

F. 研究発表

論文（過去の関連するもの及び直接の研究成果）

Kimura T, Yokoi H, Nakagawa Y, Tamura T, Kaburagi S, Sawada Y, Sato Y, Yokoi H, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M. Three-year follow-up after implantation of metallic coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996;334:561-566.

Mintz GS, Kimura T, Nobuyoshi M, Leon MB. Intravascular ultrasound assessment of the relation between early and late changes in arterial area and neointimal hyperplasia after percutaneous transluminal coronary angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am J Cardiol*. 1999;83:1518-1523.

von Birgelen C, Mintz GS, de Vrey EA, Serruys PW, Kimura T, Nobuyoshi M, Popma JJ, Leon MB, Erbel R, de Feyter PJ. Preintervention lesion remodelling affects operative mechanisms of balloon optimised directional coronary atherectomy procedures: a volumetric study with three dimensional intravascular ultrasound. *Heart*. 2000;83:192-197.

Nakagawa Y, Yufu K, Nakamori S, Kimura T, Yokoi H, Tamura T, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M. Clinical and angiographic follow-up after single long GFX coronary stent implantation. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2000;50:40-47.

Mintz GS, Kimura T, Nobuyoshi M, Dangas G, Leon MB. Relation between preintervention remodeling and late arterial responses to coronary angioplasty or atherectomy. *Am J Cardiol*. 2001;87:392-396.

Sakai K, Nakagawa Y, Kimura T, Doi T, Yokoi H, Iwabuchi M, Hamasaki N, Inoue K, Nosaka H, Nobuyoshi M. Comparison of results of coronary angioplasty for acute myocardial infarction in patients > or =75 years of age versus patients <75 years of age. *Am J Cardiol* 2002;89:797-800.

Kimura T, Abe K, Shizuta S, Odashiro K, Yoshida Y, Sakai K, Kaitani K, Inoue K, Nakagawa Y, Yokoi H, Iwabuchi M, Hamasaki N, Nosaka H, Nobuyoshi M. Long-term clinical and angiographic follow-up after coronary stent placement in native coronary arteries. *Circulation* 2002;105:2986-2991.

Park SJ, Park SW, Hong MK, Lee CW, Lee JH, Kim JJ, Jang YS, Shin EK, Yoshida Y, Tamura T, Kimura T, Nobuyoshi M. Long-term (three-year) outcomes after stenting of unprotected left main coronary artery stenosis in patients with normal left ventricular function. *Am J Cardiol.* 2003;91:12-16.

分担研究者 久米 典昭 京都大学大学院医学研究科内科学講座循環器内科学講師

研究要旨 「目的」 LOX-1 は虚血性心疾患の発症の成因となる酸化 LDL の受容体であるが、その一部が細胞表面から切断されて血中に放出される。そこで、可溶性 LOX-1 の血中濃度が急性冠症候群を早期から診断しうるマーカーとなるか否かを検討した。「方法」急性冠症候群および非急性冠症候群（安定狭心症などの虚血性心疾患）を対象として、新たに開発した ELISA 法でヒト可溶性 LOX-1 の血中濃度を測定した。「結果」急性冠症候群では、安定狭心症群、慢性疾患群、心血管病以外の救急患者群、のいずれよりも有意に可溶性 LOX-1 の血中濃度は高かった。また、可溶性 LOX-1 値の上昇は、トロポニン T 値が上昇する以前よりみられた。「総括」急性冠症候群の早期診断における血中可溶性 LOX-1 濃度測定の意義が明らかになった。

A. 研究目的

急性心筋梗塞、不安定狭心症などの急性冠症候群は、その超急性期での死亡率が高いことから、その早い時期からの的確な診断マーカーの確立が望まれる。トロポニン T などの障害心筋由来のマーカーが急性冠症候群の診断マーカーとして利用されているが、これらは冠動脈の閉塞あるいは亜閉塞により心筋虚血が生じて初めて血中に増加するマーカーであり、必ずしもその超急性期を検出しうるとは言いがたい。近年の研究により、冠動脈硬化プラークの破綻が急性冠症候群の成因であることが明らかになってきた。LOX-1 は虚血性心疾患の発症の成因となる酸化 LDL の受容体であるが、その発現は催炎症性の刺激により誘導されるとともに、進行した動脈硬化プラークに強く発現されること、酸化 LDL によるアポトーシスやマトリックスメタロプロテアーゼの発現誘導などに関与し、動脈硬化

プラーク破綻の成因となっていることが明らかにされている。また、その一部が細胞表面から切断されて可溶性分子として血中に放出されることが示された。そこで、可溶性 LOX-1 の血中濃度が急性冠症候群の発症を早期から診断しうるマーカーとなるか否かを検討した。

B. 研究方法

血中可溶性 LOX-1 濃度を測定するために、2種類の特異的な抗体を開発し ELISA 法を確立した。インフォームドコンセントの得られた虚血性心疾患が疑われ冠動脈造影検査を施行された連続症例 472 例、心疾患以外の慢性疾患で外来に通院する患者 60 例、心血管疾患以外で救急外来を受診し緊急入院となった患者 34 例を対象として、末梢血を採取し血清を分離して今回確立された ELISA 法でヒト可溶性 LOX-1 の血中濃度を測定した。冠動脈造影を受けた患者

は、正常冠動脈（第1群）、薬物でコントロール可能な安定狭心症（第2群）、薬物のみではコントロールが不可で待機的にPCIかCABGによる冠血行再建を要した安定狭心症（第3群）、胸部症状と心電図変化により緊急に冠動脈造影を行い、冠動脈の閉塞か高度狭窄が確認された急性冠症候群（急性心筋梗塞あるいは不安定狭心症；第4群）に分類した。また、急性冠症候群40例に対しては、来院時、緊急PCI直後、1日後、3日後、7日後、と経時的に採血し、可溶性LOX-1の値と他の血中マーカーの値とを比較した。

