurochem* 2000; 75: 708-17.
- 18) Chappleau MW, Abboud FM: Mechanisms of adaptation and resetting of the baroreceptor reflex. In: Hainsworth R, Mark AL, eds, *Cardiovascular Reflex Control in Health and Disease*, London: WB Saunders; 1993. p. 165-93.
- 19) Dampney RA: Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 1994; 74: 323-64.



- 20) Kumada M, Terui N, Kuwaki T: Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 331-61.
- 21) Hirooka Y, Head GA, Potts PD, et al: Medullary neurons activated by angiotensin II in the conscious rabbit. *Hypertension* 1996; 27: 287-96.
- 22) Nakamura S, Moriguchi A, Morishita R, et al: Activation of the brain angiotensin system by in vivo human angiotensin-converting enzyme gene transfer in rats. *Hypertension* 1999; 34: 302-8.
- 23) Tagawa T, Imaizumi T, Harada S, et al: Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices. *Circ Res* 1994; 75: 70-6.
- 24) Sakai K, Hirooka Y, Matsuo I, et al: Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. *Hypertension* 2000; 36: 1023-8.
- 25) Kishi T, Hirooka Y, Sakai K, et al: Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. *Hypertension* 2001; 38: 896-901.
- 26) Huang BS, Leenen FH: Brain "ouabain" and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28: 1005-12.
- 27) Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, et al: Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1086-92.
- 28) Jeon S, Kim S, Park JB, et al: RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 in hippocampal neuronal cells by glutamate. *J Biol Chem* 2002; 277: 16576-84.
- 29) Hasbani MJ, Schlieff ML, Fisher DA, et al: Dendritic spines lost during glutamate receptor activation re-emerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci* 2001; 21: 2393-403.
- 30) Ito K, Hirooka Y, Sakai K, et al: Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension. *Circ Res* 2003; 92: 1337-43.
- 31) Laufs U, Liao JK: Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24266-71.
- 32) Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al: Rho-kinase mediates in angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001; 38: 100-4.
- 33) Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, et al: Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27 (Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 2001; 89: 488-95.
- 34) Kataoka C, Egashira K, Inoue S, et al: Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 2002; 39: 245-50.