

- 5) Hideaki Moriwaki, Noriaki Kume, Tatsuya Sawamura, Takuma Aoyama, Hajime Hoshikawa, Hiroshi Ochi, Eiichiro Nishi, Tomoh Masaki, and Toru Kita
Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. vol. 18, 1541-1547, 1998
- 6) Hideaki Moriwaki, Noriaki Kume, Hiroharu Kataoka, Takatoshi Murase, Eiichiro Nishi, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Toru Kita
Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages - upregulated expression by TNF- α
FEBS Lett. vol. 440, 29-32, 1998
- 7) Hiroharu Kataoka, Noriaki Kume, Susumu Miyamoto, Manabu Minami, Hideaki Moriwaki, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Nobuo Hashimoto, Toru Kita
Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions
Circulation vol. 99, 3110-3117, 1999.
- 8) Takatoshi Murase, Noriaki Kume, Hiroharu Kataoka, Manabu Minami, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Toru Kita
Identification of soluble forms of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. vol. 20: 715-720, 2000
- 9) Hiroharu Kataoka, Noriaki Kume, Susumu Miyamoto, Takatoshi Murase, Manabu Minami, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Nobuo Hashimoto, Toru Kita
Biosynthesis and posttranslational processing of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects the cell-surface expression and the ligand binding.
J. Biol. Chem. vol. 275: 6573-6579, 2000
- 10) Manabu Minami, Noriaki Kume, Hiroharu Kataoka, Masafumi Morimoto, Kazutaka Hayashida, Tatsuya Sawamura,

Tomoh Masaki, Toru Kita

Transforming growth factor- β 1 increases the expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1.

Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 272: 357-361, 2000

11) Mingyi Chen, Makoto Kakutani, Manabu Minami, Hiroharu Kataoka, Noriaki Kume, Shuh Narumiya, Toru Kita, Tomoh Masaki, Tatsuya Sawamura

Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. vol. 20: 1107-1115, 2000

12) Kita, T, Kume N, Ishii K, Arai H, Horiuchi H, Yokode M.

LOX-1 and atherosclerosis Gerontological approaches to care for the aged in the 21st century

Proceedings of the 6th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology 59-64, 2000

13) Toru Kita, Noriaki Kume, Masayuki Yokode, Kenji Ishii, Hidenori Arai, Hisanori Horiuchi, Hideaki Moriwaki, Manabu Minami, Hiroharu Kataoka, Yoshio Wakatsuki

Oxidized LDL and atherosclerosis Role of LOX-1.

Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 902: 95-102, 2000

14) Noriaki Kume, Hideaki Moriwaki, Hiroharu Kataoka, Manabu Minami, Takatoshi Murase, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Toru Kita

Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL in macrophages and vascular smooth muscle cells.

Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 902: 323-327, 2000

15) Hiroharu Kataoka, Noriaki Kume, Hideaki Moriwaki, Manabu Minami, Hideaki Moriwaki, Tatsuya Sawamura, Tomoh Masaki, Toru Kita

Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human atherosclerotic lesions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 902: 328-335, 2000

16) Minami M, Kume N, Kataoka H,

Morimoto M, Kita T.

TGF- β 1 increases the expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)

In: Stemme S., Olsson AG (eds.) Atherosclerosis XII, Elsevier Science, The Netherlands, 275-276, 2000

17) Kume N, Murase T, Moriwaki H, Kataoka H, Minami M, Kita T.

Inducible expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in vascular endothelial cells and macrophages.

In: Kita T, Yokode M, (eds.) Lipoprotein metabolism and atherosclerosis, Springer Verlag, Tokyo, 199-206, 2000.

18) Hiroharu Kataoka, Noriaki Kume, Susumu Miyamoto, Manabu Minami, Masafumi Morimoto, Kazutaka Hayashida, Nobuo Hashimoto, Toru Kita

Oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) modulates Bax/Bcl-2 through lectin-like Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. vol. 21: 955-960, 2001

19) Takeshi Shimaoka, Noriaki Kume, Manabu Minami, Kazutaka Hayashida, Tatsuya Sawamura, Toru Kita, and Shin Yonehara

LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

J. Immunol. vol. 166: 5108-5114, 2001

20) Takeshi Shimaoka, Noriaki Kume, Manabu Minami, Kazutaka Hayashida, Tatsuya Sawamura, Toru Kita, Shin Yonehara

Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) supports cell adhesion to fibronectin.

FEBS Lett. vol. 504: 65-68, 2001

21) Noriaki Kume, Toru Kita

Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherogenesis.

Noriaki Kume, Toru Kita

Trends Cardiovasc. Med. vol. 11: 22-25, 2001

22) Noriaki Kume, Toru Kita

Roles of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and its

soluble forms in atherogenesis.

Curr. Opin. Lipidol. vol. 12: 419-423, 2001

23) Kazutaka Hayashida, Noriaki Kume,
Manabu Minami, Toru Kita
Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)
supports adhesion of mononuclear
leukocytes and a monocyte-like cell line
THP-1 cells under static and flow conditions.
FEBS Lett. vol. 511: 133-138, 2002

24) Kazutaka Hayashida, Noriaki Kume,
Manabu Minami, Hiroharu Kataoka,
Masafumi Morimoto, Toru Kita
Peroxisome proliferator-activated receptor- α
ligands increase lectin-like oxidized low
density lipoprotein receptor-1 expression in
vascular endothelial cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 947: 370-372, 2002

25) Toru Kita, Noriaki Kume, Manabu
Minami, Kazutaka Hayashida, Toshinori
Murayama, Hideto Sano, Hideaki Moriwaki,
Hiroshi Kataoka, Eiichiro Nishi, Hisanori
Horiuchi, Hidenori Arai, Masayuki Yokode
Role of oxidized LDL in atherogenesis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 947: 199-206, 2002

26) Noriaki Kume, Toru Kita

New scavenger receptors and their functions
in atherogenesis.

Current Atherosclerosis Reports vol. 4:
253-257, 2002

27) Noriaki Kume, Toru Kita

Roles of oxidized low-density lipoprotein and
its receptors in the pathogenesis of
atherosclerotic diseases.

