

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

HGF 蛋白ならびに HGF 遺伝子による難治性疾患の治療と その作用機構に関する研究

分担研究者 中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

心筋症は心筋の線維化と心筋細胞死を特徴とする慢性心疾患であり根本的な治療法は確立されていない。心筋症に対する HGF (hepatocyte growth factor) の治療効果を心筋症ハムスターを用いて調べた結果、HGF は病態末期からの投与にもかかわらず心筋の線維化ならびに心機能の著しい改善作用を示した。HGF は心筋症に対する有効な治療法となるものと考えられる。また、肝硬変をモデルとして HGF の線維性疾患に対する治癒作用のメカニズムを解析した結果、HGF が線維組織の増生に関与する筋線維芽細胞の細胞死を直接促進することによって線維化の改善をもたらすことを明らかにした。

A. 目的

肝硬変、慢性腎不全、心筋症などの臓器疾患は代表的難治性疾患である。これら慢性進行性疾患の治療を目的として、再生医学に根ざした根本的治療法を確立することは厚生科学のはたすべき重要な医療課題といえる。私達は HGF (肝細胞増殖因子) を長らく不明であった肝再生因子の実体として発見・単離・クローニングするとともに、HGF が肝再生に留まらず各種臓器・組織において再生・修復因子として機能することを明らかにした。本研究は器官再生機構の解明を背景として、これら疾患に対する HGF 投与あるいは HGF 遺伝子を gene drug とする遺伝子治療の有効性を実証し、根本的治療法のなかった疾患に対する新しい治療法を確立することを目的とした。平成 13 年度においては、(1) HGF からみた心筋症の発症機構と HGF による心筋症の治療、ならびに (2) HGF による慢性線維性疾患の再生治療の作用メカニズムを肝硬変をモデルとして解析した。

B. 研究方法

心筋症のモデルとして広く使用されているハムスターを用いた。心筋症の病態進行にともなう心筋組織における TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) ならびに HGF のレベルを

ELISA によって定量した。心筋症の病態に対する HGF の治療効果を調べるため、病態の末期に近い生後 27 週目から 300 μ g/day/kg ならびに 1,000 μ g/day/kg の容量にて連日リコンビナント HGF を皮下投与し、心筋組織における線維化、心機能をそれぞれ組織染色ならびに心エコー解析によって調べた。また、HGF の抗線維化機構、抗心肥大に対する作用メカニズムを調べるため心組織における TGF- β 1、Type-I コラーゲン、ANP (atrial natriuretic peptide) の発現をノーザンブロットによって調べた。

一方、HGF の抗線維化作用のメカニズムを調べるため、ラットに dimethylnitrosamine (DMN) を週に 3 日連投する処理を 5 週間継続することによってラット肝硬変モデルを作成した。5 週間の DMN 処理によって肝硬変を発症したラットにリコンビナント HGF を腹腔内に 500 μ g/day/kg の容量にて 7 日間連日投与した。肝臓の線維化を組織学的に評価するとともに、肝硬変の発症にともない活性化された伊東細胞 (筋線維芽細胞) のマーカーである α -SMA (α -smooth muscle actin) の発現、筋線維芽細胞のアポトーシスを調べた。また、筋線維芽細胞に対する HGF の直接的な作用を調べるため、ラット肝臓から筋線維芽細胞

を分離培養し、c-Met/HGF レセプターの発現、培養筋線維芽細胞の細胞死に対する HGF の作用を調べた。

C. 研究結果

(1) HGF による心筋症の治療

心筋症ハムスターにおいては生後 16 週目において心筋の線維化が認められ、生後 26 週以降では心筋の著しい線維化ならびに心機能不全が認められた。これまで、各種慢性線維性疾患の発症には TGF- β が中心的な役割を果たすことが知られているが、心組織の TGF- β レベルは心組織の線維化とほぼ一致して著しく増加することが明らかになった。一方、心筋症の発症・進行過程における心組織の内因性 HGF レベルは生後 16 週目には正常レベルを上回っているものの、病態の末期では正常レベルに比べ低下していることがわかった。したがって、病態の進行にともない線維化をもたらす TGF- β の発現上昇とは相反的に内因性 HGF が低下することが心筋症の病態の進行に関与することが示唆された。

上記の結果に基づき、内因性 HGF の低下を補うべく HGF を投与することが心筋症の改善・治療に結びつか検討した。HGF を投与していないハムスターにおいては 27 週目から 30 週にかけて心組織の線維化がさらに進行するとともに、心機能が著しく低下した。実際に HGF を投与していないコントロールのハムスターは 8 匹中 3 匹が心不全によって死亡した。これに対して HGF を投与したハムスターにおいては、HGF の投与量に依存して心組織の線維化の改善、ならびに心機能の改善が認められ、HGF を投与したハムスターにおいては心不全によるハムスターの死亡は認められなかった。また、HGF を投与したハムスターにおいては心筋細胞の肥大が改善された。

一方、HGF による心筋症の治療作用のメカニズムを解析するため、心組織における TGF- β ならびに ANP の発現を調べたところコントロールのハムスターの心組織においては TGF- β ならびに ANP の発現が著明に上昇していたのに対して、HGF 投与によって TGF- β ならびに ANP の発現が強く抑制された。TGF- β ならびに ANP は、それぞれ心組織の線維化ならびに心筋細胞の肥大をもたらす主因子であり、

HGF 投与によってもたらされるこれら分子の発現抑制が HGF による心筋症の改善・治療の主要なメカニズムであると考えられる。

(2) HGF による肝硬変治療とその作用メカニズム：筋線維芽細胞の細胞死を中心として

肝硬変、慢性腎不全、肺線維症、心筋症など様々な線維性疾患の発症には筋線維芽細胞の増殖と筋線維芽細胞による細胞外マトリックスの過剰な産生が関与している。これまで私達は HGF による肝硬変の治療には TGF- β の発現抑制や肝細胞の再生促進が関与することを明らかにしているが、HGF による肝硬変の改善・治療には線維化をもたらす主細胞である筋線維芽細胞に対する何らかの作用が関与することが考えられた。

ラットに DMN 処理を 5 週間にわたり継続すると、肝組織には筋線維芽細胞とコラーゲンなどの細胞外マトリックスの過剰な蓄積が認められ、肝硬変が引き起こされた。これに対して DMN 処理によって肝硬変を発症したラットにリコンビナント HGF を 7 日間投与したところ、たった 1 週間の投与にもかかわらず、 α -SMA の発現を指標にした筋線維芽細胞の蓄積、細胞外マトリックスの減少が認められた。

