

KLF5 は平滑筋や線維芽細胞だけでなく、炎症性細胞や心筋細胞でも機能している可能性がある。in vivo でこれらの細胞に特異的な機能を解析するためには、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を作成することが重要となる。そこで、KLF5 を各種細胞で強発現するコンストラクトを作成した。既に心筋細胞特異的に KLF5 を発現するマウスを確立している。また、組織特異的なノックアウトマウスを作成するために KLF5 遺伝子に loxP サイトをノックインするためのコンストラクトを作成した。

一方、KLF5 の分子機能の解析により、この転写因子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た。今後、KLF5 の蛋白構造が明らかになることにより特異的な蛋白相互作用に作用する薬剤の開発が可能になると考えられる。

D 考察

今回の我々の研究によって zinc finger 型転写因子のネットワークが心血管系病態の形成に重要であることが初めて示された。特に KLF5 は初期ストレス応答で誘導される超急性期因子によって発現誘導され、中長期に組織リモデリングを調節するパラクライン因子の発現を制御することから、外的ストレスへの応答に必須の役割を果たしていると考えられる。

本研究では KLF5 機能を抑制する薬剤の同定とその臨床応用に向けての研究を行っており、合成レチノイン酸受容体リガンドが KLF5 の機能を抑制することを明らかとした。この抑制は KLF5 とレチノイン酸受容体との相互作用によるものと考えられる。KLF5 はレチノイン酸受容体以外にも核内受容体を含む複数の炎症反応に関わる転写因子と相互作用する。また、ヒストンアセチル化酵素を含む転写コレギュレーターとも相互作用することより、KLF5 を中心とした転写制御ネットワークが心血管系細胞・炎症細胞の外的ストレスへの応答を決定していると考えられる。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。

E 結論

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。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

- 1) 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. Krippel-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
- 2) Sata M, Saura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y and Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis *Nat Med* 8 403-409, 2002
- 3) Manabe I, Shindo T and Nagai R. Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis Involvement in Cardiac Hypertrophy *Circ Res* 91 1103-1113, 2002
- 4) Aizawa T, Ishizaka N, Usui S, Ohashi N, Ohno M and Nagai R. Angiotensin II and catecholamines increase plasma levels of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) with different pressor dependencies in rats *Hypertension* 39 149-154, 2002
- 5) Fukino K, Suzuki T, Saito Y, Shindo T, Amaki T, Kurabayashi M and Nagai R. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho *Biochem Biophys Res Commun* 293 332-337, 2002
- 6) Harada T, Aoyagi T, Endo Y, Uno K, Takenaka K, Nakamura F, Sonoda M, Takahashi T, Yamazaki T, Hiroi Y, Ohno M, Hirata Y and Nagai R. Effusive constrictive pericarditis due to rheumatoid arthritis revealed by pericardiocentesis with simultaneous pressure recording--a case report *Angiology* 53 105-108, 2002
- 7) Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashu Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R and Kurihara H. Resistance to neonatal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 1310-1315, 2002
- 8) Ishizaka N, Saito K, Mitani H, Yamazaki I, Sata M, Usui S, Mori I, Ohno M and Nagai R. Iron overload

- augments angiotensin II-induced cardiac fibrosis and promotes neointima formation *Circulation* 106 1840-1846, 2002
- 9) Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Mori I, Tang SS, Ingelfinger JR, Kimura S and Nagai R Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II *Hypertension* 39 122-128, 2002
- 10) Ishizaka N, Aizawa T, Yamazaki I, Usui S, Mori I, Kurokawa K, Tang SS, Ingelfinger JR, Ohno M and Nagai R Abnormal iron deposition in renal cells in the rat with chronic angiotensin II administration *Lab Invest* 82 87-96, 2002
- 11) Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N and 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* 22 1680-1685, 2002
- 12) Maemura K and Nagai R Novel Insight into the Role of Endothelial PAS Domain Protein 1 in Congestive Heart Failure *J Mol Cell Cardiol* 34 703-707, 2002
- 13) Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, Nangaku M, Hirata Y and Nagai R. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage *Hypertension* 39 838-843, 2002
- 14) Morita H, Saito Y, Kurabayashi M and Nagai R Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner *J Hypertens* 20 55-62, 2002
- 15) Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao K, Nakamura K, Tomita K, Kitamura T, Kurabayashi M, Nagai R, Higashihara E, Harris PC, Katsuki M and Horie S Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant *Hum Mol Genet* 11 1731-1742, 2002
- 16) 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 and 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* 90 657-663, 2002
- 17) Sata M, Hirata Y and Nagai R Role of Fas/Fas ligand interaction in ischemia-induced collateral vessel growth *Hypertens Res* 25 577-582, 2002
- 18) Sata M, Takahashi A, Tanaka K, Washida M, Ishizaka N, Ako J, Yoshizumi M, Ouchi Y, Taniguchi T, Hirata Y, Yokoyama M, Nagai R and Walsh K Mouse genetic evidence that tranilast reduces smooth muscle cell hyperplasia via a p21(WAF1)-dependent pathway *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 1305-1309, 2002
- 19) 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 and 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* 11 166-170, 2002
- 20) Seko Y, Kayagaki N, Seino K, Yagita H, Okumura K and 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* 39 1399-1403, 2002
- 21) Takeda N, Yokoyama I, Hiroi Y, Sakata M, Harada T, Nakamura F, Murakawa Y and Nagai R Positron emission tomography predicted recovery of complete A-V nodal dysfunction in a patient with cardiac sarcoidosis *Circulation* 105 1144-1145, 2002

