

高血圧及び動脈硬化の成因と治療に関わる遺伝子の探索と機能解析

主任研究者 田辺 忠 国立循環器病センター研究所 薬理部長

高血圧や動脈硬化などの心血管系疾患の診断・治療の基礎的基盤形成に貢献するため、関連遺伝子の探索と機能解析を行い次の成果を得た。(1) 循環器疾患の病因遺伝子の探索には、日本人特有の変異及び多型解析が有用であり、候補遺伝子変異 ACE/DD は、日本人男性の高血圧感受性を高める遺伝因子であると考えられる。(2) 血管弛緩因子の一つプロスタサイクリン(PGI₂)が、血管平滑筋の増殖抑制に関わっており、大動脈でその傾向が顕著である。PGI₂欠損マウスは動脈硬化のモデル動物になりうる。PGI₂合成酵素の遺伝子導入は動脈硬化遺伝子治療へ応用出来る可能性がある。(3) 新たに見出された血管弛緩因子アドレノメデュリン(AM)の血漿濃度は、循環器疾患の重傷度とともに増加し、循環ホルモンとして血管のトーン調節に関係する。心臓においては、局所ホルモンとして働いている可能性がある。AM 遺伝子の発現には、TATA ボックスが必須であり、NF-IL6 や AP-2 が転写因子として重要な働きを持つ。(4) ホモシステインやリゾホスファチジルコリンなどで誘導される遺伝子の一つ RTP の遺伝子産物はリン酸化蛋白質で、小胞体ストレスの誘導蛋白質では珍しく細胞質に存在し、細胞増殖時に高発現する。(5) ホモシステインで発現誘導されるもう一つの遺伝子 Herp の遺伝子産物は小胞体に局在した。その遺伝子のプロモーター領域には、小胞体ストレスエレメント様配列を見出した。(6) 酸化 LDL をリガンドとする受容体 LOX-1 は、動脈硬化を促進する要因により発現が亢進し、LOX-1 そのものも動脈硬化を促進する因子である。

分担研究者

田辺 忠 国立循環器病センター 研究所 薬理部
部長
加藤 久雄 同 研究所 病因部 部長
寒川 賢治 同 研究所 生化学部 部長
瀧下 修一 同 病院 内科 部長
沢村 達也 同 研究所 バイオサイエンス部 室長
森崎 裕子 同 研究所 バイオサイエンス部 室長
馬場 俊六 同 病院 集団検診部 医長
荻原 俊男 大阪大学大学院 加齢医学講座 教授

心血管の機能の破綻から生ずる動脈硬化や高血圧などの成因の解析は、近年の心血管作動性因子とその受容体に関する研究、あるいはリポ蛋白質とその受容体の研究により急速に進歩しつつある。さらに、これらの物質の病態生理学的な研究成果は、多くの循環器疾患患者の救命に繋がって来た。しかし、原発性肺高血圧症や動脈閉塞症など未だに成因や有効な治療法が不明な心血管系の疾患も多い。これまでに、本研究分担者らにより、血管は細胞間や臓器間の情報交換に積極的に関与する器官であり、特に血管内皮細胞の機能的な変化が、生体の恒常性維持に重大な影響を与え、高血圧や動脈硬化などの心血管

A. 研究目的

系の疾患を惹起することが認識されつつある。これらの機能変化を司る遺伝子に変異を与えた疾患モデル動物を作製し、遺伝子の機能を解析することは、その成因に多因子の関与が予想される循環器疾患の成因の正確な理解と治療法の開発に不可欠である。さらに、これらのモデルでの遺伝子異常を循環器疾患の臨床例に相関出来れば、その成果は循環器疾患の診断と予防に大きな貢献が期待される。特に、心血管機能の異常からの修復に働く遺伝子の探索と解析は、循環器疾患の遺伝子治療に向けての新たな視点から大きな貢献が期待出来る。また、高血圧症は動脈硬化を始めとして多くの病態に深く関わることからその病態、病因の解析と適切な対応は極めて重要である。その発症は複数の遺伝要因と環境要因との共同作用と考えられ複雑であるが、疾患感受性遺伝子の解析が進めば、成果の予知医学としての応用が可能となり、急速に進行する超高齢化社会における朗報となりうる。

B. 研究方法

高血圧症などの循環器疾患の病因遺伝子の探索のためのゲノム遺伝子バンクを構築するため、国立循環器病センターにおけるサンプルの採取と保存ガイドラインを作成した。心血管系の機能にかかわる遺伝子 FBN1 と AMPD1 の翻訳領域の変異解析を行い、日本人に特異な変異の有無を調べた。また、高血圧疾患感受性遺伝子の候補としてアンジオテンシン変換酵素(ACE)遺伝子の挿入・欠失多型を 30-79 才の吹田市民の中から無作為に抽出された 5014 人を用いて検討した。

降圧作用を示す生理活性脂質プロスタサイクリン(PGI₂)の合成酵素遺伝子の発現と欠損動物を用いて PGI₂ の血管における生理作用と動脈硬化との関連を調べた。血管拡張に基づく著明な降圧作用を示す生理活性ペプチド・アドレノメデュリン(AM)のヒト遺伝子の転写調節機構をヒト大動脈由来の内皮細胞(HAEC)と平滑筋(VSMC)を用いて

調べた。循環器疾患と AM の関係を解明するため、急性心筋梗塞および肺高血圧症における血漿 AM 濃度と病態の関係とラット新生仔心筋と繊維芽細胞での AM 産生機構を調べた。

血管内皮細胞障害を惹起するホモシステインおよびリゾホスファチジルコリンで発現する新規遺伝子 RTP と Herp を発現させ作成した抗体を用いて、両遺伝子産物の機能解析と、ヒト Herp 遺伝子の構造決定をおこなった。動脈硬化形成などに密接に関連する血管内皮細胞機能で重要な役割を示すレクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)の遺伝子構造決定と誘導機構を血管内皮細胞を使って調べるとともに、マウス LOX-1 cDNA のクローニングと欠損マウスの作成を行った。

C. 研究結果

1. 病因遺伝子の探索

高血圧症などの循環器疾患の病因遺伝子の探索のためのゲノム遺伝子バンクを構築するにあたり、ゲノム DNA の採取と保存および提供者のプライバシーの保護など倫理面での配慮が極めて重要なため、国立循環器病センターにおいて新たに整備したガイドラインに基づき、遺伝子検体管理室を発足させ、本研究および臨床遺伝子診断推進のため基盤を整備した。

心血管系の機能にかかわる 2 つの遺伝子 - Marfan 症候群原因遺伝子 FBN1 と AMPD1 を選び日本人に特異な変異の有無を調べた。その結果、FBN1 遺伝子には、コーカシア人で報告されている変異や多型は見出されず、これまで報告のない新たな変異とアジア人に多い多型を見出した。一方、AMPD1 の翻訳領域の変異解析を行い、欧米で報告されていない新たなアミノ酸変異 Arg388Trp をきたす変異を見出した。突然死を引き起こす QT 延長症候群の原因遺伝子領域を解析し、その発現制御が周囲とリンクする新規

遺伝子 ITM を見出した。一方、高血圧疾患感受性遺伝子の候補としてアンジオテンシン変換酵素(ACE)の挿入・欠失多型を、30-79才の吹田市民の中から無作為に抽出され国立循環器病センター集団検診部受診者中、遺伝子検査の同意書が得られた5014人を用いて検討した。ACE/DD の頻度は、白人の頻度の約 1/2 の 13.1%であり、男性高血圧患者の頻度は 17.1%で、その他の男性対照者 11.8%に較べ有意に(<0.0015)高値を示した。