Geriatrics Gerontology International vol. 2:
172-178, 2002

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

心筋梗塞、脳硬塞の予知因子としての血小板活性化の評価法に関する研究

分担研究者 堀内 久徳 京都大学大学院医学研究科老年内科助手

研究要旨：血小板活性化は動脈血栓症の引き金であり、血小板活性化指標が予知因子となる可能性があるが、測定法が不安定なため広く臨床応用されていない。血小板活性化の分子メカニズムは、不明な点が多い。それは、血小板に蛋白合成能がないために分子生物学をこの分野に用いることができなく、主として、薬理学的研究に留まっていたことが大きな理由である。本年度までに、形質膜透過型血小板を用いた極めて安定な顆粒放出アッセイ系、凝集アッセイ系を確立することができ、血小板活性化の分子機構を解析している。本年度は、small GTPase Rab27 が濃染顆粒放出を制御していること（投稿中）、PKC ζ が凝集を制御していること（投稿中）を直接的に証明した。さらに、現在、抗血小板療法は心筋梗塞・脳梗塞の有効な予防法として証明され、非常に多くの患者が抗血小板療法を受けている。抗血小板療法は同時に脳出血や消化管出血などの出血性副作用の頻度を増加させる。ワーファリンを用いた抗凝固療法では、その効果はプロトロンビン時間（PT）をモニターすることによりモニターされ、適度な効果が得られ、過剰による出血性合併症を避けられるように容量が調節される。しかしながら、現在、抗血小板療法では、その効果を判定・モニターする適切な検査法がないので、十分な効果が得られているのか、あるいは、効きすぎて安全域を越えているのか、判断できない。平成14年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法の開発する目的にて、京都大学工学部の研究グループと血小板凝集を促進する素材の開発を通じ、抗血小板療法モニタリングシステムの開発を開始した。

A. 研究目的：動脈硬化を基盤にして生じた動脈血栓により、心筋梗塞症や脳梗塞症等の心血管障害が発症し、高齢者の生命予後やQOLに深く関与する。動脈血栓形成の引き金は、血小板の活性化にあることが判明しているが、血小板活性化の評価法は、これまでのところ、臨床の場で広く使われているものはない。さらに、現在、抗血小板療法は心筋梗塞・脳梗塞の有効な予防法として証明され、非常に多くの患者が抗血小板療法を受けている。抗血小板療法は同時に脳出血や消化管出血などの出血性副作用の頻度を増加させる。ワーファリンを用いた抗凝固療法では、その効果はプロトロンビン時間 (PT) をモニターすることによりモニターされ、適度な効果が得られ、過剰による出血性合併症を避けられるように容量が調節される。しかしながら、現在、抗血小板療法では、その効果を判定・モニターする適切な検査法がないので、十分な効果が得られているのか、あるいは、効きすぎて安全域を越えているのか、判断できない。血小板活性化の指標としては、血小板特異的分子である β TG等の血清濃度が報告されてはいるが、測定値が非常に不安定なこともあり、これまでのところ広く臨床の場で用いられてはいない。そこで、われわれは、本研究では臨床の場で広く用いられるような

血小板活性化の指標の確立・抗血小板療法の効果モニター法の開発を目的とした。

B. 研究方法：

1. 透過型血小板を用いた血小板活性化メカニズムの解析：Streptolysin O(SLO)は細胞膜に径約 30nm の一様な穴をあける。蛋白質などは自由にその穴を行き来できるが、細胞内顆粒を含め細胞内小器官は通過できない大きさである。SLO は孔を開けずに4℃で形質膜に結合できる。そのため、SLO を血小板に4℃で結合させ、血小板を洗浄することによって結合していない SLO を除いた後に、温度を上昇させることにより形質膜のみを透過型にできる。

(1). 顆粒放出解析系：顆粒放出反応については、放出された α 顆粒は von Willebrand 因子 (vWF) をウェスタンブロット法にて、放出された濃染顆粒はあらかじめ血小板に取り込ませた $[^3H]$ セロトニンのカウントを測定することにより解析している。顆粒放出反応の引き金は細胞内 Ca イオンの上昇であるが本アッセイでは透過型細胞を用いているため細胞内外の Ca イオンが等しくなるので、顆粒放出刺激は Ca 塩としている。この系では、外部より ATP と細胞質を補充しなけ

ればいずれの放出も起きず、両顆粒の放出には、エネルギーと細胞質因子の存在が必須であることが示唆された。

(2). 凝集解析系:同様の、形質膜を透過型血小板を用い、従来よりの光透過度測定による凝集アッセイ系を確立しえた。外部より細胞質を加えないと刺激をしても凝集が起こらない(細胞質依存性)ので、細胞質中の必須分子の存在が示唆された。

2. 血小板活性化評価法の開発:本テーマは未だ予備実験の域を出ないが、平成14年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法の開発する目的にて、京都大学工学部の研究グループと血小板凝集を促進する素材の開発を通じ、抗血小板療法モニタリングシステムの開発を進めた。

C. 研究結果:

本年度は、small GTPase Rab27が濃染顆粒放出を制御していること(投稿中)、PKC γ が凝集を制御していること(投稿中)を直接的に証明した。

Streptolysin-O (SLO)は細胞膜に径約30nmの一様な穴をあける。蛋白質などは自由にその穴を行き来できるが、細胞内顆粒を含め細胞内小器官は通過できない大きさである。SLOは孔を開けずに4°Cで形質膜に結合できるので

SLOを血小板に4°Cで結合させ、血小板を洗浄することによって結合していないSLOを除いた後に、温度を上昇させることにより形質膜のみを透過型にすることができる。顆粒放出反応の引き金は細胞内Ca²⁺イオンの上昇であるが本アッセイでは透過型細胞を用いているため細胞内外のCa²⁺イオンが等しくなるので、顆粒放出刺激はCa²⁺塩としている。放出された α 顆粒中のvon Willebrand因子(vWF)をウェスタンブロット法にて測定し、あらかじめ血小板濃染顆粒に取り込ませておいた³Hセロトニンの放出量をカウントすることにより、 α 顆粒及び濃染顆粒の放出を同時に解析する方法を確立した。この系では、外部よりATPと細胞質を補充しなければいずれの放出も起きず、両顆粒の放出には、エネルギーと細胞質因子の存在が必須であることが示唆された。私達はすでに、必須細胞質因子のひとつを精製し、PKC α と同定している。また、低分子量GTP結合蛋白質Rab4が α 顆粒分泌を制御していることも見出している。

変異マウス *ashen* は、皮膚色の異常、免疫異常および血小板異常による出血時間延長を来すが、その原因が低分子量GTP結合蛋白質Rab27Aの異常であることが明らかになった。色素異常はメラノサイト内でのメラノソームの輸送障害によって生じ、免疫異常は細胞障害性Tリンパ球のlytic granuleの分泌

