

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横山 知永子

平成15年（2003）年3月

目 次

I	総括研究報告書	
	動脈硬化・心不全等の循環器疾患に関わる遺伝子・タンパク質の機能に関する研究	2
	横山 知永子	
II	分担研究報告	
1	心血管系の恒常性に関わる脂質代謝酵素遺伝子の機能とその改変マウスに関する研究	8
	横山 知永子	
2	血管系の恒常性に関わる脂質代謝酵素遺伝子の機能解析	11
	田邊 忠	
3	血管内皮細胞の機能に関わる遺伝子の動脈硬化等の循環器病における役割に関する研究	13
	沢村 達也	
4	心筋虚血再灌流傷害によるアトレノメデュリンの保護作用と作用機序の検討	16
	寒川 賢治	
5	シーンターゲティングによる血管制御に関わる新規遺伝子の機能解析	19
	永井 良三	
6	心血管系の障害及び機能維持に関わるヌクレオチド代謝のための遺伝子改変動物の作成	23
	森崎 隆幸	
7	心筋および血管平滑筋のカルシウムシグナルに関わる遺伝子の機能解析	25
	竹島 浩	
8	遺伝子異常と心機能の相関	27
	菅 弘之	
9	遺伝子改変小動物を用いた右心系循環器障害の発生機構と治療に関する研究	29
	白井 幹康	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV	別刷（別添）	

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
総括研究者報告書

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

主任研究者 横山知永子 国立循環器病センター研究所 室長

各種遺伝子改変マウスや病態モデル動物の作成と解析を行い、以下のごとく多くの成果と創薬や治療法開発に向けた今後への期待が得られた。

1) PGI 合成酵素遺伝子欠損により、血小板凝集抑制や血管平滑筋弛緩作用、細胞増殖抑制能をもつ PGI を欠損したマウスは、血圧の上昇と動脈硬化様の血管壁肥厚や狭窄、間質の線維化が惹起され、PGI が血管壁の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが個体レベルで示唆された。また、PGI 合成経路が遮断されたことにより、炎症に関与する PGE 産生が上昇しており、PGE 合成酵素の炎症による発現誘導に転写因子 Egr-1 が必須であることが明らかになった。今後の PGI 欠損マウスを用いた血管障害抑制薬の探索が期待される。

2) 虚血性下肢結核モデルマウスの下肢筋肉内への PGI 合成酵素と HGF の両遺伝子導入は、HGF の血管新生と血流増加効果を増強させることを見出し、閉塞性動脈硬化症(ASO)など新たな血管障害治療への PGI 合成酵素遺伝子の利用が期待される。また PPAR δ を介する新しい PGI シグナル伝達系が存在することを明らかにし、本新規シグナル伝達系に応答する候補遺伝子群を同定した。

3) 炎症や虚血再灌流障害と関連した LOX-1 の全く新しい機能を見出した。酸化 LDL 受容体としての機能とこれらの新しい機能がどのように複合して循環器疾患の成り立ちに関わっているかが今後の焦点である。

4) アドレノメデュリンの短期的な投与は、心筋における虚血再灌流傷害を著明に軽減させた。この効果は主に、アドレノメデュリンの Akt 活性化に伴う抗アポトーシス作用によると考えられ、臨床応用への可能性が示唆された。

5) 心血管系疾患の基本病態として、炎症、間質細胞の活性化、線維化、血管障害などが大きく関与するが、その中でも重要な役割を果たすと考えられる転写因子 KLF5 を解析した。今後、KLF5 を中心とした研究を展開することにより、心血管疾患の分子メカニズムの基礎的研究が進められるとともに、臨床的にも治療戦略に重要な知見や創薬の機会を与えるものと考えられる。

6) 核酸代謝ことにアデニンヌクレオチド代謝の律速酵素 AMPD について AMPD2 腎組織における AMPD 機能に関する興味ある結果が得られた。今後、このモデル動物は未知の機能の解明、特に腎機能との関係を明らかにする目的で有用であることが期待される。

7) JP-1 欠損骨格筋の解析では、JP-1 が二つ組から三つ組への形態変化に重要であることが確認された。しかし、心筋細胞にて JP-1 と JP-2 の共発現により、骨格筋と類似の三つ組形成は観察されず、両細胞での結合膜構造の形成機構が異なることが示唆された。結合膜構築に規定する未知の因子の分子同定、サルカルメニン、ミツグミン 53 の機能解明を進めている。

8) 丸ごと拍動心を用いた心筋内興奮収縮連関動員カルシウム除去動態の解析法を確立し、今後、カルシウム除去系に関わる遺伝子異常と細胞内カルシウム筋小胞体経路再循環率の変化とを対応することにより、遺伝子異常発現があるがままの丸ごと心で機能面から解析することが可能となった。

9) 覚醒下での心肺生理機能解析システムを用いて PGI 欠損マウスを解析し、PGI は、室内気より低酸素環境での循環調節に重要であり、 α_2 アドレナリン受容体との協調作用で、低酸素時の心拍数の過剰な増大を抑制することを見出した。本システムの種々の遺伝子改変マウスへの応用は、個体レベルでの遺伝子・タンパク質の機能解析を飛躍的に進めるものと期待される。

主任研究者

横山 知永子 国立循環器病センター研究所 室長
分担研究者

田邊 忠 国立循環器病センター研究所 名誉所員
菅 弘之 国立循環器病センター研究所 所長
寒川賢治 国立循環器病センター研究所 部長
森崎隆幸 国立循環器病センター研究所 部長
永井良三 東京大学大学院医学系 教授
竹島 浩 東北大学大学院医学系 教授
白井幹康 国立循環器病センター研究所 室長
沢村達也 国立循環器病センター研究所 室長

A 研究目的

循環器病の克服は高齢化社会での大きな課題である。心血管系の機能の破綻から生ずる動脈硬化や心不全等の成因の解析は、分子生物学の進歩に伴い、近年の心血管佐渡旺盛因子とその受容体あるいはリポタンパク質受容体の研究により新しい循環調節機構が明らかになってきた。これらの物質の病態生理学的な研究成果は、多くの循環器疾患患者の救命に繋がってきた。しかし、未だ心臓や脳の梗塞などに関わる動脈硬化の機構や心不全に関わる心筋の機能調節機構などに関して未知の部分が多く、マウスやラットなど動物個体を用いる心血管系に働く遺伝子の生理機能を病態生理学的役割の解析が重要となっている。

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

B 研究方法

血管及び心機能に関連する遺伝子とその産物である

タンパク質、ペプチド、脂質の機能を細胞及び個体レベルで明らかにし、循環器疾患モデル動物の作成を目指し、生理学、生化学、薬理学、遺伝子工学等の方法を駆使して研究を実施した。本年度は、昨年度ひきつづき作成した遺伝子改変マウスと確立した解析システムを用いて研究を進めた。また、得られた結果をもとに薬剤探索を行った。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果および考察

PGI 合成酵素遺伝子破壊により作成した PGI 欠損マウスは、加齢に伴い腎臓や大動脈に動脈硬化様病変を伴う異常を発症した。腎臓は血管壁の肥厚のほか、間質の線維化、ボーマン腔の肥大など形態変化を生じ、有意な血圧の上昇および血漿中の尿素窒素およびクレアチニン値の上昇が観察された。PGI 合成酵素の過剰発現は血管内膜剥離や肺高血圧による血管壁の肥厚を抑制するが、PGI マウスでは、腎臓や大動脈に血管壁の肥厚や狭窄を生じることから、PGI が血管壁の恒常性維持に重要であることが個体レベルで示唆された。これらの異常は細胞膜上に発現している PGI の特異的 G タンパク質共役型受容体(IP)欠損マウスでは報告されておらず、田邊らが明らかにしたように(後述)、PGI は核内受容体 PPAR δ を介した経路で細胞死を制御している可能性があり、PGI 欠損による血管障害の発症に核内受容体経路の関与の可能性が *in vivo* で示唆された。また、PGI 合成酵素欠損によりプロスタノイド合成系のバランスが変化し、PGI と相反する作用を示す TX や炎症に関与する PGE の産生亢進が認められ、これらのプロスタノイドが血管障害の進展に関与している可能性も考えられる。血管障害部位での PGE 産生亢進には誘導型の膜結合型 PGE 合成酵素(mPGES)の関与が考えられ、本酵素遺伝子の構造を決定し、mPGES プロモータ/LacZ-TG マウスを作成し、レポーターアノセイトともに解析した結果、転写開始点から約 70bp 上流の 2 つの GC-box が本酵素遺伝子の発現誘導に重要な領域であり、転写因子 Egr-1 の関与が必須であることが明らかになった。今後、PGI 欠損が引き起こす血管壁肥厚のメカニズムを分子レベルで明らかにするとともに、PGI 欠損マウスを虚血性腎症などの血管障害モデルマウスとして薬剤探索に利用できると考えられる(横山)。

