

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

動脈硬化・心不全等の循環器疾患に関わる遺伝子・タンパク質の
機能に関する研究

平成13年度 総括・分担報告書

主任研究者 田邊 忠

平成14(2002)年3月

様式 A (4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 14 年 4 月 10 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 〒560-0003 大阪府豊中市東豊中町 3-18-13
フリカ ナ タ ナヘ タタシ
研究者 氏 名 田 邊 忠 
(所属機関 国立循環器病センター)

平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等 研究事業) を完了したので
次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 動脈硬化・心不全等の疾患に関する遺伝子・
タンパク質の機能に関する研究 (H12-ヒトゲノム-021)

国庫補助金精算所要額 : 金 50,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク(別添)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書表紙 (別添)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権等の出願・登録状況
(別添総括・分担報告書中に記載)
8. 健康危険情報 (別添総括・分担報告書中に記載)

目 次

| | | |
|------|---|----|
| I. | 総括研究報告書 | |
| | 動脈硬化・心不全等の循環器疾患に関わる遺伝子・タンパク質の機能に関する研究 | 2 |
| | 田邊 忠 | |
| II. | 分担研究報告 | |
| 1. | 心血管系の性に関わる脂質代謝酵素遺伝子の機能とその改変マウスの機能解析 | 6 |
| | 田邊 忠 | |
| 2. | 血管内皮細胞の機能に関わる遺伝子の動脈硬化等の循環器病における役割に関する研究 | 8 |
| | 沢村 達也 | |
| 3. | 新規ペプチド性心血管作動物質とその受容体遺伝子の病態生理学的意義と機能解析 | 10 |
| | 寒川 賢治 | |
| 4. | ジーンターゲットングによる血管制御遺伝子の機能解析に関する研究 | 13 |
| | 森田 啓行 | |
| 5. | 遺伝子改変動物を用いた心機能に関係する遺伝子の機能解析 | 15 |
| | 森崎 隆幸 | |
| 6. | 心筋および血管平滑筋のカルシウムシグナルに関わる遺伝子の機能解析 | 17 |
| | 竹島 浩 | |
| 7. | 遺伝子異常と心機能の相関 | 19 |
| | 菅 弘之 | |
| 8. | 遺伝子改変小動物を用いた右心系循環器障害の発生機構と治療に関する研究 | 20 |
| | 白井 幹康 | |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | 22 |

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
総括研究報告書

動脈硬化・心不全に関わる遺伝子・タンパク質の機能に関する研究

主任研究者 田邊 忠 国立循環器病センター研究所部長

心臓や脳の梗塞などに関わる動脈硬機構や心不全に関わる心筋の機能を明らかにするため、動物個体を用いる心血管系に働く遺伝子の生理作用と病態生理学的役割の解析を行い、以下の成果が得られた。

1) 肺高血圧モデルラットの肝にプロスタサイクリン合成酵素遺伝子を導入した結果、肺高血圧の軽減と予後の改善が認められた。また、細胞内プロスタサイクリン(PGI)量の上昇に伴い細胞のアポトーシスが誘導され、核内受容体・PPAR δ が PGI の新たなシグナル伝達経路として関与していることを明らかにした。

2) 虚血再還流によりレクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)の発現が誘導され、抗 LOX-1 抗体により虚血再還流による臓器障害が抑制されることから、LOX-1 は虚血再還流の病態に深くかかわっていることを明らかにした。

3) 培養心筋細胞における低酸素によるアドレノメデュリン(AM)の産生増加は N-アセチル-L-システインにより抑制され、酸化ストレスが低酸素による AM 分泌刺激に一部関与していること、さらにその機序として NF- κ B 系の関与が示唆された。また、AM の心筋細胞保護作用にアポトーシス抑制作用が一部関与していることが示唆された。

4) KLF5/BTEB2 は、臓器傷害後に誘導される線維芽細胞、平滑筋細胞、免疫系細胞の活性化と増殖、その結果としての肉芽形成、線維化、血管新生、ひいては臓器リモデリングを制御している重要な転写因子であること、ADAMTS-1 は、細胞外マトリックスの代謝に関わることにより、血管を含めた組織構築の維持に重要であることが明らかになった。

5) AMP デアミナーゼ(AMPD)2 遺伝子破壊マウスは離乳期以降の体重増加が野生型に比して不良であり、また AMPD 遺伝子群複合破壊マウス(AMPD2/AMPD3 ダブルノックアウトマウス)は骨格筋、肝臓、腎臓において異常が認められ生後約3週において死亡した。

6) リアノジン受容体(RyR)-2 欠損心筋細胞においてストア容量依存性 Ca²⁺流入が存在することを示し、心筋ではストア容量依存性 Ca²⁺流入の活性化には Ca²⁺放出チャネルは関与しないことを証明した。また、ジャンクトフィリン(JP)分子群は心筋細胞だけでなく、骨格筋細胞や無脊椎動物における Ca²⁺シグナリングにも重要であることが判明した。一方、高純度の心筋小胞体の調製法の開発に成功し、それを用いた単クローン抗体の検索を行い、新規と推定される小胞体膜蛋白質群を数種類見出した。

7) 自然発症糖尿病ラットは先天的遺伝子異常の結果、筋小胞体 Ca²⁺ポンプの発現量の低下がみられ、心機能としては弛緩機能障害と1分間当たりのカルシウムハンドリングに要する酸素消費量の減少が見られ、Ca²⁺ポンプの発現量の低下と弛緩機能障害との間で明確な相関が認められた。

8) 覚醒下遺伝子改変マウスの循環(血圧、心拍数)、呼吸(一回換気量、呼吸回数等)、代謝(酸素消費量、二酸化炭素排出量)が、beat by beat から日内変動レベルまで実時間解析できる新しいシステムを開発した。これを PGI 欠損マウスに応用し、PGIは低酸素下での循環、呼吸、代謝調節に重要であり、特に、一酸化窒素との協調作用が生命維持に必須であることを明らかにした。

主任研究者:

田邊 忠 国立循環器病センター 研究所部長

分担研究者:

菅 弘之 国立循環器病センター 研究所所長

寒川 賢治 国立循環器病センター 研究所部長

森崎 隆幸 国立循環器病センター 研究所部長

竹島 浩 東北大学大学院医学系 教授

白井 幹康 国立循環器病センター 研究所室長

沢村 達也 国立循環器病センター 研究所室長

森田 啓行 東京大学大学院医学系 助手

A. 研究目的

循環器病の克服は高齢化社会での大きな課題である。心血管系の機能の破綻から生ずる動脈硬化や心不全等の成因の解析は、分子生物学の進歩に伴い、近年の「心血管作動性因子」とその受容体あるいはリポ蛋白質受容体の研究により新しい循環調節機構が明らかになってきた。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究明に繋がってきた。しかし、未だ心臓や脳の梗塞などに関わる動脈硬化の機構や心不全に関わる心筋の機能調節機構などに関して未知の部分が多く、マウスやラットなど

動物個体を用いる心血管系に働く遺伝子の生理機能を病態生理学的役割の解析が重要となっている。

本研究分担者らにより、心血管系に作用する新しい生理活性ペプチド(AMP、アドレノメデュリン(AM)、グレリン)などが発見され、また、プロスタサイクリン(PGI)合成酵素、酸化 LDL 受容体 LOX-1、カルシウムチャネル、血管平滑筋細胞の分化調節因子、AMP デアミナーゼ(AMPD)などの遺伝子と蛋白質の構造が明らかにされた。一方、ラットなど中動物を用いて、心臓や肺の生理機能の解析がなされた。前述の遺伝子の機能を知り病態との関連を解明するために、これらの遺伝子の改変動物を観察し、遺伝子の機能を正確に把握しモデル動物として確立することは、循環器疾患の正確な理解に不可欠である。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できれば、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ほか、創薬や遺伝子治療などへの応用が可能となり、急速に進行する超高齢社会における朗報と成り得る。このため本研究では、研究分担者がこれまでに明らかにしてきた心血管系の機能維持に働くと考えられる関連遺伝子とその産物である蛋白質の機能を、細胞、病態モデルや遺伝子改変マウスなどの個体を用いて生化学的あるいはマウスの生理機能を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

血管及び心機能に関連する遺伝子とその産物であるタンパク質、ペプチド、脂質の機能を細胞及び個体レベルで明らかにし、循環器疾患モデル動物の作成を目指し、生理学、生化学、薬理学、遺伝子工学等の方法を駆使して研究を実施した。本年度は、昨年度に作成した遺伝子改変マウスと確立した解析システムを用いて研究を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトの検体を用いる研究は行わなかった。遺伝子組換え等の実験は各所属施設の委員会の承認を得て行われ、動物の取扱いは各所属施設の実験動物取扱規定に基づいて行い、また動物愛護に配慮して実験を行った。特に動物実験の計測機器の装着は、苦痛を与えないよう麻酔下で行った。覚醒動物実験では、使用動物数ならびに刺激付加時の動物への苦痛を最小限に留めるよう注意を払った。