2. 遺伝子とその産物の機能の解析

降圧作用を示す生理活性脂質 PGI₂ 生合成の責任遺伝子の一つ PGI₂ 合成酵素遺伝子の転写調節機構を明らかにするため、5' プロモーター領域を解析し、血管内皮細胞と平滑筋に共通な SP1 配列と平滑筋のみに特異的な SP1 配列が転写促進に重要であることが分かった。肺静脈や肺動脈に比べて大動脈や大静脈発現が高いヒト PGI₂ 合成酵素をバルーン障害したラット頸動脈に過剰発現させると、頸動脈の新生内膜肥厚が 30%抑制され、合成型の血管平滑筋の増殖が抑制された。また、活性中心を欠損する PGI₂ 合成酵素遺伝子を持つマウスでは、腎臓の組織の壊死や繊維化、ボーマン囊の拡張などが認められ、腎動脈の一部で中膜の肥厚や粥状動脈硬化に類似の病変が観察された。

血管拡張に基づく著明な降圧作用を有するアドレノメデュリン(AM)の病態生理学的意義を調べた。急性心筋梗塞 24-48 時間で血漿濃度が最高値に達し心筋梗塞のサイズと相関した。肺高血圧症では軽症-中等症では、肺動脈圧と相関し、重症例では右心不全の指標と相関した。モノクロタリン肺高血圧ラットに AM を慢性投与すると病態生理的濃度で肺高血圧症の進展を有意に抑制した。ヒト AM 遺伝子の転写調節機構をヒト大動脈由来の内皮細胞(HAEC)と平滑筋(VSMC)を用いて調べた。両細胞でラット同

様発現が認められ、VSMC で HAEC より高い発現が認められた。ヒト AM 遺伝子の転写調節領域には転写開始点の 21 または 25 bp 上流に存在する TATA ボックスの他に、-33/-68 bp に存在する AP-2 結合配列の 7 回反復と -85/-93 bp に存在する NF-IL6 が機能していた。

血管内皮細胞障害を惹起するホモシステインおよびリゾホスファチジルコリン(LysoPC)で血管内皮細胞で発現する新規遺伝子 RTP と Herp を発現させ作成した抗体を用いて、両遺伝子産物の機能解析と、ヒト Herp 遺伝子の構造決定をした。RTP 蛋白質は、7カ所のプロテインキナーゼ A によってリン酸化される部位を有する 47 kDa のリン酸化蛋白質であり、細胞質に分布した。この蛋白質は、腎臓の近位尿細管に発現し、細胞増殖時に高かった。一方、ヒト Herp 遺伝子は約 1.2 kb サイズを有し、8 個のエキソンからなり、還元剤などの小胞体ストレスによって誘導された。5' 上流には、小胞体ストレスに共通してみられる転写調節因子結合配列が存在した。

血管内皮細胞において発現し、酸化 LDL をリガンドとするレクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)遺伝子は、6 個のエキソンからなり、各々のエキソンが機能ドメインと対応していた。LOX-1 は酸化 LDL やその構成成分である LysoPC によって誘導され、遺伝子の 5' 転写調節領域には、TATA ボックス、CAAT ボックス、AP-1 結合配列、shear stress 応答配列が、3' 非翻訳領域には、mRNA 不安定化配列 ATTTA が存在した。この遺伝子は、家族性高血圧の遺伝子がマップされている 12 番染色体の短腕 12.13 に位置していた。高血圧モデルである SHR-SP ラットや食塩負荷 Dahl ラットの大動脈と静脈において LOX-1 が誘導されていた。LOX-1 遺伝子のエキソン 6-8 を neo 遺伝子で置換するように構築したターゲティングベクターを用い

て、LOX-1 欠損マウスの作成を行い、LOX-1(+/-)ヘテロマウスの作成に成功した。

D. 考察

本研究を推進する上で重要基盤であるゲノムDNAの採取と保存のためのガイドラインが整備され、研究の公明性の確保が容易になった。これを基盤とした、心血管系の機能に関わる遺伝子の解析により、日本人あるいはアジア人に特異な変異や発現頻度の変化がある可能性が示唆された。また、QT延長症候群の原因遺伝子とリンクする新規遺伝子の探索がなされITMを見出した。

AMと急性心筋梗塞や肺高血圧などの病態との関連が明らかにされたことにより、AM遺伝子の変異と循環器疾患との相関性解明の重要性が増した。血管内皮細胞の機能を担い高血圧や動脈効果と関連する可能性の高い新規遺伝子RTP、Herp、LOX-1遺伝子の機能解析が進んだ。一方で、PGI₂合成酵素遺伝子を持つPGI₂合成酵素欠損マウスやLOX-1欠損マウスが作成され、これらのマウスが、新たな高血圧あるいは、動脈硬化研究のモデル動物となる可能性が見えてきた。これらの成果は、いずれも将来循環器疾患の研究や遺伝子診断・治療開発に、大きく貢献することが期待される。

E. 結論

- 1) 循環器疾患の病因遺伝子の探索には、日本人特有の変異及び多型解析が重要であり、積極的に進める必要がある。
- 2) ACE/DDは、日本人男性の高血圧感受性を高める遺伝因子であると考えられる。
- 3) PGI₂が、血管平滑筋の増殖抑制に関わっており、大動脈でその傾向が顕著である。PGI₂欠損マウスは動脈硬化のモデル動物になりうるようになった。PGI₂合成酵素の遺伝子導入は動脈硬化遺伝子治療へ応用出来る可能性がある。
- 4) 種々の循環器疾患において、AMの血漿

濃度は、重傷度とともに増加し、循環ホルモンとして血管のトーン調節に関係する。心臓においては、局所ホルモンとして働いている可能性がある。AM遺伝子の発現には、TATAボックスが必須であり、NF-IL6やAP-2が転写因子として重要な働きを持つ。

5) RTP蛋白質はリン酸化蛋白質で、小胞体ストレスの誘導蛋白質では珍しく細胞質に存在し、細胞増殖時に高発現する。

6) ホモシステインで発現誘導されるHerpは小胞体に局在した。その遺伝子のプロモーター領域には、小胞体ストレスエレメント様配列を見出した。

7) LOX-1は動脈硬化を促進する要因で発現が亢進し、LOX-1そのものも動脈硬化を促進する因子である。LOX-1遺伝子の構造とノックアウトマウスを使ってLOX-1の病態生理的役割の確定可能になった。

心血管系の恒常性維持に関わる脂質代謝酵素遺伝子の探索と解析

分担研究者 田辺 忠 国立循環器病センター研究所 薬理部長

動脈硬化形成に関与している脂質特にアラキドン酸代謝に関与する酵素遺伝子の探索と機能の解析行うとともに、得られた遺伝子を修飾し、アラキドン酸代謝異常と動脈硬化などの循環器疾患の病態との関連を明らかにすることを目的に、(1)マウスプロスタサイクリン(PGI₂)合成酵素遺伝子の5'プロモーター領域のSP1配列が転写促進に重要なこと、(2)活性中心を欠損するPGI₂合成酵素遺伝子を持つマウスでは、腎臓の組織の壊死や繊維化、ボーマン嚢の拡張などが認められ、腎動脈の一部で中膜の肥厚や、粥状動脈硬化に類似の病変が観察されること、(3)PGI₂生合成に関わる酵素-PGI₂生合成の基質を作るCOXのアイソザイム(COX-1、COX-2)とPGI₂合成酵素は、肺静脈や肺動脈ではどの酵素も大動脈や大静脈に比べて発現が低こと、(4)バルーン障害したラット頸動脈にヒトPGI₂合成酵素を過剰発現させると、頸動脈の新生内膜肥厚が30%抑制されることが明らかになった。

A. 研究目的

高度不飽和脂肪酸、アラキドン酸の代謝物であるプロスタグランジン(PG)やトロンボキサン(TX)は、血圧調節、血栓形成、血管透過性、炎症などにおいて強い生理活性を示し、循環器の生理に重要な役割を果たしている。すなわち、アラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼ(COX)により、多くのプロスタグランジン(PG)誘導体の出発物質であるPGH₂に代謝される。血小板/巨核球やマクロファージでは、PGH₂から血栓形成、血管平滑筋の収縮、細胞増殖作用を示すトロンボキサン(TX)が、血管内皮細胞では、血小板凝集抑制能、血管平滑筋弛緩、細胞増殖抑制作用を示すプロスタサイクリン(PGI₂)などが生合成され、両者のバランスの異常が循環器疾患の成因の一つになると考えられている(Moncada,