（倫理面への配慮）

京都大学医の倫理委員会に申請し、承認を受けた。文書を用いたインフォームドコンセントの得られた症例のみを対象とした。

C. 研究結果

可溶性LOX-1値は、高感度CRP値と有意な相関を示さなかった。急性冠症候群（第4群）では、他のいかなる群（第1～3群、慢性疾患群、心血管病以外の救急患者群）よりも有意に可溶性LOX-1の血中濃度は高かった。可溶性LOX-1のカットオフ値を1ng/mlとすると、急性冠症候群の診断のための感度は81%、特異度は78%と、良好な数値であった。またその急性期の推移を比較すると、トロポニンTのピークは、PCI後ないし1日後であったのに対し、可溶性LOX-1は来院時からほぼピーク値を示した。

D. 考察

急性冠症候群では、LOX-1が強く発現された不安定プラークでプロテアーゼ活性が高まることにより血中可溶性LOX-1濃度が上昇し、それは単に非特異的な炎症を反映するものではないと考えられた。

E. 結論

急性冠症候群の早期診断マーカーとしての可溶性LOX-1の有用性が示された。さらに、発症前からの前向き試験による検討により、可溶性LOX-1値の変動が、急性冠症候群の発症を予知しうるマーカーとなるかが検討される予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hayashida K, Kume N, et al: Soluble form of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (soluble LOX-1) as an early diagnostic marker for acute coronary syndrome. (投稿中)

2) Kume N, Kita T: Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1, and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ. Res.* 94: 269-270, 2004

2. 学会発表

1) 久米典昭：LOX-1とその臨床応用。第40回日本臨床分子医学会総会 Translational Research Forum II, 2003年7月10日、東京

2) Hayashida K, Kume N, et al: Serum soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (soluble LOX-1) is a novel and independent marker for acute coronary syndrome. American Heart Association Scientific Sessions, November 11, 2003, Orlando, FL, U.S.A

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

心筋梗塞、脳硬塞の予知因子としての血小板活性化の評価法に関する研究

分担研究者 堀内 久徳 京都大学大学院医学研究科循環器内科助手

研究要旨：血小板活性化は動脈血栓症の引き金であり、血小板活性化指標が予知因子となる可能性があるが、測定法が不安定なため広く臨床応用されていない。さらに、現在、抗血小板療法は心筋梗塞・脳梗塞の有効な予防法として証明され、非常に多くの患者が抗血小板療法を受けている。抗血小板療法は同時に脳出血や消化管出血などの出血性副作用の頻度を増加させる。ワーファリンを用いた抗凝固療法では、その効果はプロトロンビン時間 (PT) をモニターすることによりモニターされ、適度な効果が得られ、過剰による出血性合併症を避けられるように容量が調節される。しかしながら、現在、抗血小板療法では、その効果を判定・モニターする適切な検査法がないので、十分な効果が得られているのか、あるいは、効きすぎて安全域を越えているのか、判断できない。平成15年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法を開発しえた。本測定系を用い、多くの症例、特に急性冠症候群や脳梗塞で本血小板指標を測定し、心血管イベントの予知因子となるかどうか検証する。さらに、抗血小板療法の効果モニター法として有用かどうか検証していく計画である。

血小板活性化の分子メカニズムは、不明な点が多い。それは、血小板に蛋白合成能がないために分子生物学をこの分野に用いることができなく、主として、薬理学的研究に留まっていたことが大きな理由である。本年度までに、形質膜透過型血小板を用いた極めて安定な顆粒放出アッセイ系、凝集アッセイ系を確立することができ、血小板活性化の分子機構を解析している。本年度は、small GTPase Rab27がその標的分子Munc13-4を介して濃染顆粒放出を制御していること (JBC, 2004)、PKC α が凝集を制御していること (JBC, 2003) を直接的に証明した。

A. 研究目的： 動脈硬化を基盤にして生じた動脈血栓により、心筋梗塞症や脳梗塞症等の心血管障害が発症し、 高齢者の生命予後やQOLに深く関与する。動脈血栓形成の引き金は、血小板の活性化にあることが判明してい

るが、血小板活性化の評価法は、これまでのところ、臨床の場で広く使われているものはない。さらに、現在、抗血小板療法は心筋梗塞・脳梗塞の有効な予防法として証明され、非常に多くの患者が抗血小板療法を受けている。抗血小板療法は同時に脳出血や消化管出血などの出血性副作用の頻度を増加させる。ワーファリンを用いた抗凝固療法では、その効果はプロトロンビン時間 (PT) をモニターすることによりモニターされ、適度な効果が得られ、過剰による出血性合併症を避けられるように容量が調節される。しかしながら、現在、抗血小板療法では、その効果を判定・モニターする適切な検査法がないので、十分な効果が得られているのか、あるいは、効きすぎて安全域を越えているのか、判断できない。血小板活性化の指標としては、血小板特異的分子である β TG等の血清濃度が報告されてはいるが、測定値が非常に不安定なこともあり、これまでのところ広く臨床の場で用いられてはいない。そこで、われわれは、本研究では臨床の場で広く用いられるような血小板活性化の指標の確立・抗血小板療法の効果モニター法の開発を目的とした。

また、血小板には核がなく、分子生物学を応用することが困難であったことより、活性化の分子メカニ

ズムの研究は困難であった。我々は下記の透過型血小板を用いた凝集および顆粒放出のアッセイ系を確立することができ、研究を続けている。本研究では、血小板活性化メカニズムの解明も目的とした。