C. 研究結果及び考察

1) 動脈硬化に関する研究

モノクローリン投与により肺高血圧を誘発させたラットの肝にヒト・プロスタサイクリン合成酵素(PGIS)発現プラスミドを HVJ-リポソーム法で直接投与した結果、有意に右心室圧が低下し、肺高血圧の軽減と予後の改善が認められた。また、ヒト・PGIS を血管内皮細胞や血管平滑筋細胞をはじめ培養細胞に過剰発現させ細胞内 PGI 濃度を上昇させるとアポトーシスが誘導され、PPAR 応答配列をもつレポーター遺伝子のプロモーター活性が上昇した。このプロモーターの活性化はドミナントネガティブ型 PPAR δ により完全に抑制されたことから PPAR δ が新たな PGI 情報伝達系として関与す

ること、G タンパク質共役型 PGI 受容体経路による細胞内 cAMP の上昇はこの PGI-PPAR δ 依存性アポトーシスを抑制することを明らかにし、PGI の細胞内と細胞外からの異なるシグナル伝達系により血管平滑筋の増殖抑制がコントロールされている可能性を見出した(田邊)。一方、虚血再還流により LOX-1 の発現が血管内皮細胞および心筋細胞において急速に誘導され、心臓の虚血再還流モデルにおいては、抗 LOX-1 抗体の前投与により梗塞巣の大きさが約 50%抑制された。また、抗 LOX-1 抗体は、再還流後見られる網膜静脈での白血球のローリングを効果的に抑制し、本抗体の前投与は網膜の神経細胞のアポトーシスを抑制すると同時に、結果として起きる網膜の組織構築の崩壊をも抑制した(沢村)。KLF5/BTEB2 欠損マウスは発生早期に致死であり、ヘテロ接合体は間葉系細胞の増殖や血管新生の低下、アンジオテンシン II 慢性投与による心肥大及び線維化の低下が認められた。ADAMTS-1 欠損マウスは生後より発育が遅延し、腎盂尿管移行部の平滑筋機能不全及び細胞外マトリックスの異常集積により水腎症がみられ、副腎髄質の血管形成不全が認められた。アドレノメデュリン(AM)欠損マウスは胎児致死であり、胎生中期に全身の出血と卵黄動脈の発達不良、胎児の心嚢水貯留等の変化が認められた。一方ヘテロ接合体は野生型と比較して血圧の上昇が認められた(森田)。低酸素暴露および過酸化水素添加による酸化ストレスは心筋細胞の AM の分泌と遺伝子発現レベルを亢進させ、逆にナトリウム利尿ペプチドの分泌と遺伝子発現レベルを低下させた。また、酸化ストレスによる心筋細胞障害は AM 添加により有意に抑制された(寒川)。

2) 心不全に関する研究

アデニンヌクレオチド代謝系律速酵素で虚血や心機能不全への関与が示唆されている AMP デアミナーゼ(AMPD)2 欠損マウスおよび AMPD2/ AMPD3 遺伝子複合変異マウスの作成を進めており、現在のところ AMPD2/ AMPD3 欠損マウスは生後約2週より体重増加がなくなり、約3週で全て致死となることを見出した(森崎)。心筋細胞におけるストア容量依存性の Ca^{2+} 流入機構は、これまでの報告と異なり非常にユニークな性質を有し、胎児期の未成熟心筋細胞ではこの Ca^{2+} 流入活性は高く、発達に従い低下した。また、心筋細胞の容量依存性 Ca^{2+} 流入はカルシウムチャネルである 2 型リアノジン受容体(RyR-2)及び 2 型ジャンクトフィリン(JP-2)の欠損により損なわれず、 Ca^{2+} 放出チャネルや結合膜構造の有無に作用されないことが明らかになった。作成された JP-1 欠損マウスは生後まもなく死亡し、JP-1 欠損筋の三つ組構造形成不良、単収縮の低下が示された。一方、純度の高い心筋小胞体分画の調整法を確立し、単クローン抗体ライブラリーを作成し、Z 線上の染色を指標にスクリーニングを行い、7 種の抗体を単離した(竹島)。心機能の新しい統合解析法を開発し、小動物に応用した結果、先天的遺伝子異常による自然発症糖尿病ラットは筋小胞体のカルシウムポンプの発現量の低下が見られ、心機能としては弛緩機能障害と 1 分間当たりのカルシウ

ムハンドリングに要する酸素消費量の減少が見られた(菅)。覚醒下遺伝子改変マウスの循環(血圧、心拍数)、呼吸(一回換気量、呼吸回数等)、代謝(酸素消費量、二酸化炭素排出量)が、beat by beatから日内変動レベルまで実時間解析できる新しいシステムを開発した。このシステムをPGI欠損マウスに応用し、PGIが低酸素下で循環・呼吸・代謝調節に重要で、特に一酸化窒素との協調性があることを明らかにした(白井)。

田邊らは、肺高血圧のPGI合成酵素(PGIS)遺伝子を用いた遺伝子治療の実現化に向けてさらに努力するとともに、作成したPGI欠損マウス等、プロスタノイド合成系酵素遺伝子改変マウスを用いて動脈硬化や高血圧における血管障害や循環・呼吸・代謝におけるプロスタノイドの作用を明らかにする。一方、沢村らはLOX-1の酸化LDL受容体としての機能の他に白血球接着分子としての機能を見出し、動脈硬化における血管障害時においてこの新たな機能が病態を修飾していることが示唆された。今後は、LOX-1遺伝子改変マウスを用いた解析を進め、動脈硬化等の慢性の病態におけるLOX-1の役割も明らかにしていく。寒川らは、アドレノメデュリン(AM)の心筋や血管壁細胞での遺伝子発現調節機構、心血管系の病態における意義を明らかにし、AM遺伝子改変マウスの解析により血管形成や恒常性維持での重要性を示した。また、新規成長ホルモン分泌促進ペプチドであるグレリンが血管拡張作用、強心作用、心筋リモデリングの調節などに重要な機能を有することをあきらかにし、現在作成中であるクレリン遺伝子改変マウスの解析が期待される。森田らは、血管制御に関わる各種遺伝子の改変マウスの機能解析を進め、本年度は、KLF5/BTEB2が線維化、血管新生、ひいては臓器リモデリングを制御している重要な転写因子であること、新しいメタロプロテアーゼ群に属するADAMTS-1は血管を含めた組織構築の維持に重要であること、AMが胎児期において発生や妊娠の維持に重要な役割を担っていることを明らかにし、循環器病発症機序の解明に有用な情報を提供し、創薬や新しい治療法開発への展開が期待される。森崎らは、心筋などにおけるアデニンヌクレオチド代謝異常の役割を明らかにするために、本年度はこの代謝律速となるAMPデアミナーゼ(AMPD)群の遺伝子破壊マウスを作成し表現型の解析を進めており、今後さらに検討を行い、アデニンヌクレオチド代謝異常と新血管系の関連についてAMPD遺伝子群の機能として検討する。竹島らは、心筋細胞特有の筋小胞体のCa²⁺含量低下に伴うCa²⁺流入機構を見出し、遺伝子改変マウスを用いて解析を行うとともに、ジャンクトフィリンサブタイプのノックアウトによる機能解析、新規心筋小胞体Ca²⁺シグナル分子を検索し、今後心肥大・心不全との関連が注目される。菅らは心機能において重要な興奮収縮関連におけるカルシウムハンドリングに関係する主要なチャネル、ポンプ、受容体、収縮蛋白などの要素と心力学エネルギー学的特徴とを論理的に結びつける方法論を開発し、小動物への応用を確立した。また、白井らは覚醒下マウスの循環・呼吸・代謝同時モニタリングシ