S. & Vane, J., *Pharmacol. Rev.* **30**, 293, 1978)。本研究では、これまでに行ってきたアラキドン酸代謝調節機構に関する基礎的研究 (Yokoyama, C. et al., *Genomics* **30**, 296, 1996; Tanabe, T. & Ullrich V., *J. Lipid Mediators Cell Signal.* **12**, 243, 1995)を発展させ、巨核球/血小板、血管内皮細胞、血管平滑筋、マクロファージ等の細胞において機能している動脈硬化形成に関与する遺伝子の探索と機能の解析行うとともに、アラキドン酸代謝と動脈硬化などの循環器疾患の病態との関連を明らかにするための基礎研究を以下の通り行う。(1)PGやTXなどのプロスタノイドの生合成に関与する酵素の遺伝子の性質の解明する。(2)酵素を欠損あるいは過剰発現する疾患モデルマウスを作成し、これら個体の循環器系の病態を明ら

かにすると。(3)遺伝子導入など治療としての分子療法の可能性を探る。

本年度は、マウス PGI₂ 合成酵素遺伝子のプロモーター領域の解析を行うとともに、活性中心を欠損させた PGI₂ 合成酵素遺伝子を持つマウスの病態解析を行った。また、大血管における PGI₂ 生合成に関わる酵素-PGI₂ 生合成の基質を作る COX のアイソザイム (COX-1、COX-2) と PGI₂ 合成酵素の大血管における発現を RNA レベルで解析した。次に、バルーンによる血管障害ラットを用いて、PGI₂ 合成酵素の新生内膜肥厚に対する抑制効果を調べた。

B. 研究方法

PGI₂ の既に知られている生理活性の循環器系におよぼす効果と、これまでに報告されていない新たな生理活性を調べるため、PGI₂ の生合成を行う PGI₂ 合成酵素を欠損したマウスを作成した。具体的には、マウス PGI₂ 合成酵素の遺伝子をクローニングし、活性中心である Cys とその近傍をコードしているエキソン 7-9 を含む領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換した ES 細胞を作製し、この細胞を定法に従って受精卵に導入し欠損マウスを作製、解析を行った。

一方、マウス PGI₂ 合成酵素遺伝子のプロモーター領域の解析は、様々なマウス PGI₂ 合成酵素遺伝子のプロモーター領域を有するルシフェラーゼベクターを作成し、ウシ血管内皮細胞およびラット合成型血管平滑筋に導入して行った。ラット大血管の PGI₂ 産生に関与する PGI₂ 合成酵素、COX-1、COX-2 の発現は、³²P 標識 cDNA をプローブに用いる RNA プロットと、³⁵S 標識 cRNA をプローブに用いる in situ ハイブリダイゼーション法を用いて調べた。

また、ヒト PGI₂ 合成酵素の過剰発現による in

vivo での血管平滑筋増殖抑制効果を検討するため、ヒト cDNA を発現ベクター PUC-CAGGS に挿入し、HVJ リポソーム法により Fogarty 社の A2 フレンチ・バルーン・カテーテルで傷害した SD ラット頸動脈に遺伝子導入した。3 日後頸動脈組織の PGI₂ の産生量、1 週間後の PGI₂ 合成酵素蛋白の発現量、2 週間後の血管の内膜肥厚を顕微鏡下に計測した。

C. 研究結果

PGI₂ の生理活性と循環器疾患との関連を詳細に検討するため、PGI₂ 合成酵素欠損マウスを作成した。ホモ個体では、PGI₂ と合成酵素のいずれも存在しないか極めてレベルであった。これまでの解析では、ホモ個体の成長、行動、繁殖の点は野生型と変わらないが、生後 4 週令付近から腎臓に形態的な変化が認められ、飼育期間に依存して重症化することが明らかになった。解剖の結果、腎臓の組織の壊死や繊維化、ボーマン嚢の拡張などが認められた。興味あることに、形態異常を示す一部の腎動脈で、中膜の肥厚や粥状動脈硬化に類似した病変が観察された。これらの異常は、個体ごとに異なっていた。

血小板凝集抑制能、血管平滑筋弛緩、細胞増殖抑制作用を示す PGI₂ は、主として血管内皮細胞で産生されるとこれまで考えられてきた。我々は、大動脈平滑筋においても同程度かそれ以上の PGI₂ が産生されており、血管平滑筋の増殖制御に関わっている可能性を見出した (Tone, Y. et al., Eur. J. Cell Biol. 30, 268, 1997)。このため、PGI₂ 合成酵素の血管内皮細胞と平滑筋に関わる転写因子の共通性と差についてマウス PGI₂ 合成酵素遺伝子を使って検討した。その結果、転写調節領域の -199/-194 bp の SP1 サイトが内皮細胞と平滑筋で、-289/-297 bp の SP1 サイトが平滑筋で機能している可能性が示唆され、

細胞特異的発現調節機構が存在する可能性が明らかになった。

今回、大血管の種類の違いと PGI₂ 産生の関連を調べるため、PGI₂ 生合成に関わる 3 つの酵素の血管内発現分布を、アンチセンス cRNA を使った *insitu* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。その結果、大動脈では、内皮細胞と中膜平滑筋で COX-1、COX-2、PGI₂ 合成酵素のいずれもの発現が認められた。一方、大静脈においては、COX-1 や PGI₂ 合成酵素は、内膜、中膜平滑筋共に発現を認めたが、内膜においては COX-2 の発現は確認できなかった。次に、これらの酵素の肺血管系と心大血管系での発現量を、ノザンブロット解析により調べた。肺静脈や肺動脈では、どの酵素も大動脈や大静脈に比べて発現が低かった。また、COX-2 は肺動脈では大動脈の 1/5 程度しか発現しておらず、動脈における発現の差が大きかった。この差は、肺動脈と大動脈での血圧やずり応力の差が影響している可能性が考えられた。

PGI₂ は、血圧降下作用を持つため、PGI₂ 産生の律速酵素の一つである COX-2 の役割を、培養ウシ血管内皮細胞を使って調べた。LPS(1 mg/ml) 添加により約 50 倍の PGI₂ 産生亢進が認められた。このとき、COX-2 特異的阻害剤ニメスリド(1 mM) を添加すると 70% の抑制が観察されたが、一方、マクロファージ/単球においては強力な COX-2 mRNA の誘導抑制作用を示す糖質コルチコイド・デキサメタゾン(1 nM) の添加では、この誘導は 30% しか抑制されなかった。観察された PGI₂ 産生の亢進と抑制は、COX-2 mRNA の発現とはほぼ関連していた。一方、デキサメタゾンの誘導抑制は、グルココルチコイド受容体を発現させることにより増強されることから、血管内皮における PGI₂ 産生は、ステロイド系抗炎症薬の影響を受け難い性質を有することが示唆された。

血管平滑筋において、PGI₂ は細胞の増殖を制御している可能性が培養細胞を用い

た実験結果や(Hara, S. et al., FEBS Lett. 216, 862, 1995) 上記の結果から示唆されたので、ヒト PGI₂ 合成酵素の過剰発現による *in vivo* での血管平滑筋増殖抑制効果を検討するため、バルーン・カテーテルで傷害した SD ラット頸動脈の PGI₂ 産生量、PGI₂ 合成酵素の発現と内膜肥厚とを調べた。その結果、遺伝子導入でヒト PGI₂ 合成酵素を過剰発現させた血管壁の損傷は、コントロールに較べ修復が進んでおり、PGI₂ の産生が 60% 促進され、血管の内膜肥厚は平均で 30% 抑制された。ヒト PGI₂ 合成酵素に対する特異的抗体で血管の免疫染色を行った結果、血管内皮細胞に強いヒト PGI₂ 合成酵素の発現が認められた。