一方、虚血性下肢結搾モデルマウスの下肢筋肉内へのPGI合成酵素遺伝子およびHGF遺伝子の導入は、HGF遺伝子だけの場合より有意な血管新生・血流増加が確認され、ASO治療など新たな血管障害治療への本酵素遺伝子の利用が期待される。また、PGI合成酵素遺伝子を細胞に導入すると顕著な細胞生存率の低下とアポトーシスが誘導され、本現象はドミナント・ネガティブ型PPAR δ の共発現で有意に抑制された。マイクロアレイを用いた解析によって、内在性PGIによるPPAR δ の活性化に応答する候補遺伝子群を同定し、解析を進めており、新たな創薬ターゲットの発掘が期待される(田邊)。

LOX-1は、虚血再還流により、血管内皮細胞および心筋細胞において急速に発現誘導されることが明らかになった。抗LOX-1抗体の前投与は、心臓の虚血再還流モデルにおいて、結果としてできる梗塞巣の大きさを約50%抑制し、網膜の虚血再還流モデルにおいては、再還流後見られる網膜静脈での白血球のローリングを効果的に抑制した。さらに網膜の神経細胞のアポトーシスを抑制すると同時に、結果として起きる網膜の組織構築の崩壊をも抑制した。LOX-1の白血球接着分子として生体防御に働く機能は、炎症や還流障害における血管内皮細胞の役割と深く結びついており、動脈硬化における血管障害時においても、酸化LDL受容体として働くと同時に、このような生体防御機能を介して病態を修飾していることが示唆された。今後、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた解析を進め、動脈硬化のような慢性の病態におけるLOX-1の役割解明が期待される(沢村)。

虚血還流中のアドレノメデュリン(AM)の投与は、心筋梗塞サイズの低下ならびに虚血再灌流後の血行動態を著しく改善させた。また、虚血再灌流傷害による心筋細胞のアポトーシスの発生を著明に減少させた。一方、AMを投与した心筋では、Aktが活性化(リン酸化)され、Aktの上流にあるホスファチシルイノシトール3キナーゼ(PI3K)阻害により、AMによる梗塞サイズ減少・血行動態改善・アポトーシス抑制といった保護効果はほぼ抑制された。さらに、ワルトマニンを前投与した心筋では、AMによるAktの活性化が抑制された。AM投与による心筋虚血再灌流傷害保護効果を目指した臨床応用への可能性が期待される(寒川)。

Zinc-finger型転写因子KLF5のノックアウトマウスを作成し、各種心血管病態モデルの解析を進めた結果、ヘテロノックアウトマウスにおいて血管傷害に対する反応性の著明な低下、アンジオテンシンII負荷による心肥大・心臓線維化の抑制が認められ、KLF5が心血管系の外的ストレスに対する応答に重要であり、組織リモデリングを進める機能を持つことが明らかになった。さらにKLF5がアンジオテンシンIIなどの外的ストレスによって

平滑筋細胞や線維芽細胞において誘導され、PDGF-AやTGF- β などのパラクライン因子の発現を制御することを明らかとした。KLF5の転写制御機能に作用する薬剤をスクリーニングし、合成RAR α リガンドであるAm80がKLF5を抑制し、動脈硬化や心肥大・線維化を軽減させることを示した。KLF5が他の様々な転写因子・コレギュレーターと相互作用して機能する結果を得ており、KLF5の細胞に特異的な機能解析のために、細胞種特異的なKLF5トランスジェニック・ノックアウトマウスの作成を開始している。今後、Am80の臨床応用を進めるとともに、蛋白相互作用などの研究を進展させることによって、新しい創薬のターゲットが明らかになるものと考えられる(永井)。

アデニンヌクレオチド代謝の律速酵素であるAMPDの遺伝子破壊マウスを樹立・解析した結果、AMPD3遺伝子破壊マウスではAMPD2遺伝子の代償性発現上昇が見られ、組織所見に変化はなかったが、AMPD2遺伝子破壊においてはAMPD3遺伝子の発現変化は明らかではなく、発育不良と腎臓に電顕像で軽度の変化を認めた。AMPD3・AMPD2両遺伝子破壊ホモマウスは出生後約2週齢より体重増加が不良となり、生後約3週にて全て死亡し、腎尿細管の拡大と著明な拡大を認めた。両遺伝子破壊マウスでは骨格筋以外のすべての組織細胞においてAMPD酵素欠損をきたしていると考えられ、腎臓において当該核酸代謝異常がとくに重要な変化をもたらすものと結論づけられる。AMPD2遺伝子の腎臓における機能は未知であり、腎臓構成細胞のうち、機能異常をきたすものが何であるかを含め、今後、このモデル動物を用いて、ヌクレオチド代謝の果たす未知の機能の解明にむけて解析を進めることは極めて興味深い(森崎)。

骨格筋の結合膜構造は胎生期までにはほぼ心筋と同様の二つ組(diad)となるか、その後の成熟化の過程で三つ組(triad)が形成される。JPサブタイプmRNAとタンパク質の発現量を検討した結果、その結合膜構造成熟化とJP-1の発現増加がよく連関することが明らかになった。 α -MHCプロモーターにJP-1 cDNAを連結したトランスジェニックマウスを作製した結果、心筋細胞でのJP-1とJP-2の共発現と、結合膜構造中への両分子の局在が確認された。しかしながら骨格筋で観察されるような三つ組形成は見出せなかった。心筋細胞において骨格筋と類似の三つ組形成が観察されないことは、両細胞での結合膜構造の形成機構が異なることを示すものと考察される。結合膜構築に規定する未知の因子の分子同定も今後の課題となった。一方、心筋と骨格筋に特異的に発現しているサルカルメニンとミツグミン53について現在解析しており、サルカルメニンは小胞体内の独特なCa²⁺結合活性を有し、ノックアウトマウスで小胞体へのCa²⁺再取り込みに起因すると考えられる収縮機能

の変化が明らかになりつつあり、その分子機序の解明が期待される。また、ミツグミン 53 は表層膜上の新規 RBCC ファミリーに属する点などで注目されており、その欠損マウスによる機能解析が待たれる(竹島)。

イヌ拍動丸ごと心臓を用いて、スターリング効果や、細胞内カルシウム輸送系である筋小胞体カルシウムポンプと形質膜カルシウム・ナトリウム交換機構との温度依存性が、どの程度筋小胞体経路細胞内カルシウム再循環率に影響を与えるかを解析した。その結果、心室容積を変えて心室内圧が大幅に変わっても、そのスターリング効果は再循環率に殆ど影響を与えなかった。しかし、心筋温を 33 度から 38 度に 2 段階で上昇させると、再循環率が 0.7 から 0.5 に低下した。この際の Q_{10} はほぼ 2 であり、有意に温度依存性があった。今後、カルシウム除去系に関わる遺伝子異常と細胞内カルシウム筋小胞体経路再循環率の変化とを対応することにより、遺伝子異常発現をあるがままの丸ごと心で機能面から解析することが可能となった(菅)。