B. 研究方法：

1. 血小板活性化評価法の開発：平成15年度には、安定かつ信頼性の高い血小板活性化指標の測定法の開発することができた。今後は、多くの症例で本血小板指標を測定し、予知因子となりうるか、また、抗血小板療法の効果判定法となりうるか、検証していく。

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

(1) 顆粒放出解析系：顆粒放出反応

については、放出された α 顆粒は von Willebrand 因子 (vWF) をウェスタンブロット法にて、放出された濃染顆粒はあらかじめ血小板に取り込ませた [3 H] セロトニンのカウントを測定することにより解析している。顆粒放出反応の引き金は細胞内 Ca イオンの上昇であるが本アッセイでは透過型細胞を用いているため細胞内外の Ca イオンが等しくなるので、顆粒放出刺激は Ca 塩としている。この系では、外部より ATP と細胞質を補充しなければいずれの放出も起きず、両顆粒の放出には、エネルギーと細胞質因子の存在が必須であることが示唆された。

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

C. 研究結果：

平成15年度には、安定かつ信頼性の高い血小板凝集指標の測定法を確立した。ADP およびコラーゲンを種々の濃度で血小板を刺激し、光透過度を測定する従来法と、より簡便な全血血小板凝集計を用いて解析する方法である。京都大学医の倫理委員会の承認も受けることができ、平成16

年度には、多くの症例で測定し、予知因子となるか検証していく計画である。また、その指標が、抗血小板療法の効果判定指標となるかも検討していく計画である。

動脈硬化の最終段階は血栓形成による動脈の閉塞であるが、透過型血小板を用いた凝集 (BBRC, 2001)・顆粒放出 (JBC, 2000) 解析系を確立し、血小板活性化の分子機構を解析している。本年度は、small GTPase Rab27 がその標的タンパク質 Munc13-4 を介し、濃染顆粒放出を制御していること (JBC, 2004) を見いだした。また、PKC α が凝集を制御していること (JBC, 2003) を直接的に証明した。

変異マウス *ashen* は、皮膚色の異常、免疫異常および血小板異常による出血時間延長を来すが、その原因が低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab27A の異常であることが明らかになった。色素異常はメラノサイト内でのメラノソームの輸送障害によって生じ、免疫異常は細胞障害性 T リンパ球の lytic granule の分泌障害によることが明らかになっている。出血時間延長は血小板異常によるとされ、血小板濃染顆粒が形成されないためであるとされた。しかし、血小板には、Rab27B が存在し、Rab27B が Rab27A の欠損を補うため、*ashen* マウスの血小板および出血時間は正常とする報告もある。一連

のメラノソーム、lytic granule、血小板濃染顆粒は膜上にリソソームに特異的な蛋白質を有し、リソソーム関連小器官(Lysosome-related organelles)と分類されている。そのため、我々は、本研究において Rab27 の血小板濃染顆粒放出への関与を解析した。顆粒放出アッセイ系に、大腸菌より精製した Rab27A を過剰量加えても濃染顆粒放出が抑制されたが、Rab3B, Rab4B, Rab5A, Rap1B を同量加えても影響はなかった。加えた Rab27A は、顆粒放出に必要な Rab27A の標的蛋白質をブロックしているのであろう。さらに、活性型である GTP 結合型 Rab27A に特異的に結合する蛋白質を血小板細胞質分画よりアフィニティ法により見出し、Munc13-4 と同定した。我々の顆粒放出系に遺伝子組み換えにより作成した Munc13-4 を加えると放出は促進され、また、抗 Munc13-4 抗体を加えると放出は抑制された。以上より、血小板濃染顆粒放出は Rab27-Munc13-4 により制御されていると考えられた。Rab27-Munc13-4 経路を糸口に血小板顆粒放出の分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

さらに、血小板凝集においても同様のセミインタクトアッセイを確立することができた。外部より加え

る細胞質より、抗体を用いて PKC α を除くと、凝集はおこらず、そこに精製した PKC α をくわえると、凝集反応は回復した。しかし、精製した PKC α だけでは、凝集反応は起こらなかった。

D. 考察：

血小板活性化指標としては、血小板特異的タンパク質である血清 β TG 等が用いられているが、その値は採血法の影響を強く受けるため、広く臨床の場で用いられているとはいえない。しかし、脳梗塞等では、血小板活性化との相関を示すデータが蓄積されつつある。本年度に我々が確立した血小板活性化の測定法では、採血の影響はほとんど受けない。そのため、上昇している患者において、心血管イベントの発症率が高いと、臨床の場で広く使われる予知因子となる可能性が高い。

アスピリンを中心とする抗血小板療法は、心血管イベントに対する予防効果が明らかにされている。しかしながら、最近、一部の患者にはアスピリンの効果が弱く、そのような患者にイベントが多発するというデータが発表され、アスピリン抵抗性として临床上、問題となっている。我々の開発した測定法を用い、日本人におけるアスピリン抵抗性患者を明らかにし、

さらに、抗血小板療法の効果モニター法として発展させられればと考えている。

形質膜透過型血小板を用いた極めて安定な顆粒放出アッセイ系、凝集アッセイ系を確立することができた。血小板活性化の分子メカニズムは、不明な点が多い。それは、血小板に蛋白合成能がないために分子生物学をこの分野に用いることができなく、主として、薬理学的研究に留まっていたことが大きな理由である。我々のアッセイ系では、ドミナントネガティブに作用するリコンビナント蛋白質の影響を我々の系を用いて解析できるので、今後、多くの知見を得ることができるであろう。本アッセイ系を用いて必須因子を同定しつつある。さらに多くの必須因子を同定し、それらの時間的・空間的相互関係を見出し、血小板活性化反応の分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。そして、それらの知見を基に、創薬にかかわる鍵分子を見出したいと考えている。