2 学会発表

- 1) 12th International Vascular Biology Meeting "Roles of KLF5/BTEB2 in phenotypic modulation of smooth muscle cell and cardiovascular remodeling" 軽井沢, 2002 5 14
- 2) International Congress on cardiomyopathies and heart failure "KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, is a target gene for angiotensin II signaling and involved in cardiovascular remodeling" 京都, 2002 5 30
- 3) 第34回日本動脈硬化化学会 日本動脈硬化化学会賞受賞講演「平滑筋形質変換の分子機構 心血管リモデリング因子 KLF5/BTEB2 の役割と意義」神戸, 2002 7 19
- 4) 血管リモデリング研究会 「転写因子 KLF5/BTEB2 による心血管リモデリング制御」 御殿場, 2002 8 8 分子
- 5) 第6回日本心不全学会 会長講演 "KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor,

- both smooth muscle activation and cardiac hypertrophy” 東京, 2002 10 3
- 6) 循環器研究会「転写因子 KLF5/BTEB2 による心血管リモデリング制御」大阪, 2002 10 26 分子
- 7) The 4th Fujihara Seminar Molecular and cellular aspects of muscle contraction “KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy” 箱根, 2002 10 28
- 8) 日本脈管学会「クロマチン内の平滑筋サブタイプ特異的転写調節」東京, 2002 11 7
- 9) American Heart Association Scientific Meeting “Kruppel -like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling” シカゴ, 2002 11 19

10) Gordon Research Conference “Kruppel-like factor 5 (KLF5) controls cellular responses in vascular diseases” ヘンチュラ, 2003 1 26

11) 日本心脈管作動物質学会「動脈硬化病変の形成、進展における KLF5 と PPAR γ の役割」大阪, 2003 2 2

H 知的財産権

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、首藤絃一、

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)
分担研究報告書

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解析のための
遺伝子改変動物の作製

分担研究者 森崎 隆幸 国立循環器病センター研究所 部長

心血管系の障害および機能維持に関わる代謝系としてヌクレオチド代謝をとらえ、代謝律速である AMPD 遺伝子とりわけ、全身に発現し、筋組織では血管を含む平滑筋に発現するアインザイムをコードする AMPD2 遺伝子について、遺伝子機能を明らかにするために遺伝子改変マウスを利用し *in vivo* 解析を進めた。胚幹細胞における相同組換えにより AMPD2 遺伝子マウスを作製した。得られたマウス個体における遺伝子発現を確認するとともに、心血管系を中心に *in vivo* における形態学的変化、機能変化を解析した。AMPD2 欠損ホモマウスは交配を重ねることができ、産仔数にも野生型と大きな違いを認めなかったが、体重増加が相対的が悪く、生後数週よりタンパク尿を認めた。組織像では光顕レベルでは糸球体、尿管に異常を認めないが、電顕像で軽度の変化を認めたことから、本遺伝子が腎機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A 研究目的

心血管系の障害および機能維持に関わる代謝系としてヌクレオチド代謝をとらえ、代謝律速である AMPD 遺伝子とりわけ、全身に発現し、筋組織では血管を含む平滑筋に発現するアインザイムをコードする AMPD2 遺伝子について、*in vivo* 解析にて遺伝子機能を明らかにする。

B 研究方法

ES 細胞における相同組換えにより AMPD2 遺伝子破壊クローン細胞を得、胚盤胞インジェクションにより、AMPD2 遺伝子破壊マウスを作製した。さらに、別に作製した AMPD3 遺伝子破壊マウスとの交配により、AMPD3/AMPD2 遺伝子複合破壊マウスを作製した。得られたマウス個体における遺伝子発現を確認するとともに、心血管系を中心に *in vivo* における形態学的変化、機能変化を解析した。