D. 考察

PGI₂ 生合成に関与するいずれの酵素も、大動脈や大静脈では肺静脈や肺動脈に比べて発現が高かった。また、COX-2 は肺動脈では大動脈の 1/5 程度しか発現しておらず、動脈における発現の差が大きかった。この差は、肺動脈と大動脈での血圧やずり応力に対する PGI₂ 産生応答性の差を反映している可能性が示唆された。ラット頸動脈の新生内膜肥厚の PGI₂ による抑制や、PGI₂ 欠損動物において腎動脈の肥厚から、PGI₂ の血管平滑筋増殖抑制作用が明らかになった。PGI₂ は半減期の短い不安定な化合物であるため、局所的に作用する生理活性物質である可能性が高い。このためか PGI₂ の安定アゴニストは臨床薬として使用に困難が指摘されており、ヒト PGI₂ 合成酵素を遺伝子導入により過剰発現させる遺伝子治療は、PTCA 後の再狭窄の防止や、現在 PGI₂ の投与だけが唯一の治療法である原発性肺高血圧の新しい治療法として有効である可能性が示唆された。

E. 結論

PGI₂ が、血管平滑筋の増殖抑制に関わっていることが明らかになった。特に大動脈でその傾向が顕著であり、PGI₂ 欠損マウスは動脈硬化のモデル動物になりうることが明らかになった。

今後 PGI₂ 欠損による動脈硬化形成の機構と、ヒト PGI₂ 合成酵素遺伝子導入による遺伝子治療への応用研究を行いたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kito, H., Yokoyama, C., Inoue, H., Tanabe, T., Nakajima, N. and Sampio, B.E., Cyclooxygenase expression in bovine aortic endothelial cells exposed cyclic strain. *Endothelium* 6, 107-112, 1998
- 2) Todaka, T., Yokoyama, C., Yanamoto, H., Hashimoto, N., Nagata, I., Tsukahara, T., Hara, S., Hatae, T., Morishita, R., Aoki, M., Ogihara, T. Kaneda, Y. and Tanabe, T., Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury. *Stroke* 30, 419-426, 1999
- 3) Inoue, H., Umezono, K., Nishimori, T., Hirata, Y. and Tanabe, T., Glucocorticoid-mediated suppression of the promoter activity of the cyclooxygenase-2 gene is modulated by the expression of the receptor in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 292-298, 1999
- 4) 田辺忠：特集/アラキドン酸代謝と血管. *オーバービュー. 血管と内皮* 9:5-6, 1999
- 5) 井上裕康, 田辺忠：特集/アラキドン酸代謝と血管. *血管におけるシクロオキシゲナーゼの発現. 血管と内皮* 9: 25-32, 1999
- 6) 横山知永子, 田辺忠：プロスタサイクリン 合成酵素の構造と遺伝子発現. *血管と内皮* 9, 33-38, 1999
学会発表
- 1) 井上裕康, 田辺 忠, 誘導型シクロオキシゲナーゼ-2 遺伝子の転写調節—マクロファージ系 U937 細胞と血管内皮細胞におけるその相違について, 日本生化学会近畿支部大会, 吹田市, 1998年6月23日
- 2) 横山知永子, 矢吹共子, 竹田潤二, 下西 学, 大河原 晋, 刀禰佳典, 田辺 忠, プロスタサイクリン合成酵素遺伝子の発現と欠損マウスの作製, 第71回日本生化学会大会, 名古屋市, 1998年10月14日
- 3) 井上裕康, 田辺 忠, 血管内皮細胞とマクロファージにおける COX-2 遺伝子の転写調節, 第21回日本分子生物学会年会, 横浜市, 1998年12月17日
- 3) 波多江利久, 大河原 晋, 横山知永子, 下西 学, 田辺 忠, プロスタサイクリン細胞内刺激および細胞外刺激の HEK-293 細胞における apoptosis 様形態変化と viability に及ぼす効果, 第21回日本分子生物学会年会, 横浜市, 1998年12月18日
- 4) 下西 学, 横山知永子, 波多江利久, 大河原 晋, 田辺 忠, ラット血管におけるプロスタサイクリン合成酵素とシクロオキシゲナーゼの発現, 第28回心血管作動物質学会, 津市, 1999年2月12日
- 4) 下西 学, 横山知永子, 波多江利久, 大河原 晋, 田辺 忠, ラット動/静脈におけるプロスタサイクリンの合成, 第72回日本薬理学会年会, 札幌市, 1999年3月25日

動脈硬化惹起物質により内皮に発現する新規遺伝子群の解析

分担研究者 加藤久雄 国立循環器病センター研究所・病因部部长

ホモシステインおよびリゾホスファチジルコリンで発現が上昇する新規遺伝子 RTP の抗体を用いた解析から、RTP は細胞質に存在するリン酸化蛋白質であることが判明した。このリン酸化はプロテインキナーゼ A が触媒した。リン酸化型 RTP は細胞増殖時に高発現していた。また、ホモシステインで発現誘導される新規遺伝子 Herp は小胞体局在蛋白質であり、遺伝子のプロモーター領域に小胞体ストレスに共通してみられる転写因子結合シスエレメントの存在が示唆された。

A. 研究目的

血管内皮細胞傷害を惹起するホモシステインおよびリゾホスファチジルコリンで発現が誘導する遺伝子を解析し、内皮細胞傷害メカニズムを解明するとともに、これらの知見に基づいて内皮細胞の保護に応用する。

B. 研究方法

ホモシステインおよびリゾホスファチジルコリンで発現する新規遺伝子 RTP と Herp を大腸菌で発現させ、組み換え蛋白質を調製した。これらの蛋白質を抗原にして家兔を用いて特異抗血清を作成した。細胞内の両蛋白質は抗血清を用いて解析した。生体内の分布はマウスの組織を用いた免疫組織学的手法を用いて行った。また、ヒト Herp 遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定した。

C. 研究結果

抗 RTP 抗血清を用いて細胞内 RTP を調べたところ、RTP は 47-49kDa を示した。細胞

抽出液のホスファターゼ処理により、その分子量は 47kDa にシフトした。また、2 次元電気泳動により 7 スポットに分離した。これらのことから、RTP はリン酸化蛋白質であることが判明した。細胞抽出液を超遠心で分画すると RTP は上清に存在し、細胞免疫学的手法で調べると RTP は細胞内に広く存在することから、RTP は細胞質蛋白質であることが判明した。RTP のリン酸化は細胞をホモシステイン処理することにより消失した。リン酸化型は細胞増殖時に多いことも判明した。また、リン酸化はプロテインキナーゼ A が触媒することも判明した。抗体を用いてマウス組織抽出液を調べたところ、腎臓に高発現を認めた。組織免疫化学的手法で調べたところ、腎近位尿細管に高発現しており、遠位尿細管や糸球体には発現していなかった。また、小腸の微絨毛にも高発現を認めた。

一方、抗血清を用いて Herp の細胞内局在性を調べたところ、小胞体内に存在することが判明した。Herp 遺伝子は還元剤やツニカ

マイシンなどの小胞体ストレスで発現が誘導されるので、その転写調節機構を明らかにする目的で、ヒト Herp 遺伝子を単離した。ヒト Herp 遺伝子は 8 個のエキソンから構成される約 12 kb の大きさの遺伝子であった。遺伝子の 5' 上流域には小胞体ストレスに共通してみられる転写因子結合シスエレメントの存在が示唆された。

D. 考察

我々は細胞をホモシステインで処理すると小胞体ストレスにより一群の遺伝子の転写が上昇することを見い出している。これまで、小胞体ストレスで誘導される蛋白質は小胞体に局在するものがほとんどであり、唯一の例外は核に存在する C/EBP ファミリーの転写因子の CHOP である。我々は、RTP が細胞質蛋白質であることを同定した。即ち、RTP は小胞体ストレスで誘導される蛋白質であるにもかかわらず、小胞体に局在しない点が極めてユニークであった。RTP はガンで発現が抑制され、p53 で発現が誘導されると報告されている。本遺伝子は線虫や植物にも同定されているので、広く生物界に存在し重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結論

RTP はリン酸化蛋白質で、小胞体ストレスで誘導される蛋白質には珍しく細胞質に存在した。RTP は細胞増殖時に高発現していた。ホモシステインで発現誘導される Herp は小胞体に局在した。その遺伝子のプロモーター領域に小胞体ストレス応答エレメント様配列

を見い出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato et al., Lysophosphatidylcholine decreases the synthesis of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *Thromb. Haemost.*, 79, 217-221, 1998.