E. 結論:安定した血小板活性化の測定法を開発した。多くの症例で本血小板活性化指標を測定し、予知因子としての、また、抗血小板療法の効果判定法として有効かどうか検証していきたい。血小板活性化の分子メカニズムを

解明するための、強力なツールとして透過型血小板を用いた顆粒放出および凝集アッセイ系を確立し得た。本アッセイ系を用いて必須因子を同定しつつある。

F. 健康危険情報：なし

G. 平成14年度業績：

1. H. Horiuchi, Y. Matsuzawa, H. Mabuchi, H. Itakura, J. Sasaki, M. Yokoyama, Y. Ishikawa, S. Yokoyama, S. Mori, T. Ohrui, M. Akishita, T. Hayashi, K. Yamane, G. Egusa, and T. Kita

Strategy for treating elderly Japanese with hypercholesterolemia: From the report of the Research Group for 'Long-term prognosis of elderly Japanese with hypercholesterolemia' in the Comprehensive Research on Aging and Health. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2004, in press

2. Shirakawa R, Higashi T, Tabuchi A, Yoshioka A, Nishioka H, Fukuda M, Kita T, Horiuchi H.

Munc13-4 is a GTP-Rab27 binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* 2004 in press.

3. Tabuchi A,
Yoshioka A, Higashi T, Shirakawa R,
Nishioka H, Kita T, Horiuchi H.

Direct demonstration of involvement
of protein kinase C α in the Ca²⁺
- induced platelet aggregation.

J.Biol.Chem. 278: 26374-26379, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

分担研究者 (京都大学 荒井秀典)

研究要旨

新規増殖因子 growth arrest specific gene 6(Gas6)の血管障害における役割を分析するため、糖尿病性腎症における Gas6 の意義を検討した。また、その情報伝達経路に関しても明らかにした。今後は Gas6 の ELISA の系を確立し、尿中 Gas6 が糖尿病性腎症の早期診断マーカーとなるか否かを検討するとともに高血圧・糖尿病患者における血中濃度の解析を行い、心血管イベント発症との相関を検討する。

A. 研究目的

Gas6 (growth arrest-specific gene 6) は細胞増殖停止時に発現誘導される遺伝子群の一つとしてクローニングされ、その作用として G 蛋白結合型受容体を介した平滑筋増殖作用を増強することが示された。Gas6 はその N 末端に Gla domain が存在し、これがビタミン K 存在下に γカルボキシル化される (Gla 化) ことによって生理活性を獲得し、ビタミンK阻害剤であるワーファリンによりこの Gla 化が阻害され、Gas6 が不活化されることが明らかにされた。我々は腎炎治療においてワーファリンが使用されているにもかかわらず、その作用機序が明らかになっていないことに着目し、Gas6 によるメサンギウム細胞への影響に関して解析を始めた。まず糖尿病性腎症の初期において認められ、その発症のキーとなると考えられているメサンギウム細胞肥大に Gas6 が関与していることをすでに明らかにした。すなわちストレプトゾトシン (STZ)糖尿病ラットにて Gas6 とその受容体である Axl の糸球体における発現が増加し、Gas6 の阻害剤であるワーファリンによりメサンギウム細胞肥大及び糸球体肥大の抑制、過剰濾過の改善、尿中アルブミン排泄の減少を認め、in vitro において Gas6 がメサンギウム細胞肥大作用を有することを

明らかにした。今回は糖尿病性腎症の初期病変の特徴であるメサンギウム細胞肥大に関わる分子機構を明らかにする。また、この糖尿病ラットにおいては尿中への Gas6 の排泄も定性的には増加しており、アルブミン尿とともに早期腎症の診断に使用できる可能性がある。従って、その定量的な測定のための ELISA 法を確立する。

B. 研究方法

STZ によりラット、マウスで糖尿病モデルを作成し、その糸球体において Akt/mTOR 経路に関わる p70 S6 kinase、4E-BP-1 の発現及びそのリン酸化を検討するとともに p27 の発現を組織学的及び Western Blot 法により検討する。また in vitro においてメサンギウム細胞を用いて Gas6 刺激による上記情報伝達物質のリン酸化、発現を検討する。

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

C&D. 研究結果と考察

STZ 糖尿病ラットでは 12 週目の糸球体蛋白において Akt と p70 S6 kinase、4E-BP-1 の発現が増強、かつそのリン酸化が誘導され、そのリン酸化は p27 の発現と完全に平行していた。さらに、Akt のリン酸化は p27 の発現と共にワーファリン投与により抑制された。また糸球体における Gas6 の発現とリン酸化 Akt は、主にメサンギウム領域で認められた。また、STZ 糖尿病誘発 Gas6 ノックアウトマウスでは、12 週目にて野生型と比較して、メサンギウム細胞肥大、糸球体肥大の抑制と共に糸球体での Akt のリン酸化も有意に抑制された。in vitro では高血糖刺激においてメサンギウム細胞肥大が惹起されるが、その肥大はワーファリンや Gas6 のスカベンジャーである Axl-Fc にて有意に抑制された。また、高血糖により Gas6/Axl の発現は上昇し、Akt のリン酸化も認められた。Gas6 刺激による細胞肥大は PI3 キナーゼ阻害剤である LY294002 や mTOR 阻害剤である rapamycin にて有意に抑制され、Gas6 刺激による Akt 及び p70 S6 kinase、4E-BP-1 のリン酸化は、LY294002 や rapamycin にて完全に阻害された。加えて活性型 Akt のプラスミドをメサンギウム細胞に遺伝子導入したところ、野生型 Akt と比較して有意に細胞肥大を認めた。このように Gas6 によるメサンギウム細胞肥大は高血糖が引き金となり、Akt/mTOR 経路が重要であることが明らかとなった。