HGF による著明な肝硬変の改善作用に筋線維芽細胞に対する HGF の直接的な作用が関与するかどうか調べるため、ラット肝臓から筋線維芽細胞を分離・培養した。その結果、培養筋線維芽細胞において c-Met/HGF レセプターの発現誘導が認められるとともに、HGF は筋線維芽細胞の細胞死を容量依存的に促進することがわかった。すなわち、HGF によって引き起こされる筋線維芽細胞の細胞死が HGF による肝硬変の改善に関与することが示唆された。そこで、肝硬変におちいった肝臓における筋線維芽細胞の細胞死に対する HGF 投与の効果を調べたところ、HGF は投与開始 3 日後をピークに *in vivo* においても筋線維芽細胞の細胞死を促進することが明らかになった。

D. 考察

(1) HGF による心筋症の治療

心筋症は心筋細胞と細胞外マトリックスの接着に関与する分子群における遺伝的な変異、

長期に及ぶ心筋細胞のストレスなどが原因で発症するが、現在でも有効な根本的治療法のない疾患である。今回、心筋における HGF の発現低下が心筋症の発症に関与する一方、心筋保護因子 (cardiotrophic factor) としての HGF を外因的に補うことが心筋症の改善・治癒をもたらすことを明らかにした。これまで、心筋症ハムスターを用いて心筋症の治療を目指した研究がなされてきたが、病態の末期からの投与において心組織の線維化抑制、さらには心機能の改善をもたらされたという報告はなく、今回の成果は心筋症に対する新しい治療法を確立する上で画期的な成果と考えられる。したがって、リコンビナント HGF の投与、あるいは HGF 遺伝子治療法は心筋症に対する新しい再生治療法になることが期待される。

(2) HGF による抗線維化作用の新しいメカニズム

今回、ラット肝硬変をモデルとして HGF による抗線維化作用のメカニズムを解析した結果、筋線維芽細胞への形質転換と一致して c-Met/HGF レセプターの発現が誘導されるとともに、HGF が線維組織の増生に関与する筋線維芽細胞の細胞死を直接促進することによって線維化の改善をもたらすことを明らかにした。私達はこれまで HGF が TGF- β 1 の発現を抑制する一方、細胞外マトリックスの分解促進、肝細胞の再生促進を介して肝硬変の改善をもたらすことを明らかにしている。したがって HGF は肝硬変におちいった肝臓に対して、1) TGF- β 1 の発現抑制、2) 細胞外マトリックスの分解促進、3) 筋線維芽細胞の細胞死促進、4) 肝細胞の再生促進など、標的細胞依存的に多様な生物活性を同時に発揮することによって強力な肝硬変の改善・治癒作用を示すものと考えられる。

(3) HGF による線維性疾患の治療

HGF は肝硬変や心筋症に加え、慢性腎不全や肺線維症に対しても強力な治癒作用をもつ。おそらく、HGF による線維性疾患の改善・治癒には臓器・組織が異なっても共通のメカニズムが関与しているものと考えられる。線維性疾患の発症・進行には複数のシグナル分子や細胞種依存的な増殖あるいは細胞死が関与

するゆえに、単一の分子を標的とした治療戦略は有効な改善・治癒にいたらない。HGF は上記のように生体に備わった内因性再生因子として多才な生物活性を同時に発揮することによって各種線維性疾患に対して強い治癒作用を示す。HGF を用いた再生医療こそ慢性線維性疾患に対する有効な治療法となるものと考えられる。

E. 結論

- (1) HGF は心筋症に対し、病態末期の投与においても強い改善・治癒作用をもつことから心筋症に対する治療薬となることが期待される。
- (2) HGF は 1) TGF- β 1 の発現抑制、2) 細胞外マトリックスの分解促進、3) 筋線維芽細胞の細胞死促進、4) 機能細胞の再生促進・抗細胞死など、標的細胞依存的に多様な生物活性を発揮することによって線維性疾患の改善・治癒作用を示す。

F. 研究発表

1. T. Sumi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Specific activation of LIM-kinase 2 via threonine-505 phosphorylation by ROCK under the control of Rho. *J. Biol. Chem.* 276, 670-676
2. T. Sumi, K. Matsumoto, A. Shibuya and T. Nakamura (2001) Activation of LIM-kinases by Myotonic dystrophy kinase-related Cdc 42-binding kinase α . *J. Biol. Chem.* 276, 23092-23096
3. S. Mizuno, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Intern.* 59, 1304-1314
4. T. Kuroiwa, E. Kakishita, T. Hamano, Y. Kataoka, Y. Seto, N. Iwata, Y. Kaneda, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ueki, J. Fujimoto and T. Iwasaki (2001) Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J. Clin. Invest.* 107, 1365-1373
5. K. Nakamura, H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokunaga, T. Nakamura (2001) Molecular cloning and functional characterization of human scavenger receptor with c-type lectin (SRCL), a novel member of scavenger receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1028-1035
6. H. Ueda, K. Matsumoto, Y. Sawa, T. Nakamura,