昨年度までに確立したマウス心肺生理機能解析システムにおいて、血圧、心拍数の日内変動リズムは、送信器の埋め込み後 2 日目で回復し、約 30 日間、安定計測できた。化学受容体反射の中核である延髄には PGI が多く分布するが、その役割は不明なため、PGI 欠損マウスを用いて、延髄の神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) あるいは α_2 アドレナリン受容体との相互作用について解析した。その結果、低酸素に対する心拍と換気の増大応答は、選択的 nNOS 阻害薬 (7-nitroindazole) で強く抑制され、抑制の程度は、野生型と PGI 欠損マウスの間でほぼ同じであった。他方、 α_2 アドレナリン受容体の拮抗薬 (idazoxan) は、野生型マウスの心拍応答のみを有意に増強させた。PGI 欠損マウスの心拍並びに両者の換気応答には無効であった。以上のことから、心拍と呼吸の低酸素性応答において、nNOS 由来の NO は、PGI の有無とは無関係に増強的に作用すること、 α_2 アドレナリン受容体は、心拍の低酸素性増大に対し抑制的に作用し、その作用には PGI が不可欠であることが明らかとなり、これらは協調して、低酸素時の心拍増大が過剰にならないようブレーキ的な役割を果たすことが示唆された(白井)。

E 結論

本年度は、13 年度に引き続き各種遺伝子改変マウスや病態モデル動物の作成と解析を行い、以下のごとく多くの成果と創薬や治療法開発に向けた今後への期待が得られた。

1) PGI 合成酵素遺伝子欠損により、血小板凝集抑制や血管平滑筋弛緩作用、細胞増殖抑制能をもつ PGI を欠損したマウスは、血圧の上昇と動脈硬化様の血管壁肥厚や狭窄、間質の線維化が惹起され、PGI が血管壁

の恒常性維持に重要な役割を果たしていることを個体レベルで示唆された。また、PGI 合成経路が遮断されたことにより、炎症に関与する PGE 産生が上昇しており、PGE 合成酵素の炎症による発現誘導に転写因子 Egr-1 が必須であることが明らかになった。今後の PGI 欠損マウスを用いた血管障害抑制薬の探索が期待される。

2) 虚血性下肢結締モデルマウスの下肢筋肉内への PGI 合成酵素と HGF の両遺伝子導入は、HGF の血管新生と血流増加効果を増強させることを見出し、ASO など新たな血管障害治療への PGI 合成酵素遺伝子の利用が期待された。また PPAR δ を介する新しい PGI シグナル伝達系が存在することを明らかにし、本新規シグナル伝達系に応答する候補遺伝子群を同定した。

3) 炎症や虚血再還流障害と関連した LOX-1 の全く新しい機能を見いだした。酸化 LDL 受容体としての機能とこれらの新しい機能がどのように複合して循環器疾患の成り立ちに関わっているかが今後の焦点である。

4) アドレノメデュリンの短期的な投与は、心筋における虚血再灌流傷害を著明に軽減させた。この効果は主に、アドレノメデュリンの Akt 活性化に伴う抗アポトーシス作用によると考えられ、臨床応用への可能性が示唆された。

5) 心血管系疾患の基本病態として、炎症、間質細胞の活性化、線維化、血管障害などが大きく関与するが、その中でも重要な役割を果たすと考えられる転写因子 KLF5 を解析した。今後、KLF5 を中心とした研究を展開することにより、心血管疾患の分子メカニズムの基礎的研究が進められるとともに、臨床的にも治療戦略に重要な知見や創薬の機会を与えるものと考えられる。

6) 核酸代謝ことにアデニンスクレオチド代謝の律速酵素 AMPD について AMPD2 腎組織における AMPD 機能に関する興味ある結果が得られた。今後、このモデル動物は未知の機能の解明、特に腎機能との関係を明らかにする目的で有用であることが期待される。

7) JP-1 欠損骨格筋の解析では、JP-1 が二つ組から三つ組への形態変化に重要であることが確認された。しかし、心筋細胞にて JP-1 と JP-2 の共発現により、骨格筋と類似の三つ組形成は観察されず、両細胞での結合膜構造の形成機構が異なることが示唆された。結合膜構築に規定する未知の因子の分子同定、サルカルメン、ミツグミン 53 の機能解明が待たれる。

8) 丸ごと拍動心を用いた心筋内興奮収縮連関動員カルシウム除去動態の解析法を確立し、今後、カルシウム除去系に関わる遺伝子異常と細胞内カルシウム筋小胞体経路再循環率の変化とを対応することにより、遺伝子異常発現をあるがままの丸ごと心で機能面から解析することが可能となった。

9) 覚醒下での心肺生理機能解析システムを用いて PGI 欠損マウスを解析し、PGI は室内気より低酸素環境

での循環調節に重要であり、 α_2 アドレナリン受容体との協調作用で、低酸素時の心拍数の過剰な増大を抑制することを見出した。本システムの種々の遺伝子改変マウスへの応用は、個体レベルでの遺伝子・タンパクの機能解析を飛躍的に進めるものと期待される。

E 健康危険情報

ヒトにまでの応用研究は無かったので、特に問題は無かった。

G 研究発表

論文発表 80件
口頭発表 34件

そのうち主なもの

論文発表

- 1) Yokoyama C, Yabuki T, Shimonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, Takeda J, Kinoshita T, Okabe M and Tanabe T Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction *Circulation* 106 2397-2403, 2002
- 2) Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-ishi S and Tanabe T Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E_2 synthase gene Essential role of the transcription factor Egr-1 *J Biol Chem* 277 28601-28608, 2002
- 3) Suhara H, Sawa Y, Fukushima N, Kagisaki K, Yokoyama C, Tanabe T, Ohtake S and Matsuda H Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for the treatment of pulmonary hypertension in rats *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 855-861, 2002
- 4) Koike H, Morishita R, Iguchi S, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Yokoyama C, Tanabe T, Ogiwara T and Kaneda Y Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene *FASEB J* 5 Feb 5 2003
- 5) Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Taniguchi H, McEvoy LM, Honda Y, Butcher EC, Masaki T and Sawamura T Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation *Proc Natl Acad Sci USA* 100 1274-1279, 2003
- 6) Shimosawa T, Shubagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K and Fujita T Adrenomedullin, an endogenous peptide,

counteracts cardiovascular damage *Circulation*, 105 106-111, 2002

- 7) 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 and 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* 8 856-863, 2002
- 8) Tomikura Y, Hisatome I, Tsuboi M, Yamawaki M, Shimoyama M, Yamamoto Y, Sasaki N, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ishiguro S, Ohgi S, Nanba E, Shiota G, Morisaki H, Morisaki T, and Kitakaze M Coordinate induction of AMP deaminase in human atrium with mitochondrial DNA deletion *Biochem Biophys Res Commun* 302 372-376, 2003
- 9) Nishi M, Hashimoto K, Kuriyama K, Komazaki S, Kano M, Shibata S and Takeshima H Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3 *Biochem Biophys Res Commun* 292 318-324, 2002
- 10) Suga H Cardiac energetics From Emax to pressure-volume area (PVA) *Clin Exp Pharmacol Physiol* in press, 2003
- 11) Shirai M, Shimouchi A, Pearson JT, Nagaya N, Tsuchimochi H, Ninomiya I and Mori H Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries *Brit J Pharmacol* in press, 2003

学会発表

- 1) Yokoyama C, Yabuki T, Ohkawara S, Wada M, Hatae T, Naraba H, Takeda J, and Tanabe T Prostacyclin-deficient mice develop vascular disorders in the kidneys *Keystone Symposia, Eicosanoid Lipid Mediators From Molecular Discovery to Clinical Application* 2003年3月 (Tahoe City, 米国)
- 2) Naraba H, Yokoyama C, and Tanabe T Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E synthase-1 gene Essential role of the transcription factor Egr-1 *Keystone Symposia, Eicosanoid Lipid Mediators From Molecular Discovery to Clinical Application* 2003年3月 (Tahoe City, 米国)

- 3) Sawamura T Pathophysiological Significance of LOX-1 in Atherosclerosis *International Society for Heart Research The 19th Annual Meeting* 2002 年
- 4) Nagai R Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling *American Heart Association Scientific Meeting* 2002 年 11 月 (Chicago, 米国)
- 5) Pearson JT and Shirai M Possible role of nitric oxide and prostacyclin in cardiorespiratory control in mice *XV Congress Cardiovascular System Dynamics Society* 2002 年