E. 結論

我々はこのように Akt/mTOR 経路が糖尿病性腎症初期病変の特徴であるメサンギウム細胞肥大に関与し、しかもその上流には Gas6/Axl が存在することを in vivo 及び in vitro において明らかにした。メサンギウム細胞肥大の分子機構を明らかにすることにより、糖尿病性腎症の発症機構が解明され、新たな治療薬の開発につながる可能性があると考えられる。今後はこの成果をもとに Gas6 の ELISA 系を確立し、尿中、血中 Gas6 濃度を測定することにより、早期腎症の診断マーカーになりうるか否かまた

心血管イベントの予知因子になりうるか否かを検討したい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Nagai, K., Arai, H., Yanagita, M., Matsubara, T., Kanamori, H., Nakano, T., Iehara, N., Fukatsu, A., Kita, T., and Doi, T. Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* 278: 18229- 18234, 2003
2. Ashida, N., Takechi, H., Kita, T., and Arai, H. Vortex-mediated mechanical stress induces integrin-dependent cell adhesion mediated by inositol-1,4,5 triphosphate-sensitive Ca^{2+} release in THP-1 cells. *J Biol Chem* 278: 9327 – 9331, 2003.
3. Yanagita, M., Ishimoto, Y., Arai, H., Nagai, K., Ito, T., Nakano, T., Salant, DJ., Fukatsu, A., Doi, T., Kita, T. Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 110:239-246, 2002

学会発表

1. 平成 15 年日本農芸化学会シンポジウム

生活習慣病の予防・改善を目指した「食」と「栄養」のバイオサイエンス 糖尿病の予防・改善を目指した「食」と「栄養」のバイオサイエンスービタミン K 依存性新規増殖因子 Gas6 の糖尿病性腎症発症における役割

荒井秀典、長井幸二郎、柳田素子、深津敦司、土井俊夫

2. 第 46 回日本腎臓学会学術集会

Gas6 のメサングウム細胞肥大作用に関する
長井幸二郎、荒井秀典、松原雄、美馬晶、金森
弘志、角栄里子、柳田素子、家原典之、深津敦
司、土井俊夫、北徹

3 第 35 回日本糖尿病合併症学会

Gas6 はメサングウム細胞肥大を介して糖尿病
性腎症の発症に関する

長井幸二郎、荒井秀典、松原 雄、美馬 晶、
角栄里子、金森弘志、柳田素子、家原典之、深
津敦司、北 徹、土井俊夫

4. 2003 American Society of Nephrology
Annual Meeting

Akt/mTOR-Mediated Mesangial Hypertrophy Is
Important in the Development of Diabetic
Nephropathy

Kojiro Nagai, **Hidenori Arai**, Takeshi Matsubara,

シグナル伝達経路の解明

Akira Mima, Eriko Sumi, Hiroshi Kanamori,
Motoko Yanagita, Noriyuki Iehara, Atsushi Fukatsu,
Toru Kita, Toshio Doi.

5. Smad1 Transcriptionally Regulates Type
IV Collagen Expression, Correlates with ALK1 in
Diabetic Nephropathy

Hideharu Abe, Takeshi Matsubara, Noriyuki Iehara,
Kojiro Nagai, Toshikazu Takahashi, **Hidenori Arai**,
Toru Kita, Toshio Doi.

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

分担研究報告書

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発

分担研究者 田中 誠 京都大学大学院医学研究科助教授

研究要旨

心臓弁膜疾患における SR-PSOX の発現を調べ、その機能について検討した。SR-PSOX は弁膜疾患において弁表面や弁内新生血管の内皮細胞で顕著に発現が上昇しており、*in vitro* の検討では、SR-PSOX は CD8 陽性 T 細胞の VCAM-1 への接着を促進するとともに、IFN γ の産生を増加させた。可溶性 SR-PSOX が急性弁膜疾患の診断や経過をみるうえで有用なマーカーとなる可能性が示されるとともに、SR-PSOX が弁膜疾患における炎症の増悪に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

SR-PSOX は新規スカベンジャー受容体で、LOX-1 と同様、可溶性が存在することが知られている。我々は SR-PSOX の発現様式について研究し、SR-PSOX が心臓の弁内皮細胞に特異的に発現することを発見した。そこで、今回、SR-PSOX の心臓弁膜疾患における発現、その機能について検討した。

B. 研究方法

弁置換手術後の切除弁組織での SR-PSOX の発現の変化を免疫組織化学法にて検討した。また、マウス脾臓より分離した T リンパ球を用いて SR-PSOX の機能を解析した。

(倫理面への配慮)

術前に組織標本を作製する旨説明し承諾を得た。また、組織標本と個人がむすびつかないようにデータを管理した。

C. 研究結果

ヒトの弁組織においては、SR-PSOX の発現は変性性弁疾患ではほとんど見られなかったが、感染性心内膜炎では弁表面や弁内新生血管の、リウマチ性や動脈硬化性弁疾患では弁内新生血管の内皮細胞で顕著に上昇していた。*in vitro* の検討では、SR-PSOX は CD8 陽性 T 細胞の VLA-4 を介する VCAM-1 への接着を促進するとともに、IFN γ の産生を有意に増加させた。

D. 考察

SR-PSOX は弁膜疾患において CD8 陽性 T 細胞を炎症部位にリクルートし、IFN γ の産生を刺激して炎症を増悪させる可能性が示唆され、治療ターゲットになる可能性がある。また、可溶性 SR-PSOX は急性や慢性の炎症性弁膜症の診断や経過をみるうえで、有用なマーカーになる可能性があると考えられた。

E. 結論

SR-PSOX は心臓の弁内皮細胞に特異的に発現し、急性や慢性の炎症性弁疾患で弁内皮細胞におけるSR-PSOXの発現は顕著に上昇していた。治療ターゲットや疾患の活動性を示すマーカーになる可能性がある。

G. 研究発表

論文発表

1. Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Takahashi S, Yamaguchi J, Nishina T, Kitaichi M, Komeda M, Manabe T, Yonehara S and Kita T. Up-regulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8⁺ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24: 282–287.

2. Togi K, Kawamoto T, Yamauchi R, Yoshida Y, Kita T and Tanaka M A role of HAND1/eHAND in the dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart. *Mol. Cell. Biol.* in press.

学会発表

1. Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Nishina T, Kitaichi M,

Komeda M, Manabe T, Yonehara S and Kita T Up-regulation of CXCL16/SR-PSOX and recruitment of CD8⁺ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *The 13th International Symposium on Atherosclerosis*. Kyoto 2003.

2. Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Yonehara S and Kita T Up-regulation of CXCL16/SR-PSOX and recruitment of CD8⁺ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Keystone Symposium* Keystone 2004.

3. 山内亮子、田中 誠、久米典昭、川元隆弘、東儀圭則、島岡 猛、米原 伸、北 徹 炎症性弁膜疾患におけるSR-PSOX/CXCL16の発現とその役割 第35回日本動脈硬化学会、京都2003.

4. 山内亮子、田中 誠、久米典昭、川元隆弘、東儀圭則、島岡 猛、米原 伸、北 徹 炎症性弁膜疾患におけるSR-PSOX/CXCL16の発現とその役割 第24回日本炎症・再生医学会、京都2003.

心筋梗塞、脳梗塞の予知因子の同定と予知法の開発に関する研究

分担研究者 福山秀直 京都大学医学研究科・教授

研究要旨 MRI T2 延長画像にて大脳白質に認める線状高信号病変 (LHO) を認めることがある。本研究では、高血圧症患者を対象とし MRI で認める高血圧性脳病変（脳内出血巣およびラクナ梗塞巣）と LHO との関連について検討した。LHO は、とくに高血圧性脳内出血巣により深い関連を持ち、側脳室周囲 T2 延長像とは独立した高血圧性脳合併症の予知因子であることが示唆された。

A. 研究目的 高血圧症は脳梗塞や脳出血のもっとも重要な危険因子である。MRI T2 強調画像にて認める白質の高信号病変は高血圧にともなう変化とされ、脳梗塞や脳出血の前段階と考えられる。本研究では、MRI T2 強調画像にて大脳白質に認める所見の一つである線状高信号病変 (Linear Hyperintensity Objects: LHO) の高血圧性脳合併症の予知因子としての意義を検討した。

B. 研究方法 49 例の高血圧患者を、MRI 所見にて、高血圧性脳内出血 (HIH) を有する群 (HIH 群: n=17)、ラクナ梗塞を有するが HIH を認めない群 (CI 群: n=19)、ラクナ梗塞も HIH も認めない群 (HT 群: n=13) の 3 群に分けた。MRI は、シーメンス社製マグネトーム ビジョン (1.5Tesla) を用いて通常臨床条件にて Turbo spin-echo pulse sequences による T2 強調画像 (repetition time 4500 msec, echo time 96 msec)、スライス厚 5 mm) を撮像し、フィルム上にて LHO の数および径を測定した。

(倫理面への配慮) 本研究は、当該施設での倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に準拠して行われた。

C. 研究結果 LHO の数は、それぞれ HIH 群 10.7 ± 4.5 個 (mean \pm SD)、CI 群 7.0 ± 3.6 、HT 群 5.5 ± 2.1 で、HIH 群と CI 群間 ($p=0.013$) および HIH 群と HT 群間 ($p<0.001$) にそれぞれ有意差を認めた。また、LHO の平均直径はそれぞれ HIH 群

0.67 ± 0.14 mm、CI 群 0.59 ± 0.22 、HT 群 0.37 ± 0.11 で、HIH 群と HT 群間に有意差 ($p<0.015$) を認めた。

D. 考察 LHO は、ラクナ梗塞や高血圧性脳内出血を合併する患者に有意に多く認められた。側脳室周囲の T2 延長像 (PVH) は虚血性病変とされ、脳梗塞の前段階あるいは脳血管性痴呆に関連があるとされる。LHO はラクナ梗塞より高血圧性脳内出血により強い関連を認め、PVH とは独立した高血圧性脳合併症の予知因子であると考えられた。

E. 結論 MRI にて認める LHO は高血圧性脳病変に関連する。とくに高血圧性脳内出血の危険因子であり血圧コントロールなど治療方針に決定に有用な所見である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cerebrovascular Dis. 2004 in press.

信学技報 M12003-49: 17-22, 2003.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

心筋梗塞における凝固第VII因子遺伝子多型の重要性に関する研究

分担研究者 鄭 忠和 鹿兒島大学大学院医歯学総合研究科
循環器・呼吸器・代謝内科学講座

研究要旨

若年発症心筋梗塞患者における凝固第VII因子 (FVII) 遺伝子多型と、FVII、活性型FVII (FVIIa) の意義を検討することを目的として、若年発症心筋梗塞127例とage matchさせた正常対照150例で、R353Q解析と血漿FVII、FVIIa濃度測定を行った。遺伝子多型のRR:RQ:QQは、患者群で117:10:0、対照群で131:17:2であり、Q alleleと冠危険因子を含めて多重ロジスティック回帰分析を行うと、Q alleleはodds ratio 0.41 (95%CI=0.18-0.95) と有意の関連を認めた (P=0.04)。以上より、発症に易血栓性が関与している若年発症心筋梗塞患者では、Q alleleが心筋梗塞発症に保護的に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

凝固第VII因子 (FVII) は心筋梗塞の危険因子と報告されている。しかしFVIIの代表的な遺伝子多型であるR353Qが、心筋梗塞発症に関与しているかについては意見の一致をみていない。本研究では若年発症心筋梗塞患者におけるFVII遺伝子多型と、FVII、活性型FVII (FVIIa) の意義を検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象は45才以下で発症した男性心筋梗塞患者127例とage matchさせた正常男性150例、全対象でPCR法に基づきR353Qを決定し、血漿FVII抗原量、FVIIa濃度を測定した。また、冠危険因子 (喫煙歴、高脂血症、高血圧、糖尿病) を含めて、心筋梗塞発症との関連を検討した。

C. 研究結果

- (1) 遺伝子多型RR:RQ:QQは、患者群で117:10:0、対照群で131:17:2であった。Q alleleの比は各々3.9%、7.0%であり、患者群は対照群と比べて低い傾向にあった。
- (2) Q alleleと冠危険因子を含め、多重ロジスティック回帰を行うと、Q alleleはodds ratio 0.41 (95%CI=0.18-0.95) と有意の関連を認めた (P=0.04)。喫煙歴 (odds ratio=2.43、P=0.01)、高脂血症 (odds ratio=1.87、P=0.02)、糖尿病 (odds ratio=5.37、P<0.01) も有意の関連があった。
- (3) 患者群と対照群のFVIIaは各々55.1±41.7、44.8±20.2 U/lで、有意差はなかった (P=0.08)。
- (3) 患者群のFVIIa濃度を遺伝子多型でみるとRR: 58.3±41.0, RQ: 21.0±9.8 U/lであり、遺伝子多型がFVIIa濃度を有意に規定していた (P<0.01)。

D. 考察

R353QのQ alleleではVIIa濃度の低下がみられることから、凝固外因系が抑制されていることが予想される。Q alleleが心筋梗塞と有意の関連を認めたことより、若年発症心筋梗塞では凝固系の亢進が重要な役割を果たしていることが確認された。

E. 結論

発症に易血栓性が強く関与していることが予想される若年発症心筋梗塞患者では、FVIIa濃度を低下させるQ alleleが心筋梗塞発症に保護的に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa M, Abe S, Saigo M, Toda H, Torii H, Minagoe S, Maruyama I, Tei C: Homocysteine and hemostatic disorder as a risk factor for myocardial infarction at a young age. *Thromb Res* 2003;109:253-258.
2. Ogawa M, Abe S, Biro S, Saigo M, Kihara T, Setoyama S, Matsuoka T, Toda H, Torii H, Atsuchi Y, Toyama Y, Tateishi S, Minagoe S, Maruyama I, Tei C: R353Q Polymorphism, activated factor VII, and risk of premature myocardial infarction in Japanese men. *Circ J* (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1) 酸化ストレス因子の免疫学測定。心血管患者の血清を試料とした。抗体は、抗カルボニル化タンパク抗体と抗チオール化タンパク抗体を使用した。

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

(2) sLOX-1 と酸化ストレス因子との関連性の検討。

(3) 抗酸化酵素と酸化ストレスの研究。酸化ストレスによる心血管細胞のアポトーシスに及ぼす抗酸化酵素の意義をラット心筋芽細胞 H9c2 を用いて検討した。

C. 研究結果

(1) 閉塞性動脈硬化症 (ASO) 患者血清では、病期 (Fontain 分類) II~III 度の患者でチオール化タンパクが上昇していた。動脈瘤患者、狭心症患者でも同様であった。一方、カルボニル化タンパクには疾患との関連は認められなかった。

(2) 血清 sLOX-1 値とチオール化タンパク値を比較検討すると、ASO 患者では両因子が病期進展に伴って上昇する傾向を示した。

(3) 抗酸化作用とタンパク質 SH 基の酸化修飾を還元する作用を有するレドックス (酸化還元) 因子のグルタレドキシシン (GRX) による抗アポトーシス作用を持つ Akt 活性制御を検討した。GRX は Akt 活性を上昇させることで抗アポトーシスに働いた。この機序に GRX による Akt SH 基のレドックス制御が関与していた。

D. 考察

ASO 患者では、病期進展とともに sLOX-1 が上昇したことから、sLOX-1 が血管病変の予知因子となることが示唆された。チオール化タンパク上昇例で sLOX-1 の高値が認められたことから、チオール化タンパクを酸化ストレスマーカーとし、sLOX-1 を病状進展のマーカーとして経過を追うことが臨床的に意義があると考えられる。

E. 結論

酸化ストレスマーカーの血管病変における意義はまだ不明であるが、今後は酸化ストレスマーカーと sLOX-1 を経過を追って測定して、病態的意義を詳細に検討する。ASO 以外の動脈瘤、虚血性心疾患や脳血管疾患でも同様に検討を行う。

F. 健康危険情報

今回の実験からは、心血管疾患における酸化ストレスの関与と、抗酸化機能を維持することの重要性が強く示唆された。

G. 研究発表 【1. 論文発表】

- 1: Murata H., Ihara Y., Nakamura H., Yodoi J., Sumikawa K., and Kondo T.: Glutaredoxin exerts anti-apoptotic effect by regulating redox state of Akt. *J. Biol. Chem.*, 278:50226-33, 2003
- 2: Atarashi, R., Nishida, N., Shigematsu, K., Goto, S., Kondo, T., and Sakaguchi, S. Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-like protein/Doppel-induced neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 278(31):28944-28949. 2003
- 3: Ohira, A., Tanito, M., Kaidzu, S., Kondo, T. Glutathione peroxidase induced in rat retinas to counteract photic injury. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 44(3):1230-1236, 2003
- 4: Muroya, T., Ihara, Y., Ikeda, S., Yasuoka, C., Miyahara, Y., Urata, Y., Kondo, T., and Kohno, S. Oxidative modulation of NF- κ B signaling by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:900-905, 2003
- 5: 池田 聡司、近藤 宇史
フリーラジカルの産生と消去機構
『分子呼吸器病』(先端医学社) 6:2, 20-26, 2002
- 6: 後藤 信治、谷 政治、鎌田 健作、飯田 桂子、浦田 芳重、井原 義人、近藤 宇史、奥村 寛
抗酸化因子の遺伝子制御と放射線感受性
『広島医学』 55:3, 258-260, 2002
- 7: 井原 義人、近藤 宇史
分子シャペロンとレドックス制御
THE LUNG メディカルレビュー (株) 10(4):59-63, 2002
- 8: 近藤 宇史、後藤 信治

【合成系】 γ -グルタミルシステインシンターゼ。

Vitamins (Japan) 76(11)515-519, 2002

9: 村田 寛明、近藤 宇史

『急性肺損傷と酸化ストレス』

医学の歩み 【別冊・呼吸器疾患 2003—2005】: 14-16, 2003

【2. 学会発表】

1: 第35回 日本動脈硬化学会総会

『長時間の酸化 LDL の曝露によるマクロファージの機能低下。』

室屋 隆浩、池田 聡、安岡 千枝、宮原 嘉之、河野 茂、関根 一郎、近藤 宇史

2: 第35回 日本動脈硬化学会総会

『ヒト動脈硬化病変における酸化ストレスマーカーの測定と評価 ヒト動脈硬化病変における酸化ストレスマーカーの測定と評価』

野中 和樹、陰山 寛、神田 宗武、瀬戸 信二、矢野 捷介、中山 敏幸、関根 一郎、浦田 芳重、近藤 宇史

3: 第13回 国際動脈硬化学会

『Impairment of the activity of transcription factor by oxidized LDL in macrophages.』 Muroya, T., Ikeda, S., Yasuoka, C., Miyahara, Y., Kohno, S., Sekine, I., and Kondo, T.

4: 第13回 国際動脈硬化学会

『Clinical evaluation of oxidative stress in cardiovascular disease.』 Nonaka, K., Kageyama, K., Kanda, M., Seto, S., Yano, R., Nakayama, T., Sekine, I., Urata, Y., and Kondo, T.

5: 第76回 日本生化学会大会

Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by doxorubicin in human lung cancer cells.

後藤 信治

A. 研究目的

酸化ストレスは虚血心筋における細胞障害の重要な増悪因子であり、細胞内で種々のストレスタンパク質の発現を誘導する。本研究は、心筋梗塞や脳梗塞における酸化ストレス応答に関連するストレスタンパク質について、その病態における意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 心筋系細胞 H9c2 におけるカルレチキュリン(CRT)高発現の酸化ストレスによるアポトーシス感受性に対する影響について、細胞内カルシウム代謝とタンパク分解系における影響を中心に生化学的な解析を行った。

(2) 酸化ストレス下での細胞内カルシウム変動による細胞生存シグナル Akt の制御機構について検討した。

C. 研究結果

(1) H9c2 細胞において、CRT 遺伝子の高発現は酸化ストレスによるアポトーシス感受性を増加させた。その分子機構には小胞体 Ca-ATPase 2 (SERCA2)の機能抑制とプロテアソームに依存したタンパク質分解系の促進があることを明らかにした。

(2) 酸化ストレス下の細胞内遊離カルシウムの上昇が継起となり Akt シグナルの抑制と細胞傷害感受性の増強が起こることが明らかとなった。その分子機構には Akt の脱リン酸化に関わる PP2Ac の発現誘導のあることを見出した。

D. 考察

今回の実験から、酸化ストレスによる心筋細

胞傷害において小胞体シャペロン CRT の恒常的な高発現は心筋細胞の傷害感受性の増強に働くこと、その分子機構にはカルシウム代謝の制御への影響を介した細胞生存シグナル Akt シグナルの抑制があることを明らかにした。

E. 結論

今後はストレスタンパク質が関わる酸化ストレス下における心筋細胞傷害機構の詳細な解析を進め、さらに心筋梗塞患者検体を用いて、CRT や他の酸化ストレスに関連するストレスタンパク質マーカー発現の意義を検討する。

F. 健康危険情報

今回の実験からは、酸化ストレスによる心筋細胞傷害において小胞体シャペロンがカルシウム代謝の制御を介して、その傷害感受性の分子制御に寄与することが示唆された。

G. 研究発表

【1. 論文発表】

1. Murata H., Ihara Y., et al (4). *J. Biol. Chem.* 278:50226-50223, 2003

2. Muroya T., Ihara Y., et al (6). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:900-905, 2003

【2. 学会発表】

1. Ihara Y., Kageyama K., and Kondo T. (2003) Overexpression of calreticulin enhances apoptosis in cardiac H9c2 cells under oxidative stress. *Mol. Biol. Cell*, 14 (supplement), 22a, 2003. 43rd American society for cell biology annual meeting, December 13-17, 2003, San Francisco, CA, USA