

200/0616

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転に基づく脳血管性痴呆病因解明と治療法  
(発症および進行阻止法)の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 祖父江 憲治

平成14(2002)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転 に基づく脳血管性痴呆病因解明と治療法（発症 および進行阻止法）の開発に関する研究 祖父江憲治	----- 1
II. 分担研究報告	
不飽和L P A予備蓄積能定量法による脳血管性痴 呆発症前診断法の確立に関する研究 荻原俊男	----- 6
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 8
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 10

主任研究者 祖父江 憲治 大阪大学大学院医学系研究科教授

**研究要旨** 脳血管性痴呆の発症原因を血管閉塞および梗塞性要因から解明し、予防・発症および進行阻止に向けた治療法の開発を目的とする。血管硬化誘導因子とそのレセプターの検索、脳血管性痴呆モデル動物の作製と阻害薬の開発を主目的として研究を行ってきた。分化型血管平滑筋細胞培養系を用いてヒト血清、酸化 LDL、および動脈硬化病巣中に存在する不飽和リゾホスファチジン酸(LPA)が強力かつ特異的脱分化能を有すること、不飽和 LPA による血管平滑筋細胞脱分化の細胞内シグナル伝達系を明らかにし、不飽和 LPA による血管平滑筋細胞脱分化の細胞内シグナル伝達系を明らかにするとともに、不飽和 LPA による血管平滑筋細胞脱分化の細胞内シグナル伝達系を明らかにし、不飽和 LPA による血管内膜肥厚モデルラットの作製に成功した。さらに、脳血管硬化モデルラットの作製中である。本研究により、不飽和 LPA が脳血管性痴呆の有力な発症因子であることが明らかになったことより、現在不飽和 LPA 特異的レセプターをクローニング中である。また、ドラッグデザインから阻害薬の開発に向けた研究を行うため、足場蛋白質(PSD-Zip45)により膜 7 回貫通型レセプターのクラスターを形成させた膜標品を用いた立体構造解析に成功しており、不飽和 LPA レセプター立体構造解析とドラッグデザインに向けた準備が完了した。シグナル伝達系異常による脳血管性痴呆モデルマウスも作製中である。本研究遂行中に見い出した血管内膜肥厚増悪因子はエビレギュリンであることを同定した。血管硬化および脳血管性痴呆と不飽和 LPA 予備蓄積能の相関については、LPA 微量定量化を目指して測定法を確立中であり、完成次第臨床検体の測定に入る予定である。

分担研究者・荻原 俊男 大阪大学大学院医学系研究科教授

#### A. 研究目的

我が国における全痴呆患者数は、現在 80 万人を超えている。このままの状態が続けば、2020 年には 200 万人に達すると予想される。中でも全痴呆患者中、脳血管性痴呆は半数以上を占めており、超高齢化時代への突入に伴い本疾患への対策は厚生労働行政にとり深刻かつ重大な課題となってきた。本研究は、脳血管性痴呆の主因である大梗塞および多発性中・小梗塞、さらにはピンズワンガー型痴呆などの発症原因を血管病変（大・中・小細動脈硬化および毛細血管閉塞と随伴する血小板活性化による血栓形成）の立場から究明し、発症前診断・予防法の確立、さらに発症・進行阻止に向けた治療法を開発を目的とし、この事態に対応するものである。

#### B. 研究方法

- 1) 血管内膜肥厚因子（血管平滑筋細胞脱分化因子）の検索——分化型血管平滑筋細胞培養系を検出系とした血管内膜肥厚因子の分離・精製・同定。
- 2) 不飽和 LPA 予備蓄積能定量化システムの開発——ヒト LDL 分画の酸化により形成される不飽和 LPA を多数の血液試料から簡便に微量定量化する MS-MS システムの確立。

3) 血管内膜肥厚・脳血管内膜肥厚モデルラットの作成——不飽和 LPA 処理による血管内膜肥厚と脳血管内膜肥厚モデルラットの作成。

4) 不飽和 LPA 特異的レセプターの検索——ligand-binding assay による不飽和 LPA 特異的レセプターのクローニング。

5) 血管平滑筋細胞内シグナル伝達系の解析——分化型・脱分化型血管平滑筋細胞を用いた各種細胞内シグナル伝達因子の活性測定と相互作用の解析。

6) 血管内膜肥厚増悪因子の検索——分化型血管平滑筋細胞に活性型 MEK1 と MKK6 を感染後、培養液中の増悪因子を分離、精製・同定。

7) シグナル伝達異常による脳血管内膜肥厚モデルマウスの作成——SM-MHC プロモーター・活性型 Ras の脳血管平滑筋細胞特異的トランスジェニックマウスの作成。