H 知的所有権の出願・取得状況

発明者 永井良三、真鍋一郎、新藤隆行

発明の名称 血管性疾患の治療のための医薬

出願人 永井良三、真鍋一郎、新藤隆行、首藤紘一、
乙卯研究所

出願日 平成 14 年 4 月 22 日

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究者報告書

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

分担研究者 横山知永子 国立循環器病センター研究所 室長

脂質生理活性物質である PGI の欠損が生体内で及ぼす影響を明らかにするため、遺伝子改変により PGI 合成酵素を欠損させ、PGI を産生できないマウスを作成した。得られた PGI 欠損マウスは、加齢とともに動脈硬化様病変を伴う血管障害を発症し、PGI が血管壁の恒常性維持に重要であることが個体レベルで示唆された。また、PGI 合成経路が遮断されたことにより、炎症に関与する PGE 産生が上昇すること、さらに炎症による膜結合型 PGE 合成酵素の発現誘導に転写因子 Egr-1 が必須であることが明らかになった。

A 研究目的

プロスタサイクリン(又はプロスタグランジン(PG)I)は血小板凝集抑制能、血管平滑筋弛緩作用や細胞保護作用などの生理活性を有する非常に不安定な化合物である。PGI はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ(COX)によって産生された PGH₂ から PGI 合成酵素(PGIS)の作用を受けて産生されるが、PGI と拮抗する作用を有するトロンボキサン(TX)もまた同じく PGH₂ より TX 合成酵素(TXS)によって産生される。PGI と TX の生理活性は循環器系の生理機能に重要であり、両者のバランスの破綻が心筋梗塞や脳梗塞、動脈硬化などの血管障害の成因と考えられている。しかしながらそれらの詳細な作用機序は明らかでない。本研究は、これら脂質生理活性物質の生合成系に関わる酵素の遺伝子機能を解析するとともに、生合成系のバランスの変化が循環器系に及ぼす影響を細胞レベルならびに遺伝子改変動物を用いて個体レベルで解析することを目的とする。本年度は、PGI 合成酵素遺伝子改変により PGI 欠損マウスと PGE 合成酵素遺伝子のプロモータ/LacZ-トランスジェニックマウスを作成し、PGI の血管恒常性維持への重要性と PGE 合成酵素発現誘導の必須因子を明らかにした。

B 研究方法

1 PGI 合成酵素遺伝子欠損マウスの解析

マウス PGI 合成酵素遺伝子を単離し、酵素の活性部位をコードする領域を neo 耐性遺伝子に置き換えたターゲットヘクターを構築した。相同組み換えを起こした ES 細胞を単離し、本酵素遺伝子欠損マウスを作成した。マウスの遺伝子背景を均一にするため、C57/BL6J 系マウスに6回戻し交配を行った。

1) マウス血漿及び組織中プロスタグランジンの測定

インドメタシン存在下で採血し、マウス血漿を調製した。15 匹分の血漿をプールして各種 PG 測定用に分け、

トレーサーとして [³H] 標識の各 PG をそれぞれ添加して ODS カラム、HPLC で精製した。腎および肺組織は液体窒素中で粉碎し、エタノール抽出後、血漿と同様に精製した。精製サンプル中の PG は、各種 PG 酵素免疫測定法で定量した。

2) 血圧の測定

テールカフを用いた非観血式血圧測定法により測定した。1 個体当たり連続5回測定し、平均を個体の血圧値とした。

3) 血中尿素窒素およびクレアチニンの測定

エーテル麻酔下にマウス腹部大静脈よりヘパリン採血し、血漿中の尿素窒素およびクレアチニンを測定キント(和光)を用いて定量した。

4) 腎形態変化の観察

マウスはエーテル麻酔下で生理食塩水で還流した後、腎臓を摘出し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定した。パラフィン包埋を行い連続切片を作成した後 PAS、PAM ならびに MTC 染色を行った。また、抗コラーゲン抗体で免疫染色を行った。

5) 胸部大動脈血管壁肥厚の観察

マウス大動脈は生理食塩水で還流した後、10%ホルマリン中性緩衝液で還流固定した。胸部大動脈はパラフィン包埋後不連続切片を作成し、MTC 染色を行った。

2 膜結合型 PGE 合成酵素(mPGES)発現誘導機構の解析

1) マウス mPGES 遺伝子の構造決定とトランスジェニック(TG)マウスにおける発現誘導

マウス 129SvJ ゲノムライブラリーより mPGES 遺伝子を単離した。酵素遺伝子の 5' 上流域(約 2 kb)をβ-ガラクトシダーゼ発現ヘクターに挿入し、TG マウスを作成した。得られた TG マウスに LPS(5mg/kg)を腹腔投与し、16 時

間後に各臓器における β -ガラクトシダーゼ活性と mPGES mRNA レベルを調べた。

2) mPGES プロモータ領域の決定と結合因子の同定

段階的に欠失させた本酵素遺伝子の 5' 上流域をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入して作成したレポーターヘクターを MC3T3-E1 および RAW264.7 細胞に導入した。IL-1、TNF- α 、TPA、LPS 等で細胞を刺激し、16 時間後にレポーターアッセイを行った。決定したプロモータ領域の配列を用い、TPA 刺激細胞の各抽出液と反応させ、ゲルシフトアッセイ、サウスウエスタン解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

1 PGI 合成酵素遺伝子欠損マウスの解析

PGI 合成酵素欠損マウスは PGI を欠損しており、加齢に伴い腎臓に形態変化を伴う異常を発症した。非観血的に血圧を測定した結果、野生型と比較して欠損マウスでは有意な血圧の上昇が観察された。しかしながら 10 週齢までは野生型と差は認められなかった。腎機能低下の指標として血漿中の尿素窒素およびクレアチンを測定したところ、いずれも野生型と比較して高い値を示した。腎組織像を観察した結果、間質の線維化、細動脈壁や腎動脈の肥厚や狭窄、ボーマン腔の拡大などが観察された。また、障害部位にはコラーゲンの発現上昇が免疫染色により観察された。

23-25 週齢の欠損マウスの胸部大動脈を観察した結果、中膜平滑筋層と外膜層は野生型に比べ、それぞれ約 1.2 倍と 2 倍の肥厚が観察された。しかしながら新生内膜層の増殖はほとんど観察されず、血管内径に差は認められなかった。

PGI 合成酵素欠損によりプロスタノイド生合成系のバランスが変化していることが予想されるため、血漿中、腎および肺組織における PG 量を測定した。PGI 合成酵素欠損マウスでは PGI の安定代謝物である 6-keto PGF_{1 α} の減少に対して TX および PGE の産生上昇が認められた。

2 膜結合型 PGE 合成酵素(mPGES)発現誘導機構の解析

マウス mPGES 遺伝子は 3 つのエキソンからなり約 10 kb に分布していた。5' 上流域には典型的な TATA-box は認められず、転写開始点の 70bp 上流に 2 つの GC-box が存在した。1.8 kb 上流までに C/EBP α 、AP-1、C/EBP β 、CACCC 結合因子の認識配列が認められた。

mPGES は LPS 刺激により著しく発現誘導されるので、mPGES プロモータ/LacZ-TG マウスを作成し、LPS 刺激 16 時間後に各臓器における β -ガラクトシダーゼ活性を調べた結果、胸腺、肺、胃、腎、脾において著しく上昇した。この結果は各臓器における本酵素 mRNA の発現誘導と一致した。レポーターアッセイの結果、転写開始点から約 70bp 上流に認められた 2 つの GC-box が本酵素遺伝子の発現誘導に重要な領域であることが明らかになった。さらに、ゲルシフトアッセイにより、TPA 刺激後経時的に出現するバンドを見出した。またこのバンドの出現は TPA 濃度依存的であった。この GC-box に特異的に結合するタンパク質は転写因子 Egr-1 であった。