ステムを確立して成果を上げており、これらの新たに開発された生理機能解析システムは、今後の遺伝子改変マウスの心肺機能解析に大いに力を発揮すると期待される。

D. 結論

本年度は、12年度に引き続き種々遺伝子改変マウスの作成ならびに解析が行われ、以下の如く多くの成果と今後への期待が得られた。

- 1) 肝へ直接PGIS遺伝子を導入する方法で肺高血圧の症状の改善に有効であることが示された。PGIの細胞内と細胞外からの異なるシグナル伝達系により血管平滑筋の増殖抑制がコントロールされている可能性を見出し、循環器系の恒常性維持における重要な作用機序として注目される。
- 2) 炎症や虚血再還流障害と関連したLOX-1の全く新しい機能を見いだした。酸化LDL受容体としての機能とこれらの新しい機能がどのように複合して循環器疾患の成り立ちに関わっているかが今後の焦点である。
- 3) 心筋細胞におけるAM分泌および遺伝子発現調節機構を明らかにし、AM遺伝子改変マウスの解析により血管形成や恒常性維持でのAMの重要性を示した。これらの成果は、心筋梗塞や心不全、血管病変の新しい診断・治療法の開発につながつと考えられる。
- 4) KLF5/BTEB2やADAMTS-1の欠損マウスの解析により、血管制御におけるこれら転写因子や酵素の役割が明らかとなり、循環器病発症機序の解明に有用な情報を提供し、創薬や新しい治療法開発への展開が期待される。
- 5) アデニンヌクレオチド代謝系律速酵素で虚血や心機能不全への関与が示唆されているAMPD2遺伝子変異マウスおよびAMPD2/AMPD3遺伝子複合変異マウスの作成を進めており、心血管における病態生理的意義ならびに新規機能の解明が期待される。
- 6) 心筋細胞特有な筋小胞体のCa²⁺含量低下に伴うCa²⁺流入機構を見出し、今後、心肥大や心不全における機能変化等が注目される。
- 7) 前年度に確立した心臓レベルでの心筋興奮収縮関連カルシウム動員量の新しい評価法を小動物として本年度はラットに応用し、解析可能であることが明らかになった。
- 8) 覚醒下マウスの循環・呼吸・代謝同時モニタリングシステムを確立してPGI欠損マウスの解析に応用し、PGIが低酸素下で循環・呼吸・代謝調節に重要で、特に一酸化窒素との協調性があることを明らかにした。これらの生理機能解析システムは、今後の遺伝子改変マウスの心肺機能解析に大いに力を発揮すると期待される。

E. 健康危険情報

ヒトにまでの応用研究は無かったので、特に問題は無かった。

F. 研究発表

原著論文による発表 49件
口頭発表 36件

そのうち主なもの

論文発表

- 1) T. Tanabe et al. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR δ , *J. Biol. Chem.* 276, 4260-4267 (2001).
- 2) T. Tanabe et al. Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for a treatment of pulmonary hypertension in rats, *J. Thoracic. Cardiovasc. Surg.*, in press (2002).
- 3) H. Suga et al. Rat cardiac contractile dysfunction included by Ca²⁺ overload: possible link to the proteolysis of α -fodrin, *Am. J. Physiol.* 281 Heart Circ. Physiol): H1286-H1294 2001.
- 4) K. Kangawa et al. Possible involvement of oxidative stress in hypoxia-induced adrenomedullin secretion in cultured rat cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 436: 1-6, 2002.
- 5) T. Morisaki et al. Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 31:489-496, 2001
- 6) H. Takeshima et al. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* 154, 1059-1068, 2001.
- 7) M. Shirai et al.: K_{ATP} channels predominantly regulate conduit vessel tone in normoxic cat pulmonary arteries in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 422: 181-184, 2001
- 8) T. Sawamira, et al. Activation of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1

Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circulation*, 104:2948-2954, 2001

9) Shindo T et al. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001; 104:1964-71

学会発表

- 1) T. Tanabe et al. Physiological function of prostacyclin synthase. COE International Symposium Endogenous Vasodilators, 2002
- 2) T. Morisaki et al. Single nucleotide polymorphism in AMPD genes, Gordon Research Conference, New Port, 2001
- 3) H. Takeshima, Ryanodine Receptor and Junctophilin in Cardiac Myocytes, International Symposium on Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular System, 2002
- 4) M. Shirai et al. Efficacy of additional pulmonary blood flow in the pulmonary circulation of cavopulmonary anastomosis. 3rd World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery, Toronto, 2001
- 5) T. Sawamura et al. LOX-1 is a novel leukocyte-adhesion molecule that contribute to ischemia-reperfusion injury. 74th Scientific Sessions of AHA, 2001
- 6) T. Sindo et al. Protective effect of adrenomedullin against hypertensive organ damages – Studies on knockout mice. 第74回アメリカ心臓病学会 アナハイム 2001. 11. 13

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
無し。

心血管系の恒常性に関わる脂質代謝酵素遺伝子の機能解析とその改変マウスに関する研究

分担研究者 田邊 忠 国立循環器病センター研究所部長

脂質生理活性物質であるプロスタサイクリン(PGI)の血管平滑筋増殖抑制能の作用機序を明らかにするために各種培養細胞に PGI 合成酵素(PGIS)を過剰発現させ細胞内 PGI 濃度を上昇させた。その結果、PGI 産生量の上昇に伴い細胞のアポトーシスが誘導され、PPAR δ が PGI の新たなシグナル伝達経路として関与していることが明らかになった。また、肺高血圧モデルラットの肝に PGIS 遺伝子を導入した結果、肺高血圧の軽減と予後の改善が認められた。

A. 研究目的

プロスタサイクリン(又はプロスタグランジン(PGI))は血小板凝集抑制能、血管平滑筋弛緩作用や細胞保護作用などの生理活性を有する非常に不安定な化合物である。PGI はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)によって産生された PGH₂ から PGI 合成酵素(PGIS)の作用を受けて産生されるが、PGI と拮抗する作用を有するトロンボキサン(TX)もまた同じく PGH₂ より TX 合成酵素(TXS)によって産生される。PGI と TX の生理活性は循環器系の生理機能に重要であり、両者のバランスの破綻が心筋梗塞や脳梗塞、動脈硬化などの血管障害の成因と考えられている。しかしながらそれらの詳細な作用機序は明らかでない。本研究は、これら脂質生理活性物質の生合成系に関わる酵素の遺伝子機能を解析するとともに、生合成系のバランスの変化が循環器系に及ぼす影響を細胞レベルならびに遺伝子改変動物を用いて解析することを目的とする。本年度は、培養細胞に PGI を過剰産生させるとアポトーシスが誘導され、PGI のシグナル伝達に核内受容体 PPAR- δ が関与することを明らかにした。また、モノクローリン誘導肺高血圧ラットの肝に PGIS 遺伝子を導入した結果、有意に肺高血圧が軽減し予後の改善が認められた。

B. 研究方法

1) モノクローリン誘導肺高血圧ラットの作成とヒト・PGIS 遺伝子導入

雄 Sprague-Dawley ラット(約 200g)にモノクローリン(60 mg/kg)を皮下投与して肺高血圧を誘発させた。4週後にヒト・PGIS 発現ベクターを HVJ-リポソーム法でラット肝に 27G 針を用いて投与し、7日後に血行動態を調べた。PGIS の発現は免疫組織化学的及ウェスタンブロット法で確認した。6-keto-PGF_{1 α} 、エンドセリン-1、コラーゲンは酵素免疫測定法で定量した。

2) PGI 過剰産生細胞におけるアポトーシスと PPAR δ の関与

ヒト・PGIS 及び失活型 PGIS 発現ベクターをリポフェクトアミン法で種々の細胞に導入した。発現した酵素タンパク質は免疫組織化学的及びウェスタンブロット法で検出した。アポトーシスをおこした細胞は形態変

化、Hoechst 33258 染色、DNA 断片化により確認した。PPAR δ の関与を調べるために PPAR 応答配列をもつルシフェラーゼレポーターベクターとドミナントネガティブ型 PPAR δ を細胞に共発現させ、レポーターアッセイを行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 委員会ならびに実験動物委員会で承認を受けた後実験を実施した。動物実験は動物への苦痛を最小限に止めるため麻酔下で処置を行い十分な注意を払った。

C. 研究結果

1) ヒト・PGIS 遺伝子導入によるモノクローリン誘導肺高血圧ラットにおける肺高血圧症の改善

モノクローリン投与により肺高血圧を誘発させたラットの肝にヒト・PGIS 発現プラスミドと HVJ-リポソーム複合体を直接投与した結果、肝に有意な PGIS の発現が確認され、血中の 6-keto-PGF_{1 α} 濃度は上昇した。大腿動脈圧は変化しないが、右心室圧は PGIS 過剰発現により有意に低下した。このとき組織中のエンドセリン-1 ならびに総コラーゲン量を測定した結果、PGIS 過剰発現群がコントロール群に比べて有意に低下していた。

1) PGI 過剰産生細胞のアポトーシスの誘導と PPAR δ の関与

ヒト・PGIS を血管内皮細胞や血管平滑筋細胞をはじめ種々の培養細胞を過剰発現させた結果、アポトーシスの誘導が認められた。これに対し酵素活性をもたない変異型 PGIS では、アポトーシスの誘導は認められなかった。PPAR 応答配列をもつレポーター遺伝子を用いてレポーターアッセイを行った結果、細胞内 PGI 濃度に依存してプロモーターの活性化が認められ、このプロモーター活性の上昇は、ドミナントネガティブ型 PPAR δ を細胞に共発現させることにより完全に抑制された。さらに、細胞外に PGI アナログであるイロprostを添加すると、cAMP の上昇に伴い PGI-PPAR δ 依存性アポトーシスの抑制が認められ、cAMP アナログの dbcAMP の添加で同様の結果が得られた。これに対し cAMP アンタゴニストである