8) 細胞膜 7 回貫通型レセプターの立体構造の解析——膜 7 回貫通型レセプターを PSD-Zip45 により細胞膜上でクラスター化し、この膜標品を用いた立体構造解析。

（倫理面への配慮）

モデルラットとトランスジェニックマウスの作成・解析については、大阪大学医学部医学科動物実験委員会の許可を得ており、同委員会ガイドラインに準じて研究を施行している。ヒト血中 LDL の不飽和 LPA 予備蓄積能に関する研究は、大阪大学倫理委員

会の許可を得ている。患者血液を使用する際は、本人のインフォームドコンセントを十分に得た上で倫理面に配慮して施行する。

### C. 研究結果

#### 1) 血管平滑筋細胞の分化・脱分化型形質を決定するシグナル伝達系の解析

血管平滑筋細胞分化は PI3K/PKB、脱分化は ERK と p38MAPK 系の協調的活性化で誘導されること、すなわち、PI3K/PKB 系と ERK 及び p38MAPK 系の力のバランスで血管平滑筋細胞の分化・脱分化形質が決定されることを明らかにした。次いで、分化シグナルである PI3K/PKB 系下流はカルシニューリン(Cn)/NFAT系がSRF転写を制御していること、脱分化誘導シグナルはRasがERKとp38MAPK系を活性化することを明らかにした。

#### 2) 血管平滑筋細胞特異的転写装置の解析

血管平滑筋細胞特異遺伝子の転写制御はNkx3.2/SRF/GATA6によること、心筋特異的転写についてもNkx2.5/SRF/GATA4であることを解明し、両筋肉系転写装置の類型化を明らかにした。

#### 3) 血管内膜肥厚因子の検索と血管内膜肥厚・脳血管内膜肥厚モデルラットの作成

ヒト血清中の主要かつ強力な因子として不飽和LPAを同定し、不飽和LPAは血小板活性化・LDL酸化により形成されることを見出した。飽和LPAは全く脱分化能を示さない。また、不飽和LPAによる血管平滑筋細胞脱分化は、三量体G蛋白質を介したERKとp38MAPK系活性化であることを明らかにした。次いで、動脈に不飽和LPA処理を行い血管内膜肥厚モデルラットの作成に成功した。

#### 4) 不飽和LPA特異的レセプターの検索

本研究で見出したLPAによる血管平滑筋細胞脱分化は不飽和LPA特異的であり、LPAレセプターとして報告されたEdg-2,-4,-7とは異なる。そこで、不飽和LPA特異的レセプターのクローニングを行い、約50種類の既知及び未知遺伝子を検出した。現在、functional selectionを施行中である。

#### 5) 不飽和LPA予備蓄能から血管内膜肥厚による動脈硬化及び脳血管性痴呆発症前診断法の確立

LDL酸化により不飽和LPAが形成されること、健康人においてこの産生能が高値と低値群に分かれることから、不飽和LPA予備蓄能と動脈硬化並びに脳血管性痴呆の相関を検討する目的で、簡便なLDL精製法を開発した。次いで、LDL酸化による不飽和LPAの多数かつ迅速微量定量法としてMS-MS法を開発中である。

#### 6) 細胞内シグナル伝達異常による脳血管内膜肥厚モデルマウスの作成

血管平滑筋細胞シグナル伝達系解析の結果、RasがERKとp38MAPKを活性化し、脱分化誘導を起すことを見出した。そこで、Ras(ERKとp38MAPK)の異常活性化による脳血管内膜肥厚モデルマウスの作成を開始した。成熟した脳血管系でRasの活性化をはかる必要があり、SM-MHCプロモーター・活性型Ras系にコンディショニング装置を組み込んだトランスジェニックマウスの作成中である。