D 考察

PGI 合成酵素の過剰発現は血管内膜剥離や肺高血圧による血管壁の肥厚を抑制するが、PGI 合成酵素欠損マウスでは、腎臓に血管壁の肥厚や狭窄を生じ、PGI が血管壁の恒常性維持に重要であることが個体レベルで示唆された。これらの異常は細胞膜上に発現している PGI の特異的 G タンパク質共役型受容体(IP)欠損マウスでは報告されていない。PGI は核内受容体 PPAR δ を介した経路で細胞の生死を制御している可能性があり、PGI 欠損による血管障害の発症に核内受容体経路の関与が示唆された。また本酵素欠損マウスでは、血小板凝集抑制や血管平滑筋弛緩作用をもつ PGI の産生が抑制される代わりに PGI と相反する作用を示す TX や炎症に関与する PGE の産生が亢進しており、これらのプロスタノイドが血管障害の進展に関与している可能性も考えられる。また、血管障害部位で亢進していると考えられる PGE の産生には誘導型の膜結合型 PGE 合成酵素が作用するが、本酵素の発現誘導には転写因子 Egr-1 の関与が必須であることが明らかになった。今後、PGI 欠損マウスを血管障害モデルとして治療薬の探索への利用が期待できる。

E 結論

PGI 合成酵素欠損マウスは血小板凝集抑制や血管平滑筋弛緩作用、細胞増殖抑制能をもつ PGI が欠損しており、血圧の上昇と動脈硬化様の血管壁肥厚や狭窄、間質の線維化が惹起された。この結果は PGI が血管壁の恒常性維持に重要な役割を果たしていることを個体レベルで示したものである。また、PGI 合成経路が遮断されたことにより、炎症に関与する PGE 産生が上昇すること、ならびに PGE 合成酵素の炎症による発現誘導に転写因子 Egr-1 が必須であることが明らかになった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Yokoyama C, Yabuki T, Shimonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, Takeda J, Kinoshita T, Okabe M and Tanabe T Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation* 106, 2397-2403, 2002
- 2) Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-ishi S and Tanabe T Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E₂ synthase gene Essential role of the transcription factor Egr-1 *J Biol Chem* 277 28601-28608, 2002
- 3) Yokoyama C, Todaka T, Yanamoto H, Hatae T, Hara S, Shimonishi M, Ohkawara S, Wada M, and Tanabe T Effects of overexpression of prostacyclin synthase in vascular smooth muscle cells *Adv Exp Med Biol* 507 275-280, 2002
- 4) Ohkawara S, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T Analysis of the transcriptional regulation of mouse prostacyclin synthase gene *Adv Exp Med Biol* 507 281-286, 2002
- 5) Suhara H, Sawa Y, Fukushima N, Kagasaki K, Yokoyama C, Tanabe T, Ohtake S and Matsuda H Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for the treatment of pulmonary hypertension in rats *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 855-861, 2002
- 6) Korita D, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Yoshida M, Kakui K, Takemura M, Yokoyama C, Tanabe T and Fujii S Cyclic mechanical stretch augments prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells from pregnant women possible involvement of up-regulation of prostacyclin synthase expression *J Clin Endocrinol Metab* 87 5209-5219, 2002
- 7) Koike H, Morishita R, Iguchi S, Aoki M,

Matsumoto K, Nakamura T, Yokoyama C, Tanabe T, Ogiwara T and Kaneda Y Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene *FASB J* 5, Feb 5, 2003

2 学会発表

- 1) 奈良場博昭、横山知永子、田子なおみ、田邊忠 “膜結合型プロスタグランシンE₂合成酵素の転写調節”第75回日本生化学会大会 2002年10月(京都)
- 2) Yokoyama C, Yabuki T, Ohkawara S, Wada M, Hatae T, Naraba H, Takeda J, and Tanabe T “Prostacyclin-deficient mice develop vascular disorders in the kidneys” Keystone Symposia, Eicosanoid Lipid Mediators From Molecular Discovery to Clinical Application 2003年3月 (Tahoe City, 米国)
- 3) Naraba H, Yokoyama C, and Tanabe T “Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E synthase-1 gene essential role of the transcription factor Egr-1” Keystone Symposia, Eicosanoid Lipid Mediators From Molecular Discovery to Clinical Application 2003年3月 (Tahoe City, 米国)

H 知的財産権

なし

研究協力者

奈良場博昭 (国立循環器病センター研究所 室員)

血管系の恒常性に関わる脂質代謝酵素遺伝子の機能解析

分担研究者 田邊 忠 国立循環器病センター研究所 名誉所員

生体および細胞への血管拡張物質プロスタサイクリン(PGI)合成酵素(PGIS)遺伝子導入に伴う、PGIの新しい作用を検討した。肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子を用いた血管新生遺伝子治療において、PGIS遺伝子とHGF遺伝子の共導入は、HGF遺伝子単独よりも有意な血管新生と血流の増加が認められた。一方、PGIは一般的に良く知られた作用に加え、従来知られていなかった新規の作用を有することも明らかになった。Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド誘導性の転写因子であり、脂質代謝、糖質代謝、炎症、細胞増殖、悪性腫瘍、動脈硬化、糖尿病などの、生命維持に重要な反応や疾患に深く関与している。一方、プロスタグランジン(PG)は、循環器系の調節をはじめ生殖系、免疫系、炎症への関与など、生体の恒常性の維持に重要かつ多彩な役割を有している。PGIを含めたPGの作用は、主に細胞膜上にある特異的なGタンパク共役型受容体を介して発揮されると考えられていた。しかし、本研究において、PGIがPPAR δ の内因性リガンドとして作用し細胞に生理的変化を導くことを見出し、Gタンパク共役型受容体を経路しない、PPAR δ 依存型の新しいPG情報伝達経路が存在することを明らかにした。さらに、本経路に反応する候補遺伝子群の解析を進めている。

A 研究目的

本研究では、血管新生遺伝子治療においてPGIS遺伝子導入がどのような効果をもつか明らかにすることを目的とした。また、PPAR δ は多くの組織で普遍的な発現が認められ、PGIアナログがPPAR δ と結合することが報告されているが、PPAR δ の生理的な機能に関しては不明な点が多く、内因性PGIとの関係もほとんど不明であることから、PPAR δ とPGIシグナル伝達との関係を明らかにすることを目的とした。

B 研究方法

ヒトPGIS遺伝子およびHGF遺伝子を、虚血性下肢結核モデルマウスの下肢筋肉内へ導入した後、血管新生および血流の変化を測定した。また、内在的にPGISおよびGタンパク結合型PGI受容体の発現の認められないモデル細胞を用いて、PGIS遺伝子または部位特異的置換を導入した不活性型PGIS遺伝子を導入し発現させ、細胞の変化を観察した。さらに、ドミナント・ネガティブ型PPAR δ を作製して本解析系に導入し、観察された現象とPPAR δ との関係を解析した。また、マイクロアレイを用いた解析を行ない、PGI-PPAR δ シグナリング経路への応答遺伝子の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究において、動物実験および遺伝子組換え実験等は各所属施設の認証を得て行ない、十分な配慮に基づいて行なった。

C 研究結果

虚血性下肢結核モデルマウスの下肢筋肉内へのヒトPGIS遺伝子およびHGF遺伝子の導入は、HGF遺伝子だけの場合より有意な血管新生・血流増加が確認された。一方、モデル細胞においてPGIS遺伝子を導入すると顕著な細胞生存率の低下とアポトーシスが誘導された。アポトーシスに特徴的な細胞の形態変化を指標として、本現象におけるPGIシグナル伝達経路の解析を行なったところ、本現象はドミナント・ネガティブ型PPAR δ の共発現で有意に抑制された。さらに、マイクロアレイを用いた解析によって、内在性PGIによるPPAR δ の活性化に反応する候補遺伝子群を同定した。

D 考察

PGIS遺伝子の導入は、HGF遺伝子を用いた血管新生遺伝子治療における血管新生と血流の増加に有効であったHGFは抗アポトーシス作用を有することが知られており、患部において両遺伝子の導入によって新たに産生されたPGIとHGFが相互に作用し合うことで、結果的に遺伝子治療の効果として良好な血管新生と血流の増加を導いたものと考えられた。さらに本研究では、モデル細胞系へのPGIS遺伝子導入系を用いることで、細胞内PGIがPPAR δ の活性化を介して、細胞の生死制御へ関与していることを新たに見出しただけでなく、本現象が、これまで内因性リガンドによる生理機能が全

