

厚生省厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

平成10年度 研究報告書

主任研究者	静田	裕	高知医科大学医学部教授
分担研究者	永井	良三	群馬大学医学部教授
	竹下	彰	九州大学医学部教授
	服部	隆一	京都大学救急部助教授
	木村	彰方	東京医科歯科大学 難治疾患研究所教授

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

血管老化の代謝機能とその分子生物学的解明

主任研究者 静田 裕 高知医科大学 医学部 医化学教室 教授

研究要旨

早発性老化マウスを樹立し、原因遺伝子klothoを特定し、この動物にNO産生機構の異常があること、先天性高血圧症(SDH)ラットでは、klothoの発現が極めて低下していることを明らかにした。また、欧米でヒトの心筋梗塞の遺伝的危険因子であるとされるACE,eNOSなどの遺伝子産物が、必ずしも日本人の場合には適用されず、PECAM-1遺伝子の多型の方が有意な相関を持つことを明らかにした。更に、ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清中から新しい血管平滑筋増殖因子を精製し、それをTFPI-IIと特定したこの増殖刺激経路を解析したところ、MAPKを活性化し、c-fosの発現を誘導するという知見を得た。また、NOS阻害剤の投与により起る血管壁肥厚のメカニズムを解明した。

【研究組織】

- 静田 裕 (高知医科大学 医学部 教授)
- 永井良三 (群馬大学 医学部 教授)
- 竹下 彰 (九州大学 医学部 教授)
- 服部隆一 (京都大学 救急部 助教授)
- 木村彰方 (東京医科歯科大学
難治疾患研究所 教授)

A. 研究目的

「人は血管と共に老いる」と言われるが、血管の老化には動脈硬化や高血圧症、高脂血症など色々な要因が密接に関係している。当初本研究は、NOや成長因子プロスタノイド、サイトカインなどの生理活性因子の関与に重点を置き研究を進めたが、本年度は、早発性老化マウスによる老化機構の解明と共に、心筋梗塞や血管炎の遺伝的危険因子の見直しや、血管平滑筋増殖機構そのものの解明を目指した。また引き続いて、NO阻害剤による血管肥厚機構を解析して、血管老化の実態と本体に迫ることを目標とした。

B. 研究方法

本年度の本班における研究は、次の5項目のサブテーマよりなる。

1. 血管老化における血管平滑筋増殖因子の役割 (静田・服部)
2. 老化におけるアポトーシスとテロメアーゼの役割 (静田)
3. 早発性老化マウスの血管老化機構 (永井)
4. 心筋梗塞と血管炎の遺伝的危険因子の検索 (木村)
5. NO阻害剤による血管肥厚機構の解析 (竹下)
方法としては、主として生化学的・分子生物学的方法を用い、材料としては老化モデルマウスや自然高血圧発症ラット、正常マウス及びラット、培養ヒト株組織細胞などを用いた。

C. 研究成果

- 1) ヒト臍帯静脈内皮細胞培養の無血清培養上清を濃縮し、これより、血管平滑筋増殖因子の精製を行った。精製された蛋白質のアミノ酸分析により因子を同定し、更にrecombinant蛋白を作成して、その情報伝達経路の解析を行った。

培養上清より、ヘパリンアフィニティ、逆相クロマトグラフィーにて血管平滑筋増殖刺激性のある、32kDの蛋白を精製できた。アミノ酸分析より、この蛋白はTissue Factor Pathway Inhibitor-II (TFPI-II) に一致することが判明した。BHK細胞にTFPI-IIを発現させ、得られた recombinant TFPI-II は用量依存的に、平滑筋細胞の数、DNA合成を増加させた。これは、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化と、それに続くearly protooncogene のc-fosの発現を介していた。

2) 血圧上昇ホルモンであるアルドステロンの合成不全症2例を解析し、その変異部分を解明した。また、血管弛緩因子であるNOの合成酵素の遺伝子プロモーター領域を調べ、エンハンサー或いはサプレッサーとして機能するシス配列を同定し、それに対応するトランス因子を検索した。

3) ヒトの老化によく似た表現型を示す新しい老化モデルマウスを開発し、その原因遺伝子として老化抑制遺伝子klothoを単離、同定した。klotho遺伝子産物 (Klotho蛋白) は、 β グルコシダーゼと40%のホモロジーを持つ2個のドメインと膜貫通領域をコードし、一種の膜蛋白と考えられた。klothoの全長cDNAを過剰表現するトランスジェニックマウスを作製し、klotho欠損マウス(老化モデルマウス)と交配すると、老化の表現系が消失することより、klothoはヒトの老化に伴う病態(動脈硬化、肺気腫、骨粗鬆症など)の形成に関与する重要な遺伝子であると考えられた。次に、Klotho蛋白自身またはKlotho蛋白を介する何らかのhumoral factorが血管内皮保護作用を持つことを示した。また、klothoの発現は出生後に強く誘導されることが明らかになり、klothoは出生後の生体維持機構に関与していると考えられた。高血圧、糖尿病、慢性腎不全モデ

ルで腎臓におけるklotho mRNAの発現が低下することから、慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスはklotho mRNAの発現を低下させると考えられた。これらの結果より、血管内皮保護作用を持つKlotho蛋白の発現低下が高血圧や糖尿病などの生活習慣病に合併する動脈硬化の形成に関与している可能性がある。