障害によることが明らかになっている。出血時間延長は血小板異常によるとされ、血小板濃染顆粒が形成されないためであるとされた。しかし、血小板には、Rab27B が存在し、Rab27B が Rab27A の欠損を補うため、*ashen* マウスの血小板および出血時間は正常とする報告もある。一連のメラノソーム、lytic granule、血小板濃染顆粒は膜上にリソソームに特異的な蛋白質を有し、リソソーム関連小器官(Lysosome-related organelles)と分類されている。そのため、我々は、本研究において Rab27 の血小板濃染顆粒放出への関与を解析した。Rab27A の標的蛋白質は数個同定されているが、アミノ末端の約 100 アミノ酸よりなる SLD ドメインで GTP 結合型 Rab27A に結合することが報告されている。その中で、Slac2-b と名付けられた蛋白質は、Rab27A 特異的であり、我々は、Slac2-b の Rab27A 結合ドメイン (SHD ドメイン) のみを含む約 100 アミノ酸よりなるペプチドを大腸菌で作成・精製した。その蛋白質は GTP 結合型の Rab27A および Rab27B に特異的に結合した。Slac2-b は Rab27A および Rab27B の共通の標的蛋白質と言えよう。さらに、SHD ドメイン中の保存されている10番目のグルタミン酸をアラニンに変えたミュータントを作成したが、そのミュータントと Rab27A/B との結合は非常に弱かった。そして、それらの SHD ドメインを顆粒放出アッセイ系に加えたが

、SHD ドメインは強く濃染顆粒放出を抑制した。しかし、一アミノ酸変異の SHD-E10A はほとんど抑制しなかったため、SHD ドメインの特異性が確認されている。おそらく、加えた SHD ドメインは GTP 結合型 Rab27A/B と結合し、機能をブロックすることで放出反応を阻害しているであろう。

さらに、顆粒放出アッセイ系に、大腸菌より精製した Rab27A を過剰量加えても濃染顆粒放出が抑制されたが、Rab3B, Rab4B, Rab5A, Rap1B を同量加えても影響はなかった。加えた Rab27A は、顆粒放出に必要な Rab27A の標的蛋白質をブロックしているであろう。

さらに、血小板凝集においても同様のセミインタクトアッセイを確立することができた。外部より加える細胞質より、抗体を用いて PKC ζ を除くと、凝集はおこらず、そこに精製した PKC ζ をくわえると、凝集反応は回復した。しかし、精製した PKC ζ だけでは、凝集反応は起こらなかった。

D. 考察：Rab27A は血小板濃染顆粒放出を制御していると考えられた (投稿中)。さらに、活性型である GTP 結合型 Rab27A に特異的に結合する蛋白質 (p120) を血小板細胞質分画よりアフィニティ法により見出し、現在、解析しており、Rab27A を糸口にして、血

血小板濃染顆粒放出の分子メカニズムを解明していきたいと考えている。さらに、凝集には、PKC ζ が十分因子ではないが、必須因子であると考えられた（投稿中）。本アッセイ系を用いて必須因子を同定しつつある。さらに多くの必須因子を同定し、それらの時間的・空間的相互関係を見出し、血小板活性化反応の分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。そして、それらの知見を基に、創薬にかかわる鍵分子を見出したり、抗血小板療法のモニターシステムの構築に結びつけていきたいと考えている。

E. 結論：血小板活性化の分子メカニズムを解明するための、強力なツールとして透過型血小板を用いた顆粒放出および凝集アッセイ系を確立し得た。本アッセイ系を用いて必須因子を同定しつつある。

F. 健康危険情報：なし

G. 平成14年度業績：

1. A. Yoshioka, R. Shirakawa, H. Nishioka, A. Tabuchi, T. Higashi, A. Yamamoto, T. Kita, and H. Horiuchi (2001) Identification of protein kinase Ca as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca²⁺-induced

a-and dense-core granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem.* 276, 39379-39385

2. Fukuhara, A., Irie, K., Nakanishi, H., Takekuni, K., Kawakatsu, T., Ikeda, W., Yamada, A., Katata, T., Honda, T., Sato, T., Shimizu, K. Ozaki, H. Horiuchi, H., Kita T. and Takai Y. (2002) Involvement of Nectin in the Localization of Junctional of Adhesion Molecule at Tight Junctions. *Oncogene* 21:7642-7655.

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

分担研究者 (京都大学 荒井秀典)

研究要旨

新規増殖因子 growth arrest specific gene 6(Gas6)の血管障害における役割を分析するため、糖尿病性腎症における Gas6 の役割について検討した。今後は Gas6 の ELISA の系を確立し、動脈硬化性疾患を持つ患者や糖尿病患者における血中濃度の解析を行う。

A. 研究目的

Gas6 (growth arrest-specific gene 6) は細胞増殖停止時に発現誘導される遺伝子群の一つとしてクローニングされ、その作用として G 蛋白結合型受容体を介した平滑筋増殖作用を増強することが示された。Gas6 はその N 末端に Gla domain が存在し、これがビタミン K 存在下に γカルボキシル化される (Gla 化) ことによって生理活性を獲得し、ビタミンK阻害剤であるワーファリンによりこの Gla 化が阻害され、Gas6 が不活化されることが明らかにされた。我々は腎炎治療においてワーファリンが使用されているにもかかわらず、その作用機序が明らかになっていないことに着目し、Gas6 によるメサンギウム細胞への影響に関して解析を始めた。今回我々は糖尿病性腎症の初期において認められ、その発症のキーとなると考えられているメサンギウム細胞肥大に Gas6 が関与しているか否かにつき、まず in vitro で検討すると同時に糖尿病性腎症など腎不全により透析中の患者の血清 Gas6 濃度測定のための ELISA 法を確立する。

B. 研究方法

糖尿病性腎症初期において Gas6 を誘導するものとして高血糖や過濾過による糸球体の過伸展が考えられる。我々はまず培養メサンギウム細胞を高血糖培地で培養し、低血糖培地のものと比較して、Gas6 やその受容体である Axl の発現の亢進