2) Sato et al., Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others. *J. Biochem.*, 123, 1119-1126, 1998.

2. 学会発表

1) Kokame, et al., Characterization of a novel protein, Herp, induced by endoplasmic-reticulum stress in human vascular endothelial cells. *International Conference on Dynamics and Regulation of the Stress Response*. Kyoto, March 9-12, 1998.

2) Agarwala et al., Homocysteine-inducible cytoplasmic protein RTP is regulated by endoplasmic-reticulum (ER) stress. *The First Japan-US Joint Meeting on Vascular Biology 1998*. 神戸市、1998 年 8 月 30-31 日.

3) 小亀浩市 他、小胞体ストレスに応答する新規小胞体膜蛋白質 Herp の遺伝子構造解析. 第 71 回日本生化学会大会、名古屋市、1998 年 10 月；*生化学* 70, 743, 1998.

G. 知的所有権の所得状況

なし

ペプチド性血管作動物質と受容体に関わる遺伝子の探索と解析

分担研究者 寒川 賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

アドレノメデュリン(AM)は血管拡張に基づく著明な降圧作用をもち、血圧調節に深く関与し、心血管系の保全に役割を担う循環調節因子であると考えられる。AMの血中濃度は各種循環器疾患において上昇しているが、循環血液中のAMは主として血管内皮細胞や平滑筋細胞などの血管壁細胞に由来すると推測される。本研究では、培養血管内皮細胞にヒトAM遺伝子プロモーター領域のDNAを導入して、AM遺伝子発現の調節に関与する cis-acting element を解析した。

A. 研究目的

心房性ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンの発見により新しい循環調節機序が明らかになってきたように、心血管作動性の新しい因子及びその受容体を同定することは循環調節研究の新領域への展開が期待できる。

我々は、ラット血小板中のcAMP増加活性を指標としたアッセイ系を用いて、ヒト褐色細胞腫組織より新しいペプチドを発見し、これを“アドレノメデュリン(adrenomedullin)”(AM)と命名した。AMは52残基のアミノ酸よりなり、強力で長時間持続する降圧活性を示す。

AMのmRNAは、副腎のみならず心臓、腎臓、肺、血管など広く循環器系の臓器に発現し、循環血液中でもAMが存在すると共に、循環器疾患において血中濃度の上昇が見られることから、AMは心血管系の調節に関与する新しい循環ホルモンであると考えられる。また最近、我々はAMの遺伝子構造も明らかにすると共に、AMが血管内皮及び血管平滑筋細胞で多量に産生され、オートクリン及びパラクリンの局所因子としても機能している可能性を示した。

このようにAMは、循環ホルモン及び血管壁

の局所因子として、血管拡張作用を介して心血管系の保全に重要な役割を担う新しい循環調節因子であると言える。

本研究では高血圧症に関連する遺伝子解析の一環として、血管壁細胞におけるAMの遺伝子発現調節機序について、培養血管内皮細胞にヒトAM遺伝子プロモーター領域のDNAを導入して、遺伝子発現の調節に関与する cis-acting element の解析を行った。

B. 研究方法

1) ヒト血管細胞におけるAM遺伝子発現の検討と転写開始点の決定

ヒト大動脈由来の血管内皮細胞(HAEC)及び血管平滑筋細胞(VSMC)より抽出したtotal RNAを、ヒトAM cDNAをプローブとしてノザンプロット法により、AM遺伝子発現を検討した。cDNAの+92~+69に相当する24 baseの合成プライマーを用いて、HAEC及びVSMCのtotal RNAについてプライマー伸長法にてAM遺伝子の転写開始点の解析を行った。

2) AM遺伝子の転写調節に関与する cis element の同定

転写開始点より-1534~+70及びその5'側を短縮した種々の鎖長のヒトAM遺伝子プロモーター領域DNAを、ルシフェラーゼ発現ベクター(pLCF-B)に組み込み、リポゾーム法にてHAECに導入した。24時間後に、発現したルシフェラーゼの活性をPica Gene Luminescenc Kitを用いて測定し、AM遺伝子5'隣接領域DNAのプロモーター活性を評価した。また、センス、ノンセンスのオリゴDNAを用いたゲルシフト法及びPCRによる点変異導入により、AM遺伝子の転写調節に関与するcis elementの同定を行った。

C. 研究結果

1) ラット血管細胞ではAM mRNAが多量に発現しているが、ヒトにおいてもHAEC及びVSMCのいずれもAM mRNAを発現することが確認された。ラットでは、VSMCに比べECにおいて高濃度のAM mRNA発現が見られたが、ヒトにおいてはHAECよりもVSMCでより高い発現が認められた。我々は既にヒトAM cDNA及び遺伝子の塩基配列決定していたが、正確な転写開始点は明かでなかった。今回プライマー伸長法により解析した結果、ヒトAM遺伝子の転写開始点はTATA boxの下流21及び25 baseの2ヶ所に存在することが明かになった。

2) 転写開始点の上流1534 baseのDNAを組み込んだルシフェラーゼ・ベクターをHAECに導入すると、SV40 ウィルスのプロモーターの11%の発現活性を示し、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞(HUVEC)においては38%の発現活性を示した。しかし、共導入した β -ガラクトシダーゼで補正した場合ほぼ同等の発現活性となるため、プロモーター解析はHAECを用いて行った。

AM遺伝子プロモーター領域DNAの鎖長を漸次短くしていくと、-100 base付近で約40%、-50 base付近で約80%の発現活性がの低下が見

られ、TATA boxを失うとほとんど発現活性が消失した。

転写開始点より-85~-93 baseの部位にはNF-IL6のコンセンサス配列が存在する。その3 baseに変異を導入すると、ルシフェラーゼの発現が42%低下した。また、HAECの核蛋白を用いてゲルシフト法により解析した結果、NF-IL6のコンセンサス配列を含むオリゴDNAに特異的に結合するバンドが認められた。

一方、-33~-68 baseの部位はGCに富み、AP-2の結合部位のコンセンサス配列が7つ重複して存在した。また、ゲルシフト・アッセイでもAP-2のコンセンサス配列に特異的に結合する核蛋白のバンドが検出された。

D. 考察

AMは副腎のみならず血管内皮細胞や平滑筋細胞などの血管壁細胞においても産生されることが示されたが、血管壁では他にプロスタサイクリン、NO、CNP、エンドセリン、IL-1、PDGFなどの血管作動物質が産生されることが知られている。血管壁で産生されるAMは、これらの血管壁に由来する血管作動物質と共に、血管の緊張度や構築の変化に影響を与える因子の一つであることが推測される。従って、血管壁細胞におけるAM産生調節メカニズムの解明は、循環器系におけるAMの病態生理的意義や高血圧の発症を理解する上で重要である。

本研究では、血管内皮細胞においてヒトAM遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、AM遺伝子の発現調節には、TATA boxに加え、NF-IL6やAP-2が転写調節因子として関与することが明かになった。従って、感染症や外傷などの炎症に際し血中AMが著明に上昇することには、炎症性のサイトカインやLPSの増加が転写因子としてNF-IL6を介し関与することが推測される。また、高血圧症をはじめとする種々の循環器疾患患者の血中において、

1AMとノルエピネフリンが正相関することより、 $\alpha 1$ 受容体によるフォスホリパーゼC, プロテインキナーゼCの活性化がAP-2を介し、AM遺伝子の発現を促進する可能性が考えられる。

