

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

循環器疾患関連遺伝子の解明に関する研究

(H13-ゲノム-002)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山崎 力

平成15(2003)年4月

## 臨床情報とゲノム情報との統合的解析

主任研究者 山崎 力

東京大学大学院医学系研究科・臨床バイオインフォマティクス研究ユニット 教授

### 研究要旨

心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する遺伝子多型性を同定を目的とし心筋梗塞、冠動脈硬化に代表される循環器疾患の発症に関わる遺伝子多型として MMP-1 および MMP-3 多型および冠危険因子である HDL コレステロール濃度を規定する遺伝子多型として ABCA-1 を同定した。また心血管リモデリングに重要な転写因子 KLF5 の生理的機能を遺伝子改変動物を使用し明らかとした。これらの実績の実地臨床への応用は将来的に個別化医療の実践に結びつくと考えられる。

### 分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

永井 良三

東京大学大学院医学系研究科・循環器内科、  
教授

世古 義規

東京大学大学院医学系研究科・循環器内科、  
講師

前村 浩二

東京大学大学院医学系研究科・循環器内科、  
助手

林 同文

東京大学大学院医学系研究科・薬剤疫学講座、  
助手

つ解析し、それを臨床データベースと統合的に相関性を検討し、循環器疾患発症および予後、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定を試みる。遺伝子多型解析については動脈硬化関連因子、特に増殖因子および増殖因子受容体およびそれらの発現調節を行う転写因子に着目し、アミノ酸変異を伴うエクソン領域の SNP および遺伝子発現量と関連するプロモーター領域を中心に SNP 解析を施行する。また病態との関連性の高い遺伝子および遺伝子産物については分子生物学的、発生工学的に遺伝子機能の解析を平行して行い、循環器疾患の診断・治療における有用性を検証する。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析に関して東京大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会において申請、承認を受けたのち、倫理委員会にて承認された承諾書を使用し十分な口頭説明の上、承諾を得て採血を行い、遺伝子解析を施行している。

### A. 研究目的

本研究は、心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する遺伝的背景について主として遺伝子多型の観点から検討を行い、循環器疾患に関連した遺伝子多型、変異、発現をプローブによって検出する遺伝子診断法の開発・実用化を目的としている。さらに患者の個性に合わせた個別化医療の実践が可能になるように汎用的で実地臨床に還元される遺伝子診断システム構築を目指すものである。

### B. 研究方法

東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行う。遺伝子解析にあたり心臓カテーテル検査時に採血、採血検体より DNA 抽出を行い、冠動脈硬化・高血圧との関連性の示唆される遺伝子の SNP について解析を既存の手法に加え日立製作所開発の BAMPER 法と呼ばれる新しい遺伝子解析システムを活用し

### C. 研究結果 および D. 考察

2003 年 3 月の段階で 1800 例の臨床情報収集が終了、遺伝子検体数は約 1100 例に達した。この臨床情報および遺伝子検体を活用し以下の結果を得た。

動脈硬化に代表される血管のリモデリングの病態に深く関与するマトリクスメタロプロテナーゼ (MMP) の遺伝子多型に関して心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。各々の転写活性に関与する MMP-1 プロモーター領域-1607 1G/2G 多型、MMP-3 プロモーター領域-1171 5A/6A 多型には互いに強い連鎖不平衡を認め、MMP3 の 5A アレルおよび MMP1 1G-MMP3 5A ハプロタイプを保有することは有意に心筋梗塞発症のリスク因子となることを明らかとした。この遺伝子型は心筋梗塞を伴わない冠動脈硬化症（狭心症、無痛性心筋虚血）とは関連性が乏しいことから、粥腫崩壊に関連した病態に関連した遺伝的マーカー

一である可能性が示唆された。

また HDL コレステロール合成に関して lipid poor ApoA1 particle にコレステロールエステルを付与して HDL コレステロール生成に関与する ATP-binding cassette A1 (ABCA1) の遺伝子多型に着目、Ile823Met, Arg291Lys の 2 つのエクソン領域の missense 多型について解析、両者に連鎖はなく前者の遺伝子多型が HDL コレステロールと有意に関連し、HDL コレステロール濃度を介して冠動脈疾患発症に関連する可能性が示唆された。