#### 7) 血管内膜肥厚増悪因子の検索

ERKとp38MAPK活性化により脱分化した血管平滑筋細胞よりパラクラインされる増悪因子として、エピレギュリンを同定した。

#### 8) 膜貫通型レセプターの立体構造解析(不飽和LPA特異的レセプター阻害薬開発を目指して)

膜レセプター阻害薬の開発は、ドラッグデザイン上からもその立体構造の解明が有力な手段と期待される。しかしながら、膜7回貫通型レセプターの結晶化と解析はロドプシン以外に成功していない。PSD-Zip45が膜レセプターの強力なクラスター能を示すことを利用して、エンドセリンレセプターの立体構造解析に成功した。Edg-2,-4,-7についても試行中であり、現在クローニング中の不飽和LPA特異的レセプター立体構造解析への応用を目指している。

### D. 考察

「血管平滑筋細胞の分化・脱分化型形質を決定するシグナル伝達系の解析」及び「血管平滑筋細胞特異的転写装置の解析」については、当初の目標通り血管平滑筋細胞のシグナル伝達系と転写装置の全貌がほぼ解明出来た。中でも、PI3K/PKB系からCn/NFAT系によるSRF転写制御の解明により、これまで不明であった血管平滑筋細胞シグナル伝達と転写制御の関連を明らかにすることが出来た。血管平滑筋細胞形質を決定するシグナル伝達系の研究は、分化型血管平滑筋細胞培養系を確立した主任研究者らにおいて初めて可能となったもので、類似の研究はなく学術上の波及効果が大きい。

血管内膜肥厚因子として不飽和LPAの同定、血小板活性化とLDL酸化による不飽和LPAの形成、さらに不飽和LPA特異的血管内膜肥厚モデルラット作成の成功は、脂質の中でコレステロールが血管内膜肥厚危険因子として注目されてきた流れを変革するものである。この不飽和LPA特異的レセプターについては、LPAレセプターとして知られるEdg-2,-4,-7とは異なり、クローニングの結果が期待される。不飽和LPA予備蓄能から発症前診断法の開発は、本研究成果により追加した研究である。LDL簡便分離法、不飽和LPAのMS-MS法による定量もほぼ目途がつき、さらに微量化を試行中である。不飽和

LPA が血管内膜肥厚因子であることも主任研究者らの独走である。また、この不飽和 LPA は糸球体腎炎・肝腺維症・肺腺維症・前立腺肥大など慢性腺維芽症に共通の引き金である可能性が期待され、単に脳血管内膜肥厚・動脈硬化症のみならず、上記疾患群の病因としての可能性が強く、これら疾患の病因解明・発症前診断・予防・治療に向けた本研究の社会的意義は大きい。

シグナル伝達系異常による脳血管肥厚モデルマウスの作成を目指し、SM22 $\alpha$ プロモーターを用い MEK1 と MKK6 を脳血管平滑筋細胞に発現するマウスの作成を開始した。しかし、SM22 $\alpha$ プロモーターは胎生期一過性に心筋に発現し、心肥大を起して胎児期で致死となる。また、SM22 $\alpha$ プロモーターは通常の大・中・小血管平滑筋細胞には発現するが、脳血管平滑筋細胞では発現しないことが判明した。そこで、脳血管平滑筋細胞に発現可能な SM-MHC プロモーターを使用し、本研究で判明した ERK と p38MAPK 上流因子に活性型 Ras にコンディショニング装置を組み込んだトランスジェニックマウスの作成に研究計画を変更した。シグナル伝達異常による脳血管内膜肥厚モデルマウスに関しては、モデルマウスの作成により、シグナル伝達・転写装置の *in vivo* での実証が行え、薬剤開発・検定システムへの応用も期待される。

当初研究目的に入っていなかった不飽和 LPA 特異レセプター阻害薬開発を目的として、ドラッグデザイン上必要な立体構造解析を開始し、PSD-Zip45 を用いた膜レセプター立体構造解析モデルとしてエンドセリンレセプターの立体構造解析に成功した。

膜7回貫通型レセプターの立体構造解析については、本研究はその端緒を作ったもので、一つの膜レセプター立体構造の解明にとどまらず、膜7回貫通型レセプター立体構造の研究に大きな影響を与えるばかりか、得られた成果をドラッグデザインに応用出来る等社会的波及効果も大きい。

#### E. 結論

本研究は、分化型血管平滑筋細胞培養系の確立という基礎的研究から、これを用いたシグナル伝達と遺伝子発現機構の解明、血管内膜肥厚因子として不飽和 LPA の同定と不飽和 LPA による血管内膜肥厚モデルの作成へと発展した。さらに、不飽和 LPA レセプターのクローニングとその立体構造解析及び阻害剤開発・不飽和 LPA とシグナル伝達異常による脳血管肥厚モデル動物の作成、SRF 過剰発現 ES 細胞を用いた再建医療の研究に至っている。従って、本研究は血管平滑筋細胞と血小板活性化機転を中心に、脳血管性痴呆症の発症前診断・予防法の確立と発

症・進行阻止を目指した総合的アプローチであり、本研究目的の達成は QOL 向上に貢献するものであり、社会的意義も極めて大きいと考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hayashi K. et al. Different pathways triggered by IGF-I in different phenotypes of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* (in press) 2002
- Takahashi M. et al. Epiregulin produced by the coordinated activation of the ERK and p38MAPK pathways in differentiated vascular smooth muscle cells in a paracrine factor inducing dedifferentiation of neighboring vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* (in press) 2002
- Hayashi K. et al. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acids. *J. Clin. Invest.* (in press) 2002
- Usui S. et al. PSD-Zip45/Shank and PSD-95/GKAP interactions form different compartments within the postsynaptic structure. *J. Cell Biol.* (in press) 2002
- Irie K. et al. Crystal structure of conserved region of the Homer 1 family. *J. Mol. Biol.* (in press) 2002
- Konno D. et al. The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70 containing an N-myristoylation sequence and leucine zipper motifs. *J. Cell. Sci.* (in press) 2002
- Nishida W. et al. The triad of serum response factor and GATA and NK families governs transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J. Biol. Chem.* 277, 7308-7317, 2002
- Okabe S. et al. Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *J. Neurosci.* 21: 9561-9571, 2001
- Hayashi K. et al. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acid. *Circ. Res.* 89: 251-258, 2001
- Nakamura M. et al. Transcriptional activation of  $\beta$ -tropomyosin mediated by serum response factor and a novel Barx Homologue, Barx1b, in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276: 1831-18320, 2001
- Yamanaka Y. et al. EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:373-377, 2001
- Tadokoro S. et al. Involvement of unique leucine-zipper motif of PSD-Zip45 (Homer 1c/vesl-1L) in group 1 metabotropic glutamate receptor clustering. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 96: 13801-13806, 1999

Hayashi K. et al. Changes in the balance of Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine the phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. J. Cell Biol. 145: 727-740, 1999

## 2. 学会発表

3<sup>rd</sup> symposium of COE (Osaka)

○ Signal transduction and gene regulation determining the smooth muscle cell phenotype (Kenji Sobue)

The 1<sup>st</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaScience (Tokyo)

○ Vascular remodeling induced by unsaturated lysophosphatidic acids (Kenji Sobue)

第78回日本生理学会大会シンポジウム2001年(京都)

○シナプス後肥厚部の分子機構と機能解析(祖父江憲治)

第74回日本生化学会大会シンポジウム2001年(京都)

○不飽和リゾフォスファチジン酸による血管リモデリング(祖父江憲治、林謙一郎、西田亙、吉田研二)

第74回日本生化学会大会2001年(京都)

○平滑筋および心筋におけるSRF/GATA/Homeobox転写因子群による転写調節機構(西田亙、中村真子、吉田研二、大川恭行、林謙一郎、祖父江憲治)

第74回日本生化学会大会2001年(京都)

○不飽和リゾフォスファチジン酸(LPA)による血管リモデリング(林謙一郎、高橋正典、吉田研二、大川恭行、西田亙、祖父江憲治)

第33回日本動脈硬化学会総会シンポジウム

○「動脈硬化治療薬の最前」不飽和リゾフォスファチジン酸による血管リモデリング(祖父江憲治)

第24回日本神経科学/第44回日本神経科学合同大会2001年(京都)

○新規 PSD 構成蛋白質 PSD-Zip70(今野大治郎、堀啓、白井審一、祖父江憲治)

第24回日本神経科学/第44回日本神経科学合同大会2001年(京都)

○海馬神経細胞におけるPSD-Zip45の動態(岡部繁雄、漆戸知恵、今野大治郎、岡部晴生、祖父江憲治)

第24回日本神経科学/第44回日本神経科学合同大会2001年(京都)

○マイクロインジェクション法を用いたPSD足場蛋白質のシナプスターゲティング(白井審一、今野大治郎、堀啓、祖父江憲治)

第54回日本細胞生物学会大会

○PSD構成蛋白質IRSp58/53の細胞形態変化に関与

するドメインの解析(堀啓、今野大治郎、白井審一、祖父江憲治)

第54回日本細胞生物学会大会

○SRF/GATA/Homeobox転写因子群による平滑筋および心筋特異的遺伝子の転写調節機構(西田亙、中村真子、高橋正典、大川恭行、吉田研二、林謙一郎、祖父江憲治)

第54回日本細胞生物学会大会

○平滑筋細胞の形質に依存したIGF-Iシグナリング(高橋正典、林謙一郎、吉田研二、大川恭行、中村真子、西田亙、祖父江憲治)

第54回日本細胞生物学会大会

○新規 PSD 構成蛋白質 PSD-Zip70の細胞内局在の検討(今野大治郎、堀啓、白井審一、祖父江憲治)

第54回日本細胞生物学会大会

○PSD-Zip45のシナプスへのターゲティング(白井審一、今野大治郎、堀啓、祖父江憲治)

第16回「大学と科学」公開シンポジウム2001年(東京)

○動脈硬化病巣の平滑筋細胞で何がおこっているのか(祖父江憲治)

第32回日本動脈硬化学会総会シンポジウム(千葉県)

○血管平滑筋細胞(分化・脱分化型)形質を決定するシグナル伝達と遺伝子発現機構(祖父江憲治)

第53回日本生物学会大会2000年(福岡)

○血管平滑筋細胞における $\alpha 1$ インテグリン遺伝子の転写調節機構(西田亙、中村真子、高橋正典、林謙一郎、大川恭行、祖父江憲治)

○平滑筋細胞におけるBarx1bとSerum response factorによる $\beta$ -tropomyosin遺伝子の協調的転写調節機構(中村真子、西田亙、林謙一郎、大川恭行、高橋正典、祖父江憲治)

○ヒト血清に存在する平滑筋細胞脱分化誘導因子の同定(林謙一郎、高橋正典、大川恭行、西田亙、祖父江憲治)

○mGluRの集積機構を利用した2次元結晶化への試み(廣明洋子、西川幸希、入江克雅、土井知子、光岡薫、立花太郎、祖父江憲治、藤吉好則)

○ホメオドメイン蛋白質Barx1bとserum response factor(SRF)による $\beta$ -tropomyosin遺伝子の平滑筋細胞特異的転写調節機構の解析(中村真子、西田亙、大川恭行、高橋正典、林謙一郎、祖父江憲治)

○Nkx3.2, SRFおよびGAT-6による $\alpha 1$ インテグリン遺伝子の血管平滑筋細胞特異的転写調節機構(西田亙、中村真子、高橋正典、大川恭行、林謙一郎、祖父江憲治)

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

筋線維芽細胞症動物モデル作成方法（特許2001-154519）



分担研究者 荻原 俊男 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 脳血管性痴呆の発症原因を血管閉塞と梗塞性要因から解明し、予防・発症および進行阻止に向けた治療法の開発を目的としている。殊に、不飽和リゾホスファチジン酸(LPA)による血管内膜肥厚と脳血管性痴呆発疾病態との関連解明を目指し、不飽和 LPA 予備蓄積能定量法による脳血管性痴呆発症前診断法の確立を目的とした。この結果、健常者血中の LDL 酸化により形成される不飽和 LPA（不飽和 LPA 予備蓄積能）には、高値群と低値群の二群に大別されることが判明した。この結果は、血管硬化および脳血管性痴呆発症の発症前診断を可能性の示唆するものである。そこで、血管硬化および脳血管性痴呆と不飽和 LPA 予備蓄積能の相関を検討するために、微量血液検体で多数かつ迅速な測定法が必要となる。現在、不飽和 LPA 予備蓄積能定量法についてこの条件を満たす方法の確立を検討中である。また、血管内膜肥厚増悪因子について研究を行い、分離・精製を終了し、EGF 様作用を示すことを明らかにしており、現在最終的同定を進めている。血管硬化および脳血管性痴呆患者不飽和 LPA 予備蓄積能に関する採血については、大阪大学医学倫理委員会の承認を得ており、十分にインフォームドコンセントを行った後、行う予定である。

#### A. 研究目的

脳血管性痴呆の主因である大梗塞および多発性中・小梗塞、さらにはビンスワンガー型痴呆などの血管病変（大・中・小細動脈硬化および毛細血管閉塞と随伴する血管梗塞）を血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化の立場から究明し、発症前診断・予防法確立と発症・進行阻止に向けた治療法の開発を、主任研究者との協同研究により解明することを目的としている。

#### B. 研究方法

##### ○不飽和 LPA 予備蓄積能定量法

不飽和 LPA の定量は、ヒト血清、酸化 LDL・動脈硬化病巣の極性脂質抽出分画から二次元クロマトグラフィーにより LPA 分画を分離し、メチルエステル化後ガスクロマトグラフィーで分離・定量化している。現在、MS-MS 法による微量定量化を検討している。

##### ○細胞内シグナル伝達系の解析

細胞内シグナル伝達系は、各種 MAPK 系、PI3 キナーゼ PKB(Akt)系などについて、酵素活性を測定した。

##### ○血管内膜肥厚増悪因子の特性と検索

培養血管平滑筋細胞に活性型 MEK1 と MKK6 を感染あるいは LPA 処理後、培養液をヘパリンアフィニティカラム・DEAE セファセルカラムなどにより分離し、分化型血管平滑筋細胞を用いて、脱分化・細胞内シグナル伝達系を解析した。

#### C. 研究成果

本研究は脳血管性痴呆の発症原因を、血管平滑筋

細胞形質転換（脱分化後の細胞増殖・運動能獲得）血小板活性化機転による血管閉塞性機転から解析し、脳血管性痴呆の発症および治療法の開発を目的としたものである。

##### 1) 血管硬化および脳血管性痴呆と不飽和 LPA 予備蓄積能

不飽和 LPA による血管内膜肥厚と脳血管性痴呆発症との関連解明を目指して、健常者 LDL の酸化（oxLDL）により形成される不飽和 LPA 形成能（不飽和 LPA 予備蓄積能）について主任研究者と共同して研究を行った。この結果、健常者の不飽和 LPA 予備蓄積能には、高値群を低値群の二群に大別されることを見出した。引き続き、血管硬化および脳血管性痴呆患者での不飽和 LPA 予備蓄積能を検討すべく、本学医学倫理委員会の承認を得ている。MS-MS 法が確立され次第、検討を開始する予定である。

##### 2) 血管内膜肥厚増悪因子

本研究において主任研究者が新たに見出した血管内膜肥厚増悪因子（脱分化細胞から放出される蛋白質で、同辺の正常な血管平滑筋細胞の脱分化カスケードを増大する）の、特性解析と分離・同定を検討した。ヘパリンアフィニティカラムと DEAE セファセルカラムで分離・同定を検討した。ヘパリンアフィニティと DEAE セファセルカラムで分離し特性を検討した所、EGF 様の作用（EGF 自体ではない）を有し、EGF レセプターを介して作用発現することを見出した。

（倫理面への配慮）

血管硬化および脳血管性痴呆患者不飽和 LPA 予備蓄積能に関する採血については、大阪大学医学倫理



委員会の承認を得ており、十分にインフォームドコンセントを行った後、行う予定である。

#### D. 考察

本研究で健常者の不飽和 LPA 予備蓄積能には高値群と低値群の二群存在することから、健常者の長期フォローアップを行うとともに血管硬化および脳血管性痴呆患者での不飽和 LPA 予備蓄積能と発症との相関を検討する予定である。この研究により、血管硬化および脳血管性痴呆の発症前診断が可能になれば、臨床上意義が大きいものと期待している。

血管内膜肥厚憎悪因子も脳血管硬化の進展に重要な因子であり、現在、最終的同定を急いでいる。これについても、臨床症例との対応を検討する予定である。

平滑筋細胞分化マーカーを用いたヒト脳血管硬化病変の解析に向けて、免疫組織化学・in situ hybridization・immunoblotting・western blotting 系のヒト標品での検討を開始している。