Rp-cAMP 処理は、PGI-PPAR δ 依存性アポトーシスを促進した。

D. 考察

1) HVJ-リポソーム法で肝に直接 PGIS 遺伝子導入する方法で既に発症し手いる肺高血圧を軽減し予後が改善されたことから、肺以外への遺伝子導入でも PGIS 遺伝子を用いた治療の可能性がある。

2) PGI は細胞内で PPAR δ を介してアポトーシスを誘導するが、一方で細胞表面に発現している G 蛋白質共役型 PGI 受容体を介して細胞内 cAMP レベルを上昇させ、アポトーシスを抑制しており、これら2つのシグナル伝達経路により PGI による血管平滑筋などの細胞増殖抑制能がコントロールされている可能性が考えられる。

E. 結論

モノクローリン誘導肺高血圧ラットの肝に PGIS 遺伝子を導入した結果、有意に肺高血圧が軽減し予後の改善が認められた。

また、培養細胞に PGI を過剰産生させるとアポトーシスが誘導され、PGI のシグナル伝達に核内受容体 PPAR- δ が関与すること、cAMP の上昇は PGI-PPAR δ 依存性アポトーシスを抑制することを明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) J.R. Mestre, P.J. Mackrell, D.E. Rivadeneira, P.P. Stapleton, T. Tanabe and J.M. Day, Redundancy in signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells, *J. Biol. Chem.* 276, 3977-3982 (2001).

2) K. Kadoyama, Y. Takahashi, H. Higashida, T. Tanabe and T. Yoshimoto, Cyclooxygenase-2 overexpression stimulates production of amyloid precursor protein and neurite outgrowth in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 483-490 (2001).

3) S. Yun Son, H.S. Jong, H.H. Choi, H. Inoue, T. Tanabe, N.K. Kim and Y.J. Bang, Transcriptional silencing cyclooxygenase-2 by hypermethylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells, *Cancer Res.* 61, 4628-4635 (2001).

4) J.R. Mestre, D.E. Rivadeneira, P.J. Mackrell, M. Duff, P.P. Stapleton, V. Mack-Strong, S. Maddali, G.P. Smyth, T. Tanabe and J.M. Daly, Overlapping CRE and E-box promoter elements can independently regulate COX-2 gene transcription in macrophages, *FEBS Lett.* 496, 483-490 (2001).

5) S. Murono, H. Inoue, T. Tanabe, I. Joab, T. Yoshizaki, M. Furukawa, J.S. Pagano, Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in

nasopharyngeal carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6905-6910 (2001).

6) N. Ueno, M. Murakami, T. Tanioka, K. Fujimori, T. Tanabe, Y. Urade and I. Kudo, Coupling between cyclooxygenases, terminal prostanoic acid synthase and phospholipase A₂s, *J. Biol. Chem.* 276, 34918-34927 (2001).

7) T. Hatae, M. Wada, C. Yokoyama, M. Shimonishi and T. Tanabe, Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR δ , *J. Biol. Chem.* 276, 4260-4267 (2001).

8) N. Mori, H. Inoue, T. Yoshida, T. Tanabe, N. Yamamoto, Constitutive expression of cyclooxygenase-2 gene in T-cell line infected with human leukemia virus type-1, *Int. J. Cancer* 94, 813-819 (2001)

9) H. Sahara, Y. Sawa, N. Fukushima, K. Kagisaki, C. Yokoyama, T. Tanabe, H. Matsuda, Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for a treatment of pulmonary hypertension in rats, *J. Thoracic. Cardiovasc. Surg.*, in press (2002).

2. 学会発表

1) C. Yokoyama, T. Yabuki, T. Hatae, T. Tanabe, et al. Prostacyclin deficiency in mice induces vascular disorders in kidney. The 1st Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences Lipids in Signaling and Related Diseases 2001年10月

2) 横山知永子、岩井直温、田邊 忠他:プロスタサイクリン合成酵素遺伝子の発現調節とヒト遺伝子プロモーター領域の多型 第74回日本生化学会大会 2001年10月

3) 横山知永子、波多江利久、田邊 忠:プロスタサイクリンによる血管平滑筋の増殖抑制 平成13年度日本生化学会近畿支部シンポジウム 動脈硬化の分子機構—血球血管相互作用と血管新生も含めて— 2001年11月

4) T. Tanabe, C. Yokoyama, N. Nagaya, T. Hatae, Physiological function of prostacyclin synthase. COE International Symposium Endogenous Vasodilators 2002年1月

5) T. Hatae, and T. Tanabe, Control of cell fate by prostacyclin. International Symposium on Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular System: Their Roles in System form Ation and Functional Regulation 2002年2月

6) 波多江利久、田邊 忠:PPAR- δ を介したプロスタサイクリンによる血管壁細胞の制御 心脈管作動物質学会 2002年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

研究協力者:

横山知永子 (国立循環器病センター研究所室長)

波多江利久 (国立循環器病センター研究所室員)

血管内皮細胞の機能に関わる遺伝子の動脈硬化等の循環器病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(LOX-1)の研究を中心に、動脈硬化の治療へつながる可能性を追求している。本年度は、虚血再還流障害について検討し、LOX-1が再還流による臓器障害の成因に深くかかわっていることが明らかとなった。

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。分担者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、構造決定をこれまでの研究で行った。本研究はLOX-1分子の動脈硬化などの循環器疾患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可能性がある。

B. 研究方法

LOX-1 中和抗体

LOX-1を抗原として作製したモノクローナル抗体のうち、LOX-1機能中和活性を持つものを選択し使用した。

虚血再還流障害モデル

虚血再還流により引き起こされる生体反応についての検討を行った。眼動脈、あるいは冠動脈の結紮により、網膜および心筋虚血を導き、一定時間後再還流することによるLOX-1の発現レベルの変化を解析するとともに、臓器障害や白血球の動態変化に対する抗LOX-1中和抗体の影響を観察した。

C. 研究結果

LOX-1の発現は、通常のレベルと比して、虚血再還流により、血管内皮細胞および心筋細胞において急速に誘導がかかることが明らかとなった。つぎに、抗LOX-1抗体を投与して、虚血再還流により起きる臓器障害におけるLOX-1の関与を解析した。心臓の虚血再還流モデルにおいては、抗LOX-1抗体の前投与は、梗塞危険領域の大きさには変化を与えなかったが、結果としてできる梗塞巣の大きさを約50%抑制した。

また、網膜の虚血再還流モデルにおいて、再還流後見られる網膜静脈での白血球のローリングを、抗LOX-1抗体は効果的に抑制した。また抗LOX-1抗体の前投与は網膜の神経細胞のアポトーシスを抑制すると同時に、結果として起きる網膜の組織構築の崩壊をも抑制した。

D. 考察

LOX-1へのリガンド結合は活性酸素の産生を導き、酸化ストレスを引き起こすが、その一方で白血球の血管内皮細胞への接着を促進することにより白血球から産生される活性酸素を介した酸化ストレスの増大にも関係していると考えられる。LOX-1の酸化LDL受容体としての機能とは全く異なる白血球接着分子としての機能は、生体防御分子として働くLOX-1の生理的機能のひとつと考えられる。この新しく明らかになった機能は血管内皮細胞の役割と深く結びついたものであり、動脈硬化における血管障害時においても、酸化LDL受容体として働くと同時に、このような機能を介して病態を修飾していることが示唆された。

今後は、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた解析を進め、動脈硬化のような慢性的な病態におけるLOX-1の役割も明らかにしていく。

E. 結論

本研究は我々が発見したLOX-1の研究を通じ、LOX-1の機能を操作することにより血管病の病態に即した治療の開発を目指したものである。本研究では炎症や虚血再還流障害と関連したLOX-1の全く新しい機能を見いだした。酸化LDL受容体としての機能とこれらの新しい機能がどのように複合して循環器疾患の成り立ちに関わっているかが今後の焦点である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Halvorsen, B., Staff, A.C., Henriksen, T., Sawamura, T., and Ranheim, T.: 8-iso-Prostaglandin F₂ increases expression of LOX-1 in JAR cells. *Hypertension*, 37(4): 1184-1190, 2001
- Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A.F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A.M., Cascio, V.L., Sawamura, T.: The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, 276(17): 13750-13755, 2001
- Chen, M., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura,