(倫理面での配慮)

本研究は直接にヒトゲノム解析研究は含まず、既に明らかになったヒトゲノム情報を利用し、一方、施設の取り扱い指針に則り、実験動物を適切に取り扱って行った。

C 研究結果

AMPD2 遺伝子破壊マウスはホモ接合体は生存し、子孫を得ることが可能であった。対応する正常 mRNA は検出されなかった。別に作製した AMPD3 遺伝子破壊では AMPD2 遺伝子の代償性発現上昇が見られたが、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かった。AMPD3 遺伝子破壊ホモマ

ウスでは組織所見はどの臓器においても変化はなかったが、AMPD2 遺伝子破壊ホモマウスは体重増加が生後次第にやや不良となり、生後数週よりタンパク尿を認めた。しかし、光学顕微鏡による検索では腎組織の変化はほとんど認めなかったが電顕像で軽度の変化を認めた。さらに、交配により、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週にて全て死亡した。死亡時のマウスの組織検索では、腎尿管の拡大と著明な拡大を認めた。AMPD3・AMPD2 両遺伝子破壊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ることから、腎組織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。しかし、病的状態における機能変化と核酸代謝との関係はさらに検討が必要と考えられる。

D 考察

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 遺伝子破壊マウスが樹立され、腎組織における AMPD 機能について興味ある結果が得られた。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ぶかい。

E 結論

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

能について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。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Tomikura Y, Hisatome I, Tsuboi M, Yamawaki M, Shunoyama M, Yamamoto Y, Sasaki N, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ishiguro S, Ohgi S, Nanba E, Shota G, Morisaki H, Morisaki T, Kitakaze M
Coordinate induction of AMP deaminase in human

atrium with mitochondrial DNA deletion *Biochem Biophys Res Commun* 302 372-376, 2003

- 2) 森崎隆幸、プリン代謝異常症の実験モデル 日本臨床 61, suppl 1 482-486, 2003

2 学会発表

- 1) 森崎隆幸 他、AMP deaminase 欠損症 ゲノム解析による新たな発見 第36回日本痛風・核酸代謝学会、東京都、2003年2月13-14日

H 知的所有権の取得状況

なし

循環器系筋細胞での膜興奮から収縮に至るシグナル変換反応においては、細胞表層膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネル(DHP 受容体)、細胞内ストアの Ca^{2+} 放出チャネル(リアノシン受容体)、両受容体の機能共役の場である結合膜構造の形成に寄与するジャンクトフィリンが必須な分子として同定されている。これらの分子群の生理機能の詳細を解析するとともに、さらに Ca^{2+} シグナルに寄与する新規分子を同定することにより、循環器系疾患の病態の理解に貢献することが本研究の主目的である。平成 14 年度には以下に記載した研究を遂行した。

A 研究目的

循環器系筋細胞における膜興奮から収縮に至るシグナル変換反応においては、細胞表層膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネル(DHP 受容体)、細胞内ストアの Ca^{2+} 放出チャネル(リアノシン受容体)、両受容体の機能共役の場である結合膜構造の形成に寄与するジャンクトフィリン(JP)が必須な分子として同定されている。これらの生理調節や新規の細胞内 Ca^{2+} ストア機能に寄与する分子を同定することを目的とした。

B 研究方法

- (1) JP サブタイプの機能解析 心筋では JP-2 が特異的に発現し、骨格筋では JP-1 と JP-2 が共発現する。JP-1 と JP-2 の機能的な相違を明らかにするため、骨格筋における結合膜構造と JP サブタイプ発現の成熟化過程、心筋細胞での JP-1 異所的発現の効果について、電子顕微鏡による形態観察と分子生物学的手法にて解析した。また、心筋特異的な α -MHC プロモーターに JP-1 cDNA を連結したトランス遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製し、JP-1 と JP-2 を共発現する心筋細胞の結合膜構造の形態変化を解析した。
- (2) 新規 Ca^{2+} シグナル分子の検索 昨年度までと同様に蛍光抗体法による心筋細胞内局在を指標にした膜タンパク質のスクリーニングを遂行した。得られた分子の中で、サルカルメニンとミツグミン 53 の 2 種の分子について、クローニングによる分子構造解析、組織分布検討を遂行した。