#### E. 結論

不飽和 LPA 特異的血管内膜肥厚に関する研究は、現在、阻害剤開発に進展中であるが、これにより脳血管痴呆発症阻止が大いに期待される。また、不飽和 LPA 予備蓄積能についても現在検討中で、脳血管性痴呆症のポストゲノム発症前診断が可能になるものと期待している。これら研究により、脳血管性痴呆の病因解明のみならず、発症前診断・予防および発症・進行阻止に向けた治療法の開発へと発展するものと期待している。

F. 健康危険情報  
特記なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamanaka Y. et al. EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:373-377, 2001

##### 2. 学会発表

平成 13 年度適塾記念講演会（大阪）

○21 世紀の医療－遺伝子は命を救う（荻原俊男）

第 42 回日本老年医学会学術集会 2000 年（仙台）

○ 動脈硬化巣および正常血管の培養平滑筋細胞を用いた遺伝子発現の比較（安田修，前田信代，福尾恵介，荻原俊男）

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

特記なし

##### 2. 実用新案登録

特記なし

##### 3. その他

特記なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi K, Takahashi M, Ohkawa Y, Namakura M, Yoshida K, Ogawa A, Nishida W. & Kenji Sobue	Dual function IGF-I mediated through the different downstream signaling pathways in different phenotype of vascular smooth muscle cells.	J. Biol. Chem.	(in press )		2002
Takahashi M, Hayashi K, Ohokawa Y, Nakamura M, Yoshida K, Komurasaki T, Kitabatake A, Ogawa A, Nishida W, & Sobue K.	Epiregulin produced by the coordinated activation of the ERK and p38MAPK pathways in differentiated vascular smooth muscle cells in a paracrine factor inducing dedifferentiation of neighboring vascular smooth muscle cells.	Circ. Res.	(in press)		2002
Hayashi K, Nishida W, Yoshida K, Aoki J, Arai H, Ogawa A, & Sobue K.	Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acids.	J. Clin. Invest.	(in press)		2002
Usui S, Konno D, Hori K, Okabe S, Fujikado T, Tano Y, & Sobue K.	PSD-Zip45/Shank and PSD-95/GKAP interactions form different compartments within the postsynaptic structure	J. Cell Biol.	(in press)		2002
Irie K, Nakatsu T, Mitsuoka K, Miyazawa A, Sobue K, Hiroaki Y, Doi T, Fujiyoshi Y, & Kato H.	Crystal structure of conserved region of the Homer1 family.	J. Mol. Biol.	(in press)		2002
Konno D, Ko J, Usui S, Hori K, Inui M, Fujikado T, Tano Y, Suzuki T, Tohyama K, & Sobue K.	The postsynaptic density and dendritic raft localization of PSD-Zip70 containing an N-myristoylation sequence and leucine zipper motifs.	J. Cell. Sci.	(in press )		2002
Nishida W, Nakamura M, Mori S, Takahashi M, Ohokawa Y, Tadokoro S, Yoshida K, Hiwada K, Hayashi K, & Sobue K	The triad of serum response factor and GATA and NK families governs transcription of smooth and cardiac muscle genes.	J. Biol. Chem.	277	7308-7317	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okabe S, Uurshido T, Konno D, Okado H, & Sobue K.	Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels.	J. Neurosci.	21	9561-9571	2001
Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H, & Sobue K.	Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acid.	Circ. Res.	89	251-258	2001
Nakamura M, Nishida W, Mori S, Hiwada K, Hayashi K, & Sobue K.	Transcriptional activation of $\beta$ -tropomyosin mediated by serum response factor and a novel Barx Homologue, Barx1b, in smooth muscle cells.	J. Biol. Chem.	276	18313-18320	2001
Yamanaka Y, Hayashi K, Komurasaki T, Morimoto S, Ogihara T, & Sobue K.	EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	281	373-377	2001
Tadokoro S, Thchibana T, Imanaka T, Nishida W, & Sobue K.	Involvement of unique leucine-zipper motif of PSD-Zip45 (Homer 1c/vesl-1L) in group 1 metabotropic glutamate receptor clustering.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA,	96	13801-13806	1999
Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, & Sobue K.	Changes in the balance of Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine the phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells.	J. Cell Biol.	145	727-740	1999

20010616

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。