- T.: Conserved carboxyl-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized LDL binding. *Biochem J*, 355(Pt2): 289-296, 2001.
4. Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S.: LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol*, 166:5108-5114, 2001.
 5. Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 499:215-219, 2001.
 6. Morawietz, H., Duerschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T. and Holtz, J.: Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284:961-965, 2001.
 7. Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S.: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) supports cell adhesion to fibronectin. *FEBS Lett*, 504:65-68, 2001.
 8. Chen, M., Nagase, M., Fujita, T., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T.: Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of lox-1 ligand and age. *Biochem Biophys Res Commun*, 287:962-968, 2001.
 9. Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., Sawamura, T., Fujita, M., Yanazume, T., Toyokuni, S., Adachi, S., Kihara, Y. and Sasayama, S.: Activation of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Circulation*, 104:2948-2954, 2001
 10. Jono T., Miyazaki A., Nagai R., Sawamura T., Kitamura T. and Horiuchi S.: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett*, 511: 170-174, 2002
 11. Morawietz, H., Duerschmidt, N., Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T. and Holtz, J.: Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin. Sci.*, in press, 2002.
2. 学会発表
 1. Structure-function relationships of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) analyzed by site-directed mutagenesis 沢村達也
第33回日本動脈硬化学会総会
 2. 酸化LDL受容体LOX-1の病態生理学的意義 沢村達也
- 第51回日本電気泳動学会春季大会
 3. 酸化LDL受容体LOX-1の多様な機能と病態生理的意義 沢村達也
第6回 Vascular Medicine 学会
 4. Expression of LOX-1 during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction in rats. Deyuan Li, Victor Williams, Ling Liu, Hongjiang Chen, Francesco Romeo, Tatsuya Sawamura, Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of American Heart Association
 5. The Role LOX-1, an Oxidized LDL Receptor, in Myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. Victor Williams, Dayuan Li, Ling Liu, Tatsuya Sawamura, Tamim Antakli, Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of AHA
 6. LOX-1 mediates the oxidized LDL-induced expression of matrix metalloproteases (MMPs) in human coronary artery endothelial cells. Dayuan Li, Lin Liu, Tatsuya Sawamura, and Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of AHA
 7. Lox-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. Ling Liu, Dayuan Li, Francesco Romeo, Tatsuya Sawamura, Jawahar L. Mehta 74th Scientific Sessions of AHA
 8. Myocardial LOX-1 pathway contributes to the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury. Kazuaki Kataoka, Koji Hasegawa, Tetsuhiko Yanazume, Eri Iwai-Kanai, Taku Hirai, Tatsuya Sawamura, Masatoshi Fujita, Ryuji Nohara 74th Scientific Sessions of AHA
 9. Essential role of the cytoplasmic domain in the sorting of LOX-1 to cell surface. Mingyi Chen, Tomoh Masaki, Tatsuya Sawamura 74th Scientific Sessions of AHA
 10. Accelerated atherogenesis in mice overexpressing LOX-1. Tatsuya Sawamura, Kazuhiko Inoue, Tomoh Masaki 74th Scientific Sessions of AHA
 11. LOX-1 is a novel leukocyte-adhesion molecule that contribute to ischemia-reperfusion injury. Megumi Honjo-Sawamura, Kayo Nakamura, Yoshihito Honda, Tomoh Masaki, Tatsuya Sawamura 74th Scientific Sessions of AHA
 12. 酸化LDL 受容体LOX-1と酸化ストレス 沢村達也
第75回日本薬理学会年会
- G. 知的所有権の取得
なし。

新規ペプチド性心血管作動性物質とその受容体遺伝子の病態生理学的意義と機能解析

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)は血圧調節や心血管系の保全に重要な役割を担う循環調節因子である。心筋細胞や心筋線維芽細胞がアドレノメデュリンを分泌し、オートクリン、パラクリンの心機能や心肥大の調節因子として作用していると考えられている。本研究では、培養心筋細胞において、酸化ストレスによるアドレノメデュリン分泌、低酸素によるアドレノメデュリン産生増加への酸化ストレスの関与、酸化ストレスによる心筋傷害に対するアドレノメデュリンの生理的意義についての検討を行った。

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およびその受容体の同定とそれに続く機能解析は循環調節研究の新領域への展開が期待できる。

アドレノメデュリン(AM)は、我々がヒト褐色細胞腫組織より発見した新規ペプチドであり、強力で長時間持続する血管拡張性の降圧活性を有する。アドレノメデュリンのmRNAは、副腎のみならず心臓、腎臓、肺、血管などの循環器系の臓器に広く発現し、循環器疾患において血中濃度の上昇が見られ、心血管系の調節に関与する新しい循環ホルモンである。我々はこれまでにアドレノメデュリンの遺伝子構造も明らかにすると共に、アドレノメデュリンが血管内皮および血管平滑筋細胞で多量に産生され、オートクリンおよびパラクリンの局所因子としても機能していることを示した。

このようにアドレノメデュリンは、循環ホルモンおよび心血管系の局所因子として、血管拡張作用を介して心臓や血管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。

本研究は、アドレノメデュリンとその受容体について遺伝子解析および発現調節の解析により、心血管系の機能制御のメカニズムや心血管病変の発症および修復における役割について解明すると共に、診断、治療への応用を目指したものである。これまでの研究において、アドレノメデュリン遺伝子5'隣接領域のプロモーター活性の解析により、発現調節に重要なコンセンサス配列を同定している。また、マウスアドレノメデュリン受容体の構造解析と敗血症の病態モデルにおける受容体の発現解析を行った。一方、アドレノメデュリンは心筋細胞や心筋線維芽細胞でも産生され、その遺伝子発現は低酸素刺激により増加することが知られており、心機能や心肥大の調節因子として作用していると考えられている。

本年度は、①培養心筋細胞において酸化ストレス

がアドレノメデュリン分泌を促進するか否か、②低酸素によるアドレノメデュリン産生増加に酸化ストレスが関与するか否か、さらに、③アドレノメデュリンが酸化ストレスによる細胞傷害に対して防御的な作用を有するか否かについて検討を行った。

B. 研究方法

1)細胞培養

1-2日齢・雄ウイスターラットの心室を採取、コラーゲナーゼ処理により細胞を剥離させ、パーコール法にて心筋細胞と非心筋細胞を分離した。心筋細胞は接着法にてさらに非心筋細胞と分離した後、6穴プレートに 4.0×10^5 個/穴で培養した。非心筋細胞は2-3代の継代の後、6穴プレートに 2.5×10^5 個/穴で培養し、以下の実験に用いた。

2)低酸素負荷

心筋細胞と非心筋細胞は、NAPCO社製CO₂インキュベーターを用い、5% CO₂ / 94% N₂ / 1% O₂の設定にて1% O₂の低酸素環境下で細胞培養を行った。

3)酸化ストレスと抗酸化剤

培養メディアウムに 10^{-5} ~ 10^{-4} mol/Lの過酸化水素および 10^{-4} ~ 10^{-2} mol/LのN-アセチル-L-システインを加えることにより、酸化ストレスおよび抗酸化剤の効果を検討した。

4)アドレノメデュリンと心房性ナトリウム利尿ペプチドの測定

培養上清を回収後、酢酸により酸性化し、5分間の煮沸により内因性蛋白分解酵素を失活させた後、各々、特異的ラジオイムノアッセイ法にて測定を行った。

5)アドレノメデュリンと心房性ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子発現定量

既報の方法にてノーザンブロットを行い定量的に解析した。

6)乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の測定

ワコー社製キット(LDH-Cytotoxic Test)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究の実験動物を用いた研究においては、実験動物飼養および保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

1) 心筋細胞・非心筋細胞いずれも時間依存性にアドレノメデュリンの基礎分泌が認められた。低酸素は心筋細胞からのアドレノメデュリン分泌を促進したが、非心筋細胞からの分泌は不変であった。アドレノメデュリン遺伝子発現も心筋細胞でのみ低酸素により有意に増加していた。

2) 心筋細胞において時間依存性に心房性ナトリウム利尿ペプチドの基礎分泌を認めたが、低酸素は心房性ナトリウム利尿ペプチドの分泌とその遺伝子発現を有意に低下させた。

3) 10^{-4} mol/L の過酸化水素は、心筋細胞からのアドレノメデュリン分泌を有意に増加させた。過酸化水素によるアドレノメデュリン分泌増加は、 10^{-3} ~ 10^{-2} mol/L の N-アセチル-L-システインによってほぼ完全に抑制された。さらに、 10^{-3} ~ 10^{-2} mol/L の N-アセチル-L-システインは低酸素によるアドレノメデュリンの分泌増加も有意に抑制した。

4) 10^{-4} mol/L の過酸化水素は心筋細胞から培養上清への LDH 漏出を著しく増加させたが、 10^{-6} mol/L のアドレノメデュリンはこの増加を有意に抑制した。