- H. Matsuda and T. Nakamura (2001) A role of HGF in myocardial infarction induced in rats. *Cardiovas. Res.* 51, 41-50
7. N. Maehara, K. Matsumoto, K. Kuba, K. Mizunoto, M. Tanaka and T. Nakamura (2001) NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* 84, 864-873
 8. H. Funakoshi and T. Nakamura (2001) Identification of HGF-like protein (HLP) as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 606-612
 9. T. Takahashi, U. Koshimizu, H. Abe, T. Obinata and T. Nakamura (2001) Functional involvement of LIM-kinase in *Xenopus* oocyte maturation. *Develop. Biol.* 229, 554-567
 10. T. Nakamura, S. Aoki, K. Kitajima, T. Takahashi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel Kringle-containing transmembrane protein. *Biochem. Biophys. Acta* 93513, 1-10
 11. H. Azuma, S. Takahara, K. Matsumoto, N. Ichimaru, J. D. Wang, T. Moriyama, A. Wega, Y. Otsuki, M. Kitamura, A. Okuyama, Y. Katsuoka, A. Chandraker, M. H. Sayegh and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor prevents development of chronic allograft nephropathy in an experimental rat transplant model. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1280-1292
 12. K. Yamamoto, R. Morishita, S. Hayashi, H. Matsumoto, H. Nakagami, Y. Taniyama, A. Moriguchi, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2001) Contribution of Bcl-2 but not Bcl-xL and Bax, to anti-apoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37, 1341-1348
 13. Y. Taniyama, R. Morishita, M. Aoki, H. Nakagami, K. Yamamoto, K. Yamazaki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, and T. Ogihara (2001) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hind limb ischemia models: Preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Therapy* 8, 181-189
 14. K. Hayashi, R. Morishita, H. Nakagami, S. Yoshimura, A. Hara, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, Y. Kaneda and N. Sakai (2001) Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor: in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Therapy* 8, 1167-1173
 15. H. Nakagami, R. Morishita, K. Yamamoto, Y. Taniyama, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, M. Horiuchi and T. Ogihara (2001) Mitogenic and antiapoptotic action of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and Akt in endothelial cells. *Hypertension* 37, iss 2, part 2 Suppl. S. pp581-586
 16. K. Matsumoto, R. Morishita, A. Moriguchi, N. Tomita, M. Aoki, H. Sakonjo, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2001) Inhibition of neointima by angiotensin-converting enzyme inhibitor in porcine coronary artery balloon-injury model. *Hypertension* 37, 270-274
 17. N. Tsuzuki, T. Miyazawa, K. Matsumoto, T. Nakamura, and K. Shima (2001) Hepatocyte growth factor reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurol. Res.* 23, 417-424
 18. M. Aoki, R. Morishita, S. Hayashi, N. Jo, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, T. Ogihara (2001) Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabetologia* 44, 1034-1042
 19. K. Beppu, A. Uchiyama, T. Morisaki, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Tanaka, and M. Katang (2001) Hepatocyte growth factor production by peripheral blood mononuclear cells of recurrent cancer patients. *Anticancer Research* 21, 2195-2200
 20. Y. Saga, H. Mizukami, M. Suzuki, M. Urabe, A. Kume, T. Nakamura, I. Sato and K. Ozawa (2001) Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. *Gene Therapy* 8, 1450-145
 21. T. Brzozowski, P. C. Konturek S. J. Konturek, D. Schuppan, D. Drozdowicz, S. Kwiecien, J. Majka, T. Nakamura and E. G. Hahn (2001) Effect of local application of growth factors on gastric ulcer healing and mucosal expression of cyclooxygenase-1 and -2. *Digestion* 64, 15-2
 22. C. Parr, G. Davies, T. Nakamura, K. Matsumoto, M. D. Mason and W. G. Jiang (2001) The HGF/SF-induced phosphorylation of paxillin, matrix adhesion and invasion of prostate cancer cells were suppressed by NK4, the HGF/SF variant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1330-133
 23. Z. Warzecha, A. Dembinski, P. C. Konturek, P. Ceranowicz, S. J. Konturek, R. Tomaszewska, D. Schuppan, J. Stachura, and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor attenuates pancreatic damage in caerulein-induced pancreatitis in rats. *Eur. J. pharmacol.* 430, 113-121
 24. D. Tomioka, N. Maehara, K. Kuba, K. Mizumoto, M. Tanaka, K. Matsumoto and T. Nakamura

- (2001) Inhibition of growth, invasion and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model. *Cancer Res.* 61, 7518-7524
25. H. Takahashi, U. Koshimizu, J. Miyazaki and T. Nakamura (2002) Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIM-kinase 2 gene. *Develop. Biol.*, 241, 259-272
 26. T. Sumi, K. Matsumoto, T. Nakamura (2002) Mitosis-Dependent Phosphorylation and Activation of LIM-Kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1315-1320
 27. H. Shibuki, N. Katai, S. Kuroiwa, T. Kurokawa, K. Matsumoto, T. Nakamura and N. Yoshimura (2002) Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemic-reperfusion injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43, 528-536
 28. Y. Taniyama, R. Morishita, K. Hiraoka, M. Aoki, H. Nakagami, K. Yamazaki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda and T. Ogihara (2002) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: Molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation* 104, 2344-2350
 29. M. Maemondo, K. Narumi, Y. Saijo, K. Usui, M. Tahara, R. Tazawa, K. Hagiwara, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Nukiwa (2002) Multi-molecular targeting for angiogenesis and HGF function by adenoviral vector expressing HGF antagonist, NK4 in cancer therapy. *Human Gene Therapy*, 5, 177-185, 2002
 30. H. Funakoshi, T. Yonemasu, T. Nakao, K. Matsumoto and T. Nakamura (2002) Identification of Gas 6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, in press
 31. W. Sun, H. Funakoshi and T. Nakamura (2002) Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met in the rat developing cerebral cortex. *Mol. Brain Res.*, in press
 32. Y. A. Kishi, H. Funakoshi, K. Miyamoto and T. Nakamura (2002) Xksy, a gene expressed in developing neural tissues, encodes a novel Sky family receptor tyrosine kinase with a glutamic acid-rich domain. *Gene*, in press
 33. Y. Sakamaki, K. Matsumoto, S. Mizuno, S. Miyoshi, H. Matsuda, T. Nakamura: Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, in press
 34. O. Amano, A. Yamane, U. Shimada, M. Koshimizu, T. Nakamura and S. Iseki (2002) Hepatocyte growth factor is essential for migration of myogenic cells and promotes their proliferation during the early periods of tongue morphogenesis in mouse embryos. *Dev. Dyn.*, in press
 35. T. Funatsu, Y. Sawa, S. Ohtake, T. Takahashi, G. Matsumiya, N. Matsuura, T. Nakamura and H. Matsuda (2002) Therapeutic angiogenesis induced by myocardial injection of naked cDNA plasmid encoding hepatocyte growth factor in ischemic canine heart. *J. Thoracic & Cardiovas. Surg.*, in press
 36. S. Miyagawa, Y. Sawa, S. Taketomi, N. Kawaguchi, T. Nakamura, N. Matsuura, and H. Matsuda (2002) Myocardial regeneration therapy for heart failure: Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation*, in press
- II. 英文総説
1. K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Intern* 59, 2023-2038
 2. K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) HGF-CMet receptor pathway in tumor invasion-metastasis and potential cancer treatment with NK4. *Growth Factors and Their Receptors in Cancer Metastasis* (eds. W.G. Jiang, K. Matsumoto and T. Nakamura) pp.241-276, Kluwer Acad. Pub.