4) 日本人における心筋梗塞の遺伝的危険因子を同定するために、心筋梗塞患者集団と健常者集団において、欧米人で報告された種々の遺伝的危険因子(ACEやeNOSを始めとする遺伝子の多型)を検討したところ、何れの遺伝子多型とも日本人では主な遺伝要因ではないと考えられた。そこで、新たな遺伝的危険因子を検索し、PECAM-1遺伝子に見出した3種の多型 (Val125Leu, Asn563Ser, Gly670Arg) が、何れも心筋梗塞と有意な相関を示すことを見出した。最も強い相関を示す多型は Asn563Serであり、心筋梗塞患者集団(特に罹患動脈数が多い群及び若年発症群)には563Serのホモ接合体が有意に多く存在していた。また、この相関は高脂血症、肥満、高血圧、糖尿病、喫煙などの既知の危険因子の存在とは独立に観察されることから、PECAM-1多型はいわゆるlow risk groupを含めての新たな心筋梗塞の遺伝的危険因子と結論した。一方、難治性血管炎である高安病とBuerger病とHLA領域遺伝子群多型との相関を調べた。その結果、高安病感受性遺伝子はHLA-B遺伝子近傍に存在し、高安病の病型がB52型とB39型の2つに分類できることを明らかにした。これに対して、Buerger病感受性遺伝子はHLA-B遺伝子およびDRB1遺伝子近傍に2つ存在するが、各々は独立した危険因子であった。

5) NO合成阻害薬(*N* ω nitro-arginine methyl ester, L-NAME)を実験動物(ラット、ブタ)に4週間投

与すると、7日以内に血管壁の炎症性増殖性変化が生じ、28日以降には血管壁再構築(血管壁肥厚、線維化)が生じることを報告した。平成10年度には、このモデルにおける血管壁再構築の分子機構について以下の成果を得た。「decoy strategy」を用いてNF- κ Bの機能をブロックすると、上記炎症性増殖性変化とMCP-1発現増加が抑制された。また、MCP-1中和抗体によって炎症性増殖性変化が抑制できた。したがって、局所angII \rightarrow 酸化ストレス \rightarrow NF- κ B \rightarrow MCP-1発現増加が内皮NO産生抑制による血管再構築の分子機構の中心経路であることが明らかとなった。

D. 考察

① TFPI-IIはKunitz型のセリンプロテアーゼ阻害蛋白であるが、その生理機能はこれまで不明であった。今回の研究でTFPI-IIが内皮より産生・放出され、血管平滑筋の増殖を刺激することが初めて明らかにされた。似た構造を有する蛋白としてTFPI-Iがあるが、これは逆に平滑筋の増殖を抑制することが既に報告されている。似た構造を有しながら、TFPI-IとTFPI-IIは相異なる作用を発揮するという興味深い知見が得られた。その機能より、TFPI-IIが動脈硬化の発症、進展に深く関わっていることが推測され、その詳細を解明することが大きな課題である。

② アルドステロン血損症の成果に関しては、論文未発表のため、次年度以後に詳細を考察したい。

③ 老化マウスの原因遺伝子klothoは、主に腎臓に発現し、klotho遺伝子産物(Klotho蛋白)は、 β グルコシダーゼと40%のホモロジーを持つ2個のドメインと膜貫通領域をコードし、一種の膜蛋白と考えられた。Klotho蛋白は血管内皮に保護的に作用することが明らかになった。この

結果より、Klotho蛋白は動脈硬化の防御因子として働いていると考えられる。また、parabiosisにより血管障害が改善したことは、klothoは単に膜蛋白としてだけでなく、液性因子として個体の老化抑制を行っていると考えられた。高血圧や糖尿病などの慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスはklotho mRNAの発現を低下させると考えられた。Klotho蛋白自身またはKlotho蛋白を介する何らかのhumoral factorが血管内皮保護作用を持つことから、高血圧や糖尿病などの生活習慣病に合併する血管内皮機能障害、動脈硬化の腎臓におけるklothoの発現低下が関与している可能性がある。また、血管内皮保護作用を持つKlotho蛋白が慢性疾患に合併する動脈硬化に対する治療薬になる可能性を示している。

④ 心筋梗塞の遺伝的要因：本研究により、これまで欧米人で遺伝的危険因子とされた多型が、日本人集団では大きな遺伝的要因ではないことが判明した。そこで新たな遺伝的要因を検索した結果、PECAM-1遺伝子多型との相関を認めた。この相関は罹患動脈数が多い群、60才未満の若年患者群に認められることから、PECAM-1遺伝子多型は新たな心筋梗塞の危険因子であると考えられた。更に、PECAM-1に関する危険因子はこれまでに確立している危険因子(喫煙、高血圧、高脂血症、糖尿病、肥満など)とは独立していることが判明した。以前より日本人集団では、高脂血症や肥満などの要因は欧米人に比して心筋梗塞発症への寄与は小さいと考えられていたが、我々が見出したPECAM-1多型は、いわゆるlow riskグループにおける心筋梗塞の発症を説明する可能性が高い。

今後、この相関が欧米人にも認められるか否かを検討すると同時に、PECAM-1多型に基く蛋白レベルでの機能変化を検討し、PECAM-1多型

がいかなる分子機構で心筋梗塞の発症に寄与するのか(動脈硬化の危険因子の可能性など)を明らかにしなければならない。

⑤ 慢性的NO産生抑制ラットモデルにおいてNF- κ Bによる遺伝子発現調節が、炎症性・増殖性変化の形成ならびにMCP-1の発現増加に重要な役割を果たしている。しかし、MCP-1中和抗体投与は、L-NAME投与後早期の線維芽細胞の活性化(myofibroblastの出現)や線維化の成立に中心的役割を果たすとされるTGF- β 1やI型コラーゲンの遺伝子発現には影響しなかった。この結果から、MCP-1はNO産生抑制モデルにおける線維化の成立には関与しないことが示された。

