

生気候学部門

Department of Bioclimatology and Medicine

当部門は循環器疾患・呼吸器疾患を主に診療している関係で研究分野も動脈硬化、心不全、不整脈などに関する研究が中心である。心臓発生に関する研究では筋小胞体蛋白質について分子生物学的研究を行おこなっている。心肥大や心筋梗塞などに見られる心筋の再構築について細胞外基質蛋白の遺伝子発現と形態的变化の関係について、また、動脈硬化の研究ではアンチセンス遺伝子療法を導入し現在、動物実験を行っている。現状では急速に進歩しつつある遺伝子療法のための基礎研究を積み重ねているが、将来は成人病疾患に遺伝子治療が可能になる日も遠くないと確信している。臨床的研究ではホルター心電図を用いた生体リズムからみた自律神経活動の評価を行なっている。心不全患者や糖尿病患者を対象として、病状の進行と自律神経活動についてホルター心電図の R-R 間隔より心拍変動解析を行っている。人事面では、研究生の澤田正二郎が1998年7月には防衛医科大学へ、安藤洋志が1999年3月で浜の町病院へ転勤となった。尚、当教室の教授は九州大学医学部循環器内科の竹下彰教授が1999年3月まで併任された。

基礎的研究

A. 筋小胞体蛋白質の分子生物学的研究（松井寛輔，矢野健一）

a. Rat Cardiac Triadin cDNA の Cloning と機能解析

triadin は筋小胞体に存在する蛋白質で、calsequestrin と ryanodine receptor に結合することが示されている。このことから triadin は Ca の筋小胞体からの放出機能に関与していると推測されるが、その機能は未だ明らかにされていない。これまで我々は、Rat を用いて圧負荷肥大心での研究を行ってきたことから、rat の cardiac triadin cDNA の抽出を試みた。cDNA library の screening と 3'RACE 法により 3 つの isoform を同定した。Northern blot で mRNA の発現を観察したところ、心室と心房では isoform の発現が発生途中で変化していた。次に、圧負荷肥大心での発現変化を観察したところ、心室では 2 つの isoform の内、1 つのみ発現量が増加していた。以上のことから、triadin は心臓内部位、発生時期、病態に応じて isoform の発現がコントロールされており、何らかの機能に関与しているものと考えられた。現在、dominant negative 法を用いた triadin の機能解析を計画中である。

b. Rat Cardiac Junctin cDNA の Cloning

Junctin は triadin と同じく calsequestrin と ryanodine receptor に結合する。現在、犬の

junction 核酸配列しか解明されていないため、rat cardiac junction の cDNA の抽出を試みた。数種類の primer を作成して RT-PCR を実施したが cDNA は得られなかった。次に canine junction cDNA を RT-PCR で作成し、これを probe として rat heart cDNA library を screening した。しかし、positive clone は全く得られなかった。現在、probe を junction cDNA の別の部位に変更して検討中である。junction の機能も未だ明かではないが、我々は犬の junction 核酸配列から細胞内蛋白質輸送に関与するものではないかと推測している。

c. Calsequestrin および Triadin 遺伝子の構造

calsequestrin は筋小胞体に局在する Ca 結合蛋白質である。これまでウサギ心筋 calsequestrin genomic DNA の構造を解析してきた。calsequestrin には白筋に発現する isoform と心筋や赤筋に発現する isoform が知られているが、この遺伝子のプロモーター領域の研究を行うことにより、発現部位の特異性を決定づける機序を明らかにする。また、rat triadin の genomic DNA も screening している。この遺伝子のプロモーター研究により triadin の心房と心室の発現制御を解析する。

B. 心筋再構築に関する研究（畑 知二，矢野健一，菅野公浩，牧野直樹）

a. 心筋梗塞期の Matrix Metalloproteinase (MMP) の役割

心筋梗塞では梗塞部の心筋線維化と非梗塞部の代償的肥大が観察されるが、この再構築における細胞間質の変化を分子遺伝学的に研究している。線維芽細胞や心筋細胞から分泌される MMP ファミリーとその内因性阻害酵素の TIMP ファミリーがどのような関係にあるのか、また、どのような遺伝子制御を受けているか研究をおこなっている。更には、種々のサイトカインや増殖因子との関わりについて検討している。心筋線維化の分子機構と形態の関係や更には機能との関係が明らかになれば、最も効率のよい再構築の心筋に導き出す事は出来ないか研究中である。また、血管新生と MMP ファミリーとは深く関係していることも知られていることから、心筋梗塞に伴う副血行路の発達の分子制御について研究を行う予定である。

b. 心血管系のリモデリングとレニン-アンギオテンシン系

自然発症高血圧ラットにおいて、アンギオテンシノーゲン (AGT) のアンチセンス投与の心筋および血管リモデリングに及ぼす効果について検討した。AGT のアンチセンスを asialoglycoprotein-poly (L) lysine ODNs complex として、慢性的に尾静脈より投与し、血清アンギオテンシⅡ濃度を WKY と同程度に低下させても、肥好心や動脈平滑筋細胞の肥厚は抑制した。一方、心筋組織や動脈内の細胞外 matrix tissue の低下は見られなかった。これは、AGT のアンチセンスが肝 AGT mRNA を抑制したが、組織中の AGT、AT1 及び AT2 mRNA は抑制しておらず、血圧も WKY と同程度に低下しなかったためと考えられた。

C. 動脈硬化の成因・治療に関する研究（菅野公浩，澤田正二郎，安藤洋志，牧野直樹）

a. コレステロールエステル転送蛋白と動脈硬化

CETPは主として肝で合成されるため，CETPのアンチセンスを asialoglycoprotein-poly (L) lysine ODNs complex として，耳静脈より投与した． asialoglycoprotein-poly (L) lysine ODNs complex は肝 CETP mRNA，血清の CETP 活性及び LDL コレステロールを低下させ，HDL コレステロールを上昇させることにより，動脈硬化が抑制されることが明らかになった．また，培養肝細胞において，CETP のアンチセンスを asialoglycoprotein-poly (L) lysine ODNs complex として投与し，nascent HDL 産生に及ぼす影響を検討した．

CETP のアンチセンス添加により，肝 CETP mRNA は有意に低下，Apo A-I mRNA は有意に上昇した．又，培地の CETP 量は有意に減少し，Apo A-I 量は有意に増加していた．Apo A-I の増加は，特に prebeta HDL の増加によるものであった．以上より，肝では CETP 産生の抑制により，prebeta HDL の産生の分泌が増加し，CETP 欠損症の患者における HDL 中の Apo A-I，prebeta HDL の増加の原因の一つと考えられた．現在，CETP 抑制による LDL の組成の変化，易酸化性，マクロファージへの取り込み等を検討している．

b. 内皮細胞の障害とアポトーシス

動脈内皮細胞の障害により動脈硬化が促進されるが，近年，サイトカイン，酸化 LDL による内皮細胞の障害にアポトーシスの関与が報告されている．我々は，予備実験において，サイトカイン，酸化 LDL による内皮細胞のアポトーシスが，HDL によって抑制されることを明らかにした．HDL は CPP32 like protease を抑制することにより，アポトーシスを抑制した．今後，内皮細胞に抗アポトーシス遺伝子を導入し，動脈硬化抑制について検討していく予定である．

c. 心微小血管内皮細胞の病態生理

心微小環境の血管異常が心臓の様々な病態において重要な役割を演じている事が知られてきている．我々は，豚の心臓微小血管内皮細胞の単離培養系を確立した．この課程で，心臓微小血管内皮細胞はいくつかの点で，大血管由来内皮細胞と性質を異にすることが明らかとなった．即ち，心臓微小血管内皮細胞のストレスファイバーには， α -smooth muscle actin が存在する．心臓微小血管内皮細胞に存在する eNOS の性質は大血管由来内皮細胞から得られた eNOS の基本的性質といくつかの点で異なっていた（酵素活性におけるカルシウム依存性の有無，eNOS 発現と細胞周期との関係等）．現在，これらの点を詳細に検討している．また，心筋虚血耐性獲得に重要な副側血行路の発達のメカニズムをこの細胞を用いて検討していく予定である．

臨床的研究

D. ホルター心電図による自律神経機能の評価（平山祐義，矢野健一，畑 知二，牧野直樹）

糖尿病患者の合併症である自律神経障害について Holter 心電図からその機能を解析を行っている。本方法は24時間心電図記録の心拍変動を周波数分析と時系列解析を行なっている。周波数分析では高周波数域と周波数域の均衡により自律神経機能が正常に保たれているが，糖尿病の進行に伴い末梢神経障害に加えて心拍変動の異常がみられる。また，心室頻拍などの重症不整脈の出現時期と本疾患の自律神経機能の関係も研究中である。

業績目録

原著論文

1. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. 1998.
Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodelling in spontaneously hypertensive rats.
Hypertension. 32 : 467-472
2. Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, Kamada M, Mizushima A. 1998.
Effect of antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.
J. Biol. Chem. 273 : 5033-5036
3. Makino N, Sugano M, Otsuka S, Sawada S. 1998.
Intravenous injection with antisense oligodeoxynucleotides against angiotensinogen decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats.
Hypertension. 31 : 1166-1170
4. Yano K, Makino N, Hirayama H, Hatakenaka M, Matsui H, Soeda T, Hadama T. 1999.
Penetrating atherosclerotic ulcer at the proximal aorta complicated with cardiac tamponade and aortic valve regurgitation.
Jap Circ. Journal. 63 : 228-230
5. Tanaka F, Mori M, Haraguchi M, Makino N, Yoshikawa Y, Akiyoshi T. 1999.
Coexisting extraadrenal pheochromocytoma and von Meyenberg complexes : Report of

a case.

Jap J Surg 29 : 80-82.

6. Vogt AM, Ando H, Arras M, Elsaesser A.

Lack of adenosine causes myocardial refractoriness. 1998.

J Am Coll Cardiol. 31:1134-1141.

7. 畑 知二, 牧野直樹, 大塚祥司, 舩友一洋, 菅野公浩. 1998.

心筋梗塞急性期の collagen の合成-分解におけるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の効果.

心筋の構造と代謝, 20巻 ; 335-341.

8. Ando H, Kubin T, Schaper W, Schpaer J.

Porcine coronary microvascular endothelial cells express α -smooth muscle actin and show low NOS III activity.

Am J Physiol (in press).

9. Sawada S, Sugano M, Makino N, Okamoto H, Tsuchida K.

Secretion of preB HDL increases with the suppression of cholesteryl ester transfer protein in Hep G2 cells

Atherosclerosis. (in press).

10. Kubin T, Ando H, Schaper W, Schpaer J.

Porcine coronary microvascular endothelial cells produces a trophic factor for cardiomyocytes.

Am J Physiol (in press).

11. Extracellular Matrix Regulation in the Development of Syrian Cardiomyopathic

Bio 14.6 and Bio 53.58 Hamsters.

Masutomo K, Makino N, Sugano M, Miyamoto S, Hata T, Yanaga Y.

J Mol Cell Cardiol. (in pres).

総 説

1. 牧野直樹. 1998.

コラーゲンの isoform と mRNA の発現.

続心筋代謝実験法, 六法出版社, 381-386.

学 会 発 表

国内学会

1. Hata T, Otsuka S, Sugano M, Matsui H, Taguchi S, Makino N (1998, 12/9-11)
Collagen degradation in cardiac remodeling process after myocardial infarction and effects of AT1 blockade.
The XV meeting of the Japanese Section of International Society for Heart Research.
(東京).
2. 澤田正二郎, 菅野公浩, 牧野直樹 (1999, 3/27-29).
コレステロール転送蛋白の antisense oligodeoxynucleotide 投与により Hep G2 cell の HDL 産生は増加する.
第63回日本循環器学会学術集会 (東京).
3. 牧野直樹, 菅野公浩, 畑 知二, 舩友一洋, 大塚祥司, 安藤洋志 (1999, 3/27-29).
梗塞後の心筋リモデリングにおける Matrix Metalloproteinase (MMP) 活性の役割.
第63回日本循環器学会学術集会 (東京).
4. 松井寛輔, 矢野健一, 牧野直樹 (1999, 3/27-29).
Rat cardiac triadin の cloning と圧負荷肥大心における mRNA の発現変化.
第63回日本循環器学会学術集会 (東京).

国際学会

1. Makino N, Sugano M, Matsui H, Hata T, Yano K. (1998, 10/ 8/9).
Inhibition of renin -angiotensin system affect on cardiac remodeling process in spontaneously hypertensive rats.
International Conference on Cardiac Hypertrophy. (東京).
2. Sawada S, Sugano M, Makino N (1998,11/8-11).
Increased secretion of nascent HDL with suppression of cholesteryl ester transfer protein by antisense olidodeoxynucleotide in Hep2 G2 cells.
71st Scientific Sessions of American Heart Association (Dallas).

研究会

1. 牧野直樹, 菅野公浩, 畑 知二, 澤田正二郎 (1998, 10/24-25).
Angiotensinogen アンチセンス療法が肥大心筋に及ぼす効果.
第21回心筋代謝研究会 (東京).

2. 安藤洋志 (1998, 6/15).
心微小血管内皮細胞の特徴.
第70回別府ハート会 (別府).
3. 安藤洋志 (1998, 11/9).
循環器疾患と NO.
バイエル薬品社内研修会 (大分).
4. 安藤洋志 (1999, 1/20).
高血圧症の治療戦略-JNC 6を中心として.
宇佐高田医師会学術講演会 (宇佐市).
5. 菅野公浩, 土田啓子, 牧野直樹 (1999, 3/5-7).
コレステロール転送蛋白の抑制により LDL の酸化能は増加する.
Kyushu Lipid Club 99 (沖縄).
6. 松井寛輔, 上田安子, 牧野直樹. 1998.
Rat Cardiac Triadin の Cloning.
第 2 回 Molecular Cardiovascular Conference, 札幌.