臓器線維症の病態解明と新規治療法の開発に関する研究

分担研究者 上野 光 産業医科大学教授

研究要旨

炎症の遷延化や炎症に引き続く臓器線維症の分子病態の解明と新しい治療法の開発をめざしている。とくに TGF- β に着目して研究を進めてきた。線維化が確立した肝臓で、変異型 TGF- β 受容体の遺伝子導入により TGF- β の作用を特異的に抑制すると、線維症の緩解が誘導された。線維化の責任細胞である活性型伊東細胞が減少し、肝実質細胞の再生は亢進した。抗 TGF- β 療法は線維化の発症・進展を抑制できるだけでなく、その緩解をも促進できることが示された。高血糖状態で血管壁に傷害が加わると TGF- β の発現および細胞外マトリクスの沈着が亢進する。TGF- β を抑制すると細胞外マトリクスの蓄積が抑制され新生内膜形成（内膜肥厚）はほぼ完全に抑制された。糖尿病性血管傷害における TGF- β および細胞外マトリクスの病的意義と抗 TGF- β 療法の有用性が示唆された。

A. 研究目的

臓器線維症は進行性の臓器機能低下を招来し慢性的に患者の生活の質を著しく損ねるため臨床的には悪性疾患とも言え、病態の解明と有効な治療法の開発は重要な課題である。本研究では臓器線維化に重要と考えられる分子群やそれらの機能を抑制する分子群(Dominant-negative 受容体など)を、アデノウイルスベクターを用いて各疾患の動物モデル生体内に導入し、線維症発症・進展の分子機構の解析と有効な治療法の開発をめざす。とくに、細胞外マトリクスの産生・分解を制御している最重要分子である TGF- β に着目し、抗 TGF- β 療法の可能性を具体的な病態に即して検討する。

B. 研究方法

1. TGF- β の作用を特異的に抑制するために2種の変異型 TGF- β 受容体を作成した：

- i) II 型受容体の細胞内キナーゼ部分を欠失した変異型受容体 (Dominant-negative 受容体として野生型受容体機能を抑制する)、
- ii) II 型受容体の細胞外領域のみに免疫グロブリンの Fc 部分を融合させたキメラ体 (TGF- β を吸着。Dominant-negative 受容体としても作用する。可溶型受容体)。それぞれアデノウイルスベクターに組み込んだ (AdT β -TR および AdT β -ExR)。コントロールウイルスとして β -galactosidase 発現ウイルス AdLacZ を用いた。

2. 肝線維症モデル

Dimethylnitrosoamine (DMN)を3週間ラット腹腔内に投与し、線維肝を確立した。ここで尾静脈より AdT β -TR, AdLacZ もしくは生食水を注入した。遺伝子導入3週間後

に肝臓を解析した。線維化の程度はハイドロキシプロリンを定量して評価した。

3. 糖尿病傷害血管モデル

ラット腹腔内にストレプトゾトシンを注射し膵β細胞を破壊して高血糖とし2週間後、頸動脈にバルーン傷害を加え同時に AdTβ-ExR (あるいは AdLacZ、生食水) を感染させた。さらに2週間後に血管を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は産業医科大学での組換えDNA 審査委員会の承認を受けている。動物実験は産業医科大学動物実験委員会の承認を受け、国内法に定められた飼育方法に従った。なおアデノウイルスベクターは米国では臨床治験の承認を受けている。

C. 結果

肝線維化緩解実験

1. DMN 処理3週間で確立した線維化(ハイドロキシプロリン量で評価)は対照群(AdLacZ 群および生食水群)では DMN 処理を中止してさらに3週間経過してもほぼ同レベルに留まった。しかし AdTβ-TR 投与群ではハイドロキシプロリン量は DMN 処理3週間直後の45%に減少した。健常肝に比較して DMN 処理で増加したハイドロキシプロリン量の80%が緩解したことになる。

2. AdTβ-TR 投与群では肝実質細胞の再生が亢進した。

糖尿病性傷害血管壁実験

1. ストレプトゾトシン処理により血糖値は健常ラットの約7倍に上昇した。

2. 健常ラットのバルーン傷害血管壁に比べ、高血糖ラットの傷害血管壁では TGF-β の発現が上昇し細胞外マトリクスの蓄積

が有意に増加した。

3. 高血糖ラット傷害血管壁に AdTβ-ExR を導入すると、細胞外マトリクスの蓄積が抑制され、新生内膜肥厚は殆ど完全に抑制された。

D. 考察および結論

1) TGF-β を抑制することで線維症の緩解が促進されることがラット線維肝で示された。線維化の責任細胞である活性型伊東細胞は減少し、肝実質細胞の再生は亢進した。抗 TGF-β 療法の有用性をさらに示す結果が得られた。緩解促進の詳細な分子機構について現在解析中である。

2) 糖尿病状態(高血糖)で血管壁に傷害が加わると TGF-β の発現が上昇し、細胞外マトリクスの蓄積が亢進した。糖尿病患者では血管形成術後の再狭窄が高頻度で起る事実との関連が示唆される。

3) 糖尿病性傷害血管壁に対する抗 TGF-β 療法の応用の可能性が示唆された。

E. 研究発表

いずれの研究成果も論文投稿準備中である。

動脈硬化形成における炎症の関与の解明と治療への応用に関する研究
(分担) 研究者 森下 竜一 大阪大学医学部遺伝子治療学

炎症性サイトカイン及び接着因子発現に必須な転写因子NFκBに対するデコイの導入は、血管拡張術後再狭窄、慢性関節リウマチ、アトピー性皮膚炎などの各種炎症性疾患の新しい治療戦略として重要であることが明らかになった。

A、研究目的

炎症性転写因子であるNFκB活性化は、再狭窄、慢性関節リウマチ、アトピー性皮膚炎などのはじめとする多くの疾患で報告されているが、未だその役割は明らかでない。動脈硬化形成における炎症の関与を検討し、新規治療戦略を構築する。また、他の炎症性疾患の新しい治療戦略としてNFκBデコイの慢性関節リウマチ、アトピー性皮膚炎に対する治療効果を検討した。

B、研究方法

サル慢性関節リウマチモデルは、コラーゲンの複数感作により作成し、関節内にNFκBデコイを投与した。アトピー性皮膚炎に関しては、ダニ感作マウスモデルにおいてNFκBデコイ含有軟膏を顔面・背部に塗布し、皮膚症状を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、施設内の動物実験委員会の許可を得て実施した。また、臨床研究は施設内の倫理委員会の承認を得て実施した。

C、研究結果

慢性関節リウマチサルモデルにおいて、NFκBデコイの関節内投与による腫脹の軽減・骨破壊抑制を明らかにした。骨破壊抑制は、関節内サイトカイン(IL-1、TNF-α)の発現低下を伴っていた。また、明らかな副作用は認められなかった。一方、アトピー性皮膚炎モデルマウスに対して軟膏製剤を開発した結果、週1回の投与で著明な皮膚症状の改善を認めた。皮膚症状の軽減は、皮下への肥満細胞の浸潤抑制とアポトーシス促進を伴っていた。更に、発症後の投与

によっても、皮膚症状の軽減がみられた。

D、考察

本研究成果を元にして、2001年8月には「NFκBデコイによるヒト血管拡張術後再狭窄抑制の臨床研究」の許可を大阪大学医学部倫理委員会より得ており、現在実施に向けた最終準備をしている。更に、慢性関節リウマチやアトピー性皮膚炎など予定以上の成果を得ることができ、アトピー性皮膚炎は既に臨床研究を開始している(弘前大皮膚科との共同研究)。慢性関節リウマチに関しても、臨床研究を大阪大学倫理委員会に2月に申請して、審議中である。

E、結論

デコイによるNFκB活性化抑制は、血管拡張術後再狭窄の予防法として重要であることが明らかになった。本研究で示された再狭窄の遺伝子治療は、安全性が高く臨床応用に有用であると考えられる。また、アトピー性皮膚炎に関しては弘前大学皮膚科との共同研究で既に臨床研究を実施しているなど、NFκBデコイによる治療は、各種炎症性疾患の新しい治療戦略として有用であると考えられる。

F、研究発表

1、論文発表

Kawamura I, Morishita R (equal first author), Tsujimoto S, Manda T, Tomoi M, Tomita N, Goto T, Ogihara T, Kaneda Y. Intravenous injection of oligodeoxynucleotides to the NF-kappaB binding site inhibits hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma in mice. Gene Therapy 2001;8:905-912.

Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Lee KU,

動脈硬化形成における炎症の関与の解明と治療への応用に関する研究
(分担) 研究者 森下 竜一 大阪大学医学部遺伝子治療学

炎症性サイトカイン及び接着因子発現に必須な転写因子NFκBに対するデコイの導入は、血管拡張術後再狭窄、慢性関節リウマチ、アトピー性皮膚炎などの各種炎症性疾患の新しい治療戦略として重要であることが明らかになった。

Park JY, Jeon YJ, Song HS, Lee IK, Transcription factor decoy DON for activator protein-1 (AP-1 inhibits expression of type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene induced by high glucose and angiotensin II in cultured human vascular smooth muscle cells. Diabetologia 2001;44:713-720.	2001.6.22 10th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy Morishita R, Aoki M and Ogihara T. Oligonucleotide-based therapy for restenosis: A novel cardiovascular drug 2001 2001.3.28
Aoki M, Nata T, Morishita R , Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Nakabayashi M, Ogihara T, Kaneda Y. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NFκB: anti-apoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. Hypertension 2001;38:48-55	The Fifth Annual Scientific Meeting of Modern Medicine Morishita R. Challenge of gene therapy as next generation of cardiovascular drug 2001 2001.12.2
Yoshimura S, Morishita R , Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y, Sakai N, Ogihara T. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element "decoy" of nuclear factor-κB binding site as a novel molecular strategy. Gene Therapy 2001;8:1635-1642	The American Society of Gene Therapy 4th Annual Meeting Tomita N, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Development of tissue-specific strategy of gene therapy to glomerulonephritis 2001 2001.5.31
Morishita R , Aoki M, Kaneda Y, Ogihara T. Gene Therapy in vascular medicine: recent advances and future perspectives. Pharmacology & Therapeutics 2001;91:105-114	G、知的所有権の取得情況 1. 特許取得 なし
Nakamura T, Morishita R , Asai T, Tsuboniwa N, Aoki M, Sakonjo H, Yamasaki K, Hashiya N, Kaneda Y, Ogihara T. Molecular strategy using cis-element "decoy" of E2F binding site inhibits neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. Gene Therapy (in press)	2. 実用新案特許 なし
	3. その他 なし

2. 学会発表

第46回日本透析医学会学術集会総会特別講演 森下竜一 21世紀の遺伝子治療 2001

PPAR γ アゴニストを用いた炎症性腸疾患の新しい治療法の確立に関する研究

分担研究者 門脇 孝 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻糖尿病代謝内科助教授

研究要旨：DSS 腸炎マウスに PPAR γ リガンドを投与し、同剤により制御される遺伝子を包括的に解析した結果、DSS 刺激で発現が亢進し、かつ PPAR γ リガンドで抑制されるものとしては、炎症メディエーター、腸管での水・電解質代謝関連、薬物代謝、癌関連等の遺伝子が認められた。その中で Th1 サイトカインの低下、Th2 サイトカインの増加が示された。ヒト腸疾患の試験治療では、2 例の UC 患者では緩解導入後のステロイド離脱に pioglitazone は一定の効果があった。虚血性腸炎の 2 例の急性期に同剤は症状の軽快に著効を示した。

A.研究目的

PPAR γ リガンドの腸炎抑制効果の機序の包括的な解析を通して治療上の標的分子を探ることを目的とした。また、最終年度に当り、実際のヒト炎症性腸疾患での同剤の有効性の検証を目的とした。これらにより原因療法のない難治性疾患である炎症性腸疾患の治療法開発を目指した。

B.研究方法

マウス DSS 腸炎に Rosiglitazone を 30 mg/kg 経口で前投与し、DSS 投与後 1 日目、4 日目における遺伝子発現を Gene Chip(U-74 アレイ)により解析した。

ヒトでは、2 例の潰瘍性大腸炎、2 例の虚血性腸疾患患者に PPAR γ リガンドを投与して効果を見た。

(倫理面への配慮)

動物実験では苦痛のないよう全身麻酔下に行った。人への投与に当っては、インフォームドコンセントを得て行い、個人情報公表していない。

C.研究結果

PPAR γ 自身は炎症に伴って著減した。Day1 から Day4 にかけて発現が亢進し、かつ PPAR γ リガンド投与で発現が抑制される遺伝子としては、炎症メディエーター、腸管での水・電解質代謝に関係する遺伝子、薬物代謝遺伝子、癌遺伝子関連等が認められた。サイトカインでは TNF α や IFN γ の低下、IL-4、IL-10、GATA-3 の増加が示された。

2 例の UC 患者では緩解導入後のステロイド離脱に pioglitazone は一定の効果があった。虚血性腸炎の 2 例の急性期に同剤は症状の軽快に著効を示した。

D.考察

PPAR γ リガンドの傷害抑制作用は多くの遺伝子発現の変化を伴うことがわかった。中でも、Th1 優位の炎症を

Th2 にシフトさせる Biological Response Modifier(BRM)としての作用が重要であることが示された。このため、Th1 優位の炎症である Crohn 病での同リガンドの有効性が示唆された。

UC での治療効果は部分的なものだったが、これは炎症に伴い PPAR γ 発現が低下することが関係している可能性がある。虚血性腸炎については、発症後の投与にも拘らず有効で、動物実験から予想された以上の有用性が示唆された。

E.結論

PPAR γ リガンドは Th1 から Th2 へと炎症反応をシフトさせることにより傷害を抑制する。UC、Crohn 病や虚血性腸炎での有用性が考えられた。腸粘膜における発現の増強が今後更に治療効果を促進するのに重要と考えられた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

Yamauchi T et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) deficiency and PPAR γ agonist improve insulin resistance. J Biol Chem 276: 41245-54, 2001.

他 24 件

2.学会発表

Yamauchi et al. The optimal level of PPAR γ activity for insulin sensitivity and anti-obesity. (第 60 回米国糖尿病学会総会)

他 14 件

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

BMPによる心筋細胞分化誘導の機序に関する研究

分担研究者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授

研究要旨 突然変異 Csx/Nkx2-5 過剰発現させた P19CL6 細胞とマウスによる検討により、Csx/Nkx2-5 は成体においても心筋細胞をストレスから保護する重要な役割を担っていることが明らかとなった。

A. 研究目的

心筋新生および再生療法には心筋細胞分化に関する深い理解を要する。本研究では Csx/Nkx2-5 の分化した心筋細胞における役割について検討した。

B. 研究方法

野生型および突然変異 Csx/Nkx2-5cDNA を導入した P19CL6 細胞株を作成して心筋特異的遺伝子の発現、H₂O₂ 負荷によるアポトーシスについて野生型導入株と比較検討した。また、野生型 (WT-TG mice) および変異 Csx/Nkx2-5 遺伝子を過剰発現させたマウス (DN-TG mice) を作成し、Doxorubicin による心機能、アポトーシスについて比較した。

(倫理面への配慮)

千葉大学動物実験動物取り扱い規約を遵守して当該実験を行う。

C. 研究結果

変異 Csx/Nkx2-5 を導入した P19CL6 細胞株では MEF2C と MLC2v の発現亢進、心房利尿ペプチド遺伝子のプロモーター活性亢進が野生型導入株に比べて軽減された。突然変異導入 P19CL6 細胞は H₂O₂ 暴露により、野生型に比べて有意に細胞死が誘発された。DN-TG mice は WT-TG mice に比べて Doxorubicin による心機能障害が顕著でありアポトーシス細胞が多かった。

D. 考察

Csx/Nkx2-5 は心筋細胞をストレスから保護し、ストレスによる細胞死がヒト Csx/Nkx2-5 突然変異による心奇形の原因のひとつである可能性がある。

E. 結論

Csx/Nkx2-5 は種々のストレス下での心筋細胞のアポトーシスを抑制し、心筋保護に関与している。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Hosoda T, Komuro I, et al. A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes. *J Biol Chem* 276:35978-35989, 2001.

(2) Hiroi Y, Komuro I, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genetics* 28:276-280, 2001.

(3) Zou T, Komuro I, et al. Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 104:97-101, 2001.

2. 学会発表

(1) 小室一成：Cardiac Transcription Factors and Heart Failure. The 18th Annual Meeting ISHR Japanese Section. (2001, 秋田)

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

研究協力者 長田道夫 筑波大学臨床医学系助教授
糸球体再生を目指した糸球体上皮細胞の分化機構に関する研究

研究要旨

糸球体上皮細胞の分化維持、脱分化細胞への再分化誘導が糸球体硬化への新しい治療の方向性を持つと考え、糸球体の分化が活発なラット新生仔腎皮質に特異的に発現する遺伝子群をサブトラクションハイブリダイゼーション法によって探索した。糸球体発生過程で発現が亢進している遺伝子は未知の 30 個を含めた 117 種類で、糸球体成熟してから高度に発現する遺伝子は未知の 12 個を含めた 70 個得られた。糸球体の分化時期に高発現する遺伝子の中では DANCE, ezrin, glypican3, Mest, Fst1 など発生期に重要な因子も含まれており、今後これらの遺伝子について糸球体上皮細胞の分化に関わる機能を調べ、糸球体上皮細胞の分化誘導による障害糸球体のリモデリングの可能性を検討する。

A. 研究目的

慢性腎不全の直接原因である、糸球体硬化の共通の原因は終末分化細胞である糸球体上皮細胞の分化形質の喪失と細胞死であることをこれまで明らかにしてきた。したがって硬化糸球体の機能再生に向けては、糸球体上皮細胞の分化形質維持および脱分化細胞に対する再分化誘導が必要と考えている。これまで、糸球体上皮細胞の分化に関与する因子のひとつとして細胞周期抑制因子(cyclin kinase inhibitor)に注目しその役割を明らかにしてきた。本年度は、現在全く分かっていない糸球体上皮細胞の分化誘導因子を同定する目的で、糸球体の形態形成時期に高発現する遺伝子群をサブトラクションハイブリダイゼーション法によって探索した。

B. 研究方法

1) マウス新生仔より腎臓を 120 個採取し、トルネードエクストラクション法を用いて腎皮質のみから RNA を調整した。生後 4

週のマウス腎臓から糸球体を単離し、同様に RNA を調整した。これら相互において優位に発現する遺伝子をサブトラクションハイブリダイゼーション法によって得た。さらに、ドットプロット法、バーチャルノザン法により発現が新生仔腎皮質に高いことを確認した。

倫理面への配慮：マウスはエーテル麻酔により安楽死させた後、開腹して採取した。

C. 研究結果

1) 糸球体形成の活発な新生仔マウス腎皮質に優位に発現する遺伝子が 144 個得られ、それらの中から 139 個においてシーケンスを行った。既知の遺伝子は 87 種類、未知の遺伝子は 30 種類であり、ドットプロット法により、56 個が発生期腎皮質高発現であることが確認された。（表 1）

表一 1

B-cell receptor-associated protein 37 (Bcap37) (1)
cornichon (2)
developmental arteries and neural crest EGF-like protein (DANCE) (1)
ezrin (1)
follicle-stimulating-like (Fstl) (2)
fibroblast growth factor receptor 1-IIIb (1)
glypican 3 (Gpc3) (1)
kelch family protein Nd1-L (2)
myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (1)
mesoderm specific transcript (Mest) (1)

2) 糸球体成熟後に高発現する遺伝子は 200 個得られ、それらの中から 114 個においてシークエンスを行った。既知の遺伝子は 58 個、未知の遺伝子は 12 個であり、ドットプロット法により、40 個が成熟糸球体に高発現であることが確認された。(表 2)

表一 2

ANTIQUITIN (1)
BETA-UREIDOPROPIONASE (G6-09) (1)
CARBONIC ANHYDRASE XII PRECURSOR (1)
CHLORDENONE REDUCTASE (HUMAN) (3)
KIDNEY-SPECIFIC PROTEIN (4)
neuronal cell death related gene in neuron -7 (DN-7) (1)
TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR PRECURSOR (1)

D. 考案

糸球体の形成時期に高発現する遺伝子のなかから、DANCE, ezrin, glypican3, Mest, Fst1 など発生期に重要な因子も含まれており、糸球体形成に重要な意味を持つ可能性が考えられる。今後これらの因子の糸球体形成、糸球体上皮細胞の分化に関わる機能をさらに究明し、糸球体上皮細胞の分化・再生に関わる因子の同定と障害糸球体への導入により糸球体の機能再生の新しい方向性が確立されるものと期待する。

E. 結論

糸球体の機能再生を目指して、これまで未知

であった糸球体上皮細胞の分化誘導因子を同定するために、新生仔マウス腎皮質に高度に発現する遺伝子をいくつか同定できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- 1) Barisoni L, Mokrzycki M, Sablay L, **Nagata M**, Yamase H, Mudel P. Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. *Kidney Int* 2000; 58; 137-143.
- 2) **Nagata M**. Pathogenesis of glomerulosclerosis; role of epithelial interactions. *Clin Exp Nephrol* 2000; 4: 173-181.
- 3) Takemura T, Hino S, Kuwajima H, Yanagida H, Okada M, **Nagata M**, Sasaki S, Barasch J, Harris RC, Yoshioka K. Induction of collecting duct morphogenesis in vitro by heparin-binding EGF-like growth factor. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12: 964-972.
- 4) Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto Ki K, **Nagata M**: Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker Diabetic Fatty rats. *Lab Invest* 2002; 82: 25-35.
- 5) Hoshi S, Nomoto Ki K, Kuromitsu J, Tomari S, **Nagata M**: High Glucose Induced VEGF Expression via PKC and ERK in Glomerular Podocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 177-184.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

遺伝性脊髄小脳変性症における呼吸機能障害の究明

分担研究者 津田 丈秀 国立山形病院神経内科

研究要旨：CAG リピートの異常伸長を病因遺伝子とする遺伝性脊髄小脳変性症の呼吸機能障害を病型別に検討した。予後不良である Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)では高炭酸ガスに対する感受性の有意な低下を認めた。この結果は本疾患の死亡原因に関与し生命予後に影響する可能性を示唆した。

A. 研究目的

SCA1 は CAG リピートの異常伸長を原因とする常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症である。生命予後をみると他の遺伝性脊髄小脳変性症に比し予後不良な疾患である。この原因究明のため SCA1 を中心とする遺伝性脊髄小脳変性症の呼吸機能障害について詳細な検討を病型別におこなった。

B. 研究方法

対象はいずれも CAG リピートの異常伸長を病因遺伝子とする SCA1：7 例、MJD/SCA3：10 例、SCA6：8 例。また、対照疾患として孤発性 OPCA：14 例、Shy-Drager 症候群：7 例。吸気中の CO₂ 分圧と O₂ 分圧変化の自動調整可能な精密呼吸機能検査装置を用い各分圧変化後の分時換気量を算出し、その後、同一年齢健常群：10 例と比較検討した。尚、本検査は本人同意のうえ施行した。

C. 研究結果

高炭酸ガス感受性をみると健常群の平均値±標準誤差は 1.57 ± 0.26 (L/min ÷ % change in PaCO₂) に対し SCA1 では 0.75 ± 0.14 と有意な低下を認めた。しかし、その他の脊髄小脳変性症では異常を認めなかった。

一方、低酸素に対する感受性をみると健常群に比し、遺伝性脊髄小脳変性症では異常を認めなかったが、孤発例では以下のような所見を認めた。健常群の低酸素感受性の平均値±標準誤差は 0.52 ± 0.13 (L/min ÷ % change in SaO₂) に対し Shy-Drager 症候群や起立性低血圧など自律神経機能不全を伴う孤発性 OPCA の一群 (n=7) ではそれぞれ

0.11 ± 0.37 と 0.11 ± 0.04 と有意に低下していた。

D. 考察

以上の結果より次ぎの二つの可能性が示唆された。

- 1) SCA1 の高炭酸ガスに対する感受性の有意な低下は、本疾患が重篤な呼吸器疾患に陥りやすく、予後不良な原因の一つとなる可能性。
- 2) Shy-Drager 症候群や孤発性 OPCA の一群における生命予後も不良であるが、その詳細な機序は SCA1 と異なる可能性。

この結果は、遺伝性脊髄小脳変性症のみならず孤発例においても各病型により生命予後の異なる原因を考慮するうえで注目に値すると思われる。

E. 結論

今後も、分子生物学的アプローチも含めより詳細な病因究明とこれら研究結果を基盤とした治療法の確立が求められる。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Shiga, Y., Tsuda, T., Itoyama, Y., Shimizu, H., Miyazawa, K., Jin, K. and Yamazaki, T.: Transcranial magnetic stimulation alleviates truncal ataxia in spinocerebellar degeneration. J Neurol Neurosurgery Psychiatry (2002) 72: 124-126

2) Abe,T., Abe,K., Tsuda,T., Itoyama,Y. and Tamai,
M. : Ophthalmological findings in patients with
spinocerebellar ataxia type1 are not correlated with
neurological anticipation. Graef's Arch Clin Exp
Ophthalmol (2001) 239: 722-728

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Mitani H, Ishizawa H, Aizawa T, Ohno M, Usui M, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, Nangaku M, Hirata Y, Nagai R	Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage.	Hypertension	in press		
Fukino K, Suzuki T, Saito Y, Shindo T, Amaki T, Kurabayashi M, Nagai R	Regulation of Angiogenesis by the Aging Suppressor Gene klotho	Biochem Biophys Res Commun	in press		
Sata M, Saiura A, Kunisata A, Okada S, Hirata Y, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Nagai R	Hematopoietic stem cells differentiate into vascular progenitor cells that contribute to atherosclerosis	Nature Med	in press		
Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M.	PPAR γ ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells.	Circ Res	90	348-355	2002
Maeno T, Tanaka T, Sando Y, Suga T, Maeno Y, Nakagawa J, Hosono T, Sato M, Akiyama H, Kishi S, Nagai R, Kurabayashi M.	Stimulation of vascular endothelial growth factor gene transcription by all trans retinoic acid through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells.	Am J Respir Cell Mol Biol.	26	246-253	2002
Aizawa T, Ishizaka N, Usui S, Ohashi N, Ohno M, Nagai R.	Angiotensin II and catecholamines increase plasma levels of 8-epi-prostaglandin F(2 α) with different pressor dependencies in rats.	Hypertension	39	149-154	2002
Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui Si S, Mori I, Tang SS, Ingelfinger JR, Kimura S, Nagai R.	Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II.	Hypertension	39	122-128	2002
Ishizaka N, Aizawa T, Yamazaki I, Usui S, Mori I, Kurokawa K, Tang SS, Ingelfinger JR, Ohno M, Nagai R.	Abnormal iron deposition in renal cells in the rat with chronic angiotensin II administration.	Lab Invest	82	87-96	2002
Sato M, Tanaka T, Maeno T, Sando Y, Suga T, Maeno Y, Sato H, Nagai R, Kurabayashi M.	Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells. Role of Src family kinases-dependent pathway.	Am J Respir Cell Mol Biol	26	127-134	2002
Iwasaki T, Iwasaki T, Aihara Y, Kanda T, Oriuchi N, Endo K, Katoh H, Suzuki T, Nagai R	Immunoscintigraphy of aortic dissection with 99mTc-labeled murine anti-smooth muscle myosin monoclonal antibody in rats	J Nucl Med	42	130-137	2001
Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M	Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis.	Nature Med	7	382-383	2001
Ogata T, Nagai R, Kurabayashi M, Hoshino Y, Sekiguchi K, Kowase K, Akuzawa A, Ishikawa S, Takeyoshi I, Morishita Y	Inducible expression of basic transcription factor binding protein 2 plays a potential role in the development of the allograft vascular disease.	J Heart Lung Transplant	20	228	2001

Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R	Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese: An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes.	Thromb Haemost	85	226-230	2001
Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Saubermann LJ, Kadowaki T, Blumberg RS, Nagai R, Matsuhashi N	Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury.	Gastroenterology	120	460-469	2001
Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R	Homeobox protein hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element.	Circ Res	88	52-28	2001
Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda Si, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M	Transforming growth factor- β /Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells	Circ Res	88	30-36	2001
Morita H, Kurihara H, Yoshida S, Saito Y, Shindo T, Oh-hashii Y, Kurihara Y, Yazaki Y, Nagai R	Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury.	Circulation	103	133-139	2001
Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Amaki T, Kawai-Kowase K, Sekiguchi KI, Kurabayashi M.	Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms.	Ann N Y Acad Sci	947	56-66	2001
Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R.	Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors.	Hypertens Res	24	705-9	2001
Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair A, Scheuermann R, Kuro-o M.	Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways.	J Immunol	167	2625-31	2001

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
Nishimura EK, et al	Dominant role of niche in melanocyte stem cell fate determination.	<i>Nature</i>		in press	2002
Fujimoto T,	Step-wise divergence of primitive and definitive hematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation.	<i>Genes to Cells</i>	6:	1113 1127	2001
Oh J, et al	The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis.	Cell	107	789 800	2001
Nishikawa SI	A complex linkage in the developmental pathway of endothelial and hematopoietic cells	Cur Opin Cell Biol	13	673 678	2001
Yoshida H, et al	Expression of $\alpha 4.7$ integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T-, Fetal intestinal lymphotoxin producer-, natural killer-, and dendritic-cells.	J. Immunol.	167	2511 2521	2001
Sano H, et al	Functional blockade of platelet-derived growth factor β but not receptor α prevents vascular smooth muscle cell accumulation in the fibrous cap in apolipoprotein E-deficient mice.	Circulation	103	2955 2960	2001

別紙5 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Mizuguchi R. et al.	Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons.	Neuron	31	757-771	2001
Yamamoto S. et al.	Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord.	Exp. Neurol.	172	115-127	2001
Yamamoto S. et al.	Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord.	J. Neurosci.	21	9814-9823	2001
Yamamoto N. et al.	Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor.	J. Biol. Chem.	276	45031-45040	2001
Kato M. et al.	Identification of Sonic hedgehog-Responsive Genes by Using cDNA Microarray.	B.B.R.C.	289	472-478	2001
Imai T. et al.	The neural RNA-binding protein Musashi 1 translationally regulates the <i>m-numb</i> gene expression by interacting with its mRNA.	Mol. Cell Biol.	21	3888-3900	2001
Nakashima K. et al.	BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis.	Proc. nat. Acad. Sci. USA	98	5868-5873	2001
Kobayashi D. et al.	Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals.	Development	129	83-93	2002
Fu H. et al.	Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation.	Development	129	681-693	2002
Kamimori K. et al.	Cell-type specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat.	Mol. Brain Res.		in press	2002
Heins N. et al.	Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6.	Nat. Neurosci.		in press	2002