E. 結論

- 1.) 新しい血管平滑筋増殖因子を単離同定し、その機能を解析した。
- 2.) アルドステロン産生不全の遺伝子異常の病症を解析した。
- 3.) 老化マウスの原因遺伝子klothoを解析し、この遺伝子が生体維持に関与している実験結果を得た。また、高血圧や糖尿病がklothoの発現を低下させるという事実を確認した。
- 4.) 日本人の心筋梗塞の遺伝的危険因子は、欧米で言われるACEやNOでなく、PECAM-1遺伝子の多型が重要であることを示した。
- 5.) 慢性的NO産生抑制ラットを用い、動脈硬化の発症機構を解析した。

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

血管老化の分子生物学的研究

分担研究者 静田 裕 高知医科大学 教授

研究要旨

血圧に関与している血管弛緩因子であるNOの合成酵素の遺伝子の解析とその制御機構を解明することは、高血圧症と関連して、血管老化の研究にきわめて重要である。本研究では、血管内皮型のNO合成酵素遺伝子の転写が、Sp1および更に新しい未知の因子によって調節されていることを明らかにした。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清中から新しい血管平滑筋増殖因子を精製し、これをTFPI-IIと同定した。その増殖刺激経路を解析したところ、MAPKを活性化し、c-fosの発現を引き起こすことを証明した。

A. 研究目的

血管内皮細胞から放出されたNOは血管平滑筋を弛緩させ、高血圧を引き起こすほかに様々な機能が報告されている。我々が遺伝子を単離し、解析してきたNO合成酵素の遺伝子の発現調節を解析しつつ、分子生物学的理解を深めることは、血管内皮細胞に関与した血管老化の解明へ重要な手掛かりを与えるものと考えられる。本研究は、これらの重要な遺伝子の病変と制御のメカニズムを究明することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト内皮型NO合成酵素遺伝子上流領域を様々な欠失した変異DNA、また、ヌクレオチド置換変異DNAをルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターを作成した。このDNAをリポフェクチンを用いて、内皮細胞に導入し、2日間培養し発現させ、細胞抽出物のルシフェラーゼ活性をはかることでその転写活性を調べた。この上流領域を持つ様々なDNA断片をプローブとし、血管内皮細胞から調製した核抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行い、核蛋白質との特異的

結合を調べた。さらに、内皮細胞からの核抽出物を用いDNase Iフットプリント法により、核蛋白質との結合する塩基配列を決めた。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞培養の無血清培養上清を濃縮し、これより、血管平滑筋増殖因子の精製を行った。精製された蛋白質のアミノ酸分析により因子を同定し、さらにrecombinant蛋白を作成して、その情報伝達経路の解析を行った。

C. 研究結果

当研究室では、ヒト内皮細胞型NOSの遺伝子をクローニングし、それは26個のエクソンからなり、20数kbにわたって存在している。CATのレポーター遺伝子の活性を調べることで、5'-上流のプロモータ領域のSp1エレメントが、転写活性に必須であることを明らかにした。上流域にあるGATA転写因子による活性化が報告されているが、我々の系では、この因子による活性化は認められなかった。我々は、新たに上流90bpに、Sp1エレメント以外に転写に関与する新しい領域を見出した。この領域のある欠損変異は、内皮細胞にトランスフェクトしてルシ

フェラーゼ活性を見たところ、転写活性を劇的に上昇させるが、他の変異では、転写活性は減衰した。この領域は、比較的長い配列が転写因子との結合に必要とされた。この領域は、ホモピリミジン鎖になっている。今回の研究ではUVクロスリンク法を用いて、その領域に結合する蛋白質因子を解析し、97kDaの主要なタンパクを同定した。さらに、従来内皮細胞では、内皮細胞型NOSのみが発現すると考えられていたが、マクロファージ型も発現していることを明らかにした。内皮細胞においても、マクロファージ型NOS遺伝子は、IL-1b, IFN-g, LPSの組合せで処理した内皮細胞からの核抽出物でゲルシフトアッセイにより解析をした結果、NF-kB配列(-115 to -106)を含む断片が、結合することが判明した。また、内皮細胞の培養上清より、ヘパリンアフィニティ、逆相クロマトグラフィーにて血管平滑筋増殖刺激活性のある、32kDの蛋白を精製できた。アミノ酸分析により、この蛋白はTissue Factor Pathway Inhibitor-II (TFPI-II) に一致することが判明した。BHK細胞にTFPI-IIを発現させ、得られたrecombinant TFPI-IIは用量依存的に、平滑筋細胞の数、DNA合成を増加させた。これは、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化と、それに続くearly protooncogene のc-fosの発現を介していた。

D. 考察

以上の様に本研究では、NO合成酵素遺伝子の制御の実態を明らかにした。尚、TFPI-IIはKunitz型のセリンプロテアーゼ阻害蛋白であるが、その生理機能はこれまで不明であった。今回の研究でTFPI-IIが内皮より産生・放出され、血管平滑筋の増殖を刺激することが初めて明らかにされた。似た構造を有する蛋白としてTFPI-Iがある

が、これは逆に平滑筋の増殖を抑制することが既に報告されている。似た構造を有しながら、TFPI-IとTFPI-IIは相異なる作用を発揮するという興味深い知見が得られた。その機能より、TFPI-IIが動脈硬化の発症、進展に深く関わっていることが推測され、その詳細を解明することが大きな課題である。

E. 結論

ヒト内皮細胞型NOSの遺伝子は、TATAボックス配列がなく、Sp1因子によって強力に転写活性が制御されているが、遺伝子に近接するホモピリミジン鎖を含む領域によって活性化され、条件を変化させると抑制されることが判明した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清中から精製されたTissue Factor Pathway Inhibitor-II (TFPI-II)はmitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化と、それに続くearly protooncogene c-fosの発現を介して、量依存的に血管平滑筋を増殖させる新しい因子であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Shinoda E., Shizuta Y. et. al.
Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Is a Novel Mitogen for Vascular Smooth Muscle Cells.
J.Biol.Chem., 274, 5379-5384,1999.
- ② Terashima M., Shizuta Y. et. al.
Induction of DNA fragmentation by total-body irradiation in murine liver.
Histol.Histopathol., 13, 379-384,1998.
- ③ Terashima M., Shizuta Y. et. al.
Effects of irradiation on telomerase activity

in human lymphoma and myeloma cell lines.