く不明だった核内受容体 PPAR δ を介した現象であることを明らかにした。さらに、マイクロアレイを用いた解析によって、PGI-PPAR δ シグナル伝達系に応答する候補遺伝子群を同定した。現在、さらに新しいPGIの薬理作用の検索も含めて、さらに詳細な解析を行なっている。

E 結論

PGIS 遺伝子の導入は、HGF を用いた血管新生遺伝子治療の効果をより良好に増強した。さらに、PPAR δ を介する新しいPGIシグナル伝達系が存在することを明らかにした。また、本新規シグナル伝達系に応答する候補遺伝子群を同定した。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Tanabe T and Tohno N Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 95-114, 2002
- 2) Hatae T and Tanabe T PPARs and signal transduction of prostaglandins *Seikagaku* 74 551-554, 2002
- 3) Yokoyama C, Yabuki T, Shumonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, Takeda J, Kinoshita T, Okabe M and Tanabe T Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction *Circulation* 106 2397-2403, 2002
- 4) Korita D, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Yoshida M, Kakui K, Takemura M, Yokoyama C, Tanabe T and Fujii S Cyclic mechanical stretch augments prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells from pregnant women possible involvement of up-regulation of prostacyclin synthase expression *J Clin Endocrinol Metab* 87 5209-5219, 2002
- 5) Suhara H, Sawa Y, Fukushima N, Kagisaki K,

Yokoyama, C, Tanabe, T, Ohtake, S and Matsuda, H Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for the treatment of pulmonary hypertension in rats *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 855-861, 2002

- 6) Asano T, Shoda J, Ueda T, Kawamoto T, Todoroki T, Shumonishi M, Tanabe T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Mutoh M, Tanaka N and Miwa M Expressions of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E-receptors in carcinoma of the gallbladder crucial role of arachidonate metabolism in tumor growth and progression *Clin Cancer Res* 8 1157-1167, 2002
- 7) Koike H, Morishita R, Iguchi S, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Yokoyama C, Tanabe T, Ogihara T and Kaneda Y Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene *FASEB J* 5 Feb 5, 2003

2 学会発表

- 1) 波多江利久、田辺忠、PPAR δ を介する新しいホルモン系の解析、第25回日本分子生物学会年会、2002年12月(横浜)
- 2) Yokoyama C, Yabuki T, Ohkawara S, Wada M, Hatae T, Naraba H, Takeda J, and Tanabe T Prostacyclin-deficient mice develop vascular disorders in the kidneys Keystone Symposia, Eicosanoid Lipid Mediators From Molecular Discovery to Clinical Application. 2003年3月(Tahoe City, 米国)

H 知的財産権

なし

研究協力者

波多江利久 (国立循環器病センター研究所 室員)

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
分担研究報告書

血管内皮細胞の機能に関わる遺伝子の動脈硬化等の循環器病における役割に関する研究

分担研究者 沢村 達也 国立循環器病センター研究所 室長

血管内皮細胞の機能に大きな役割を果たしていることが予想されているレクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)の研究を中心に、動脈硬化の治療へつながる可能性を追求している。本年度は、虚血再還流障害について検討し、LOX-1が再還流による臓器障害の成因に深くかかわっていることが明らかとなった

A 研究目的

血管内皮細胞の機能が循環系の機能調節に非常に重要であることは、今日では広く受け入れられることとなった。分担者は動脈硬化の際に血管内皮細胞の機能変化を媒介する可能性のある分子、レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)の同定、構造決定をこれまでの研究で行った。本研究はLOX-1分子の動脈硬化などの循環器疾患における役割を探ることにより病気のメカニズムを明らかにするとともに効果的な新しい治療法を開発することを目的とする。とくに、多くの患者が存在する動脈硬化の、病態の基本に関わる分子を対象とした治療を行うことができれば、従来の治療とは一線を画する治療効果を上げることができると考えられる。

B 研究方法

LOX-1 中和抗体

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

虚血再還流障害モデル

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

C 研究結果

LOX-1の発現は、通常のレベルと比して、虚血再還流により、血管内皮細胞および心筋細胞において急速に誘導がかかることが明らかとなった。つぎに、抗LOX-1抗体を投与して、虚血再還流により起きる臓器障害におけるLOX-1の関与を解析した。心臓の虚血再還流モデルにおいては、抗LOX-1抗体の前投与は、梗

塞危険領域の大きさには変化を与えなかったが、結果としてできる梗塞巣の大きさを約50%抑制した。

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

D 考察

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

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

E 結論

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

F 健康危険情報
なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) D Li, H Chen, F Romeo, T Sawamura, T Saldeen and J L Mehta, Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells role of LOX-1 *J Pharmacol Exp Ther* 302 601-605, 2002
- 2) M Honjo, M Inatani, N Kido, T Sawamura, B Y Yue, Y Honda and H Tanihara, A Myosin Light Chain Kinase Inhibitor, ML-9, Lowers the Intraocular Pressure in Rabbit Eyes *Exp Eye Res* 75 135-142, 2002
- 3) M Chen, T Masaki and T Sawamura, LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis *Pharmacol Ther* 95 89, 2002
- 4) H Morawietz, N Duerrschmidt, B Niemann, J Galle, T Sawamura and J Holtz, Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1 *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 1 9S-12S, 2002
- 5) Y Delneste, G Magistrelli, J Gauchat, J Haeuw, J Aubry, K Nakamura, N Kawakami-Honda, L Goetsch, T Sawamura, J Bonnefoy and P Jeannin, Involvement of LOX-1 in Dendritic Cell-Mediated Antigen Cross-Presentation *Immunity* 17 353, 2002
- 6) T Nakagawa, M Akagi, H Hoshikawa, M Chen, T Yasuda, S Mukai, K. Ohsawa, T Masaki, T Nakamura and T Sawamura, Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis *Arthritis Rheum* 46 2486-2494, 2002
- 7) D Li, V Williams, L Liu, H Chen, T Sawamura, T Antakli and J L Mehta, LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury modulation of MMP-1 and inflammation *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 H1795-1801, 2002
- 8) T Imanishi, T Hano, T Sawamura, S Takarada and I Nishio, Oxidized low density lipoprotein potentiation of fas-induced apoptosis through lectin-like oxidized-low density lipoprotein receptor-1 in human umbilical vascular endothelial

cells *Circ J* 66 1060-1064, 2002

- 9) T Nakagawa, T Yasuda, H Hoshikawa, M Shimizu, T Kakumura, M Chen, T Masaki, T Nakamura and T Sawamura, LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt *Biochem Biophys Res Commun* 299 91-97, 2002
- 10) M Honjo, H Tanihara, K Nishijima, J Kiryu, Y Honda, B Y Yue and T Sawamura, Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 120 1707-1713, 2002
- 11) K Kataoka, K Hasegawa, T Sawamura, M Fujita, T Yanazume, E Iwai-Kanai, T Kawamura, T Hirai, T Kita and R Nohara, LOX-1 pathway affects the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury *Biochem Biophys Res Commun* 300 656-660, 2003
- 12) M Honjo, K Nakamura, K Yamashiro, J Kiryu, H Tanihara, L M McEvoy, Y Honda, E C Butcher, T Masaki and T Sawamura, Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation *Proc Natl Acad Sci USA* 100 1274-1279, 2003
- 13) D Li, L Liu, H Chen, T Sawamura, S Ranganathan and J L Mehta, LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells *Circulation* 107 612-617, 2003
- 14) L Cominacini, A Fratta Pasini, U Garbin, A Pastorino, A Rigoni, C Nava, A Davoli, V Lo Cascio and T Sawamura, The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells *J Am Coll Cardiol* 41 499-507, 2003

2 学会発表

- 1) 酸化LDL受容体LOX-1の病態生理的意義
沢村達也
第7回関西医大心臓血管病フォーラム
- 2) 酸化LDL受容体LOX-1と動脈硬化、炎症
沢村達也
第8回成人病の病因・病態の解明に関する研究会
- 3) 酸化LDL受容体LOX-1と動脈硬化
沢村達也
第34回日本動脈硬化学会総会シンポジウム