冠動脈硬化の治療である血管形成術後の再狭窄はこの治療の最大の障壁であるが、動脈硬化関連遺伝子が疾患の発症、進展および治療反応性に深く関連することが期待される。再狭窄の主たる病態である血管平滑筋の脱分化、活性化に関連する Zn フィンガー型転写因子 IKLF/KLF5 に着目し、IKLF/KLF5 が血管平滑筋の増殖および脱分化に関連した SMemb および PDGF-A 遺伝子のプロモーターを容量依存的に活性化することを示した。また発生工学的手法によりこの遺伝子のノックアウトマウスの樹立に成功、このマウスがホモ致死であること、また種々の心血管障害モデルに対して、ヘテロマウスでは野生型マウスに比較して組織修復反応が微弱であることが確認された。

動脈硬化の進展に伴って組織の灌流不全が生じる結果、虚血・低酸素という病態が生じるが、そのような虚血・低酸素状態において、VEGF、エリスロポエチンや解糖系酵素などの発現誘導に関わり、かつ内皮に発現が比較的限局している転写因子 EPAS-1 に着目して解析を進めたところ VEGF およびその受容体などの転写を低酸素下で活性化すること、また活性化ドメインを欠失させた truncated EPAS1 が dominant negative に作用して EPAS1 および HIF1 の血管新生促進作用を抑制することを明らかにした。また、心筋梗塞発症のメカニズムの一つとして血栓形成が重要であるが、凝固促進因子の一つ PAI-1 の日内変動が時計遺伝子でありかつ転写因子である CLOCK と CLIF/BMAL2 が関与していることを明らかにした。

#### E. 結論

循環器疾患関連遺伝子の解明を目指し、(1) 心筋梗塞、冠動脈硬化に代表される循環器疾患の発症に関わる遺伝子および多型性の同定、(2) 循環器疾患の治療反応性に関わる遺伝子群の同定、(3) 循環器疾患発症に寄与するマスター遺伝子群の機能解析と病態への関与についての検討 につき検討を行った。

(2) の治療反応性についてはデータベース集積が開始されてよりまだ 2 年前後と短く、現在のところ有効なデータが得られていない現状が存在するが、今後の時間経過とデータ集積により

有用な知見が得られる可能性は非常に期待される。(1)については MMP 遺伝子多型群、ABCA1 遺伝子 Met823Ile 多型の病態との関連性を示し、今後の実地臨床でのリスク評価の一指標として使用できる可能性があると考えられる。さらに 50 以上の遺伝子多型検討が進んでおり、そこで選出された遺伝子多型についても大いに期待される場所である。(3) 動脈硬化に代表される心血管病における病態修飾因子として IKLF/KLF5 および EPAS, CLIF/BMAL2 の機能解析の結果、血管リモデリングおよび血管新生また循環器疾患の発症に関与する液性因子の日内変動の分子メカニズムが明らかとなった。

以上のように、循環器疾患の発症に寄与する遺伝子多型および循環器疾患発症に関与する分子機序が本研究の推進により明らかとなり、本領域において十分な成果を挙げることが出来た。今後の研究の継続によりさらなる同領域における研究の推進が期待される。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表 (論文発表)

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, SITO A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic Variations of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Promoter Regions and their Associations with Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Int J Cardiol* (in press)

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Makamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile823Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* (in press)

Monzen K, Zhu W, Kasai H, Hiroi Y, Hosoda T, Akazawa H, Zou Y, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Komuro I. Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:493-500

Zou Y, Yamazaki T, Nakagawa K, Yamada H, Iriguchi N, Toko H, Takano H, Akazawa H, Nagai R, Komuro I. Continuous blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses activation of calcineurin

and development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2002;25:117-124

Zou Y, Nagai R, Yamazaki T. Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS Letters*. 2001;508:57-60

Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2001;51:489-494

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得      特記すべきことなし
2. 実用新案登録   特記すべきことなし
3. そのほか      特記すべきことなし

## 臨床情報とゲノム情報との統合的解析

分担研究者 永井 良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科 教授

### 研究要旨

心血管疾患の病態形成に関与する遺伝子群の機能の解明およびヒトにおけるその遺伝子多様性を明らかにすることを目的とし、動脈硬化形成のプロセスにおいて重要な血管平滑筋の脱分化・活性化に関与する転写因子 IKLF/KLF5/BTEB2 に着目、その血管リモデリングにおける役割をノックアウトマウスの作成・解析を通じて明らかにした。さらにこの遺伝子機能をレチノイン酸誘導体の新規薬剤 Am80 により制御出来ることを示した。さらに現在、この転写因子の遺伝子多型・変異についてデータが集積しつつある。これらの実績の臨床応用は将来の循環器診療の発展に大いに寄与するものと考えられる。