Int.J.Mole.Med., 2, 567-571,1998.

④ Miyahara K., Shizuta Y. et. al.

Transriptional regulation by homo-
pyrimidine string repeats in the proximal
region of the human endothelial NO
synthase gene (in preparation)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

早発性老化マウスの血管老化機構に関する研究

分担研究者 永井 良三 群馬大学医学部 教授

研究要旨 我々は、ヒトの老化によく似た表現型を示す新しい老化モデルマウスを開発し、その原因遺伝子として老化抑制遺伝子 *klotho* を単離、同定した。また、Klotho 蛋白自身または Klotho 蛋白を介する何らかの humoral factor が血管内皮保護作用を持つことを示してきた。本年度はラット腎臓における *klotho* mRNA の発現を経時的に検討し、また種々の病態における *klotho* の mRNA レベルでの発現変化を検討した。*klotho* の発現は出生後に強く誘導されることが明らかになり、*klotho* は出生後の生体維持機構に関与していると考えられた。また、高血圧、糖尿病、慢性腎不全モデルで腎臓における *klotho* mRNA の発現が低下することから、慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスは *klotho* mRNA の発現を低下させると考えられた。これらの結果より、血管内皮保護作用を持つ Klotho 蛋白の発現低下が高血圧や糖尿病などの生活習慣病に合併する動脈硬化の形成に関与している可能性がある。

A. 研究目的

我々は、ヒトの老化によく似た表現型を示す新しい老化モデルマウスを開発し、その原因遺伝子として老化抑制遺伝子 *klotho* を単離、同定した。*klotho* 遺伝子の欠損は、血管内膜の肥厚や中膜の石灰化を示す動脈硬化病変に加え、肺気腫、骨粗鬆症、性腺萎縮などの多彩な老化徴候を引き起こす。我々は、また、*klotho* 遺伝子は主に腎臓で発現し、Klotho 蛋白自身または Klotho 蛋白を介する何らかの humoral factor が血管内皮保護作用を持つことを示してきた。しかし、加齢や種々の病態における *klotho* の発現変化については未解明である。そこで本年度はラット腎臓における *klotho* mRNA の発現を経時的に検討し、また種々の病態における *klotho* の mRNA レベルでの発現変化を検討した。さらに、Klotho 蛋白に対する特異抗体を用いた免疫組織染色を行った。

B. 研究方法

Wistar ラットの腎臓における *klotho* の発現をノーザンプロット法にて経時的（胎生18日、生後1日、4日、7日、14日、28日目）に検討した。高血圧自然発症ラット（SHR）、DOCA 食塩高血圧ラット、5/6腎摘による慢性腎不全ラット、肥満・糖尿病・高脂血症合併ラット（Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat; OLETF rat）を病態モデルとして使用した。各モデルの腎臓から poly(A)⁺ RNA を精製し、ノーザンプロット法にて *klotho* の発現を検討した。ヒト Klotho 蛋白に対

するモノクローナル抗体をラットで作製し、ヒト腎臓（アルコール酢酸固定）切片を用いて免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

ラット *klotho* mRNA は、胎生後期及び生後1日目には微量に存在し、生後4日目より強く発現するようになり、その強い発現を生後7日、14日、28日目まで維持していた。この結果から *klotho* の発現は出生後に強く誘導されることが明らかになり、*klotho* は出生後の生体維持機構に関与していると考えられた。高血圧自然発症ラット（SHR）では60週令で有意に *klotho* mRNA の発現が低下していた。DOCA 食塩高血圧ラットでは、DOCA 負荷終了後2週で *klotho* mRNA の発現が有意に低下していた。5/6腎摘による慢性腎不全ラットでは5/6部分腎摘出施行後4週より *klotho* mRNA の発現が低下する傾向を認め、施行後8週では有意に低下していた。OLETF rat では、明らかな高血糖、高コレステロール血症、高中性脂肪血症を認める60週令で、対象群の LETO に比して *klotho* mRNA の発現が低下していた。これらの結果より、慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスは *klotho* mRNA の発現を低下させると考えられた。さらに、OLETF rat における *klotho* mRNA の発現低下は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）の投与により予防できた。また、ヒト Klotho 蛋白に対する特異抗体を用いた免疫組織染色を施行したところ、ヒト腎臓では遠位尿細管細胞に Klotho

蛋白が発現していると考えられた。

D. 考察

本年度の研究結果より、高血圧や糖尿病などの慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスは *klotho* mRNA の発現を低下させると考えられた。*Klotho* 蛋白自身または *Klotho* 蛋白を介する何らかの humoral factor が血管内皮保護作用を持つことをから、高血圧や糖尿病などの生活習慣病に合併する血管内皮機能障害、動脈硬化に腎臓における *klotho* の発現低下が関与している可能性がある。また、血管内皮保護作用を持つ *Klotho* 蛋白が慢性疾患に合併する動脈硬化に対する治療薬になる可能性を示している。さらに、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) が *klotho* mRNA の発現低下を予防したことから、今後他の降圧薬の効果を検討する必要がある。