C 研究結果

- (1)骨格筋の結合膜構造は胎生期までにほぼ心筋と同様の二つ組(diad)となるが、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明らかになった。

すなわち、JP-2 による二つ組形成後 JP-1 の共発現により三つ組への構造変換が起こると仮定すると、JP-2 を発現している心筋での JP-1 発現で二つ組から三つ組への構造変化が生じることが期待される。そこで、 α -MHC のプロモーターに 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。トランスジェニックマウスの心筋細胞での 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。表層膜に小胞体膜が過剰に巻き付いた異常な結合膜構造の形成が確認されたものの、骨格筋で観察されるような三つ組形成は見い出せなかった。

- (2)本研究当初より遂行中の心筋膜タンパク質の同定実験を継続するとともに、昨年までに得られたサルカルメニンとミツグミン 53 について現在解析している。両者は心筋と骨格筋に特異的に発現しており、サルカルメニンは小胞体内の独特な Ca^{2+} 結合活性を有し、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る。

D 考察と結論

- (1)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。
- (2)現在遂行中の実験で、サルカルメニンのノックアウトマウスは顕著な形態的及び生理的異常は見出せないが、骨格筋における小胞体への Ca^{2+} 再取込みに起因すると考えられる収縮機能での変化が明らかになりつつあり、その分子機序を今後解明する必要がある。また、ミツグミン 53 の機能解明のために、その欠損マウスの作製が急がれる。

E 健康危険情報
無し

F 研究発表

1論文発表

- 1) Yamazaki, T, Takeda, K, Gotoh, K, Takeshima, H, Akira, S & Kurosaki, T Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function *J Exp Med.* **195** 535-545, 2002
- 2) Higgins, G A, Kew, J N C, Richards, J G, Takeshima, H, Jenck, F, Adam, G, Wichman, J, Kemp, J A & Grottick, A J A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory *Eur J Neurosci* **15** 911-922, 2002
- 3) Nishu, M, Hashimoto, K, Kuriyama, K, Komazaki, S, Kano, M, Shibata, S & Takeshima, H Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3 *Biochem Biophys Res Commun* **292** 318-324, 2002
- 4) Uehara, A, Yasukouchi, M, Imanaga, I, Nishu, M & Takeshima, H Store-operated Ca^{2+} entry irrelevant to Ca^{2+} release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells *Cell Calcium* **31** 89-96, 2002
- 5) Pan, Z, Yang, D, Nagaraj, R. J, Nosek, T A, Nishu, M, Takeshima, H, Cheng, H & Ma, J Dysfunction of store-operated Ca^{2+} channel in muscle cells lacking mg29 gene *Nature Cell Biol* **4** 379-383, 2002
- 6) Komazaki, S, Ito, K, Takeshima, H & Nakamura, H Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1

FEBS Lett **524** 225-229, 2002

- 7) Eiraku, M, Hirata, Y, Takeshima, H, Hirano, T & Kengaku, M Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons *J Biol Chem* **277** 25400-25407, 2002
- 8) Houtani, T, Ikeda, M, Kase, M, Sato, K, Sakuma, S, Kakimoto, S, Ueyama, T, Munemoto, Y, Takeshima, H & Sugimoto, T A subset of nociceptin/orphanin FQ receptor-expressing neurons in the anterior hypothalamic area, as revealed in mice with lacZ reporter gene *Neurosci Lett* **335** 217-219, 2003
- 9) Inoue, M, Kawashima, T, Takeshima, H, Calo, G, Inoue, A, Nakata, Y & Ueda, H In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord *J Pharmacol Exp Ther* in press
- 10) Komazaki, S, Nishu, M & Takeshima, H Abnormal junctional membrane structures in cardiac myocytes expressing ectopic junctophilin type 1 submitted

2学会発表

- 1) 竹島浩、“結合膜構造とジャンクトフィリン”、日本薬理学会大会(熊本 2002年3月13日)
- 2) 竹島浩、“筋収縮とジャンクトフィリン”、日本生理学会大会(広島 2002年3月25日)
- 3) 竹島浩、“心筋細胞の容量依存性 Ca^{2+} 流入機構”、生理学研究所研究会”興奮性組織のイオン調律性制御メカニズム”(岡崎 2002年8月1日)

G 知的所有権の取得状況

なし

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

遺伝子異常と心機能の相関

分担研究者 菅 弘之 国立循環器病センター研究所 所長

遺伝子異常と心機能との対応を付けるには、心機能評価法をそれに十分対応できるようなレベルにまで改良する必要がある。既存の評価法では、またまた心機能の力学面、エネルギー学面にはかなり対応できるが、興奮収縮連関や収縮蛋白カルニウム感受性などの面では不十分である。本分担課題では、特にこれらの面での方法論の開発を目指してきた。

A 研究目的

遺伝子異常と心機能との対応を付けるには、心機能評価法をそれに十分見合うような信頼性の高い、かつ多面的評価が可能レベルにまで改良する必要がある。本分担者はこれまで心収縮性とエネルギー消費量の面で信頼性の高い評価法を開発してきたが、その他の既存の評価法では、またまた興奮収縮連関や収縮蛋白カルニウム感受性などの評価能力面で不十分である。3年計画での本分担課題では、特にこれらの面での方法論の開発を目指してきた。

B 研究方法

遺伝子操作動物はマウスが中心となるが、マウスでの心機能研究は伝統が少なく、まだ始まったばかりであり、圧容積、酸素消費計測をとってみても問題点が多い。そこで本分担研究者がこれまで開発し世界的に定評のあるイヌ摘出交叉灌流心臓標本を用いて、新しい概念に基づく興奮収縮連関カルニウム動員量の推定方法を開発した。その基本的な考え方は、細胞内カルニウム筋小胞体經由再循環率を不整脈下で求め、それと収縮性、興奮収縮連関酸素消費量、カルニウムATP公称定量比などを組み合わせて、理論的計算によりカルニウム動員量を推定することができるということである。

なお、日本生理学会動物倫理規定は完全に遵守している。現段階ではヒトに対して応用研究は含まれていない。

C 研究結果

本年度(最終年度)では、イヌ拍動丸ごと心臓にこの方法を適用して、スターリング効果や、細胞内カルニウム輸送系である筋小胞体カルニウムポンプと形質膜カルニウム・ナトリウム交換機構との温度依存性が、どの程度筋小胞体經由細胞内カルニ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。

D 考察

このような結果は、丸ごと拍動心の筋内興奮収縮連関動員カルニウム除去動態に主として関わる筋小胞体のカルニウムポンプと形質膜のカルニウム・ナトリウム交換機構(ナトリウム・カリウムポンプとカップルして)のスターリング効果に対しては依存性に差が無く、温度に対しては依存性に顕著に差がある事を意味する。このような結果は、これらのカルニウム除去系に関わる遺伝子異常と細胞内カルニウム筋小胞体經由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出来ることになる。

E 結論

これらの結果と考察により、今回開発した統合的要素解析法が、方法論的には問題がないことが示された。遺伝子との対応を調べるには、遺伝子改変イヌが得られる段階ではないので、やはりマウスへ向けての技術改革が今後必要である。しかし、最終的にはヒトへの応用を目指しているので、臨床医に対してはこの方法論の可能性を啓蒙する必要がある。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

1) Suga H Global cardiac function mechano-energetico-informatics *J Biomech* in press, 2003

2) Suga H Cardiac energetics From Emax to pressure-volume area (PVA) *Clin Exp Pharmacol Physiol* in press, 2003

2 学会発表

1) Mizuno J, Akune T, Nishiyama T, Hanaoka K, Morita K, Araki J, Suga H Temperature coefficient (Q10) of temperature-dependent alternans decay of left ventricular postextrasystolic potentiation after pressure-controlled regular beats in canine hearts 日韓麻酔シンポジウム 2003, 5, 31 パンフィコ横浜, 横浜

H 知的財産権
無し

遺伝子改変小動物を用いた右心系循環障害の発生機構と治療に関する研究

分担研究者 白井幹康 国立循環器病センター研究所 室長

循環、呼吸及び代謝の調節に関連する遺伝子・タンパクの個体レベルでの機能解析を可能とするため、覚醒下遺伝子改変マウスの循環(血圧、心拍数)、呼吸(一回換気量、呼吸回数等)及び代謝(酸素消費量、二酸化炭素排出量)が、実時間から日内変動レベルまで統合解析できる新しいシステムを開発した。このシステムのプロスタサイクリン(PGI₂)欠損マウスへの応用により、PGI₂は、室内気より低酸素環境での循環調節に重要であり、特に、 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が分かった。今後、本システムを種々の遺伝子改変マウスに応用すれば、個体レベルでの遺伝子機能解析が飛躍的に進むものと期待される。

A 研究目的

生体において、循環、呼吸及び代謝機能は常に連動し、密接に協調し合っている。従って、これらの調節機構を解明するには、各々のパラメータを、同一個体で同時に記録、解析する必要がある。しかし、従来の生理学研究の多くは、これらの機能を別々に研究してきた。近年、遺伝子操作技術が確立し、遺伝子・タンパクレベルの知見を個体レベルに還元して検証することが試みられている。しかし、この技術が最も確立しているマウスでは、覚醒下で循環、呼吸、代謝を同時に記録、解析できる方法の開発が遅れているため、遺伝子改変技術を個体での調節機構の解明に十分生かせていないのが現状である。

本研究では、無麻酔、無拘束の遺伝子改変マウスの循環、呼吸、代謝が実時間さらには日内変動レベルで統合解析できる新しいシステムを開発し、プロスタサイクリン欠損マウス(PGID)に応用した。

B 研究方法

循環(血圧、心拍数)の計測には、慢性実験用テレメトリー自動解析システム(DATA SCIENCES 社)を応用した。麻酔下でカテーテルを左頸動脈に挿入固定し、送信器は背部の皮下に埋め込んだ。呼吸(一回換気量、呼吸回数、吸気、呼気時間等)は、動物を無拘束チャンパー内に入れ、ホールボディプレチスモグラフ法(BUXCO 社)を用いて計測した。代謝は、SABLE SYSTEMS 社の酸素及び二酸化炭素解析装置(分解能<0.001%)を応用し、ケージ内の酸素と二酸化炭素の濃度変化から求めた。(倫理面への配慮)

当施設内の実験動物福祉小委員会での審査を受けた後、実験を実施した。小動物へのテレメトリー計測機

器の装着は、動物に苦痛を与えない様、麻酔下で行った。覚醒動物を用いる実験では、良好な飼育環境を維持し、使用動物数並びに刺激負荷時の動物への苦痛を最小限に止める様、十分な注意を払った。

C 研究結果および考察

1) 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。

2) 室内気環境では、正常マウス(WT)とPGID(10-12週齢)の間で、血圧、心拍数、呼吸機能及び代謝の平均レベルと日内変動リズムに有意差はなかった。

3) そこで、低酸素(10% O₂)に対する化学受容器を介した急性神経反射性応答でのPGI₂の役割を調べた。(化学受容体反射の中核である延髄にはPGI₂が多く分布するが、その役割は不明であり、特に、この反射性応答に重要とされている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興味を持たれた)。

4) 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)で強く抑制された。抑制の程度は、WTとPGID間でほぼ同じであった。

5) 他方、 α_2 アドレナリン受容体の拮抗薬(idazoxan)は、WTの心拍応答のみを有意に増強させた。PGIDの心拍並びにWTとPGIDの換気応答には無効であった。

6) 以上の結果から、a)心拍と呼吸の低酸素性応答において、nNOS由来のNOは、PGI₂の有無とは無関係に増強的に作用すること、b) 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PGI₂が不可欠であること、つまり、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プレーキ的な役割を果たすことが示唆された。

D 結論

1) PGI₂ 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と考えられた。

2) 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

無し

F 研究発表

1 論文発表

- 1) K Matsukawa, M Shirai, J Murata, H Tsuchimochi, H Komune, I Ninomiya and K Shimizu Sympathetic cholinergic vasodilatation of skeletal muscle small arteries *Jpn J Pharmacol* 88 14-18, 2002
- 2) 永谷憲歳、白井幹康 肺微小循環—肺高血圧症の病態と最新の治療法 医学のあゆみ 201, 757-762 (2002)
- 3) J T Pearson, N Yagi, M Shirai, N Nishuura, M Kanada, N Tokunaga, H Suga and H Mori Future investigations of micro-macro level cardiac functions using X-ray diffraction *BME* 16 29-35, 2002
- 4) M Shirai, A Shimouchi, J T Pearson, N Nagaya, H Tsuchimochi, I Ninomiya and H Mori Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries *Brit J Pharmacol* 2003 (in press)
- 5) N Nagaya, H Okumura, W Shimizu, M Shirai, K Miyatake, H Mori and K Kangawa Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats *Am. J Physiol* 2003 (in press)