### A. 研究目的

本研究は、心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する遺伝的背景についてとくに心血管疾患の病態形成に関わる遺伝子群の機能について細胞生物学的あるいは発生工学的に証明する。さらに心血管疾患の病態に深く関与することが判明した遺伝子群およびそれにより制御を受ける下流の遺伝子群についてその遺伝子配列の多様性とそれによりもたらされる機能的変化を解明することにより循環器疾患の診療に有用な遺伝子診断および新たな治療戦略の構築を目指すものである。

### B. 研究方法

心血管疾患の病態に関与する遺伝子群について細胞生物学的、あるいは発生工学を駆使した遺伝子改変動物作成を通じてその機能的解析を進める。一方、前述の基礎的検討から心血管系への病態形成に特に中心的に作用する遺伝子については、東京大学循環器内科の臨床症例から採取された遺伝子検体を活用し、心血管病発症あるいは治療に対する反応性などについて遺伝子多型性との関連性を検討する。臨床情報については、東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として作成されている臨床データベースを活用する。

（倫理面への配慮）

ヒト遺伝子解析に関して東京大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会において申請、承認を受けたのち、倫理委員会にて承認された承諾書を使用し十分な口頭説明の上、承諾を得て採血を行い、遺伝子解析を施行。また動物実験および遺伝子工学的実験については所属施設のガイドライン、倫理指針を遵守して施行。

### C. 研究結果 および D. 考察

□ 循環器領域において入院における診療対象の約 7 割は狭心症、心筋梗塞に代表される虚血性心疾患である。その治療として最も汎用される手技は PTCA（経皮経管的冠動脈形成術）であるが、その最も大きな障壁である再狭窄の分子メカニズムとして、血

管平滑筋の脱分化・活性化が重要であることが以前より指摘されていた。我々はこの血管平滑筋の脱分化・活性化において Zn フィンガー型転写因子 BTEB2/IKLF/KLF5 が重要であることを明らかにし、PDGF、iNOS、組織因子などのエフェクターの他、脱分化した平滑筋において発現する平滑筋型ミオシンのアイソザイム SMemb などの発現上昇に寄与することを示した。さらにこの転写因子の生理学的機能を解明するために遺伝子を欠損させたノックアウトマウスの作成に成功、ホモ接合体は胎性早期に死亡することから初期発生に必須の転写因子であることが証明されたとともに、ヘテロ接合体は正常に発生するがポリエチレンカフ留置血管障害モデルおよびアンジオテンシン II 持続投与モデルに代表される心血管障害モデルにおいて野生型に比較してヘテロの個体では心血管リモデリングが軽微であることが示され、本遺伝子産物が心血管病の病態形成において重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに KLF5 がレチノイン酸受容体である RAR $\alpha$  と相互作用することに着目し合成型レチノイドである Am80 投与により KLF の活性を抑制し心血管リモデリングが抑制されることが明らかとなった。

現在、この遺伝子についてはその遺伝子抑制について遺伝子治療の観点から検討を進めると同時に遺伝子機能を抑制する新規薬剤 Am80 の臨床応用を行うための大動物を使用した検討を行っている。さらに、2003 年 3 月までに入院患者より収集した遺伝子検体数は約 1100 例に達し、それを用いて我々が注目する BTEB2/IKLF/KLF5 の遺伝子多型について検討し、病態との関連性が明らかになりつつある。

### E. 結論

循環器疾患関連遺伝子の解明を目指し、特に動脈硬化性疾患発症に寄与するマスター遺伝子の機能解析として、IKLF/KLF5 が冠動脈形成術後の再狭窄などの動脈硬化性病変形成に重要な役割を果たすことを発生工学を駆使して証明した。さらに、この遺伝子およびこの転写因子の制御を受ける下流遺伝子群の多型・変異などの検討が進められており、この遺伝子研究を通じて血管リモデリングなどの分子機

序が明らかになるのみならず、実地臨床において有用な遺伝的素因が明確化されることとなり、我々の研究は本領域において十分な成果を挙げることが期待される。

#### F.健康危機情報

特記すべきことなし

#### G.研究発表 (論文発表)

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Sato A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic Variations of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Promoter Regions and their Associations with Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Int J Cardiol* (in press)

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Makamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile823Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* (in press)

Monzen K, Zhu W, Kasai H, Hiroi Y, Hosoda T, Akazawa H, Zou Y, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Komuro I. Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:493-500

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*. 2002;293:332-7.

Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*. 2002;51:536-40.

Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashii Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R, Kurihara H. Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1310-5

Iwasa H, Kurabayashi M, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. Twenty single-nucleotide polymorphisms in four genes encoding cardiac ion channels. *J Hum Genet*. 2002;47:208-12.

5. Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N, Nagai R. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1680-5.

Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N, Nagai R. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;20:1680-5

Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, Nangaku M, Hirata Y, Nagai R. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension*. 2002;39:838-43.

Morita H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R. Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner. *J Hypertens*. 2002;20:55-62.

Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R, Kurabayashi M. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol*. 2002;89:149-56.

Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297:1058-61.

Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Kakoki M, Nagata D, Hayakawa H, Satonaka H, Sata M, Tojo A, Suzuki E, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury: studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. *Circ Res*. 2002;90:657-63.

Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res*. 2002;90:348-55.

Sata M, Nagai R. Phosphatidylinositol 3-kinase: a key regulator of vascular tone? *Circ Res*. 2002;91:273-5.

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-9.

Sata M, Takahashi A, Tanaka K, Washida M, Ishizaka N, Ako J, Yoshizumi M, Ouchi Y, Taniguchi T, Hirata Y, Yokoyama M, Nagai R, Walsh K. Mouse genetic evidence that tranilast reduces smooth muscle cell hyperplasia via a p21(WAF1)-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1305-9.

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*. 2002;26:127-34.

Seko Y, Kayagaki N, Seino K, Yagita H, Okumura K, Nagai R. Role of Fas/FasL pathway in the activation of infiltrating cells in murine acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1399-403.

Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med*. 2002;80:105-16.

Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med*. 2002;8:856-63.

Watanabe A, Kanai H, Arai M, Sekiguchi K, Uchiyama T, Nagai R, Kurabayashi M. Retinoids induce the PAI-1 gene expression through tyrosine kinase-dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:503-12.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8:1288-95.

Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, Waki H, Komeda K, Tsuchida A, Date Y, Li MX, Miki H, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Saheki T, Nakazato M, Naitoh T, Yamamura K, Kadowaki T. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nat Genet*. 2002;30:221-6.

#### H.知的所有権の出願・登録状況

- 1.特許取得 特記すべきことなし
- 2.実用新案登録 特記すべきことなし
- 3.そのほか 特記すべきことなし

## 疾患・薬効と遺伝子多型性との関連解析および動物モデルにおける機能解析

分担研究者 世古 義規 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科 講師

### 研究要旨

循環器疾患治療薬剤との反応性、副作用と関連する遺伝子多型、変異について、臨床データの累積と多方面にわたる薬理的作用点および薬物代謝関連因子について検討中である。

動物モデルを用いた生理機能解析は非常に有用であり、心筋炎・拡張型心筋症の病態形成に TNF・TNF 受容体スーパーファミリーが重要であること、視床下部由来の新規蛋白が心臓刺激性を有することを示し、ほかの遺伝子産物および循環器治療薬剤の関連も含め機能解析が進行中である。

### A. 研究目的

本研究は、心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の治療とくに薬物療法に対する反応性、副作用と関連する遺伝子多型性を同定することを目的とし当循環器内科で作成した臨床データベースの薬歴、治療歴を活用し解析を進める。同時にマウス、ラットなどの実験動物を用いてヒト疾患モデルを活用し、治療薬の薬理作用と遺伝的背景の検討を行う。

### B. 研究方法

東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行う。遺伝子解析にあたり心臓カテーテル検査時に採血、採血検体より DNA 抽出を行い、循環器領域の治療薬の作用点となる受容体などの蛋白、および薬剤の代謝に関わる代謝酵素(チトクローム P450 など)の多型性、遺伝子変異について直接シーケンシング法、また既知の遺伝子多型性については一部、日立製作所開発の BAMPER 法と呼ばれる新しい遺伝子解析システムを活用しつつ検討する。またラット、マウスなどの実験動物を活用し、ヒトの病態に類似したモデルを作成することにより各種遺伝子および循環器領域使用薬剤の生理的機能について検証を行う。

(倫理面への配慮)

ヒト遺伝子解析に関して東京大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会において申請、承認を受けたのち、倫理委員会にて承認された承諾書を使用し十分な口頭説明の上、承諾を得て採血を行い、遺伝子解析を施行。また動物実験および遺伝子工学的実験については所属施設のガイドライン、倫理指針を遵守して施行。

### C. 研究結果 および D. 考察

2003 年 3 月の段階で 1800 例の臨床情報収集が終了、遺伝子検体数は約 1100 例に達した。この臨床情報および遺伝子検体を活用し以下の結果を得た。この循環器内科症例の経時的データ収集を統括し特に薬剤の処方変更、治療反応性について検討した。ACE 阻害薬に対する降圧反応の相違および ACE 阻害