E. 結論

ヒト血管内皮細胞におけるAM遺伝子の発現にはRNAポリメラーゼのTATA boxへの結合が必須であり、その他にNF-IL6やAP-2が転写調節因子として重要な働きをもつことが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① T. Ishimitsu, A. Miyata, H. Matsuoka and K. Kangawa : Transcriptional regulation of human adrenomedullin gene in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243, 463-470, 1998.
- ② Y. Isumi, H. Shoji, S. Sugo, T. Tochimoto, M. Yoshioka, K. Kangawa, H. Matsuo and N. Minamino : Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 139, 838-846, 1998.
- ③ A. Kubo, N. Minamino, Y. Isumi, T. Katafuchi, K. Kangawa, K. Dohi and H. Matsuo : Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J. Biol. Chem.*, 273, 16730-16738, 1998.
- ④ N. Shinoki, T. Kawasaki, N. Minamino, K. Okahara, A. Ogawa, H. Ariyoshi, M. Sakon, J. Kambayashi, K. Kangawa and

M. Monden : Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J. Cell. Biochem.*, 71, 109-115, 1998.

- ⑤ Y. Ono, M. Kojima, K. Okada and K. Kangawa : cDNA cloning of canine adrenomedullin and its gene expression in the heart and blood vessels in endotoxin shock. *Shock*, 10, 243-247, 1998.
- ⑥ Y. Isumi, N. Minamino, T. Katafuchi, M. Yoshioka, T. Tsuji, K. Kangawa and H. Matsuo : Adrenomedullin production in fibroblasts : its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells. *Endocrinology*, 139, 2552-2563, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究協力者

石光俊彦 (獨協医科大学)

南野直人 (国立循環器病センター研究所)

児島将康 (国立循環器病センター研究所)

循環器疾患臨床例における遺伝子異常の解析

分担研究者 瀧下 修一（国立循環器病センター病院 部長）

アドレノメデュリン（AM）は血管拡張に基づく著明な降圧作用をもち、生体内の特に心血管系の保全に役割を担う循環調節因子であると考えられる。AMの血中濃度は高血圧をはじめとする循環器疾患において上昇している。本研究ではこれまでの知見を発展させ、種々の循環器疾患におけるAMの病態生理的意義や心筋細胞におけるAMの分泌機序、産生調節、AMの治療効果についても検討した。

A. 研究目的

アドレノメデュリンなどの血管作動物質の遺伝子多型と循環器疾患との関連を検討し、もし多型が存在すれば、病態との関係を解析することにより、循環器疾患の診断や予防に役立てることを目的とする。その背景を検討するために、種々の循環器疾患におけるAMの病態生理的意義や心筋細胞におけるAMの分泌、産生調節、AMの治療効果についても検討した。

B. 研究方法

- 1) 急性心筋梗塞患者の血漿AM濃度を入院直後より経時的に測定し、AMの病態生理的意義について検討した。
- 2) 肺高血圧症において血漿AM濃度を測定し血行動態などとの関係について検討した。
- 3) モノクロタリン肺高血圧ラットを作成し、同時にAMの慢性投与を開始しその治療効果について検討した。
- 4) AMの遺伝子は心臓に強く発現することが知られているが、その分泌や産生調節については明確でない。そこで新生仔ラットの心筋細胞の培養系を確立し、心筋細胞、繊維芽細胞にお

けるAMの分泌と産生調節を検討した。

C. 研究結果

- 1) 血漿AM濃度は急性心筋梗塞で入院直後より増加しており、24-48時間後にピークを取り、心不全合併例で高値を示したが、再灌流の有無でピーク値は変化しなかった。ピーク値は心筋梗塞のサイズと相関した。
- 2) 肺高血圧症における血漿AM濃度は軽症～中等症の場合は肺動脈圧に相関するが、重症例ではむしろ右心不全の指標とよく相関した。
- 3) AMをラットに慢性投与すると病態生理的濃度の範囲内で、肺高血圧の進展が有意に抑制された。
- 4) 心筋細胞、繊維芽細胞はAMを培養上清中にほぼ同程度分泌していた。エンドセリン、アンジオテンシンII、フェニレフリンは心筋細胞、繊維芽細胞においてAMの分泌を刺激しなかったが、サイトカインのIL-1 β 、TNF- α は両細胞において明らかに産生、分泌を刺激した。

D. 考察

以上の結果からAMは急性心筋梗塞、肺高血

圧症などの病態においてもその血中レベルは疾患の重症度に比例して増加し、血管のトーンスの調節や局所因子として血管の再構築に抑制的に働いている可能性がある。さらに心不全時に心臓の局所で増加したAMはサイトカインがその産生に関与している可能性があり、心筋細胞、線維芽細胞で産生されたAMはオートクリン、パラクリン因子として働き、心機能や心肥大等の病態を修飾するものと考えられる。今後AMの遺伝子異常の解析を目指して、さらに研究を続けていく予定である。

E. 結論

AMは種々の循環器疾患においてその血漿濃度は重症度とともに増加し、循環ホルモンとして血管のトーンスの調節に関係する。心臓においては局所因子として働いている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nagaya N, Nishikimi T, Goto Y, Miyao Y, Kobayashi Y, Morii I, Daikoku S, Matsumoto T, Miyazaki S, Matsuoka H, Takishita S, Kangawa K, Matsuo H, Nonogi H. Plasma brain natriuretic peptide is a biochemical marker for the prediction of progressive ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 135: 21-28, 1998.
- ② Miyao Y, Nishikimi T, Goto Y, Miyazaki S, Daikoku S, Morii I, Matsumoto T, Takishita S, Miyata A, Matsuo H, Kangawa K, Nonogi H. Increased plasma adrenomedullin levels in patients with acute myocardial infarction in proportion to the clinical severity. *Heart*, 79: 39-44, 1998.
- ③ Yoshitomi Y, Nishikimi T, Kojima S, Kuramochi M, Takishita S, Matsuoka H, Miyata A, Matsuo H, Kangawa K. Plasma levels of adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci*, 94: 135-139, 1998
- ④ Ishimitsu T, Minami J, Nishikimi T, Kawano Y, Takishita S, Kangawa K, Matsuo H, Matsuoka H. Responses of natriuretic peptides to acute and chronic salt loading in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertens Res*, 21: 15-22, 1998.
- ⑤ Yoshitomi Y, Nishikimi T, Kojima S, Kuramochi M, Takishita S, Kangawa K, Matsuo H. Plasma natriuretic peptides as indicators of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 64: 153-160, 1998.
- ⑥ Yoshihara F, Nishikimi T, Kosakai Y, Isobe F, Matsuoka H, Takishita S, Kawashima Y, Saito Y, Matsuo H, Kangawa K. Atrial natriuretic peptide secretion and body fluid balance after bilateral atrial appendectomy by the maze procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 116: 213-219, 1998.
- ⑦ Kario K, Nishikimi T, Yoshihara F, Takishita S, Yamaoka R, Matsuo T, Matsuo H, Mitsuhashi T, Shimada K, Kangawa K. Plasma levels of natriuretic peptides and adrenomedullin in elderly hypertensive patients: relationships to 24 h blood pressure.