- 4) 酸化LDL受容体LOX-1の機能と病態との関連
沢村達也
第3回動脈硬化2001特別講演
- 5) 酸化LDL受容体LOX-1
沢村達也
第25回日本高血圧学会総会サテライトシンポジウム
- 6) Pathophysiological Significance of LOX-1 in
Atherosclerosis
Tatsuya Sawamura
International Society for Heart Research The 19th
Annual Meeting

H 知的所有権の取得
なし

心筋虚血再灌流傷害におけるアトレノメデュリンの保護効果と作用機序の検討

分担研究者 寒川 賢治 国立循環器病センター研究所 部長

アトレノメデュリン(AM)は、血管拡張作用に加え種々の臓器保護効果を有することが知られており、主に酸化ストレスに関連した保護効果が報告されている。さらに、AM の内皮依存性の血管拡張作用がAktを介することが知られており、Aktの活性化を介して、臓器保護効果を発揮する可能性が示唆される。しかし、これまで心筋虚血や虚血再灌流といった傷害に対する、AMの直接的な保護効果については十分な検討がなされていない。本研究では、AM投与による心筋の虚血再灌流傷害抑制効果について検討した。その結果、AMは心筋虚血再灌流傷害を著しく軽減し、その作用機序はAktを介する抗アポトーシス作用によることが明らかになり、臨床応用への可能性が示唆された。

A 研究目的

心房性ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンの発見により新しい循環調節機序が明らかになってきたように、心血管作動性の新しい因子およびその受容体の同定とそれに続く機能解析は循環調節研究の新領域への展開が期待できる。

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

このようにアトレノメデュリンは、循環ホルモンおよび心血管系の局所因子として、血管拡張作用を介して心臓や血管の保全に重要な役割を担う新しい循環調節因子であると言える。

本研究は、アトレノメデュリンとその受容体について遺伝子解析および発現調節の解析により、心血管系の機能制御のメカニズムや心血管病変の発症および修復における役割について解明すると共に、診断、治療への応用を目指したものである。これまでの研究において、アトレノメデュリン遺伝子5'隣接領域のプロモーター活性の解析により、発現調節に重要なコンセンサス配列を同定している。また、マウスアトレノメデュリン受容体の構造解析と敗血症の病態モデルにおける受容体の発現解析を行った。一方、アトレノメデュリンは虚血心や培養心筋細胞及び心筋線維芽細胞でも産生され、その遺伝

子発現は低酸素刺激により増加することが知られており、心筋梗塞等の病態に関連して、臓器保護に働く可能性が考えられる。

本年度は、①アトレノメデュリン投与が、心筋虚血再灌流モデルラットにおいて、梗塞サイズ縮小・血行動態改善等の保護作用を有するか否か、②アトレノメデュリンによる心保護作用の機序にAktの活性化を介する抗アポトーシス作用が関与するか否かについて検討を行った。

B 研究方法

1) ラット虚血再灌流モデルの作製

6週齢の雄性SDラット(180-220g)を使用して、ペントバルビタールによる麻酔・人工呼吸器下に左開胸を施行。左冠動脈を30分間結紮し、結紮解除後に閉胸。再灌流後6時間もしくは24時間目に、以下のパラメーターについて検討した。

2) 薬剤投与方法

冠動脈結紮後より、予め頸静脈より挿入しておいたカテーテルを介して60分間の薬剤投与を行った。プラセボとして生理食塩水を投与し、アトレノメデュリンは0.05 μg/kg/minで60分間投与した。さらにアトレノメデュリン投与15分前に、ホスファチンリノシトール3キナーゼ(PI3K)阻害薬であるワルトマニン16 μg/kgを静脈内投与して、0.05 μg/kg/minでアトレノメデュリンを60分間投与した。

3) 血行動態の測定

再灌流24時間後に、僅かに麻酔がかかった状態で、右頸動脈および右頸静脈より、それぞれtip付きカテーテルおよびPE50を挿入し、両心機能を評価した。

4) 心筋梗塞サイズの測定

血行動態の評価後、静脈に留置しているカテーテル

より、致死量の KCl を投与して、心臓を停止。心臓を摘出し、大動脈より逆行性の灌流固定を行った。心臓を房室間溝に沿って心基部から心尖部にかけて 4 つに切り、それぞれをパラフィン包埋切片とした。各々にマッソントリクローム染色を行い、顕微鏡にて全体像を画像化。画像解析ソフトを用いて、左室全体と梗塞巣をトレースして、梗塞サイズを決定した。

5) アポトーシスの評価

アポトーシスについては、従来の TUNEL 法による評価と DNA 断片化を評価した。

6) Akt の活性化作用

Cell Signaling Technology 社の抗体を用い、心筋組織における Akt の活性化についてウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

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

C 研究結果

- 1) 虚血再灌流中のアドレノメデュリンの投与により、再灌流 24 時間後の心筋梗塞サイズはプラセボ投与群に比べ、約半分にまで低下した。
- 2) アドレノメデュリン投与は、左室拡張末期圧を著明に低下させ、左室 dP/dT から評価する拡張能・収縮能の低下を防ぎ、虚血再灌流後の血行動態を著しく改善させた。
- 3) 虚血再灌流傷害による心筋細胞のアポトーシスの発生は、アドレノメデュリンの投与により著明に減少した。また、プラセボ投与により明らかに認められた DNA の断片化は、アドレノメデュリンの投与によりほとんど認められなくなった。
- 4) ウエスタンブロッティング法による検討の結果から、プラセボを投与した心筋組織に比べて、アドレノメデュリンを 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 60 分間投与した心筋で、明らかに Akt が活性化(リン酸化)されていた。
- 5) Akt の上流にあるホスファチシルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) を阻害することで、アドレノメデュリンによる梗塞サイズ減少・血行動態改善・アポトーシス抑制といった保護効果はほぼ抑制された。さらに、ワルトマニンを前投与した心筋では、アドレノメデュリンによる Akt の活性化が抑制されていた。

D 考察

アドレノメデュリンは血管拡張作用を有するため、梗塞減少や血行動態改善効果に血管拡張作用が関与していないかという疑問が生じる。しかし、我々は予備実験の結果から、むしろほとんど血圧が下がらない量とし

て、本研究におけるアドレノメデュリンの投与量を設定した。それ故に、今回の心保護効果は血管拡張作用よりもむしろ梗塞サイズが減少したことが、虚血再灌流後の血行動態を改善したと考えられた。

本実験におけるアドレノメデュリンの保護効果の機序について考える上で、虚血再灌流傷害による主たる細胞死の原因が何であるかということをよく考えなければならぬ。単純な虚血と比べ、虚血再灌流傷害においては、細胞死の原因としてアポトーシスを重視すべきであり、心筋梗塞後のアポトーシスは後に発生する心不全の主要因ともいわれている。本研究において、アドレノメデュリンの投与が、著しく心筋のアポトーシスを抑制したことから、その保護効果が抗アポトーシス作用を介するものであることを裏付けている。

本研究によりアドレノメデュリンは心筋の Akt を活性化し、さらにその活性化が虚血再灌流傷害の抑制に関与していることが明らかとなった。癌遺伝子である Akt は、主に抗アポトーシス作用によって、腫瘍細胞の増殖を促進させることが知られている。さらに Akt を遺伝子的に過剰発現させた心筋は、虚血再灌流に対して耐性であることが報告されている。これらの報告は、アドレノメデュリンが Akt の活性化を介して、虚血再灌流傷害を抑制した可能性を示唆している。事実、Akt の上流に位置するホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) を阻害することで、アドレノメデュリンによる効果はほとんど抑制された。以上より、本研究における心筋虚血再灌流傷害に対するアドレノメデュリンの保護効果について、Akt が非常に重要な役割を担っていると考えられた。

E 結論

アドレノメデュリンの短期的な投与は、心筋における虚血再灌流傷害を著明に軽減させた。この効果は主に、アドレノメデュリンの Akt 活性化に伴う抗アポトーシス作用によると考えられ、臨床応用への可能性が示唆された。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