2 学会発表

- 1) ピアソン・シェームズ、白井幹康、下内章人、西浦直亀、徳永宜之、神田宗武、盛英三 Appraisal of ventilation and circulatory function in transgenic mice 第79回日本生理学会大会(2002)
- 2) 白井幹康、猪飼秋夫、ピアソン・シェームズ、盛英三、二宮石雄 下大静脈血は生理的肺血管トーン維持に必須である 第79回日本生理学会大会(2002)
- 3) 鶴飼和寿、千葉康弘、ピアソン・シェームズ、グナワン・エディ、白井幹康、下内章人 間欠的低酸素性肺高血圧症ラットにおける心拍・血圧応答の解析 第79回日本生理学会大会(2002)
- 4) J T Pearson and M Shirai Roles of nitric oxide and prostacyclin in circulatory and ventilatory control in rodents (Symposium on Endogenous Vasodilators) COE International Symposium (2002)
- 5) J T Pearson, N Yagi, M Shirai, N Nishuura, H Suga and H Mori Appraisal of crossbridge cycling in rat left ventricles in situ by X-ray diffraction The 66th Annual Scientific Meeting of JCS (2002)
- 6) J T Pearson and M Shirai Possible role of nitric oxide and prostacyclin in cardiorespiratory control in mice XV Congress Cardiovascular System Dynamics Society (2002)
- 7) 白井幹康、ピアソン・シェームズ、西浦直亀、二宮石雄、盛英三 肺血管運動の交感神経性調節の多様性 シンポジウム“血管運動機能の生理・薬理学的研究”第80回日本生理学会大会(2003)

G 知的財産権

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yokoyama C Yabiki T Shimonishi M Wada M hatae T Ohkawara S Takeda J Kinoshita T Okbe M Tanabe T	Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction	Circulation	106	2397-2403	2002
Naraba H Yokoyama C Tago N Murakami M Kudo I Fueki M Oh-Ishi S 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
Yokoyama C Todaka T Yanamoto H Hatae T Hara S Shimonishi M Ohkawara S Wada M Tanabe T	Effects of overexpression of prostacyclin synthase in vascular smooth muscle cells	Adv Exp Med Biol	507	275-280	2002
Suhara H Sawa Y Fukushima N Kagisaki K Yokoyama C Tanabe T Ohtake S 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
Korita D Sagawa N Itoh H Yura S Yoshida M Kaku K Takemura M Yokoyama C Tanabe T Fuji 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
Koike H Morishita R Iguchi S Aoki M Matsumoto K Nakamura T Yokoyama C Tanabe T Ogihara T	Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene	FASB J		online published	2003

Kaneda Y					
Tanabe T Tohnai N	Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression	Prostaglandins & other Lipid Mediators	68-69	95-114	2002
Chen M Masaki T Sawamura T	LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis	Pharmacol Ther	95(1)	89	2002 7
Li D Chen H Romeo F Sawamura T Saldeen T Mehta J L	Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells role of LOX-1	Exp Ther	302(2)	601-5	2002 8
Honjo M Inatani M Kido N Sawamura T Yue B Y Honda Y Tanihara H	A Myosin Light Chain Kinase Inhibitor, ML-9, Lowers the Intraocular Pressure in Rabbit Eyes	Exp Eye Res	75(2)	135-42	2002 8
Morawietz H Duerschmidt N Niemann B Galle J Sawamura T Holtz J	Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1	Clin Sci	103Suppl 1	9S-12S	2002 8
Delneste Y Magistrelli G Gauchat J Haeuw J Aubry J Nakamura, K Kawakami-Honda N Goetsch, L Sawamura, T Bonneyfof, J Jeannin, P	Involvement of LOX-1 in Dendritic Cell-Mediated Antigen Cross-Presentation	Immunity	17(3)	353	2002 9
Nakagawa T Akagi M Hoshikawa H Chen M Yasuda T Mukai S Ohsawa K Masaki T Nakamura T Sawamura T	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis	Arthritis Rheum	46(9)	2486-94	2002 9
Li D Williams V Liu L Chen H Sawamura T Antakli T Mehta J L	LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury modulation of MMP1 and inflammation	Am J physiol	283	H1795-801	2002 11

Imanishi T Hano T Sawamura T Takarada S Nishino I	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(11)	1060-4	2002 11
Nakagawa T Yasuda T Hoshikawa H Chen M Yasuda T Mukai S Ohsawa K Masakai T Nakamura T Sawamura T	LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-included cell death---possible role of dephosphorylation of Akt	Biochem Biophys Res Commun	299	91-97	2002 11
Honjo M Tanihara H Nishijima K Kiryu J Honda Y Sawamura T	Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death included by ischemia-reperfusion in the rat retina	Arch Ophthalmol	120(12)	1707-13	2002 12
Honjo M Nakamura K Yamashiro K Kiryu, J Tanihara H McEvoy L M Honda Y Butcher E C Masaki T Sawamura T	Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation	Proc Natl Acad Sci U S A	100(3)	1274-79	2003 1
Kataoka K Hasegawa K Sawamura T Fujita M Yanazume T Iwai-Kanai E Kawamura T Hirai T Kita T Nohara R	LOX-1 pathway affects the extent of myocardial ischemia-reperfusion injury	Biochem Biophys Res Commun	300(3)	656-60	2003 1
Li D Liu L Chen H Sawamura T Ranganathan S Mehta J L	LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells	Circulation	107(4)	612-617	2003 2
Cominacini L Pasini A F Garbin U Pastorino A Rigoni A Nava C Davoli A Lo Cascio V Sawamura T	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(3)	499-507	2003 2