- J Hypertens, 16: 1253-1259, 1998.
- ⑧ Yoshihara F, Nishikimi T, Horio T, Yutani C, Takishita S, Matsuo H, Ohe T, Kangawa K. Chronic infusion of adrenomedullin reduces pulmonary hypertension and lessens right ventricular hypertrophy in rats administered monocrotaline. Eur J Pharmacol, 355: 33-39, 1998.
- ⑨ Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Nagaya N, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes: stimulation by interleukin-1 β and tumor necrosis factor - α . Endocrinology, 139: 4576-4580, 1998.
- ⑩ Nishikimi T, Hayashi Y, Iribu G, Takishita S, Kosakai Y, Minamino N, Miyata A, Matsuo H, Kuro M, Kangawa K. Increased plasma adrenomedullin concentrations during cardiac surgery. Clin Sci, 94: 585-590, 1998.
- ⑪ Kakishita M, Nishikimi T, Okano Y, Satoh T, Kyotani S, Nagaya N, Fukushima K, Nakanishi N, Takishita S, Miyata A, Kangawa K, Matsuo H, Kunieda T. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. Clin Sci, 96: 33-39, 1999.
2. 学会発表
- ① Nishikimi T, Horio T, Yoshihara F, Nagaya N, Takisita S, Matsuo H, Kangawa K. Autocrine and paracrine release of adrenomedullin increases cAMP levels in cardiac myocytes and nonmyocytes. 16th Scientific Meeting of International Society of Hypertension, 1998.
- ② Yoshihara F, Nishikimi T, Horio T, Nagaya N, Kanazawa A, Yutani C, Takishita S, Matsuo H, Kangawa K. Adrenomedullin attenuates the development of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats treated with monocrotaline (MCT). C.O.E. International Symposium, First International Symposium on Adrenomedullin and PAMP, 1998.
- ③ Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Nagaya N, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes: stimulation by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . C.O.E. International Symposium, First International Symposium on Adrenomedullin and PAMP, 1998.
- ⑤ 錦見俊雄, 堀尾武史, 吉原史樹, 永谷憲歳, 瀧下修一, 松尾寿之, 寒川賢治. 心筋細胞 (MC)、非心筋細胞 (NMC) はアドレノメデュリン (AM) を分泌している - 心臓における AM を介したオートクリン、パラクリン機構の存在 -. 第62回日本循環器学会総会, 1998.
- ⑥ 堀尾武史, 錦見俊雄, 永谷憲歳, 吉原史樹, 松尾寿之, 寒川賢治, 瀧下修一. IL-1 β および TNF- α による培養心筋細胞ならびに非心筋細胞でのアドレノメデュリンの産生、分泌調節. 第62回日本循環器学会総会, 1998.
- ⑦ 吉原史樹, 錦見俊雄, 堀尾武史, 永谷憲歳, 瀧下修一, 松尾寿之, 寒川賢治. 容量負荷およ

び圧負荷不全心モデルにおける心臓でのアドレノメデュリン(AM)の産生調節の差異,
第62回日本循環器学会総会, 1998.

研究協力者

錦見俊雄 (国立循環器病センター研究所)

堀尾武史 (国立循環器病センター内科)

血管内皮細胞の機能に関わる遺伝子の動脈硬化、高血圧における役割に関する研究

分担研究者 沢村 達也 国立循環器病センター研究所室長

血管内皮細胞の機能に大きな役割を果たしていることが予想されているレクチン様酸化LDL受容体の研究を中心に、内皮細胞の機能に関わる遺伝子の解析を行い、その血管疾患での役割を検討するとともに遺伝子治療の可能性について検討を行った。具体的には、ヒトLOX-1遺伝子のクローニングと染色体上の位置の決定、LOX-1の発現調節、マウスLOX-1cDNAのクローニング、マウスLOX-1遺伝子のクローニングとLOX-1ノックアウトマウスの作成を中心に行った。

A. 研究目的

血管内皮細胞の機能が循環系の機能調節に非常に重要であることは、今日では広く受け入れられることとなった。我々は動脈硬化の際に血管内皮細胞の機能変化を媒介する可能性のある分子、レクチン様酸化LDL受容体（LOX-1）の同定、構造決定を行った。本研究はLOX-1分子の動脈硬化や高血圧における役割を探ることにより病気のメカニズムを明らかにするとともに効果的な新しい治療法を開発することを目的とする。とくに、多くの患者が存在する動脈硬化や高血圧の、病態の基本に関わる分子を対象とした治療を行うことができれば、従来の治療とは一線を画する治療効果を上げることができると考えられる。

B. 研究方法

ヒトLOX-1遺伝子のクローニングと染色体上の位置の決定

ヒトLOX-1 cDNAをプローブとしてヒトゲノミックライブラリーをプラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた陽性クローンのインサートをプラスミドにサブクローンし、dideoxy chain termination法により配列を決定した。さらにPCR法により、ゲノミックDNAを増幅し、LOX-1遺伝子の一部をコードするDNA断片を得た。このDNA断片の配列も同様に決定した。LOX-1遺伝子DNA断片をプローブとして、ヒト末梢血分裂間期染色体を用いたfluorescence in situ hybridizationを行った。染色体はDAPIにてcounterstainし、遺伝子位置の同定に用いた。

LOX-1の発現調節

ウシ培養内皮細胞およびラット大動脈よりRNA、タンパク質を調整し、それぞれノーザン解析、ウエスタン解析によりLOX-1の発現量の変化を検討した。

マウスLOX-1cDNAのクローニング

マウス胎盤よりcDNAライブラリーを作成し、ウシLOX-1 cDNAをプローブとしてスクリーニングを行い、マウスLOX-1 cDNAを得た。配列を決定するとともに、細胞にcDNAを導入して安定発現させ、LOX-1の機能の解析に用いた。酸化LDLの調整は、ヒト血漿より分離したLDLを銅イオン存在下37

度で酸化する事により行った。この酸化LDLを¹²⁵I標識し、受容体結合実験、リポ蛋白の分解実験に用いた。また、DiIにて蛍光標識を行い、酸化LDLの取り込みの観察に用いた。

マウスLOX-1遺伝子のクローニングとLOX-1ノックアウトマウスの作成

ヒトLOX-1遺伝子の場合と同様にマウスLOX-1 cDNAをプローブとしてマウスゲノミックライブラリーをスクリーニングし、マウスLOX-1遺伝子DNA断片を得た。これを用いて、機能ドメインを置換するようにneoカセットを挿入し、negative selectionのためにtkカセットを遺伝子の一端に付加したtargeting vectorを構築した。エレクトロポレーションによりES細胞にtargeting vectorを導入した後、G418とFIAUで細胞を選別し、サザン解析により相同組み換え体をスクリーニングした。相同組み換えを起こした細胞を培養し、細胞塊を胚盤胞に注入し、擬妊娠マウスの子宮内で発生させキメラマウスを得た。キメラマウスと野生型の交配によりLOX-1(+/-)のヘテロマウスを作成し、さらにこの交配によりLOX-1(-/-)のホモマウスを得た。

C. 研究結果 D. 考察

ヒトLOX-1遺伝子のクローニングと染色体上の位置の決定

ヒトLOX-1遺伝子は6つのエクソンからなり、第1エクソンが細胞質ドメイン、第2エクソンが膜貫通ドメイン、第3エクソンがネックドメイン、第4-6エクソンがレクチン様ドメインをコードし、エクソンと機能ドメインがきれいな対応を見せていた。染色体上では12番の短腕12.3-13.2に位置していた。この領域とオーバーラップする領域にある家族性高血圧の遺伝子がマップされており、LOX-1がこの高血圧の責任遺伝子である可能性もある。LOX-1遺伝子の5'上流域の解析も同時に行った。TATA boxやCAAT boxといった基本構造とともにAP-1結合部位、shear stress responsive elementなどのエンハンサー配列が認められた。また、3'非翻訳領域にはmRNAの不安定化シグナルであるATTTAモチーフが繰り返して存在し、LOX-1の発現量が状況に応じて誘導され、必要でなくなれば速やかに消退することを示唆していた。

LOX-1の発現調節

まず、*in vitro*でLOX-1の発現調節メカニズムを検討した。LOX-1のリガンドである酸化LDLの影響を培養内皮細胞で見ると、LOX-1に対する強い発現誘導作用が認められた。この反応はLDLでは起こらず、酸化LDLの主要な脂質成分の一つで、その多くの生物学的反応を導くと考えられているリソフォスファチジルコリン(LPC)でも同様に観察された。この発現誘導の時間経過は細胞を処理した後12時間くらいでピークに達した。もちろんLPCによるLOX-1の発現誘導はmRNAレベルだけでなく、蛋白レベルおよび酸化LDLの取り込み活性の増加を伴っており、実際に機能する分子としてLOX-1の誘導が起きていることがわかった。この結果はLDL受容体がLDL(コレステロール)により、ダウンレギュレーションを受け、過剰なコレステロール供給から守っているのとは対照的で、LOX-1が高コレステロールの環境下では病態促進的に働いてしまう分子であることが示唆された。また、炎症性サイトカインであるTNF- α や、物理的刺激であるshear stressによっても強い誘導が起ることを確認しており、動脈硬化巣で種々のサイトカインが産生されていることや動脈硬化が血管分岐部で局所的に発達しやすく血行力学的な要因が重要と考えられていることと考えあわせると興味深い。