薬における主要副作用の一つである咳嗽と ACE、アンギオテンシノーゲン、AT1・AT2 受容体およびブラジキニン受容体(BK2 受容体)の多型性との関連性を検討した。しかしながら論文で過去に報告されている咳嗽と BK2 受容体多型との関連性を含めいまのところ、有意な関連遺伝子が同定されておらず、ACE 阻害薬の治療効果および副作用の出現には他の遺伝的要因の関与が大きい可能性が示唆されている。また循環器領域で心不全治療および不整脈治療で最近使用頻度が増加しつつあるβ遮断薬についてはその薬物代謝には 10 倍を超える個人差があることが知られているが、現在その代謝酵素 P450 のアイソザイムの多型性につき検討し、遺伝子多型・変異と薬理的差異(心不全の増悪の有無、血圧・心拍数低下の差異など)との関連性を検索中である。

またマウス・ラットを使用した動物モデルを活用し遺伝子および遺伝子産物、薬剤の生理的機能について検討を進めている。特にコクサッキーウイルスを用いた心筋炎・拡張型心筋症モデルを作成し、抗原特異的 T 細胞の浸潤が病態形成に深く関与するがその際、同時に刺激・誘導される TNF・TNF 受容体スーパーファミリー(特に 4-1BB, 4-1BBL)が心筋炎の病態に重要であることを証明している。

また、視床下部の細胞群から分泌される新規タンパク質の精製・同定に成功、培養ラット心筋細胞を含め心臓組織の Ca 濃度上昇およびチロシキナーゼの活性化し心筋を刺激する性質の蛋白であることが判明した。現在、実験動物を用いてラットの心筋梗塞、心不全モデル作成などを行い、この新規蛋白および TNF・TNF 受容体スーパーファミリーなどの蛋白および各種循環器薬剤がもたらす生理作用について機能的解析を進めている。

### E. 結論

循環器疾患治療薬剤との反応性、副作用と関連する遺伝子多型、変異を検討しているが有意な関連性をもつ多型性はいまのところ見いだされていない。今後のデータの累積と多方面にわたる薬理的作用点および薬物代謝関連因子についての検討を要する。

動物モデルを用いた生理機能解析は非常に有用で



あり、心筋炎および拡張型心筋症の形成に TNF・TNF 受容体スーパーファミリーの重要性を示し、また心臓刺激性の新規蛋白の同定に成功し機能解析を進めている。

今後、このような解析の推進により心血管病に関連した遺伝子群の機能が明らかになるとともに、薬効の有効、不応例を事前に予知することが可能になることが期待される。

#### F. 健康危惧情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表（論文発表）

Seko Y., Ishiyama S. Nishikawa T. Kasajima T. Hiroe M. Suzuki S. Ishiwata S. Kawai S. Tanaka Y. Azuma M. Kobata T. Yagita H. Okumura K. Nagai R. Expression of tumor necrosis factor ligand superfamily costimulatory molecules CD27L, CD30L, OX40L and 4-1BBL in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 2002;11:166-170

Seko Y., Kayagaki N. Seino K. Yagita H. Okumura K. Nagai R. Role of Fas/FasL pathway in the activation of infiltrating cells in murine acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J Am Coll Cardiol* 2002;1399-1403.

Seko Y., Takahashi N. Oshima H. Shimozato O. Akiba H. Takeda K. Kobata T. Yagita H. Okumura K. Azuma M. Nagai R. Expression of tumour necrosis factor (TNF) ligand superfamily co-stimulatory molecules CD30L, CD27L, OX40L, and 4-1BBL in murine hearts with acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J Pathol* 2001;195:593-603

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. そのほか 特記すべきことなし

## 疾患と遺伝子多型との連関解析と遺伝子プロモーター領域の機能解析

分担研究者 前村 浩二 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科 助手

### 研究要旨

本研究は、心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する遺伝子多型性を同定することを目的としている。そのなかで動脈硬化に代表される血管のリモデリングの病態に深く関与するマトリクスメタロプロテナーゼ (MMP) の遺伝子多型に関して MMP1 および MMP3 遺伝子多型と心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。また心血管病病態に深く関与する血管新生因子 VEGF およびその受容体調節に関わる転写因子 EPAS-1、血栓形成に関与する PAI-1 遺伝子の日内変動および転写調節に関わる CLOCK、CLIF/BMAL2 について遺伝子発現調節機構を明らかとした。このような研究の推進は循環器診療において病態生理解明に新たな糸口を与えるとともに遺伝的要因を考慮した個別化医療の実践に結びつくと考えられる。

### A. 研究目的

本研究は、心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する遺伝子多型性を同定することを目的とし、特に動脈硬化発症との関連性が期待される遺伝子群について遺伝子発現量と直接関連する可能性の高いプロモーター領域の遺伝子多型について解析し、臨床情報と照合、統合的に解析することで循環器診療に有用な遺伝子多型マーカーを検出する。さらに、プロモーターは種々の転写調節因子により遺伝子発現の調節を受け、プロモーター領域の多型はその転写因子あるいは調節因子との相互作用に差異をもたらす可能性があることから、転写因子に焦点を絞り、プロモーター領域の遺伝子発現調節に関与する転写因子の機能解析またそのような転写因子の同定を行う。

### B. 研究方法

東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として臨床データを網羅的にデータベース化を行う。遺伝子解析にあたり心臓カテーテル検査時に採血、採血検体より DNA 抽出を行い、冠動脈硬化・高血圧との関連性の示唆される遺伝子の SNP について解析を既存の手法に加え日立製作所開発の BAMPER 法と呼ばれる新しい遺伝子解析システムを活用しつつ解析し、それを臨床データベースと統合的に相関性を検討し循環器疾患発症および予後、治療反応性を規定する遺伝子マーカーの同定を試みる。遺伝子多型解析については動脈硬化関連因子、特に増殖因子および増殖因子受容体およびそれらの発現調節を行う転写因子に着目し、遺伝子の発現量の調節に直接関与する可能性の高いプロモーター領域の多型について検討を加えると同時に、プロモーター領域の遺伝子発現調節に関与する転写因子の同定およびその機能解析をあわせて施行する。特に病態との関連性が高い場合には、培養細胞および実験動物を活用し生体内における遺伝子機能について詳細に検討する。

(倫理面への配慮)

ヒト遺伝子解析に関して東京大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会において申請、承認を受けたのち、倫理委員会にて承認された承諾書を使用し十分な口頭説明の上、承諾を得て採血を行い、遺伝子解析を施行。また動物実験および遺伝子工学的実験については所属施設のガイドライン、倫理指針を遵守して施行。

### C. 研究結果 および D. 考察

動脈硬化に代表される血管のリモデリングの病態に深く関与するマトリクスメタロプロテナーゼ (MMP) の遺伝子多型に関して、東京大学循環器内科で収集している遺伝子検体および臨床情報データベースを活用して MMP 遺伝子多型と心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。MMP-1 プロモーター領域-1607 1G/2G 多型、MMP-3 プロモーター領域-1171 5A/6A 多型はそれぞれ、その多型の部位または近傍が転写因子結合部位があるために転写活性が遺伝子多型毎に異なることが示された。さらにこの2つの多型は、同一染色体上近傍に存在するために互いに強い連鎖不平衡を認め、MMP3 の5AアレルおよびMMP1 1G-MMP3 5A ハプロタイプを保有することは有意に心筋梗塞発症のリスク因子となることを明らかとした。この遺伝子型は心筋梗塞を伴わない冠動脈硬化症（狭心症、無痛性心筋虚血）とは関連性が乏しいことから、粥腫崩壊に関連した病態に関連した遺伝的マーカーである可能性が示唆された。

動脈硬化の進展に伴って組織の灌流不全が生じる結果、虚血・低酸素という病態が生じるが、そのような虚血・低酸素状態において VEGF、エリスロポエチンや解糖系酵素などの発現が上昇する。その発現誘導に関わり、かつ内皮に発現が限局している転写因子 EPAS-1 に着目し解析したところ VEGF およびその受容体などの転写を低酸素誘導を通じて活性化すること、また活性化ドメインを欠失させた truncated EPAS1 が dominant negative に作用して EPAS1 および HIF1 の血管新生促進作用を抑制することを明らかにした。また EPAS1 の VEGF およびそ

の受容体に対する活性化の相違を臨床的に検討するため、EPAS-1 の結合部位の近傍の遺伝子多型性について VEGF およびその受容体につき現在検索中である。

さらに心筋梗塞発症のメカニズムの一つとして血栓形成が重要であるが、凝固促進因子の一つ PAI-1 には日内変動があることが知られ、心筋梗塞発症頻度が高いとされる朝方に発現が上昇していることが本来知られている。この PAI-1 遺伝子発現の日内変動が時計遺伝子でありかつ転写因子である CLOCK と CLIF/BMAL2 が関与していることを明らかにした。現在、PAI-1 のプロモーター領域の遺伝子多型性についてこの転写因子による調節の相違を含め解析を進めている。

#### E. 結論

循環器疾患関連遺伝子の有用な遺伝的マーカーの同定とその機能解明を目指し、特に動脈硬化性疾患発症に寄与する遺伝子群のプロモーター多型およびプロモーターの調節機構について検討した。MMP-1 プロモーター領域-1607 1G/2G 多型、MMP-3 プロモーター領域-1171 5A/6A 多型からなるハプロタイプが心筋梗塞発症に関連することが示された。また心血管病において重要な血管新生因子 VEGF およびその受容体、また血栓形成に関与する PAI-1 についてその遺伝子発現を調節する転写因子群について詳細に解析し、その調節機構を明らかにした。本研究により心血管病の病態生理について分子レベルにおいて明らかになるのと同時に実地臨床において有用な遺伝的素因が明確化されることとなり、我々の研究は本領域において十分な成果を挙げることが期待される。

#### F. 健康危惧情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表 (論文発表)

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Sato A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic Variations of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Promoter Regions and their Associations with Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Int J Cardiol* (in press)

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Makamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile823Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* (in press)

Maemura K, Nagai R. Novel insight into the role of endothelial PAS domain protein 1 in congestive

heart failure. *J Moll Cell Cardiol* 2002;34:703-707

Watanabe M, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Gray S, Lee ME, Jain MK. Regulation of smooth muscle cell differentiation by AT-rich interaction domain transcription factors Mrf2alpha and Mrf2beta. *Circ Res* 2002;91:382-389

Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashii Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R, Kurihara H. Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1310-1315

Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nature Med* 2002;8:856-863

Layne MD, Yet SF, Maemura K, Hsieh CM, Liu X, Ith B, Lee ME, Perrella MA. Characterization of the mouse aortic carboxypeptidase-like protein promoter reveals activity in differentiated and dedifferentiated vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2002;90:728-36.

Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med*. 2002;80:105-16.

Maemura K, Layne MD, Watanabe M, Perrell MA, Nagai R, Lee ME. Molecular mechanisms of morning onset of myocardial infarction. *Ann NY Acad Sci* 2001;947:398-402

Imai Y, Shiindo T, Maemura K, Kurihara Y, Nagai R, Kurihara H. Evidence for the physiological and pathological roles of adrenomedullin from genetic engineering in mice. *Ann NY Acad Sci* 2001;947:26-33.

Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS.

Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res*. 2001;89:168-73

Layne MD, Yet SF, Maemura K, Hsieh CM, Bernfield M, Perrella MA, Lee ME. Impaired abdominal wall development and deficient wound healing in mice lacking aortic carboxypeptidase-like protein. *Mol Cell Biol* 2001;21:5256-5261

Wiesel P, Patel AP, Carvajal IM, Wang ZY, Pellacani A, Maemura K, DiFonzo N, Rennke HG, Layne MD, Yet SF, Lee ME, Perrella MA. Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circ Res* 2001;88:1088-1094

Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, Perrella MA, Lee ME. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 2001;276:17479-17483

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. そのほか 特記すべきことなし

## 臨床データのファイリングとその活用に関する研究

分担研究者 林 同文 東京大学大学院医学系研究科・薬剤疫学 助手

### 研究要旨

心筋梗塞、高血圧に代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する臨床的指標および遺伝的多型性を同定することを目的とし、包括的な臨床データベースを構築、それを活用することにより利尿ペプチドが遺伝的影響を受けることなく心不全および虚血性心疾患の重症度の予知マーカーになること、また ABCA1 遺伝子多型が HDL 濃度を規定し、それを介して動脈硬化発症に関連する可能性があることを示した。

これらの臨床的知見は実地臨床に大いに貢献するものであると考える。

### A. 研究目的

本研究は、心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する要因について遺伝的背景も加味しつつ各種臨床的指標、検査データおよび心血管疾患の病態に関連することが期待される遺伝子多型性を統合的に解析することにより、循環器診療において有用な臨床事象、指標および遺伝的背景を明らかにすることを目的としている。さらに診療データベースを活用し迅速に臨床現場にデータを還元することにより、患者の個性に合わせた個別化医療の実践が可能になるような汎用的で実地臨床に還元される診療支援システム構築を目指すものである。