Wilson SH Chade A R Feldstein A Sawamura T Napoli C Lerman A Lerman L O	Lipid-lowering independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolemia	Nephrol Dial Transplant	未定	未定	in press
Sakurai K Sawamura T	Endothelial Dysfunction via lectin-like oxidized LDL receptor-1	J Pharmacol Sci	未定	未定	in press
Okumura H Nagaya N Kangawa K	Adrenomedullin infusion during ischemia/reperfusion attenuates left ventricular remodeling and myocardial fibrosis in rats	Hypertens Res	26	S99-104	2003
Shimosawa T Shibagaki Y Ishibashi K Kitamura K Kangawa K Kato S Ando K Fujita T	Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage	Circulation	105	106-111	2002
Hosoda H Kojima M Mizushima T Shimizu S Kangawa K	Structural divergence of human ghrelin Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing	J Biol Chem	278	64-70	2003
Tokudome T Horio T Yoshihara F Suga S Kawano Y Kohno M Kangawa O	Adrenomedullin inhibits doxorubicin-induced cultured rat cardiac myocyte apoptosis via a cAMP-dependent mechanism	Endocrinology	143	3515-3521	2002
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	8	856-863	2002

Sata M Saura 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	8	403-409	2002
Manabe I Shindo T Nagai R	Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis Involvement in Cardiac Hypertrophy	Circ Res	91	1103-1113	2002
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 Kitakaze M	Coordinate induction of AMP deaminase in human atrium with mitochondrial DNA deletion	Biochem Biophys Res Commun	302	372-376	2003
森崎隆幸	プリン代謝異常症の実験モデル	日本臨床	61,supple 1	482-486	2003
Ymazaki T et al	Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function	J Exp Med	195	535-545	2002
G A Higgins et al	A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory	Eur J Neurosci	15	911-922	2002
Nishi M et al	Motor discoordination in mutant mice lacking juncophilin type 3	Biochem Biophys Res Commun	292	318-324	2002
Uehara A et al	Store-operated Ca ²⁺ entry irrelevant to Ca ²⁺ release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells	Cell Calcium	31,	89-96	2002
Zin Pan et al	Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking juncophilin type 1	FEBS Lett	524	225-229	2002
Eraku M et al	Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons	J Biol Chem	277	25400-25407	2002

Houtani T et al	A subset of nociceptin/orphanin FQ receptor-expressing neurons in the anterior hypothalamic area, as revealed in mice with lacZ reporter gene	Neurosci Lett	335	217-219	2002
Inoue et al	In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord	J Pharmacol Exp Ther	未定	未定	in press
Mizuno J Araki J Suzuki S Mohri S Mikane T Shimizu J Matsubara H Hirakawa M Ohe T Suga H	Temperature-dependent postextrasystolic potentiation and Ca ²⁺ recirculation fraction in canine heart	Am J Physiol	282	H403-H413	2002
Suga H	Global cardiac function mechano-energetico-informatics	J Biomech	未定	未定	2003 In press
Suga H	Cardiac energetics From Emax to pressure-volume area (PVA)	Clin Exp Pharmacol Physiol	未定	未定	2003 In press
Matsukawa K Shirai M Murata J Tsuchimochi H Komine H Ninomiya I Shimizu K	Sympathetic cholinergic vasodilatation of skeletal muscle small arteries	Jpn J Pharmacol	88	14-18	2002
Pearson J T Yagi N Shirai M Nishiura N Kanada M Tokunaga N Suga H Mori H	Future investigations of micro-macro level cardiac functions using X-ray diffraction.	BME	16	29-35	2002
永谷憲歳、 白井幹康	肺微小循環－肺高血圧症の病態と最新の治療法	医学のあゆみ	201	757-762	2002
Shirai M Shimouchi A Pearson J T Nagaya N Tsuchimochi H Ninomiya I Mori H	Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase due to chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries	Brit J Pharmacol	未定	未定	In press
Nagaya N Okumura N Shimizu W Shirai M Miyatake K Mori H Kangawa K	Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats	Am J Physiol	未定	未定	In press