*in vivo*における検討では、ノーザン解析で脳卒中易誘発性高血圧自然発症ラット(SHR-SP: stroke prone spontaneously hypertensive rat)の大動脈と静脈において、LOX-1の発現が顕著な亢進を示すことがわかった。さらにDahl食塩感受性(DS)ラットやDahl食塩非感受性(DR)ラットではともに基礎レベルではLOX-1の発現は低かったが食塩負荷をかけると、高血圧が誘導されるDSラットにのみLOX-1の発現誘導がみられた。これらの結果から、動脈硬化の重要なリスクファクターであることが知られている高血圧により、LOX-1の血管壁での発現が誘導されることがわかった。こうしたLOX-1の発現亢進により動脈硬化の進展が促進することが示唆された。

マウスLOX-1 cDNAのクローニング

クローニングしたマウスLOX-1 cDNAはLOX-1の基本構造を保っていたが、ネックドメインが3回繰り返して存在していた。細胞に発現すると酸化LDLを結合、取り込み、分解する活性が誘導され、確かにクローニングしたcDNAが酸化LDL受容体として機能することが確かめられた。

マウスLOX-1遺伝子のクローニングとノックアウトマウスの作成

マウスLOX-1遺伝子をクローニングしたところヒトの場合と比較して長くなっているネックドメインに対応するように、エクソンが3つ存在していた。レクチンドメインをコードするエクソン6-8をneoカセットで置換するようにtargeting vectorを構築し、ES細胞に導入し、相同組み替え体をスクリーニングした。約500クローンのスクリーニングに

より2クローンの相同組み替え体を得た。それぞれをblastocystに注入して得たキメラマウスを野生型のマウスと交配したところLOX-1(+/-)のヘテロマウスの誕生が確認され、相同組み替えを起こしたalleleのGermline transmissionが起こったことがわかった。さらにヘテロマウス同士を交配することにより、LOX-1(-/-)マウスを得た。このマウスの形質については次年度以降詳細に検討していく予定である。

E. 結論

発現調節の検討から、LOX-1は動脈硬化を促進するような要因により発現が亢進しており、LOX-1そのものも動脈硬化を促進する因子の一つであることが示唆された。このことから、ヒトでLOX-1遺伝子の変化により、疾患が生じることがないかを、ヒトLOX-1遺伝子の構造を決定したことを利用して、検討していきたい。またノックアウトマウスの形質の解析により、LOX-1の欠損が動脈硬化に対してどのように影響するかを検討し、LOX-1の病態生理的な役割を確定した上で、LOX-1を遺伝子治療の道具として用いる糸口をつかみたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshikawa H, Sawamura T, Kakutani M, Aoyama T, Nakamura T, Masaki T. High affinity binding of oxidized LDL to mouse lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:841-846.
2. Kido T, Sawamura T, Masaki T. The processing pathway of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:S13-15.
3. Nicholson B, Sawamura T, Masaki T, MacLeod CL. Increased Cat3-mediated Cationic Amino Acid Transport Functionally Compensates in Cat1 Knockout Cell Lines. *J Biol Chem.* 1998;273:14663-14666.
4. Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T. LOX-1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9535-9540.
5. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Inducible expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, a novel C-type lectin, in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1998;83:322-327.
6. Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1998;83:328-333.
7. Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T, Kita T. Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1541-1547.

8. Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, Murase T, Nishi E, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF- α . FEBS Lett. 1998;440:29-32.
9. Zhang XF, Komuro T, Miwa S, Minowa T, Iwamuro Y, Okamoto Y, Ninomiya H, Sawamura T, Masaki T. Role of nonselective cation channels as Ca²⁺ entry pathway in endothelin-1-induced contraction and their suppression by nitric oxide. Eur J Pharmacol. 1998;352:237-245.
10. Kikuta K, Sawamura T, Miwa S, Hashimoto N, Masaki T. High-affinity arginine transport of bovine aortic endothelial cells is impaired by lysophosphatidylcholine. Circ Res. 1998;83:1088-1096.
11. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. FEBS Lett. 1998;428:304-308.
12. Fujita M, Ikemoto M, Tanaka T, Tamaki S, Yamazato A, Sawamura T, Hasegawa K, Kihara Y, Nohara R, Sasayama S. Marked elevation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with angina pectoris. Angiogenesis. 1998;2:105-108.
13. Kaburagi S, Hasegawa K, Morimoto T, Araki M, Sawamura T, Masaki T, Sasayama S. The role of endothelin-converting enzyme-1 in the development of alpha1- adrenergic-stimulated hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes. Circulation. 1999;99:292-298.
14. Aoyama T, Sawamura T, Furutani Y, Matsuoka R., Yoshida M.C., Fujiwara H., Masaki T. Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene. Biochem. J., 1999; in press.
2. 学会発表
 1. 酸化 LDL 受容体の発見とその後の新展開
沢村達也
1998年7月22日 京都 第2回心臓血管病科学カンファレンス
 2. 酸化 LDL 受容体の構造と機能
沢村達也
1998年10月14~17日 名古屋 日本生化学会
 3. Structural organization and chromosomal assignment of human LOX-1 (lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein) gene
Takuma Aoyama, Tatsuya Sawamura, Nakamura Takashi, Yoshiyuki Furutani, Rumiko Matsuoka, Michihiro Yoshida, Hisayoshi Fujiwara, Tomoh Masaki. November 8-11 1998 Dallas Texas, USA 71st Scientific Sessions of American Heart Association
 4. Induction of LOX-1 (lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein) by oxidised low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine
Takuma Aoyama, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki. November 8-11 1998 Dallas Texas, USA 71st Scientific Sessions of American Heart Association
 5. Identification of soluble forms of LOX-1, a novel oxidized LDL receptor, and partial purification of the converting enzyme
Takatoshi Murase, Noriaki Kume, Hiroharu Kataoka, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Toru Kita. November 8-11 1998 Dallas Texas, USA 71st Scientific Sessions of American Heart Association
 6. LOX-1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells by endothelial cells
Tatsuya Sawamura, Kozo Oka, Ken-ichiro Kikuta, Shigekazu Itokawa, Noriaki Kume, Tomoh Masaki. November 8-11 1998 Dallas Texas, USA 71st Scientific Sessions of American Heart Association
 7. Induction of Apoptosis of Vascular Endothelial Cells by Pericardial Fluid of Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery
Atsushi Iwakura, Masatoshi Fujita, Tatsuya Sawamura, Koji Hasegawa, Yasuki Kihara, Ryuji Nohara, Ario Yamazato, Takeda Hosp, Masashi Komeda. November 8-11 1998 Dallas Texas, USA 71st Scientific Sessions of American Heart Association
 8. Endothelial Receptor for Oxidized LDL
沢村達也、眞崎知生
1998年11月20~21日 大阪 The Third Green Cross International Symposium
 9. レクチン様酸化 LDL 受容体 LOX-1 の発現調節
沢村達也
1998年11月27~28日 京都 第2回日本心臓血管内分泌代謝学会総会
 10. Endothelin-1 による心筋細胞 apoptosis の抑制
荒木信、長谷川浩二、沢村達也、藤田正俊、篠山重威
1998年11月27~28日 京都 第2回日本心臓血管内分泌代謝学会総会
 11. LOX-1, The Endothelial Receptor For Oxidized LDL
沢村達也
1998年12月3~5日 京都 国際シンポジウム「高脂血症と動脈硬化-基礎と臨床-京都1998」
 12. 内皮細胞の酸化 LDL 受容体 LOX-1
沢村達也
1998年12月10~11日 千葉 平成10年度日本動脈硬化学会冬季大会
 13. 動脈硬化と酸化 LDL 受容体
沢村達也
1999年1月14日 岐阜 第一回岐阜アテロジェネシスカンファレンス
 14. 酸化 LDL 受容体の発現調節と機能
沢村達也
1999年2月12日 三重 第28回日本心臓血管作動物質学会

G.知的所有権の取得 なし