D. 考察

培養心筋細胞において、低酸素によるアドレノメデュリンの産生増加には転写因子 hypoxia inducible factor-1 の活性化を介していることが知られている。本研究において N-アセチル-L-システインが低酸素によるアドレノメデュリン分泌を有意に抑制したことは、低酸素によるアドレノメデュリン分泌刺激に酸化ストレスが一部関与していることを示唆する。

過酸化水素は心筋細胞の nuclear factor κ B (NF- κ B) を活性化することが知られている。また、アドレノメデュリン遺伝子はそのプロモーター領域に NF- κ B 結合部位を有することが知られている。よって低酸素や酸化ストレスによるアドレノメデュリン分泌増加の機序のひとつとして NF- κ B 系の関与が示唆される。

増加したアドレノメデュリンの意義としては、アドレノメデュリンが過酸化水素による LDH 漏出を有意に抑制したことから、心筋細胞保護効果を有すると考えられる。この機序は不明であるが、アドレノメデュリンは内皮細胞においてアポトーシス抑制作用を有すること、また、過酸化水素は心筋細胞のアポトーシスを誘発することが知られている。これらのことから、アドレノメデュリンの心筋細胞保護作用にアポトーシス抑制作用が一部関与していることが示唆される。

E. 結論

低酸素刺激や酸化ストレスは心筋細胞からアドレノメデュリン分泌を促進し、酸化ストレスは低酸素によるアドレノメデュリン分泌刺激の一部関与している。心筋細胞から分泌されたアドレノメデュリンはオートクリン的に心筋細胞傷害に対して防御的に作用している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) F. Yoshihara, T. Horio, T. Nishikimi, H. Matsuo and K. Kangawa: Possible involvement of oxidative stress in hypoxia-induced adrenomedullin secretion in cultured rat cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 436: 1-6, 2002.
- 2) T. Nishikimi, F. Yoshihara, A. Kanazawa, I. Okano, T. Horio, N. Nagaya, C. Yutani, H. Matsuo, H. Matsuoka and K. Kangawa: Role of increased circulating and renal adrenomedullin in rats with malignant hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281: R2079-2087, 2001.
- 3) T. Shindo, Y. Kurihara, H. Nishimatsu, N. Moriyama, M. Kakoki, Y. Wang, Y. Imai, A. Ebihara, T. Kuwaki, K. H. Ju, N. Minamino, K. Kangawa, T. Ishikawa, M. Fukuda, Y. Akimoto, H. Kawakami, T. Imai, H. Morita, Y. Yazaki, R. Nagai, Y. Hirata and H. Kurihara: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation*, 104: 1964-1971, 2001.
- 4) T. Nishikimi, T. Horio, Y. Kohmoto, F. Yoshihara, N. Nagaya, T. Inenaga, M. Saito, M. Teranishi, M. Nakamura, M. Ohrai, Y. Kawano, H. Matsuo, T. Ishimitsu, S. Takishita, H. Matsuoka and K. Kangawa: Molecular forms of plasma and urinary adrenomedullin in normal, essential hypertension and chronic renal failure. *J. Hypertens.*, 19: 765-773, 2001.
- 5) T. Tsuruda, J. Kato, K. Kitamura, K. Mishima, T. Imamura, Y. Koiwaya, K. Kangawa and T. Eto: Roles of protein kinase C and Ca^{2+} -dependent signaling in angiotensin II-induced adrenomedullin production in rat cardiac myocytes. *J. Hypertens.*, 19: 757-763, 2001.
- 6) Y. Tomoda, K. Kikumoto, Y. Isumi, T. Katafuchi, A. Tanaka, K. Kangawa, K. Dohi and N. Minamino: Cardiac fibroblasts are major production and target cells of adrenomedullin in the heart in vitro. *Cardiovasc. Res.*, 49: 721-730, 2001.
- 7) T. Nishikimi, S. Nagata, T. Sasaki, F. Yoshihara, N. Nagaya, T. Horio, H. Matsuo, H. Matsuoka and K. Kangawa: The active molecular form of plasma adrenomedullin is extracted in the pulmonary circulation in patients with mitral stenosis: possible

role of adrenomedullin in pulmonary hypertension.
Clin. Sci. (Lond), 100: 61-66, 2001.

- 8) K. Kitamura, E. Matsui, J. Kato, F. Katoh, T. Kita,
T. Tsuji, K. Kangawa and T. Eto: Adrenomedullin
(11-26): a novel endogenous hypertensive peptide
isolated from bovine adrenal medulla. *Peptides*,
22: 1713-1718, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究協力者

吉原史樹(国立循環器病センター研究所)

永谷憲歳(国立循環器病センター病院)

ジーンターゲットイングによる血管制御遺伝子の機能解析に関する研究

森田啓行 東京大学大学院医学系研究科 循環器内科 助手

血管制御に関わる新規の遺伝子に注目し、ジーンターゲットイングにより新たな疾患モデル動物を作成する。血管病の本質を反映した疾患モデル動物を樹立すると同時に、循環器病発症機序の解明や治療法開発への応用する。

A. 研究目的

従来、血管は研究対象としては適切な病態モデルが少なく、細胞分子レベルでの研究が必ずしも大きく展開していなかった。このような血管研究の難点を打開するには、遺伝背景が明らかで、かつ血管病の本質を反映した疾患モデル動物の確立が極めて有用である。これらの疾患モデル動物の解析は循環器病発症機序の解明や、遺伝子治療をはじめとする新しい治療法開発へ展開すると期待される。本研究では血管制御に関わる新規の遺伝子に注目し、ジーンターゲットイングにより新たな疾患モデル動物樹立を目的とする。

B. 研究方法

(1)血管構成細胞の遺伝子発現調節、(2)血管の正常な立体構築の形成、(3)形成された血管のホメオスタシス維持、という血管制御の3つの側面に注目し、以下に挙げる遺伝子に操作を加えたモデルマウスを樹立し、血管病の病態解析に応用可能な疾患モデルを確立する。

(倫理面への配慮) 実験動物の取り扱いについては、東京大学動物実験施設が定める実験動物取り扱い規約に基づき、実験動物倫理に配慮した上で施行する。

C. 研究結果

(1) KLF5/BTEB2 ノックアウトマウス

ホモ接合体は発生早期に致死であった。ヘテロ接合体は種々の病態モデルにおける間葉系細胞の増殖や血管新生が低下していた。更にアンジオテンシン II 慢性投与による心肥大及び線維化が低下していた。

(2) ADAMTS-1 ノックアウトマウス

ホモ接合体は生後より発育遅延が見られ、腎盂尿管移行部の平滑筋機能不全及び同部の細胞外マトリックスの異常集積により、水腎症が見られた。更にホモ接合体では副腎髄質の血管形成不全が認められた。

(3) AM ノックアウトマウス

ホモ接合体は胎児致死であり、胎生中期に全身の出血と卵黄動脈の発達不良が認められた。胎児側についても、心嚢水貯留等の変化が認められた。一方ヘテロ接合体は野生型と比較して血圧の上昇が認められた。

D. 考察

(1) KLF5/BTEB2 は、臓器傷害後に誘導される線維芽細胞、平滑筋細胞、免疫系細胞の活性化と増殖、その結果としての肉芽形成、線維化、血管新生、ひいては臓器リモデリングを制御している重要な転写因子であることが明らかとなった。

(2) ADAMTS-1 は細胞外マトリックスの代謝に関わることで、血管を含めた組織構築の維持に重要であることが明らかになった。

(3) AM は成体においては降圧作用を有するが、一方で出生前においては、個体発生や妊娠の維持において重要な役割を担っているという二面性が示唆された。

E. 結論

特定の遺伝子に変異を導入した遺伝子改変マウスの解析から、これらの新規遺伝子機能を進める有用な手段が得られた。今後の方針として、傷害モデルにおける血管リモデリング応答や、虚血モデルにおける血管新生能などを更に検討する。次に血管障害を示す他の高血圧、糖尿病、高脂血症動物との交配により各病態モデルを作成し、遺伝子変異の影響を検討する。またホモ胎生致死のマウスについては、血管の発生、分化の異常に注目して解析を進める予定である。

これらの遺伝子改変マウスを疾患モデルとして利用することで、病態解析や新たな治療法開発に大いに貢献する事が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Shindo T et al. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001; 104:1964-71

(2) Imai T et al. Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ Res.* 2001; 89:55-62

(3) Shindo T et al. Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in aCGRP. *Circ Res.*

2001; 89:983-90

- (4) Shindo T et al. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J. Mol. Med.* 2002; 80:105-116
- (5) Shindo T et al. ADAMTS-1: A metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 2000; 105: 1345-52
- (6) Shindo T et al. Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 2000; 101: 2309-16