E. 結論

Klotho 蛋白自身または *Klotho* 蛋白を介する何らかの humoral factor が血管内皮保護作用を持ち、高血圧や糖尿病などの病態モデルにおいて *klotho* mRNA の発現が低下していることから、*klotho* mRNA の発現低下が高血圧や糖尿病などの生活習慣病に合併する動脈硬化の形成に関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Y. Saito, T. Yamagishi, T. Nakamura, Y. Ohyama, H. Aizawa, T. Suga, Y. Matsumura, H. Masuda, M. Kurabayashi, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, R. Nagai, *Klotho* protein protects against endothelial dysfunction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248; 324-329, 1998.
- ② H. Aizawa, Y. Saito, T. Nakamura, M. Inoue, T. Imanari, Y. Ohyama, Y. Matsumura, H. Masuda, S. Oba, N. Mise, K. Kimura, A. Hasegawa, M. Kurabayashi, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, R. Nagai, Downregulation of the *Klotho* gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249; 865-871, 1998.
- ③ Y. Ohyama, M. Kurabayashi, H. Masuda, T. Nakamura, Y. Aihara, T. Kaname, T. Suga, M. Arai, H. Aizawa, Y. Matsumura, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, R. Nagai, Molecular Cloning of Rat *klotho* cDNA: Markedly Decreased Expression of *klotho* by Acute Inflammatory Stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251; 920-925, 1998.

2. 学会発表

- ④ 相澤宏樹, 中村哲也, 斉藤勇一郎, 松村穰, 大山良雄, 倉林正彦, 長谷川昭, 永井良三, 鍋島陽一, 増田浩明, 黒尾誠, 自然発症高血圧ラット (SHR) では、片腎摘出後早期より老化抑制遺伝子 (*klotho*) の発現が低下する, 第63回日本循環器学会総会, *Japanese Circulation Journal*, vol. 63 Supplement 1; 187, 1999
- ⑤ 斉藤勇一郎, 中村哲也, 相澤宏樹, 金井宏義, 武田真一, 大山良雄, 倉品年成, 松村穰, 倉林正彦, 永井良三, 鍋島陽一, 増田浩明, 黒尾誠, 糖尿病は *klotho* 遺伝子の発現低下と血管内皮機能障害を引き起こす, 第63回日本循環器学会総会, *Japanese Circulation Journal*, vol. 63 Supplement 1; 204, 1999
- ⑥ 斉藤勇一郎, 喜楽順一, 中村哲也, 相澤宏樹, 金井宏義, 武田真一, 内山強, 松村穰, 倉林正彦, 永井良三, 鍋島陽一, 増田浩明, 黒尾誠, レニン-アンジオテンシン系の遮断は、*klotho* 欠損マウスの血管内皮機能を改善する, 第63回日本循環器学会総会, *Japanese Circulation Journal*, vol. 63 Supplement 1; 580, 1999

G. 知的所有権の取得状況 なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

血管リモデリングの分子機構、内皮細胞由来一酸化窒素産生抑制によって生じる心血管組織の炎症性増殖性病変の発生機序における monocyte chemoattractant protein-1 の役割

分担研究者 竹下 彰 九州大学医学部循環器内科・教授

研究要旨

NO合成阻害薬（N ω -nitro-arginine methyl ester、L-NAME）を実験動物（ラット、ブタ）に4週間投与すると、7日以内に血管壁の炎症性増殖性変化が生じ、28日以降には血管壁再構築（血管壁肥厚、線維化）が生じることを報告した。平成10年度には、このモデルにおける血管壁再構築の分子機序について以下の成果を得た。「decoy strategy」を用いてNF-kBの機能をブロックすると上記炎症性増殖性変化とMCP-1発現増加が抑制された。また、MCP-1中和抗体によって炎症性増殖性変化が抑制できた。したがって、局所angII→酸化ストレス→NF-kB→MCP-1発現増加が内皮NO産生抑制による血管再構築の分子機構の中心経路であることが明らかとなった。

A.研究目的

内皮細胞由来弛緩因子、とくに一酸化窒素（nitric oxide、NO）、は血管壁の構築の制御に重要な役割を果たしている。我々は、ラットに一酸化窒素合成阻害薬（N ω -nitro-L-arginine methyl ester、L-NAME）を投与すると3日後に心血管組織の炎症性変化 [単球浸潤、myofibroblast出現、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)産生増加など]ならびに増殖性変化

(proliferating nuclear antigen PCNA陽性細胞の出現)が生じ、4週以降に冠血管の再構築(冠動脈中膜肥厚、線維化)が生じることを報告した。MCP-1は単球浸潤を特異的に制御するケモカインであることから、動脈硬化の成因との関連が注目されている。しかし、我々のNO産生抑制モデルの心血管病変の成立にMCP-1がどのような役割を果たすかは不明である。本研究では、まず「decoy strategy」を用いてNF-kBの機能をブロックすると上記炎症性増殖性変化とMCP-1発現増加が抑制されるかどうかを明らかにした。つぎに、MCP-1の機能的役割をMCP-1に対す

るモノクローナル中和抗体を用いて明らかにした。

B.研究方法

実験1：雄WKYラットを用い、1)コントロール(C)群、2)L-NAME投与(L)群、3)L-NAME投与+NF-kB decoy導入(L+NF)群、4)L-NAME投与+Scramble decoy導入(L+SD)群に分けた。decoy導入は大動脈弁直上でHVJ-liposome液を注入することにより行った。decoy導入後、L-NAMEを3日間経口投与(100mg/kg/day)したのち心臓を摘出し、炎症細胞浸潤の解析(病理、ED1免疫染色)、MCP-1のノーザンブロット、NF-kBのゲルシフトアッセイを行った。HVJ-liposome法によりNF-kB decoyを心臓に導入し、NF-kBにより上記の変化が修飾されるかどうかを検討した。FITC標識Oligodeoxynucleotide(ODN)の導入では心筋全層と血管内皮細胞にその局在を認め、HVJ-liposome法によりNF-kB decoyが導入されることを確認した。実験2：雄WKYラットを対照群(無治療群)、L-NAME(100 mg/kg per day)+IgG投与群、L-NAME+

MCP-1 中和抗体(2 mg/kg per day) 投与群に分けた。MCP-1 中和抗体のは、ヒト単球の遊走実験系を用いて確認した。

C. 研究結果

実験1：L群では、炎症細胞浸潤、NF- κ B 活性、MCP-1 の mRNA の有意な増加を認めた。L+SD 群ではこれらの変化はL群と同程度に認められた。L+NF 群では炎症細胞浸潤、NF- κ B 活性、MCP-1 の mRNA とともに有意に減少した。実験2：このモデルにおける MCP-1 発現部位は、in situ hybridization 法では冠動脈内皮細胞と炎症性細胞であり、免疫染色では中膜平滑筋に免疫活性が認められた。MCP-1 中和抗体同時投与により L-NAME 投与3日後の炎症性変化(心臓組織切片内の ED-1 陽性細胞数)および増殖性変化(PCNA 陽性細胞数)はほぼ完全に抑制された。しかし、線維芽細胞の活性化型である myofibroblast の出現は抑制されなかった。MCP-1 中和抗体は、L-NAME 投与4週間後における冠血管中膜肥厚を有意に抑制したが、線維化(血管周囲および間質)には影響しなかった。線維化の成立に中心的な役割を果たす TGF- β 1 や I 型コラーゲンの遺伝子発現の増加にも影響しなかった。

D. 考察ならびに結論

慢性的 NO 産生抑制ラットモデルにおいて NF- κ B による遺伝子発現調節が、炎症性・増殖性変化の形成ならびに MCP-1 の発現増加に重要な役割を果たしていることが示唆された。MCP-1 中和抗体投与により一酸化窒素産生抑制後早期に生じる心血管組織の炎症性増

殖性病変が防止されたことより、その病変の成立に MCP-1 が中心的役割を果たすことが明らかとなった。また、MCP-1 が中膜平滑筋の MCP-1 受容体を刺激して冠血管中膜肥厚の成立にも関与することが明らかとなった。しかし、MCP-1 中和抗体投与は、L-NAME 投与後早期の線維芽細胞の活性化 (myofibroblast の出現) や線維化の成立に中心的役割を果たすとされる TGF- β 1 や I 型コラーゲンの遺伝子発現には影響しなかった。この結果から、MCP-1 は NO 産生抑制モデルにおける線維化の成立には関与しないことが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1.) Tomita H など Early induction of transforming growth factor- β via angiotensin II type 1 receptor contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. Hypertension 1998 年 32 巻 273-279
- (2.) Tomita H など Inhibition of nitric oxide synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts. Arteriosclerosis and Thrombosis Vasc Biol 1998 年 18 巻 1456-1464
- (3.) Usui M など. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. Hypertension 32 巻 1998 年 527-533
- (4.) Katoh M など Cardiac angiotensin II receptors are upregulated by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. Circ Res 83 巻 1998 年 743-751

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

血管内皮由来の新しい血管平滑筋増殖因子の同定とその機能の研究

分担研究者 服部隆一

京都大学救急部助教授

研究要旨

ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清中から、新しい血管平滑筋増殖因子を精製し、それを、Tissue Factor Pathway Inhibitor-II (TFPI-II)と同定した。recombinant TFPI-IIを作成し、その増殖刺激経路を解析したところ、用量依存的にmitogen-activated protein kinase (MAPK)を活性化し、early protooncogeneである*c-fos*の発現を引き起こした。

A. 研究目的

血管内皮細胞が産生、分泌する新しい血管平滑筋増殖因子の精製、同定、およびその作用機序を明らかにする。

B. 研究方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞培養の無血清培養上清を濃縮し、これより、血管平滑筋増殖因子の精製を行った。精製された蛋白質のアミノ酸分析より、因子を同定し、さらにrecombinant蛋白質を作成して、その情報伝達経路の解析を行った。

C. 研究結果

培養上清より、ヘパリンアフィニティ、逆相クロマトグラフィーにて血管平滑筋増殖刺激活性のある、32kDの蛋白質を精製できた。アミノ酸分析より、この蛋白質はTissue Factor Pathway Inhibitor-II (TFPI-II)に一致することが判明した。BHK細胞にTFPI-IIを発現させ、得られたrecombinant TFPI-IIは用量依存的に、平滑筋細胞の数、DNA合成を増加させた。これはmitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化と、それに続くearly protooncogeneの*c-fos*の発現を介していた。

D. 考察

TFPI-IIはKunitz型のセリンプロテアーゼ阻害蛋白質であるが、その生理機能はこれまで不明であった。今回の研究でTFPI-IIが内皮より産生、放出され、血管平滑筋の増殖を刺激することが初めて明らかにされた。似た構造を

有する蛋白質としてTFPI-Iがあるが、これは逆に平滑筋の増殖を抑制することが既に報告されている。似た構造を有しながら、TFPI-IとTFPI-IIは相異なる作用を発揮するという、興味深い知見が得られた。その機能より、TFPI-IIが動脈硬化の発症、進展に深く関わっていることが推測され、その詳細を解明することが大きな課題である。

E. 結論

ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清から精製されたTissue Factor Pathway Inhibitor-II (TFPI-II)はmitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化とそれに続く、early proto- oncogene *c-fos*の発現を介して、用量依存的に血管平滑筋を増殖させる新しい因子であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shinoda E et al. Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Is a Novel Mitogen for Vascular Smooth Muscle Cells. J Biol Chem 274: 5379- 5384, 1999

2. 学会発表

篠田英二ら. Tissue Factor Pathway Inhibitor-2は血管平滑筋細胞の新しいmitogenである. 第63回日本循環器学会学術集会 平成11年3月27-29日 東京

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究総合事業）

分担研究報告書

心筋梗塞および難治性血管炎の発症に関わる遺伝要因の解析

分担研究者 木村彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

日本人における心筋梗塞の遺伝的危険因子を同定するために、心筋梗塞患者集団と健常者集団において、欧米人で報告された種々の遺伝的危険因子（ACEやeNOSを始めとする遺伝子の多型）を検討したところ、いずれの遺伝子多型とも日本人では主な遺伝要因ではないと考えられた。そこで新たな遺伝的危険因子を検索し、PECAM-1遺伝子に見出した3種の多型（Val125Leu, Asn563Ser, Gly670Arg）が、いずれも心筋梗塞と有意な相関を示すことを見出した。最も強い相関を示す多型はAsn563Serであり、心筋梗塞患者集団（特に罹患動脈数が多い群および若年発症群）には563Serのホモ接合体が有意に多く存在していた。また、この相関は高脂血症、肥満、高血圧、糖尿病、喫煙などの既知の危険因子の存在とは独立に観察されることから、PECAM-1多型はいわゆるlow risk groupを含めての新たな心筋梗塞の遺伝的危険因子と結論した。一方、難治性血管炎である高安病およびBuerger病とHLA領域遺伝子群多型との相関を検討した。その結果、高安病感受性遺伝子はHLA-B遺伝子近傍に存在し、高安病の病型がB52型とB39型の2つに分類できることを明らかにした。これに対して、Buerger病感受性遺伝子はHLA-B遺伝子およびDRB1遺伝子近傍に2つ存在するが、それぞれは独立した危険因子であった。

A. 研究目的

ヒトの疾患の発症には環境要因と遺伝要因の両者が関与する。明らかなメンデル性の遺伝型式をとらない多くの疾患（心筋梗塞を始めとするCommon diseaseを含む）でも家族集積性が認められることから、遺伝要因の関与は明らかである。このような疾患に関わる遺伝要因の解明は、ハイリスクグループの同定を通じて、環境要因の寄与度の解明や疾患の発症予防法の開発にもつながるため、医学研究上の重要な課題である。これまでに種々の疾患について、発症に関わると規定される

遺伝子の多型が解析され、それぞれ複数の遺伝要因が報告されているが、研究の多くは欧米人を対象としたものである。しかしながら、遺伝子多型の分布は人種によって大きく異なることが知られており、このことが疾患の発症率における人種差の一因であると考えられている。従って、遺伝的危険因子は人種毎に異なる可能性が高い。本研究では、日本人における心筋梗塞および難治性血管炎（高安病、バージャー病）の遺伝的危険因子を同定することを目的として、種々の遺伝子の多型についての患者・健常者集団比較を行った。

B. 研究方式

1. 心筋梗塞の遺伝的危険因子の解析：日本人心筋梗塞患者（n=135）及び健常者（n=235）の末梢血よりゲノムDNAを抽出し、PCR-SSOP法、SSCP法、RFLP法を用いて、種々の遺伝子の多型を検討し、集団間で遺伝子型頻度を比較検討した。対象とした遺伝子（およびその多型）は、Eセレクトイン（Ser128Arg）、ACE（イントロン16 I/D）、eNOS（プロモーターA-922G、イントロン4a/4b、Glu298Asp）、βフィブリノーゲン（プロモーターG-453A、Arg448Lys、3'UTR BclI+/-）、血小板グリコプロテインⅢa（Leu33Pro）、HUMPONA-1（Arg192Glu）、MTHFR（Ala667Val）である。またPECAM-1遺伝子については、PCR-SSCP法とSSOP法でVal125Leu、Asn563Ser、Gly670Arg多型を検出したので、これも遺伝マーカーとして調査した。また患者集団については、罹患冠動脈数（50%以上狭窄動脈数）、高脂血症（血清コレステロール値 > 220mg/dl）、肥満（BMI>25）、高血圧、糖尿病、喫煙の有無を調査した。

2. 難治性動脈炎の遺伝的要因の解析：日本人高安動脈炎患者（n=97）及びBuerger病患者（n=72）を対象として、HLA-B、MICA、DRB1、DQB1、DPB1遺伝子の多型をPCR-SSOP法、SSCP法、RFLP法で検討し、それぞれの多型頻度を健常者集団（n=230~317）と比較した。2つ以上の多型が疾患と有意な相関を示した場合には2ローカス解析を行った。

C. 研究結果

1. 心筋梗塞の解析：欧米人を中心とした解析で心筋梗塞の遺伝的危険因子であると報告されているEセレクトイン、ACE、

eNOS、βフィブリノーゲン、血小板グリコプロテインⅢa、HUMPONA-1及びMTHFR遺伝子多型について検討した。Eセレクトイン128Argを有する頻度は患者群に有意に多かった（12.6% vs 6.7%, RR=2.0, p<0.05）が、その他の遺伝子多型については、患者集団と健常者集団で有意な頻度差を認めなかった。

一方、PECAM-1遺伝子多型について解析したところ、Val125Leu、Asn563Ser、Gly670Argの3種のアミノ酸置換を伴う多型を見出した。日本人健常者集団における125Leu、563Ser、670Arg（いずれもバリエーション型）の対立遺伝子頻度は、それぞれ0.447、0.502、0.496であったが、これらの多型の間には連鎖不平衡が成立しており、組み換え体の頻度は125-563間で約15%、563-670間は約1%であった。心筋梗塞患者における上記多型の対立遺伝子頻度は、それぞれ0.522、0.585、0.581であり、いずれも健常者集団に比して有意に高かった。また、遺伝子型頻度を比較すると、患者集団には563Serホモ接合体（33.3% vs 23.4%, RR=1.64, p<0.04）および670Glyホモ接合体（32.6% vs 23.0%, RR=1.62, p<0.04）が有意に多く存在していた。また、この相関は罹患冠動脈数が2枝以上の患者群、60才未満発症の患者群において有意に観察された。さらに、心筋梗塞の危険因子とされる他の要因（高脂血症、高血圧、糖尿病、肥満、喫煙）の有無とは独立に相関が観察された。

2. 高安動脈炎患者の解析：高安動脈炎患者には B*5201、B*3902、DRB1*1502、DPB1*0901、MICA1.2頻度が有意に高かった。HLA領域内の対立遺伝子は互いに連鎖不平衡にあるため2ローカス解析を行ったところ、本症との第一義的な相関を示す

対立遺伝子はB*5201とB*3902であり、その他の対立遺伝子頻度の増加はB*5201との連鎖不平衡を反映したものと考えられた。ついで患者集団をB52陽性群、B39陽性群、B52およびB39陰性群に分けて合併症頻度を比較したところ、胸部大動脈罹患合併症（大動脈弁閉塞不全、心筋梗塞）はB52陽性群に、腹部大動脈罹患合併症（腎動脈狭窄、高血圧）はB39陽性群に有意に多かった。

3. バージャー病の解析：バージャーマ病患者集団にはB*5401およびDRB1*1501頻度が有意に高かった。また2ローカス解析を行ったところ、B*5401単独陽性群、DRB1*1501単独陽性群、両者陽性群の3群の危険オッズ比はそれぞれ3.2, 4.3, 4.5であった。すなわち、B*5401とDRB1*1501は、それぞれ独立した遺伝的危険因子であると考えられた。一方、MICA遺伝子多型の検討から、MICA1.4頻度の増加とMICA1.2頻度の有意な減少が認められた。MICA1.4頻度の増加はB*5401との連鎖不平衡を反映したものであったが、MICA1.2頻度の減少はHLA-B対立遺伝子群との連鎖不平衡では説明出来なかった。

D. 考察

1. 心筋梗塞の遺伝的要因：本研究により、これまで欧米人で遺伝的危険因子とされた多型が、日本人集団では大きな遺伝的要因ではないことが判明した。そこで新たな遺伝的要因を検索した結果、PECAM-1遺伝子多型との相関を認めた。この相関は罹患冠動脈数が多い患者群、60才未満の若年患者群に認められることから、PECAM-1遺伝子多型は新たな心筋梗塞の危険因子であると考えられた。さらに、PECAM-1に関連す

る危険因子はこれまでに確立している危険因子（喫煙、高血圧、高脂血症、糖尿病、肥満など）とは独立していることが判明した。以前より日本人集団では、高脂血症や肥満などの要因は欧米人に比して心筋梗塞発症への寄与は小さいと考えられていたが、我々が見出したPECAM-1多型は、いわゆるlow riskグループにおける心筋梗塞の発症を説明する可能性が高い。今後この相関が欧米人にも認められるか否かを検討すると同時に、PECAM-1多型に基く蛋白レベルでの機能変化を検討し、PECAM-1多型がいかなる分子機構で心筋梗塞の発症に寄与するのか（動脈硬化の危険因子の可能性など）を明らかにしなければならない。

2. 難治性血管炎の解析：本研究で難治性血管炎である高安動脈炎とバージャーマ病が、いずれもHLAの特定の対立遺伝子群との正の相関を示すことが明らかとなった。しかしながら、それぞれの疾患との相関を示すHLA対立遺伝子は全く異なっていた。本研究の結果を総合すると、高安病への感受性遺伝子はHLA-B座近傍に2種（それぞれ異なる病型を規定する）存在するのに対し、バージャーマ病への感受性遺伝子はHLA-B座近傍とHLA-DRB1座近傍に存在すると考えられる。一方、バージャーマ病への抵抗性遺伝子は感受性遺伝子と異なり、MICA遺伝子近傍に存在することが示唆される。今後HLA領域内のマイクロサテライトマーカーの解析を行うことで感受性遺伝子の詳細なマッピングが可能であると考えられるが、これらの難治性血管炎の病態には動脈硬化との関連も示唆されるため、HLA以外の遺伝的要因（上記の心筋梗塞の遺伝的要因など）の検討を行わなければならない。

E. 結論

日本人集団を対象とした解析から、PECAM-1遺伝子多型が心筋梗塞の新たな遺伝的危険因子であることを明らかにした。一方、高安病及びバージャー病のそれぞれが異なるHLA領域の対立遺伝子と相関を示すことを見出した。特に高安病についてはHLA-B52型とB39型の異なる病型が存在することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kimura A, Kobayashi Y, Takahashi M, et al: MICA gene polymorphism in Takayasu arteritis and Buerger disease, Int. J. Cardiol. 66: s107-s113, 1998.
- ② Kitamura H, Kobayashi Y, Kimura A, et al: Association of clinical manifestations with HLA-B alleles in Takayasu arteritis, Int. J. Cardiol. 66: s121-s126, 1998.
- ③ Takahashi M, Kobayashi Y, …, Kimura A, et al: HLA-linked susceptibility and resistance to Buerger's disease, MHC, in press.

2. 学会発表

- ④ 笹岡大史, 有村卓朗, …, 木村彰方: 心筋梗塞の新しい危険因子としてのPECAM-1遺伝子多型の検討, 第95回日本内科学会, 1998.
- ⑤ 木村彰方 他: 高安動脈炎におけるTNFA遺伝子プロモーター多型, 第7回日本組織適合性学会, 1998.
- ⑥ 高橋めぐみ, 大淵信久, …, 木村彰方: Buerger病におけるHLA-DRB1タイピング, 第7回日本組織適合性学会, 1998.
- ⑦ Sasaoka T, Osada K, …, Kimura A: PECAM-1 polymorphism associated with

myocardial infarction in Japanese. 15th Annual Meeting of ISHR, Japanese section, 1998.