- 1) N Nagaya, K Miyatake, S Kyotani, T Nishikumi, N Nakanishi and K Kangawa Pulmonary vasodilator response to adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension *Hypertens Res*, 26 Suppl S141-146, 2003
- 2) T Nishikumi, F Yoshuhara, Y Mori, K Kangawa and H Matsuoka Cardioprotective effect of adrenomedullin in heart failure *Hypertens Res*, 26

Suppl S121-127, 2003

- 3) H Okumura, N Nagaya and K Kangawa Adrenomedullin infusion during ischemia/reperfusion attenuates left ventricular remodeling and myocardial fibrosis in rats *Hypertens Res*, 26 Suppl S99-104, 2003
- 4) T Nishikimi, K Tadokoro, Y Mori, X Wang, K Akimoto, F Yoshihara, N Minamino, K Kangawa and H Matsuoka Ventricular Adrenomedullin System in the Transition From LVH to Heart Failure in Rats *Hypertension*, 41 512-518, 2003
- 5) R Nakamura, J Kato, K Kitamura, H Onitsuka, T Imamura, K Marutsuka, Y Asada, K Kangawa and T Eto Beneficial effects of adrenomedullin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats *Cardiovasc Res*, 56 373-380, 2002
- 6) T Tokudome, T Horio, F Yoshihara, S Suga, Y Kawano, M Kohno and K. Kangawa Adrenomedullin inhibits doxorubicin-induced cultured rat cardiac myocyte apoptosis via a cAMP-dependent mechanism *Endocrinology*, 143 3515-3521, 2002
- 7) Y Imai, T Shundo, K Maemura, M Sata, Y Saito, Y Kurihara, M Akishita, J Osuga, S Ishibashi, K Tobe, H Morita, Y Oh-hashii, T Suzuki, H Maekawa, K Kangawa, N Minamino, Y Yazaki, R. Nagai and H Kurihara Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 1310-1315, 2002
- 8) Y Mori, T Nishikimi, N Kobayashi, H Ono, K Kangawa and H Matsuoka Long-term adrenomedullin infusion improves survival in malignant hypertensive rats *Hypertension*, 40 107-113, 2002
- 9) T Nishikimi, Y Mori, N Kobayashi, K Tadokoro, X Wang, K Akimoto, F Yoshihara, K. Kangawa and H Matsuoka Renoprotective effect of chronic adrenomedullin infusion in Dahl salt-sensitive rats *Hypertension*, 39 1077-1082, 2002
- 10) T Nishikimi, I Shibusaki, H Iida, H Asakawa, Y Matsushita, H Mori, Y Mochizuki, Y Okamura, S Horinaka, K Kangawa, K Shimada and H Matsuoka Molecular forms of adrenomedullin in pericardial fluid and plasma in patients with ischaemic heart disease *Clin Sci (Lond)*, 102 669-677, 2002
- 11) N Nagaya, Y Goto, T Satoh, H Sumida, S Kojima, K Miyatake and K Kangawa Intravenous adrenomedullin in myocardial function and energy metabolism in patients after myocardial infarction *J Cardiovasc Pharmacol*, 39 754-760, 2002
- 12) H Nishimatsu, Y Hirata, T Shundo, H Kurihara, M Kakoki, D Nagata, H Hayakawa, H Satonaka, M Sata, A Tojo, E Suzuki, K Kangawa, H Matsuo, T Kitamura and R. Nagai Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene *Circ Res*, 90 657-663, 2002
- 13) T Shimosawa, Y Shibusaki, K Ishibashi, K Kitamura, K Kangawa, S Kato, K Ando and T Fujita Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage *Circulation*, 105 106-111, 2002

H 知的財産権

無し

研究協力者

奥村啓之(国立循環器病センター研究所)

永谷憲歳(国立循環器病センター病院)

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究者報告書
シエンターゲティングによる血管制御に関わる新規遺伝子の機能解析

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

我々は先に平滑筋細胞の形質変換に重要な Kruppel 型転写因子 KLF5/BTEB2 を同定した。本研究では KLF5 の個体での *in vivo* 機能を検討するため、ノックアウトマウスを作成した。KLF5 ノックアウトマウスは動脈傷害モデルにおいて血管壁細胞の反応性が著明に低下し、心肥大モデルにおいても明らかな心肥大・線維化の減弱が認められた。さらに血管新生の減弱も認められ、KLF5 が組織リモデリング、線維化、血管新生などの様々な面において心血管疾患の病態に重要な働きをしていることが明らかとなった。さらに、KLF5 の機能を修飾する薬剤の同定を進め、合成レチノイドが KLF5 の機能を抑制することを見出した。この薬剤は動物個体においても KLF5 機能の抑制を介すると考えられる動脈硬化、心肥大抑制作用を示した。KLF5 機能の分子機構の解明も進め、KLF5 を中心とする転写因子・コレギュレーターネットワークが組織リモデリングの制御に重要であることを明らかとした。

A 研究目的

血管病態の形成過程において形質変換・脱分化した平滑筋細胞が重要な機能を果たすことは広く知られている。これまでの研究においてアンジオテンシン II をはじめとする増殖因子や物理的・化学的刺激が平滑筋細胞の形質変換を引き起こすことが明らかにされているが、最終的に細胞の運命を決定する遺伝子発現制御機構に関してはあまりよく分かっていない。我々は平滑筋細胞の形質変換に伴って発現誘導され、脱分化平滑筋細胞のマーカーである非筋型ミオン重鎖 SMemb の転写を制御する転写因子 KLF5/BTEB2 を先に同定した。これまでの *in vitro* の解析によってこの転写因子は血管病態形成に重要である可能性が示唆された。そこで、KLF5 の動物個体における役割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作成し KLF5 の機能を *in vivo* で検討するとともに、KLF5 の機能修飾による心血管病治療法開発の可能性に関して研究を行った。

B 研究方法

KLF5 遺伝子ターゲティングベクターを作成し、通常の方法でノックアウトマウスを作成した。ホモノックアウトマウスは胎生早期に致死となったため、以下の研究にはヘテロノックアウトマウスを用いた。

心血管系の病態モデルとして、大腿動脈カフ傷害、ワイヤー傷害、アンジオテンシン II 持続負荷、大動脈結紮などを行った。血圧などの生理学的検査を行うとともに、組織学的検討を行った。

KLF5 機能に関わる薬剤の同定とその機能解析を各種分子生物学的手法と、動物モデルを用いて進めた。
(倫理面への配慮)

上記研究は培養細胞および実験動物を用いて行わ

れた。動物実験に関しては当施設のガイドラインに厳密に従い、動物愛護の観点に配慮して行われた。また、培養細胞で代替可能な実験に関しては培養細胞を積極的に用いた。

C 研究結果

本年度は、KLF5 の *in vivo* における機能を解析するために KLF5 ノックアウトマウスを作成し、各種心血管病態モデルの解析を進めた。KLF5 ホモノックアウトマウスは胎生の初期に致死となった。そこでヘテロノックアウトマウスを用いて病態モデルへの反応を検討した。ヘテロノックアウトマウスにおいて血管傷害に対する反応性の著明な低下、アンジオテンシン II 負荷による心肥大・心臓線維化の抑制が認められ、KLF5 が心血管系の外的ストレスに対する応答に重要であり、組織リモデリングを進める機能を持つことが明らかになった。さらに KLF5 の分子機能に関して検討を行い、KLF5 がアンジオテンシン II などの外的ストレスによって平滑筋細胞や線維芽細胞において誘導され、PDGF-A や TGF- β などのパラクライン因子の発現を制御することを明らかとした。つまり、KLF5 は心血管系において外的ストレスに応じて、パラクライン因子等を発現制御を介して組織リモデリングを司る機能を持つと考えられた。

以上の結果より、KLF5 の機能を修飾することにより、動脈硬化、PCI 後再狭窄、心肥大・心臓線維化などの予防・治療が行える可能性があると考えた。そこで KLF5 の転写制御機能に作用する薬剤をスクリーニングし、合成 RAR α リガンドである Am80 が KLF5 を抑制することを明らかとした。Am80 の機能をマウスの各種疾患モデルで検討し、*in vivo* においても KLF5 を抑制し、動脈硬化や心肥大・線維化を軽減させることを示した。