2. 学会発表

- (1) 2001. 11. 13 第 74 回アメリカ心臓病学会 アナハイム Protective effect of adrenomedullin against hypertensive organ damages – Studies on knockout mice. 新藤隆行
- (2) 2001. 3. 22 第 74 回 日本薬理学会 横浜 シンポジウム: マウス遺伝子操作によるアドレノメデュリンの機能解析 新藤隆行
- (3) 2001. 3. 27 第 65 回 日本循環器学会 京都

Adrenomedullin gene targeting reveals its role in the vascular morphogenesis during development. 新藤隆行

- (4) 2001. 8. 30 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference 小樽 Key note lecture: マウス遺伝子操作によるアドレノメデュリンの機能解析 新藤隆行
- (5) 2001. 10. 1 International Society for Heart Research 秋田 シンポジウム: Pathophysiological assessment of transcriptional factor IKLF/BTEB2 by gene targeting. 新藤隆行
- (6) 2001. 11. 5 第 4 回 日本血管細胞生物学会 福岡 転写因子 IKLF/BTEB2 の病態における意義: ノックアウトマウスによる検討 新藤隆行

H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし

研究協力者

永井良三 (東京大学大学院医学系研究科)
新藤隆行 (東京大学大学院医学系研究科)

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

遺伝子改変動物を用いた心機能に関する遺伝子の機能解析

分担研究者 森崎 隆幸 国立循環器病センター研究所部長

循環器疾患の病態解明及び新治療法開発にむけて、心機能に関する遺伝子の機能解析をすすめるため、遺伝子改変動物の活用による個体レベルでの遺伝子機能解析研究を行っている。解析対象として、ATP やアデノシンなどエネルギー源、シグナル伝達分子の調節に深く関わるアデニンスクレオチド代謝の機能的理解の為、代謝律速となる AMPD 遺伝子群を取り上げ、AMPD2 遺伝子を対象に遺伝子改変動物を用いた機能解析を行っており、AMPD2 遺伝子破壊マウスの作製と解析を行うと同時に、新規に作製した AMPD3 遺伝子破壊マウスとの交配により、AMPD 遺伝子群複合遺伝子破壊マウス(AMPD2/AMPD3 複合遺伝子破壊マウス)の作製と解析を行っている。さらに、モデルマウス作製について研究を推進する一方、新たに見いだされた遺伝子変異のタンパクレベルでの機能解析を進めた。

A. 研究目的

循環器疾患の病態解明や治療対象は心血管系の細胞レベルの機能異常、調節失調であり、遺伝子機能の解明が進むことにより新たな治療法開発につながるが、その際に遺伝子改変動物の活用による個体レベルでの遺伝子機能の理解は必須事項と考えられる。

本研究は ATP やアデノシンなどエネルギー源、シグナル伝達分子の調節に深く関わるアデニンスクレオチド代謝の機能的理解のため、代謝律速となる AMPD の機能を AMPD2 遺伝子を中心に AMPD 遺伝子群を対象に複合遺伝子破壊動物を含めた遺伝子改変動物を用いて機能解析を行うことにより、こうした目的に近づこうとするものである。アデニンスクレオチド代謝は ATP やアデノシンなどエネルギー源、シグナル伝達分子の調節に深く関わり、心血管系の機能に深く関係する。すでにこの代謝系の律速酵素である AMPD は遺伝性欠損症が欧米で高頻度に見られることが明らかとなっているほか、心不全において、この遺伝子欠損と予後が逆相関することが報告され注目されている。一方、虚血再灌流モデルにおいて活性化される遺伝子として AMPD が報告され、虚血ならびに心機能不全におけるこの代謝系の機能解析を個体レベルで行うことは意義深く、心血管系の病態解明や治療標的として興味ある結果を得ることが期待される。

B. 研究方法

心血管系の機能に関連する遺伝子を個体レベルで解析するために、心筋、平滑筋に発現するアデニンスクレオチド代謝関連酵素遺伝子 AMPD について AMPD2 を中心に遺伝子破壊マウスを作製し、さらに複合遺伝子破壊マウスを作製して解析を進めることとした。昨年度に作製した AMPD2 遺伝子破壊クローンより得られた AMPD2 遺伝子破壊マウスに加えて、今年度は別に作製された AMPD3 遺伝子破壊マウスとの交配を行って AMPD 遺伝子群複合遺伝子破壊マ

ウスを作製し、これら AMPD2 遺伝子単独破壊あるいは AMPD 遺伝子群複合破壊についてマウス個体における解析を進めた。また、新たに見いだされた遺伝子変異についてタンパクレベルでの機能解析を進めた。

C. 研究結果

AMPD2 遺伝子破壊マウスの作製

すでに得られた ES 細胞クローンおよび得られたキメラマウスから相同組換えにより AMPD2 遺伝子破壊ヘテロ接合体マウスを単離したのち、C57BL6 マウスとの交配を繰り返した。これらの操作によるマウス系統背景の収束はまだ不十分であり、操作は進行中であるが、ヘテロ接合体における産仔数などの変化は認めしていない。

AMPD2 遺伝子破壊マウスの表現型

AMPD2 遺伝子破壊マウスについては、まだ、マウス系統の統一が終了していないために、表現型についての解析は完全ではないが、現在までには、特に胎生期の異常は認めず、ホモマウスからの産仔数についても大きな異常はないと考えられる。しかし、離乳期以降の体重増加は野生型に比して AMPD2 遺伝子破壊ホモマウスにおいては不良であることから、何らかの異常が AMPD2 単独遺伝子破壊により生じていることが示唆された。

AMPD 遺伝子群複合破壊マウスの作製

また、別の研究で得られた AMPD3 遺伝子破壊マウスクローンと前述の AMPD2 遺伝子破壊マウスとの交配を行い、AMPD 遺伝子群複合破壊マウス(AMPD2/AMPD3 ダブルノックアウトマウス)の作製を行った。まだ、作製された複合遺伝子破壊マウスの数が少なく、統計的な解析は不十分ではあるが、出生時までのダブルノックアウトマウスの数はほぼ期待数であったので、胎生致死とはならないものと考えられた。しかし、生後2週頃より発育不良で体重増加が見られず、むしろ体重減少をきたし、いずれの仔マウスも生

後約3週において死亡した。詳細な検討は現在継続中であるが、骨格筋の局所的な脂肪変性、肝臓、腎臓における細胞変性像が認める個体があり、全てのダブルノックアウトホモマウスにおいて、腎尿細管にタンパク円柱を著明に認めた。死亡原因ならびに組織障害の詳細についてはさらに検討を要するが、これらの異常は AMPD 遺伝子複合破壊に起因する異常と考えられる。

AMPD 酵素タンパク変異の機能解析

酵素タンパク異常の機能解析を行うべく、最近新たに同定された遺伝子変異について、発現解析により性質の検討を行う作業を進めている。

D. 考察

AMPD2 遺伝子破壊マウスはホモ接合体、ヘテロ接合体とも外見上大きな変化は見られず、妊娠も可能であり、今のところ、胎生期の発生やその後の発育には影響がないと判断された。しかし、離乳期以降の長期観察では AMPD2 遺伝子破壊ホモ接合体マウスは体重増加が正常マウスに比してやや不良であった。一方、AMPD3 遺伝子も破壊された AMPD2/ AMPD3 遺伝子複合変異マウスはホモマウスは生後約2週より体重増加がなくなり、約3週で全て致死となった。このマウスにおける機能異常は、組織所見より、骨格筋、肝臓、腎臓において想定される。心筋などにおけるアデニンヌクレオチド代謝異常の役割、また、このマウスの死亡原因ならびに組織障害の詳細については今後の検討を要するが、AMPD 遺伝子複合破壊に起因するアデニンヌクレオチド代謝異常が表現型に密接に関連するものとして極めて興味深い。

E. 結論

AMPD2 遺伝子単独破壊マウスは致死的是ではなかったが長期観察において体重減少をみとめた。一方、AMPD2/ AMPD3 遺伝子複合変異ホモマウスは全て生後約3週で致死となった。今後、AMPD 遺伝子群の

機能と心血管系について、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuboi M, Hisatome I, Morisaki T, Tanaka M, Tomikura Y, Takeda S, Shimoyama M, Ohtahara A, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ohgi S, Nanba E: Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 31:489-496, 2001

2) Genetta T, Morisaki H, Morisaki T, Holmes EW: A novel bipartite intronic splicing enhancer promotes the inclusion of a mini-exon in the AMP deaminase I gene. *J Biol Chem* 276:25589-25597, 2001

3) Iio A, Koide K, Hidaka K, Morisaki T: Expression pattern of novel chick T-box gene, Tbx20. *Dev Genes Evol* 211:559-562, 2001