### B. 研究方法

東京大学循環器内科において心臓カテーテルを施行した全症例を対象として数百項目にわたる膨大な臨床データを網羅的にデータベース化を行う。遺伝子解析にあたり心臓カテーテル検査時に採血、採血検体より DNA 抽出を行い、心血管疾患との関連性が高い遺伝子多型性について主としてアミノ酸変異を伴うエクソン領域の遺伝子多型について、従来より用いられる直接シークエンス法などの手法に加えて、共同研究者である日立製作所が開発した primer extension の変法である BAMPER 法と呼ばれる新しい遺伝子解析システムを活用しつつ解析する。さらにそのデータを集積した臨床情報と照合し遺伝子多型のもつ意義について検討する。そのほか、臨床検査指標間あるいは臨床検査データと病態との関連性の有無についても検証し、実地臨床に有用な臨床検査指標を同定する。

（倫理面への配慮）

ヒト遺伝子解析に関して東京大学医学部ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会において申請、承認を受けたのち、倫理委員会にて承認された承諾書を使用し十分な口頭説明の上、承諾を得て採血を行い、遺伝子解析を施行。また動物実験および遺伝子工学的実験については所属施設のガイドライン、倫理指針を遵守して施行。

### C. 研究結果 および D. 考察

2003年3月の段階で1800例の臨床情報収集が終了、遺伝子検体数は約1100例に達した。この臨床情報および遺伝子検体を活用し以下の結果を得た。

本来心不全患者で血中濃度が上昇するマーカーとして知られるナトリウム利尿ホルモン（ANP, BNP）が、左室収縮能力が正常である狭心症患者群において、その病変枝数と正相関し、狭心症の重症度マーカーとなる可能性があること、その機序として心筋虚血による拡張機能障害が背景にあることを見いだした。さらに糖尿病を合併している患者群においては特にその有意差は大きく、心疾患の有無を評価する上で冠動脈硬化の評価を行う上での非侵襲的検査としての意義を明らかにした。また ANP, BNP およびこの受容体のうちこれら利尿ペプチドのクリアランスに関連するとされる受容体 NPR-C には遺伝子多型が知られ、ANP, BNP との血中濃度との関連性を検討したが、それについては有意差を認めず、ANP, BNP は遺伝的影響を受けることなく、心不全のみならず冠動脈疾患重症度の予知マーカーになることが明らかとなった。

また冠動脈硬化および心筋梗塞発症に関連する遺伝子のうち、とくにアミノ酸変異を伴うエクソン領域の遺伝子多型解析を施行しており、そのなかで HDL コレステロール合成に関して lipid poor ApoA1 particle にコレステロールエステルを付与して HDL コレステロール生成に関与する ATP-binding cassette A1 (ABCA1) の遺伝子多型に着目、Ile823Met, Arg291Lys の 2 つのエクソン領域の遺伝子多型について解析したところ、両者に連鎖は認められず、前者の遺伝子多型が HDL コレステロールと有意に関連し Met アレルの保有者では HDL コレステロール濃度が高値を示す傾向があり、HDL 濃度を介して冠動脈疾患発症減少に関連する可能性が示唆された。また臨床データベースそのものの改良を加え、症例毎の断面的研究のみならず、時系列展開をすることによる予後・治療反応性について追跡可能となり、現在、薬物療法に対する治療反応性などを考慮にいれつつ解析を進めている。

#### E. 結論

循環器疾患患者の包括的臨床情報データベース構築により、利尿ペプチドが心不全の予知マーカーとしての意義に加え、虚血性心疾患の重症度を予知する指標になることが示された他、遺伝子多型を含めた解析から ABCA1 遺伝子 Met823Ile 多型が HDL 濃度と相関し、それを介して動脈硬化に関連する可能性が示唆された。今後、臨床情報収集と遺伝子情報を含めたデータ解析により、実地臨床に応用可能なマーカーを複数検出することができ、最終的にはそれを実地診療において活用されることが期待される。

#### F. 健康危惧情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表（論文発表）

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Sato A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic Variations of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Promoter Regions and their Associations with Susceptibility to Myocardial Infarction in Japanese. *Int J Cardiol* (in press)

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Makamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile823Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* (in press)

Monzen K, Zhu W, Kasai H, Hiroi Y, Hosoda T, Akazawa H, Zou Y, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Komuro I. Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:493-500

Gu Y, Zou Y, Aikawa R, Hayashi D, Kudoh S, Yamauchi T, Uozumi H, Zhu W, Kadowaki T, Yazaki Y, Komuro I. Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 2001;223:35-46.

Monzen K, Hiroi Y, Kudoh S, Akazawa H, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Kawabata M, Miyazono K, Ishii S, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol* 2001;153:687-698.

Shimoyama M, Hayashi D, Zou Y, Takimoto E, Mizukami M, Monzen K, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Calcineurin inhibitor attenuates the

development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension. *J Cardiol* 2001;37:114-118

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. そのほか 特記すべきことなし