を検討する。次に Gas6 がメサンギウム細胞肥大に関与するかどうかを検討するため、in vitro においてメサンギウム細胞に Gas6 を添加し、[3H]ロイシンの取り込みとフローサイトメリーにて細胞の肥大を評価、検討する。また、Gas6 の受容体である Axl の細胞外ドメインを同時に加えることにより、Gas6 による作用が特異的に阻害されるかどうかについても検討する。次に Gas6 のシグナル伝達に重要と考えられる MAP キナーゼ、STAT3 の関与について、細胞肥大における役割について検討する。また糖尿病性腎症は最終的には糸球体硬化に至るため、メサンギウム細胞に Gas6 を投与することにより、硬化病変の構成分子であるラミニン、I 型、III 型、IV 型コラーゲン、フィブロネクチン等の産生が亢進するか否かを検討することにより、Gas6 が発症早期のみならず、後期に至るまで病態に関与するか否かを解析する。

2. ワーファリンによる糖尿病モデル動物の治療

in vivo においてはストレプトゾトシンによる糖尿病ラットを作製し、糸球体における Gas6、Axl の発現、尿中アルブミン、糸球体肥大につき検討する。またワーファリンによる治療により尿中アルブミンと糸球体肥大が変化するかどうかに関しても検討する。加えてこれまでに我々は Gas6 の受容体 Axl の細胞外部分と Fc 部分の融合蛋白 (Am J Pathol 158:1423-1432,2001) を投与することにより、急性

糸球体腎炎の発症を抑制することを明らかにしたが、ストレプトゾトシンによる糖尿病ラットに対し、この融合蛋白を投与し、Gas6 を特異的に阻害することによる腎症の変化をマウスの場合と同じく腎肥大の程度、蛋白尿の量を定量することにより検討する。

また、Gas6 ノックアウトマウスにストレプトゾトシンによる糖尿病を作成し、野生型と比べ腎病変の比較を行う。さらに我々はマウスのメサンギウム細胞の培養、継代に成功しており、この細胞を用いて野生型との増殖や肥大といった機能の比較を行う。

3. 臨床研究

これらの研究により、Gas6 の糖尿病性腎症への関与を明らかにした後、私共は血中 Gas6 を測定する ELISA の系を用い、一部の血液透析患者において Gas6 高値を認めることを確認している。今後正常人や糖尿病患者での血中濃度の測定を行い、Gas6 血中濃度と病勢との関係を解析し、ワーファリン治療への反応性との相関を検討する。

C&D. 研究結果と考察

まず Gas6 による細胞肥大能を検討するためロイシン取り込みをその指標として用いた。2 日間 starve したメサンギウム細胞に Gas6 を投与し、18 時間後にロイシンを加え、24 時間後に細胞内に取り込まれたロイシンの量を測定した。Gas6 は dose dependent にロイシンの取り込み増加を認め、その作用は Axl-Fc で阻害された。コントロールの Fc では変化を認めなかった。また、G1a 化されていない Gas6 ではその作用はほとんど認められなかった。この結果により Gas6 はメサンギウム細胞に対して肥大作用があることを示唆された。

次に肥大作用をさらに確認するために先ほどと同様に Gas6 にて刺激後 24 時間後に、Flow Cytometry にて大きさを検討した。ロイシン取り込み実験と同様、G1a 化されていない Gas6 ではその作用はほとんどみとめられず、Gas6 において細胞肥大作用を認めた。

次に、Gas6 が糖尿病性腎症において関与して

いるかどうかを検討するため、まず高血糖による細胞肥大への Gas6 の関与をロイシン取り込み実験で検討した。低血糖培地と高血糖培地による starve を施行したのち、24 時間後にロイシンを加え、36 時間後に回収した。高血糖によりロイシンの取り込みが増加した。この増加はワーファリンを加えることにより抑制された。

Axl-Fc でも同様な結果がえられ、Fc では抑制されなかった。間接的ではあるが高血糖の状態において Gas6/Axl の signal 伝達系を介した細胞肥大がおこっていることが示唆される。

このように in vitro において高血糖により Gas6/Axl が刺激され、メサンギウム細胞肥大が起きることが示唆された。

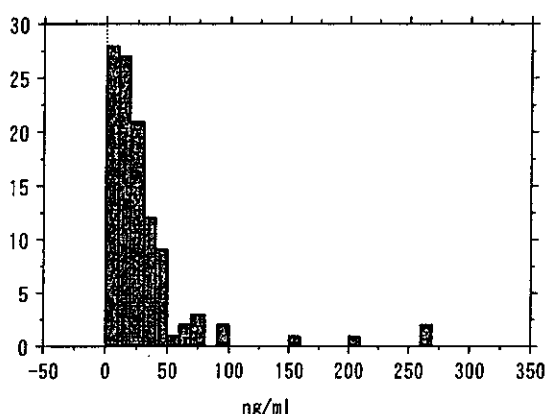
次に in vivo においてその仮説をさらに検証するため、ストレプトゾトシンによる糖尿病ラットを作成し、Gas6 の関与を検討した。非糖尿病ラット群、非糖尿病ラットにワーファリンを飲ませた群、糖尿病ラット群、糖尿病ラットにワーファリンを飲ませた群の 4 群を作成し、12 週後に蓄尿した後 sacrifice し、検討を行った。非糖尿病群にワーファリンを飲ませた群には 0.25MG/L のワーファリンを飲水に加えた。糖尿病群にワーファリンを飲ませた群は飲水量が多いため、3 日目より4分の1に減量した。

腎重量を体重で補正した値は非糖尿病群に比べ糖尿病群で増加しているもののワーファリン群とは差がなかった。血中ワーファリン濃度は抗凝固作用の濃度の約 50%であった。

蛍光抗体法による腎の組織像では糸球体の内皮細胞とメサンギウム細胞と思われる領域に Gas6 の発現増強を認めた。Axl に関しても同様の所見がえられた。

次に糸球体蛋白の Western blot において、Gas6 の発現は STZ ラットにおいて増加していた。ワーファリン治療群において Gas6 の発現は変化しないが、これは使用した抗体が G1a 化の有無を認識できないためと考えられる。Axl に関しても発現が増加しており、それがワーファリンにより抑制され

た。また STZ ラットにおいてみられる ERK のリン酸化がワーファリンにより抑制された。ERK は proein kinase C や TGF- β の下流に存在し、糖尿病性腎症に関与すると言われている一方、Gas6 の下流にも存在することが in vitro にて報告されている。いずれにせよ直接的であれ間接的であれワーファリンの糖尿病性腎症に対する効果を示唆している。



次に糖尿病性腎症の予後に関連するといわれる糸球体の大きさを測定した。顕微鏡にて糸球体を各個体に対して50個無作為に抽出し、その tuft の surface area を Image analyzer にて測定した。すると STZ ラットにおいては糸球体肥大が認められるが、ワーファリン治療群ではその糸球体肥大がおさえられた。

次に機能的な面における検討として糸球体濾過値を検討した。体重で補正した値を比較するとワーファリン群では糖尿病による過剰濾過が抑えられた。

また尿中アルブミンを ELIZA にて測定したところワーファリン群にて著明に減少していることも明らかになった。

以上組織学的にも機能的にも糖尿病の初期病変がワーファリンによって抑制されていることが明らかになった。

E. 結論

Gas6 は糖尿病性腎症の初期過程におけるメサンギウム細胞肥大に関与し、ワーファリンは Gas6 の活性化を抑制することによりメサンギウム細胞肥大

が抑制される。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

なし。

論文発表

1. Yanagita, M., Ishii, K., Ozaki, H., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Kita, T., and Doi, T. Warfarin inhibits Gas6-mediated mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 10: 2503-2509, 1999
2. Yanagita, M., Arai, H., Ishii, K., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Varnum, B., Fukatsu, A., Doi, T., and Kita, T. Gas6/Axl as central mediators of mesangial cell proliferation in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 158:1423-1432, 2001
3. Yanagita, M., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Fukatsu, A., Doi, T., and Kita, T. Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J Biol Chem*, 276:42364-42369, 2001
4. Yanagita, M., Ishimoto, Y., Arai, H., Nagai, K., Ito, T., Nakano, T., Salant, DJ., Fukatsu, A., Doi, T., Kita, T. Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 110:239-246, 2002

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

研究要旨

SR-PSOX の生体内での発現様式を調べ、疾患における発現の変化を検討した。SR-PSOX は心臓の弁をおおう内皮細胞に特異的に発現しており、感染性心内膜炎など急性の炎症性弁疾患で発現が上昇することが判明した。可溶性 SR-PSOX は感染性心内膜炎の診断や経過をみるうえで、有用なマーカーになる可能性がある。

A. 研究目的

SR-PSOX は新規スカベンジャー受容体で、LOX-1 と同様、可溶性が存在することが知られている。共同申請者久米らは血液中の可溶性 LOX-1 が急性冠症候群の予知因子となりうることを示すデータをすでに得ているが、SR-PSOX の発現様式に関してはほとんど知られていない。そこで、我々は SR-PSOX の生体内での発現様式を調べ、疾患における発現の変化を検討した。

B. 研究方法

マウス胚子および成体から組織標本を作製し、in situ hybridization にて発生の各段階、成体における SR-PSOX の発現様式を調べた。また、弁置換手術後の切除弁組織での SR-PSOX の発現の変化を免疫組織化学法にて検討した。

(倫理面への配慮)

術前に組織標本を作製する旨説明し承諾を得た。また、組織標本と個人が

むすびつかないようにデータを管理した。

C. 研究結果

マウスにおいては、胎生期から成体にいたるまで、SR-PSOX は心臓の弁をおおう内皮細胞に特異的に発現していた。ヒトの弁組織においては、変性性弁疾患では発現はほとんど見られなかったが、感染性心内膜炎では SR-PSOX の発現は顕著に上昇していた。

D. 考察

感染性心内膜炎など急性の炎症性弁疾患で弁内皮細胞における SR-PSOX の発現が上昇することから、可溶性 SR-PSOX は感染性心内膜炎の診断や経過をみるうえで、有用なマーカーになる可能性があると考えられた。

E. 結論

SR-PSOX は心臓の弁内皮細胞に特異的に発現するスカベンジャー受容体である。感染性心内膜炎など急性の炎

症性弁疾患で弁内皮細胞における SR-PSOX の発現は顕著に上昇していた。

G. 研究発表
論文発表

1. Tanaka M, Yamasaki N, Schinke M, Izumo S. The phenotypic characterization of the murine Nkx2.6 homeobox gene by gene targeting. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:2874-2879.

2. Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, Fujiwara Y, Orkin SH. FOG-2, a cofactor for *GATA* transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 2000;101:729-739.

3. Tanaka M, Komuro I, Inagaki H, Jenkins NA, Copeland NG, Izumo S. Nkx3.1, a murine homolog of *Drosophila* bagpipe, regulates epithelial ductal branching and proliferation of the prostate and palatine glands. *Dev. Dyn.* 2000;219:248-260.

4. Tanaka M, Schinke M, Liao H, Yamasaki N, Izumo S. Nkx2.5 and Nkx2.6, murine homologs of *Drosophila* tinman, are required for development of the pharynx. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:4391-4398.

5. Tanaka M, Berul CI, Ishii M, Jay PY, Wakimoto H, Douglas P, Yamasaki N, Kawamoto T, Gehrman J, Maguire CT,

Schinke M, Seidman CE, Seidman JG, Kurachi Y and Izumo S. A mouse model for cardiac arrhythmias and atrial septal defect caused by haploinsufficiency of the cardiac transcription factor *Csx/Nkx2.5*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* in press.

分担研究者 京都大学医学研究科附属高次脳機能総合研究センター 福山秀直

研究要旨 大脳白質病変はMRIでよく見られる所見であるが、痴呆症を発症する場合としない場合があり、その差がなにに由来するか、明らかではない。PETによる測定で、大脳皮質神経細胞の減少と痴呆に関連性があることを明らかにした。

A. 研究目的 大脳白質病変は必ずしも痴呆を発症しない。痴呆発症の予測とその予防に役立つよう、大脳白質病変の痴呆症発症に及ぼす影響について、大脳皮質神経細胞体上に存在するベンゾジアゼピン受容体(BzR)結合能をC-11 flumazenil (FMZ) PETを用い定量的に測定し検討した。

B. 研究方法 頭部MRI上Schmidtの分類III度の大脳白質病変と基底核のラクナ梗塞を認めた12名の患者に、動脈血採血から得られた入力関数とPETによって測定された脳内の放射活性から、各関心領域(ROI)におけるdistribution volume (分布容積)(FMZ-DV; ml/g)を算出しBzR結合能を定量的に評価した。関心領域は前頭葉、側頭葉(外側部)、頭頂葉、後頭葉、視床、基底核、小脳、深部白質に設定した。12名の患者に対しmini mental state examination (MMSE)と臨床痴呆評価尺度による痴呆の評価を行い痴呆群(D群)と非痴呆群(ND群)に分類したうえで、2群の脳内BzR結合能を比較した。D群の患者12名に対しては、 $[^{14}O]CO_2$, $[^{15}O]O_2$, $[^{15}O]CO$ を用いたsteady state法により、各ROIにおける脳血流(CBF)、酸素摂取率(OEF)、酸素代謝率(CMRO₂)を算出し2群間で比較した。頭部MRI T1, T2強調画像を用い、Frontal lobe indexとEvans indexによる脳萎縮の評価、基底核視床領域のラクナ梗塞数(径3mm以上15mm未満)の計数を行い2群間の比較も行った。

いずれの検査も、京大倫理委員会承認を得ている。

C. 研究結果 12名の患者は痴呆群(D群)(男1名、女5名;平均76.0歳;MMSE 17.3 ± 4.7 SD)と非痴呆群(ND群)(男3名、女3名;平均74.2歳;MMSE 28.6 ± 1.5 SD)に分類された。患者は高血圧(D群5名、ND群2名)、高脂血症(D群1名、ND群1名)、糖尿病(D群1名、ND群1名)、喫煙(D群2名、ND群3名)など少なくとも一つの脳血管障害の危険因子を有していた。Frontal lobe indexとEvans indexはD群で0.353 ± 0.054; 0.324 ± 0.054, ND群で0.333 ± 0.036; 0.297 ± 0.033で、D群で脳萎縮が強い傾向を認めるも有意差はなかった。基底核視床領域のラクナ梗塞数はD群2.5 ± 1.5、ND群2.3 ± 2.1で有意差はなかった。FMZ-DVは検討したすべてのROIにおいてND群に比べてD群で低い傾向を示したが、前頭葉、側頭葉、頭頂葉では有意な低下を示した:(D群 vs ND群):前頭葉6.75 ± 0.65 vs 7.69 ± 0.61 (12%低下;p=0.027)、側頭葉6.85 ± 0.72 SD vs 7.97 ± 0.54 (14%低下;p=0.012)、頭頂葉6.65 ± 0.54 vs 7.70 ± 0.61 (13%低下;p=0.010)(図A)。CBFとCMRO₂もND群と比較しD群で低下する傾向が見られた(図B, C)。D群で有意な低下が観察されたのはCBFでは前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、基底核で、CMRO₂では前頭葉、側頭葉、頭頂葉、基底核、深部白質であった。OEFは全ROIにおいて2群間の有意差を認めなかった。

D. 考察 ND群と比較しD群では前頭葉、側頭葉、頭頂葉でBzR結合能の有意な低下が観察された。BzRは大脳皮質神経細胞体上に広く分布していることか

ら、BzR結合能はneuronal integrityを、またその低下は神経細胞密度の低下を反映するとされる。したがって、本結果は、虚血性白質病変を有する痴呆患者では大脳皮質領域とくに前頭葉、側頭葉、頭頂葉の神経細胞脱落が痴呆発症に影響を及ぼす可能性を示唆する。BzR結合能の低下が見られた領域では共通してCBFとCMRO₂の低下が観察されたが、虚血性白質病変を有する患者のCBF、CMRO₂低下は、白質病変による2次的結果とする報告もあり、大脳皮質領域の神経細胞脱落も白質病変に起因する可能性もある。以上より、MRI-T2画像で広範な白質病変を認める患者の痴呆発症には、大脳白質に存在する神経軸索や髄鞘の傷害のみならず大脳皮質領域の神経細胞自体の傷害が関与している可能性があることが示唆された。

E. 結論 痴呆発症の予測には、大脳皮質細胞の障害程度をみる検査(FMZ、MRIのvolumetryなど)を行っておくことが有用であろう。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
 2. 学会発表 平成15年日本神経学会発表予定
- H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

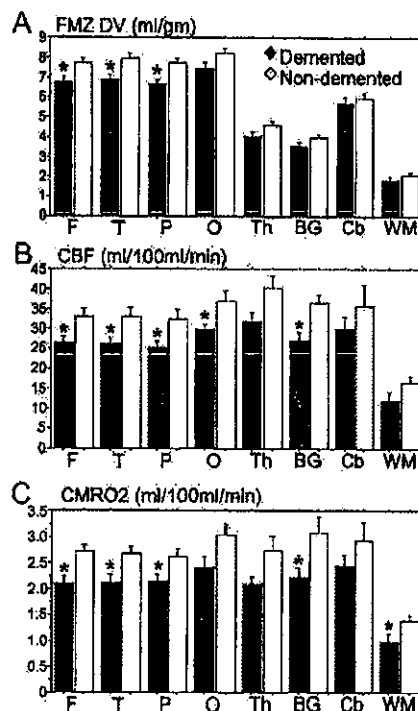


図. 痴呆患者(黒)、非痴呆患者(白)におけるFMZ-DV(図A)、CBF(図B)、CMRO₂(図C)を示す。棒グラフは平均±標準誤差を示す。*P < 0.05 (unpaired Student's t test). F, 前頭葉; T, 側頭葉; P, 頭頂葉; O, 後頭葉; Th, 視床; BG, 基底核; Cb, 小脳; WM, 深部白質

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

急性心筋梗塞に対する再疎通療法に関する研究

分担研究者 延吉 正清、酒井 孝裕、伴 敏彦

研究要旨：急性心筋梗塞は生命予後を規定する疾患であるが、再疎通療法により予後を改善してきている。再疎通療法としての直接冠動脈形成術；direct PTCA は、高い再疎通成功率を示した。再疎通療法の成功は、院内予後を改善した。

A. 研究目的

急性心筋梗塞に対する再疎通療法の手段別の成功率、再疎通成否による院内予後を検討する。

B. 研究方法

1982年1月から1998年12月までの18年間に、小倉記念病院に入院した急性心筋梗塞患者に対して緊急冠動脈造影検査を施行した2667名(男性73%)を検討した。

(倫理面への配慮)

再疎通療法の際には、事前に文章による説明を行ない、書面による承諾を得た後に実施した。

C. 研究結果

138名(5%)は冠動脈造影検査のみにて終了した。578名(22%)に対しては血栓溶解療法、388名(15%)に対しては血栓溶解療法+冠動脈形成術；rescue PTCAを施行した。1563名(59%)の患者に対しては、直接冠動脈形成術；direct PTCAを施行した。このdirect PTCA群には402名の冠動脈ステント使用例も含まれている。再疎通成功率は血栓溶解療法76%、rescue PTCA82%、direct PTCA91%であった。direct PTCA群で有意に高い成功率であった($p<0.01$)。冠動脈ステント群においては98%であった。全体の院内死亡率は7.1%であった。再疎通の成否と院内死亡率の関係を検討すると、TIMI 3 flowの再疎通を達成した場合には5%の死亡率であるのに対して、TIMI 2 flowでは18%、TIMI 0 and 1 flowでは22%であった($p<0.001$)。

D. 考察

急性心筋梗塞は、冠動脈の閉塞により引き起こされ、生命予後を規定する。その急性期治療として冠再疎通療法は有用であるが、その主たる意義は梗

塞責任血管の閉塞を解除することにより梗塞サイズを縮小し、合併症を減少させ、急性期および慢性期の予後を改善することにある。再疎通療法として1970年代の後半にRentropらにより冠動脈内血栓溶解療法が導入され、死亡率の減少が報告された。しかし、血栓溶解療法の最大の問題点である再疎通成功率が70%台であり、direct PTCAより低率なことがあげられる。本研究にてもdirect PTCAは、高い再疎通成功率を示した。さらに、再疎通療法の成功は、院内予後を改善した。

E. 結論

血栓溶解療法と比較すると、direct PTCAで再疎通成功率が高かった。特に冠動脈ステントの有用性が示唆された。再疎通成功した患者の院内予後は良好であった。

F. 健康危険情報

特記事項無し。

G. 研究発表

- 延吉正清、野坂秀行、齋藤滋、光藤和明、中村展招、小川鴨也：冠動脈造影時の冠攣縮に対するNK843L（ニトグレルリ注射剤）の臨床評価 - 硝酸イソリビド注射剤を対照とした第III相比較試験- 臨床試験統括論文報告書。厚生省提出, 2000
- 延吉正清、野坂秀行、鈴木紳、齋藤滋、鈴木孝彦、光藤和明：冠動脈造影時の冠攣縮に対するNK843（ニトグレルリ注射剤）の臨床評価-冠動脈内投与による後期第II相試験- 臨床試験統括論文報告書。厚生省提出, 2000

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

- Nakagawa Y, Yufu K, Nakamori S, Kimura T, Yokoi H, Tamura T, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M. Clinical and angiographic follow-up after single long GFX coronary stent implantation. Catheter Cardiovasc Interv. 2000 May;50(1):40-7.
- Sakai K, Nakagawa Y, Kimura T, Doi T, Yokoi H, Iwabuchi M, Hamasaki N, Inoue K, Nosaka H, Nobuyoshi M : Comparison of Results of Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction in Patient \geq 75 Years of Age Versus Patients $<$ 75 Years of Age Am J Cardiol 89: 797-800, 2002
- Kimura T, Abe K, Shizuta S, Odashiro K, Yoshida Y, Sakai K, Kaitani K, Inoue K, Nakagawa Y, Yokoi H, Iwabuchi M, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M : Long-Term Clinical and Angiographic Follow-Up After Coronary Stent Placement in Native Coronary Arteries Circulation ;105 2986-2991 2002
- Nobuyoshi M, Yokoi H : Long lesions and diffuse disease. Textbook of INTERVENTIONAL CARDIOLOGY 4th Edition edited by Topol EJ, : 367-379, W.B. SAUNDERS, Philadelphia, 2002

厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究

分担研究者 倉敷中央病院 循環器内科：光藤 和明、後藤 剛

研究要旨：急性心筋梗塞に対する早期責任梗塞枝再開通療法は、過去 20 年間の間に大きく変化している。より積極的に、より侵襲的な治療により、院内死亡率が確実に低下した。

A 研究目的

急性心筋梗塞に対する、早期責任動脈再開通療法は 1980 年台に、血栓溶解療法から始まり、最近ではステントを併用した経皮的血管形成術（以下 PTCA）が主流となっている。このような積極的な治療は、適応を拡大されているが、一方で、本当に予後を改善しているのかが問題となっている。今回、当院で 1980 年から行っている治療法の変化、適応拡大の実際と、院内死亡率の変化を検討した。

B 研究方法

1980 年から 2003 年 6 月までに、当院へ入院した発症後 24 時間以内の症例 2979 例を検討した。男性 2237 例、女性 742 例、年齢は 18 歳から 99 歳、平均 66±12 歳であった。これらの症例を、選択的冠動脈内血栓溶解療法(ICT)を中心とした 1983 年までの 114 例を A 群、ICT 後に引き続いて PTCA を行った 1986 年までの時期の 200 例を B 群、ICT を先行させず直接 PTCA を行った 1990 年までの 387 例を C 群、PTCA 後必要に応じてステントを留置した 1995 年までの 823 例を D 群、当初より可能な限りステント留置を行った 1996 年以降の 1455 例を E 群とした。治療法の変化、再開通率、拡張性効率、院内死亡率を検討した。

この研究はその時々により最善と考えられた治療を行った症例を後ろ向きに集計したものであり、特別な倫理委員会などの審査は不要と考えられる。

C 研究結果

再開通治療を行った症例の比率は A 群 61.4%, B 群 69.0%, C 群 69.8%, D 群 93.1%, E 群 94.8% と PTCA 治療が軌道に乗りステントの使用が可能となった時期に一致して再開通療法の適応が拡大された。再開通治療における PTCA 治療の割合は、A 群 2.9%, B 群 71.0%, C 群 94.4%, D 群 98.6%, E 群

99.9%であった。また PTCA 治療施行例中ステントを用いた症例の比率は、D 群 2.9%, E 群 75.8%であった。再開通成功率は、A 群 75.7%, B 群 88.8%, C 群 88.8%, D 群 98.0%, E 群 98.0%、残存狭窄 50%未満の拡張成功率は、A 群 8.6%, B 群 79.0%, C 群 85.0%, D 群 88.0%, E 群 96.0%であった。院内死亡率は A 群 20.2%, B 群 8.5%, C 群 11.2%, D 群 7.3%, E 群 6.0%であった。入院時にショック状態であった症例の死亡率は A 群 60.0%, B 群 54.0%, C 群 64.0%, D 群 45.0%, E 群 45.1%、ショックを呈していなかった症例の院内死亡率は、A 群 14.0%, B 群 5.3%, C 群 5.9%, D 群 4.9%, E 群 2.7%であった。

D 考察

再開通療法は、血栓溶解療法を主体としていた時期に比べ、PTCA を導入することで、より適応範囲が広がっている。これは出血の合併症が少ないこと、より確実な再開通が可能であることが理由と考えられる。さらにステントの導入はその治療の安全性を高めたといえる。このように積極的に急性期に冠動脈造影を行い、積極的にステントを含む PTCA 治療を行ってきたが、同時に院内死亡率も、全体として、ショックのない症例、またショックを呈した症例の院内死亡率も絶対値は高いものの減少傾向にある。もとより再開通治療だけがこの死亡率減少効果の原因ではないであろう。しかしこれまで多くの臨床研究で、急性期に閉塞した梗塞責任枝を再開通することが予後改善につながることを示されており、最も大きな寄与因子と考えられる。

E 結論

急性期梗塞責任枝再開通治療の積極的適応拡大に伴い、心原性ショックの有無を問わず院内死亡率は減少している。

心筋梗塞の危険因子としてのホモシステインの重要性に関する研究

分担研究者 鄭 忠和 鹿児島大学医学部第一内科教授

研究要旨

冠危険因子としてのホモシステインの重要性を検討するために、若年発症心筋梗塞患者127名と正常対照150名で、血中ホモシステインと凝固線溶系指標を測定した。患者のホモシステイン濃度は $11.2 \pm 5.3 \mu\text{mol/l}$ で、健常者の $8.3 \pm 5.0 \mu\text{mol/l}$ より有意に高値を示し、多重ロジスティック回帰によるオッズ比は2.22であった。ホモシステインはtissue factor、tissue factor pathway inhibitor、tissue plasminogen activatorと有意の相関を示した。以上より、ホモシステインは独立した心筋梗塞の危険因子と考えられ、凝固系の亢進がその機序に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ホモシステインは動脈硬化促進や易血栓性を惹起するといわれているが、本邦における詳細な検討はなされていない。通常の冠危険因子の役割が相対的に小さい若年心筋梗塞患者を対象に、ホモシステインが冠危険因子となりうるかについて研究し、さらに凝固線溶系因子との関連について検討した。

B. 研究方法

45歳以下で心筋梗塞を発症した127名の患者と年齢を一致させた150名の正常対照者で採血を行い、血中ホモシステイン濃度と凝固線溶系指標（tissue factor, tissue factor pathway inhibitor, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-I, fibrinogen, antithrombin, plasminogen, α_2 -antiplasmin, lipoprotein (a), protein C, protein S）を測定した。

C. 研究結果

心筋梗塞患者の血中ホモシステイン濃度は $11.2 \pm 5.3 \mu\text{mol/l}$ で、健常者の $8.3 \pm 5.0 \mu\text{mol/l}$ より有意（ $P < 0.001$ ）に高値を示した。冠危険因子と凝固線溶系指標を含めた多重ロジスティック回帰を行うと、ホモシステインはオッズ比2.22（ $P < 0.001$ ）と、独立した危険因子であることが認められた。血中ホモシステイン濃度はtissue factor濃度と $\rho = 0.26$ （ $P < 0.001$ ）、tissue factor pathway inhibitorと $\rho = 0.23$ （ $P = 0.009$ ）、tissue plasminogen activatorと $\rho = 0.25$ （ $P = 0.011$ ）の有意の相関関係を示した。

D. 考察

血中ホモシステイン濃度と凝固線溶系指標、特にtissue factor、tissue factor pathway inhibitorが有意の相関を示したことより、ホモシステインが血管障害を惹起する機序として、凝固外因系の亢進が重要な役割を果たしていると考えられた。

E. 結論

ホモシステインは独立した心筋梗塞の危険因子と考えられ、凝固系の亢進がその機序に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saigo M, Abe S, Ogawa M, Maruyama I, Tei C: Suppression of fibrinolytic activity and obesity in young patients with myocardial infarction. Thromb Haemost 2002;88:878-879.

2. Ogawa M, Abe S, Saigo M, Toda H, Torii H, Minagoe S, Maruyama I, Tei C: Homocysteine and hemostatic disorder as a risk factor for myocardial infarction at a young age. Thromb Res (投稿中)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

A. 研究目的

酸化ストレスは細胞障害と情報伝達制御の二面性を有す。この酸化ストレス、特に慢性ストレスが血管病変の進展にどのように関与するかは不明である。本研究は、心筋梗塞や脳梗塞における酸化ストレス関連因子の意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 酸化ストレス因子の免疫組織学的解析。心筋梗塞患者の切除組織断片を試料とした。抗体は4-hydroxynonenal, S-carbonylation に対する特異抗体を使用した。

(倫理面への配慮) 患者のサンプルを解析するに当たり、事前に文書による説明を行い、書面による承諾を得他の地に解析を施行している。それぞれの患者のプライバシーに配慮し、臨床経過が個人と結びつかないようにデータを管理している。

(2) 酸化 LDL による慢性酸化ストレスによる血管マクロファージ情報伝達系の制御解析。RAW264.7 を用いて、酸化 LDL を長時間添加した後のLPSに対する反応を特に NF-kappaB の転写活性に及ぼす影響を測定した。

C. 研究結果

(1) 病変部位では 4-hydroxynonenal、S-carbonylation の両者が強く発現していることを観察した。

(2) RAW264.7 細胞に LDL(50 microg/ml)を 48 時間添加した後に LPS を加えると、核内に移行した p65/p50 の DNA 結合能が低下していた。

D. 考察

心筋梗塞部位の免疫染色で脂質過酸化とタン

塞の発症機転に酸化ストレスが存在することを示唆するものである。培養細胞を用いた実験結果は、ストレス応答因子が酸化ストレスで修飾され、感受性低下を来すことを示している。

E. 結論

今後は他の酸化ストレスマーカーの意義を詳細に検討する。更にマクロファージの細胞機能や増殖に及ぼす影響を検討する。

F. 健康危険情報

今回の実験からは、高脂血症における酸化 LDL や慢性炎症が心筋梗塞などの疾病の進展に寄与することが示唆された。

G. 研究発表【1. 論文発表】

Ohira, A., Kondo, T., et al (2). *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* In press.

Kageyama, S., Kondo, T., et al (5). *J. Biol. Chem.* 277:19255-19264, 2002

Tanimura, S., Kondo, T., et al (4). *J. Biol. Chem.* 277:28256-28264, 2002

【2. 学会発表】

1) 『酸化ストレスにおける核グルタチオン S-トランスフェラーゼ?の役割』後藤 信治、近藤 宇史 他。第 75 回 日本生化学会 74:8 . 226 2002. ?

2) 『ER シャペロン・カルレチキュリンと酸化ストレスによるアポトーシス感受性』井原 義人、近藤 宇史 他。日本生化学会 74:8. 223 2002.