2. 学会発表

1) T. Morisaki, K. Toyama, H. Morisaki: Single nucleotide polymorphism in AMPD genes, Gordon Research Conference, New Port, 2001年7月1-6日

2) 飯尾明生、日高京子、森崎隆幸:ニワトリ胚心臓発生におけるBMPシグナル関連分子BAMBIの発現解析 第24回日本分子生物学会、横浜市、2001年12月9-12日

3) 森崎隆幸、遠山桂子、森崎裕子: AMPD2/AMPD3 ダブルノックアウトマウスの作製 第35回日本痛風・核酸代謝学会総会、神戸市、2002年2月8-9日

G. 知的所有権の取得状況

なし

心筋および血管平滑筋のカルシウムシグナルに関わる遺伝子の機能解析

分担研究者 竹島 浩 東北大学大学院医学系研究科医化学分野教授

循環器系筋細胞の収縮は細胞内 Ca^{2+} 濃度により調節されており、 Ca^{2+} シグナリングの異常は心不全・高血圧などの循環器疾患の原因となると推定される。実際、いくつかの遺伝性循環器疾患において Ca^{2+} チャネルなどの Ca^{2+} シグナル関連分子の点変異に起因する例が近年報告されている。本分担研究は筋小胞体の Ca^{2+} シグナル関連分子の機能異常と循環器疾患の連関を明らかにすることを目的としている。平成 13 年度の主要成果としては、心筋細胞において筋小胞体の Ca^{2+} 含量低下に伴う Ca^{2+} 流入機構を見出し、ノックアウトマウスを用いた解析を遂行したことである。

A. 研究目的

心筋・血管平滑筋の収縮反応は循環器機能の根本であり、筋収縮の生理的なスイッチは細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇である。従って、 Ca^{2+} シグナリングの異常は各種循環器疾患の原因となると推定され、事実いくつかの遺伝性循環器疾患は Ca^{2+} チャネルなどの Ca^{2+} シグナル関連の機能分子の変異に起因することが近年報告されている。本研究においては、筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体(RyR)や細胞表層膜と筋小胞体膜の架橋分子であるジャンクトフィリン(JP)の循環器系筋細胞における機能的役割と循環器疾患との連関を明らかにすることが目的である。また、循環器疾患の病因解明への貢献を目指し、未知の Ca^{2+} シグナリングに関与する機能分子の検索も遂行している。

B. 研究方法

(1) 胎性から成熟期における心筋細胞の新規な Ca^{2+} 流入経路の解析: 蛍光色素法による顕微 Ca^{2+} 測光にて、心筋細胞におけるストア依存性 Ca^{2+} 流入経路を検討した。また、ストア依存性 Ca^{2+} 流入に対する心不全関連分子2型ジャンクトフィリン(JP-2)、2型リアノジン受容体(RyR-2)の欠損効果をノックアウトマウスを利用して検討した。

(2) ジャンクトフィリンの生理機能解析: 哺乳動物組織では3つのジャンクトフィリンサブタイプ JP-1(骨格筋型), -2(心筋型), -3(脳型)が存在する。JP-2 欠損により心不全が引き起こされることは既に昨年度報告したが、骨格筋では JP-1 と-2 が共発現しており、JP-1 の生理機能も注目される。そこで、JP-1 ノックアウトマウスの作成を行い、その骨格筋における張力測定や形態学的観察を遂行した。さらに、無脊椎動物(ハエ, 線虫)における JP についても、遺伝子クローニングや dsRNA による mRNA 発現阻害実験(RNAi 法)により検

討した。

(3) 心不全関連遺伝子産物の検索: 未知の Ca^{2+} シグナル関連分子の検索のため、ウサギ心臓より組織破壊、細胞分画法、シヨ糖密度勾配遠心法を組み合わせ、純度の高い心筋小胞体(細胞内 Ca^{2+} ストア)分画の調整法の検討を遂行した。また、その小胞体膜画分を抗原として単クローン抗体ライブラリーを作成し、心臓切片による蛍光抗体法による細胞内局在を指標にしたスクリーニングを遂行した。

C. 研究結果

(1) 心筋細胞におけるストア容量依存性の Ca^{2+} 流入機構の活性化を、数種の枯渇条件下にて観察した。種々の薬物を用いた薬理的検討により、心筋細胞におけるこの新規な Ca^{2+} 流入はこれまでの報告と異なり非常にユニークな性質を有すると考えられた。また、胎児期の未成熟心筋細胞ではこの Ca^{2+} 流入活性は高いが、発達に従い活性が低下することも明らかになった。一方、心筋細胞の容量依存性 Ca^{2+} 流入は RyR-2 及び JP-2 の欠損により損なわれることはなく、 Ca^{2+} 放出チャネルや結合膜構造の有無に作用されないことが明らかになった。

(2) 作成された JP-1 欠損マウスは授乳することが出来ず、生後まもなく死亡した。形態学的観察では JP-1 欠損筋の三つ組構造形成不良、張力測定では単収縮の低下が示された。従って、骨格筋において JP-1 と JP-2 は異なる生理機能を有し、興奮-収縮連関の効率化に重要な三つ組構造の形成に JP-1 は必要不可欠であると考えられた。哺乳動物と異なり無脊椎動物においては1種の JP が存在し、主に筋細胞のみで発現が観察される。JP の発現を抑制すると、線虫では自発運動量の減少が観察された。これは JP の欠失により Ca^{2+} シグナリングの抑制が生じ、興奮収縮連関効率低下によるものと考えられた。

(3) 種々の検討により純度の高い心筋小胞体分画の調整法を確立し、その免疫により約 5,000 種類からなる単クローン抗体ライブラリーを作成した。上述の心筋脱分極- Ca^{2+} シグナル変換反応はZ線上に形成される二つ組(diad)で行われるため、Z線上の染色を指標に蛍光抗体法によるスクリーニングを行い、7種の抗体を単離した。現在、その認識抗原蛋白質を明らかにする目的で、cDNA クローニングなどを遂行中である。

E. 考察と結論

(1) ストア容量依存性 Ca^{2+} 流入では現在まで分子機構についてはまったく不明であるが、その活性化には Ca^{2+} 放出チャネルが不可欠との仮説が有力である。RyR-2欠損細胞でもストア容量依存性 Ca^{2+} 流入が存在することから、少なくとも心筋細胞ではその仮説は誤ったものと考察された。今後、新たに見い出された心筋細胞のストア容量依存性 Ca^{2+} 流入の心肥大・心不全における機能変化などが注目される。

(2) JP 分子群は心筋細胞だけでなく、骨格筋細胞や無脊椎動物における Ca^{2+} シグナリングにも重要であることが判明した。

(3) 上記の実験遂行により比較的高純度の心筋小胞体の調製法の開発に成功し、それを用いた単クローン抗体の検索も順調になされた。現在までに数種同定された新規と推定される小胞体膜蛋白質群の構造と機能が注目される。

G. 研究発表

1論文発表

- (1) Shimuta, M., Yoshikawa, M., Fukaya, M., Watanabe, M., Takeshima, H. & Manabe, T. Postsynaptic modulation of AMPA receptor-mediated synaptic responses and LTP by the type 3 ryanodine receptor. *Mol. Cell Neurosci.* 17, 921-930, 2001.
- (2) Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura K. & Takeshima, H. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* 154,

1059-1068, 2001.

(3) Yang, D., Pan, Z., Takeshima, H., Wu, C., Nagaraj, R. Y., Ma, J. & Cheng, H. RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 276, 40210-40214, 2001.

(4) Yoshida, M., Sugimoto, A., Ohshima, Y. & Takeshima, H. Important role of junctophilin in nematode motor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 234-239, 2001.

(5) Komazaki, S., Nishi, M., Takeshima, H. & Nakamura, H. Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Develop. Growth Differ.* 43, 717-723, 2001.

(6) Uehara, A., Yasukouchi, M., Imanaga, I., Nishi, M. & Takeshima, H. Store-operated Ca^{2+} entry irrelevant to Ca^{2+} release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium* in press.

2学会発表

(1) 竹島浩、“ Ca^{2+} 放出と結合膜構造”、分子ベクトル輸送シンポジウム(東京 東大山上会館 2001年7月23日)

(2) 竹島浩、“ジャンクトフィリンと結合膜構造”、日本生化学会大会(京都 国際会議場 2001年10月27日)

(3) Hiroshi Takeshima “Ryanodine Receptor and Junctophilin in Cardiac Myocytes” International Symposium on Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular System (大阪 阪大銀杏会館 2002年2月5日)

(4) 竹島浩、“結合膜構造とジャンクトフィリン”、日本薬理学会大会(熊本 2002年3月13日)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし