

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。動脈硬化の研究では抗アポトーシス遺伝子を内皮細胞に導入し、血管新生の研究を *in vitro* と *in vivo* で行っている。血管新生の研究は、心筋梗塞モデルを用いて、遺伝子治療を目指している。また、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も、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検討している。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。また、心筋梗塞患者における、種々のサイトカインの影響についても、国立大分病院及び北九州医療センターと共同研究している。人事面では、1999 年 7 月に牧野直樹助教授が、教授に昇格された。2000 年 4 月には講師の畑知二が畑病院に、助手の松井寛輔が国立中津病院へ転勤となった。2000 年 5 月には九州大学医学部循環器内科より佐藤真司が講師として、北九州医療センターより富田英春が助手として赴任の予定である。

基礎的研究

A. 動脈硬化の成因・治療に関する研究 (菅野公浩, 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

コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) は主として肝で合成されるため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。また、人において、CETP 抑制により LDL の組成の変化がおり、酸化能の低下、マクロファージへの取り込みの減少が見られた。

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。

c. 抗アポトーシスによる血管新生

TNF に拮抗する soluble TNF receptor 1 の遺伝子を内皮細胞に導入することにより、内皮細胞の増殖が促進され、また、酸化 LDL に対して抵抗性を示す事を見いだした。即ち、soluble TNF receptor 1 に血管新生の可能性があることが明らかになった。今後、血管新生における、動脈硬化抑制、心筋梗塞の遺伝子治療について検討していく予定である。

B. 心筋再構築に関する研究

(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、肥大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 AGTmRNA 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. 筋小胞体蛋白質の分子生物学的研究

(松井寛輔, 矢野健一, 牧野直樹)

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、何らかの機能に参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. 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。

臨床的研究

A. 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, 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。

B. 心筋梗塞患者におけるサイトカインの影響 (菅野公浩, 平山祐義, 牧野直樹)

心筋梗塞患者において、心筋梗塞直後より、TNF の増加がみられ、soluble TNF receptors は、24 - 48時間かけて徐々に増加した。soluble TNF receptors の増加に伴い、CPK-MB は低下した。この結果により、心筋梗塞による心筋障害において、soluble TNF receptors は防御的役割を果たしている可能性が示唆された。今後、経過を追って詳細に検討していく予定である。

業績目録

原著論文

1. Yano K, Makino N, Hirayama H, Hatakenaka M, Matsui H, Soeda T, Hadama T. 1999.

- Panetrating atherosclerotic ulcer at the proximal aorta complicated with cardiac tamponade and aortic valve regurgitation.
Jap Circ. Journal. 63: 228-230
2. 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
 3. Shojiro Sawada, Masahiro Sugano, Naoki Makino, Hiroshi Okamoto, Keiko Tsuchida. 1999.
Secretion of pre-B HDL increases with the suppression of cholesteryl ester transfer protein in Hep G2 cells.
Atherosclerosis. 146; 291-298
 4. Kazuhiro Masutomo, Naoki Makino, Masahiro Sugano, Shingo Miyamoto, Tomoji Hata, Takashi Yanaga. 1999.
Extracellular Matrix Regulation in the Development of Syrian Cardiomyopathic Bio 14.6 and Bio 53.58 Hamsters.
J. Mol. Cell. Cardiol. 31; 1607-1615
 5. Naoki Makino, Masahiro Sugano, Shoji Ohtsuka, Shojiro Sawada, Tomoji Hata. 1999.
Chronic antisense therapy for angiotensinogen on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive Rats.
Cardiovasc. Res. 44; 543-548
 6. Masahiro Sugano, Shojiro Sawada, Keiko Tsuchida, Naoki Makino, Masafumi Kamada. 2000.
Low density lipoproteins develop resistance to oxidative modification due to inhibition of cholesteryl ester transfer protein by a monoclonal antibody.
J. Lipid. Res. 41: 126-133
 7. Maruyama T, Yanaga T, Makino N. 2000.
Pacind-induced palmar sweating evaluated by unique hygrometer: possible implications of sympathetic activation during tachycardia.
Clinical Physiology 20:2:85-88
 8. Masahiro Sugano, Keiko Tsuchida, Shojiro Sawada, Naoki Makino.
Reduction of plasma angiotensin II to normal level by antisense

Oligodeoxynucleotides against liver angiotensinogen can not completely attenuate vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats .

J. Hypertension. (in press)

9. Sugino M, Tsuchida K, Makino N, High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. Biochem, Biophys. Res. Comm. (in press)

学会発表

国内学会

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 平山祐義, 阿部信行, 矢野健一, 牧野直樹. (Sep. 13-15, 1999)
高血圧を有さない糖尿病 (NIDDM) の心肥大について—インスリンとの関係—
第 47 回日本心臓病学会学術集会 (横浜)
5. 平山祐義, 阿部信行, 矢野健一, 牧野直樹. (12/4, 1999)
糖尿病患者の自律神経障害と心拍変動の関係について
日本循環器学会九州地方会 (北九州市)
6. 松井寛輔, 矢野健一, 牧野直樹. (2000, 3/31-4/2)
筋小胞体蛋白 triadin の mRNA 発現と promoter の構造解析
第 64 回日本循環器学会学術集会 (東京)
7. 菅野公浩, 土田啓子, 牧野直樹. (2000, 3/31-4/2)
高比重リポタンパクによる血管内皮細胞アポトーシスの抑制効果
第 64 回日本循環器学会学術集会 (東京)

国際学会

1. Naoki Makino, Nobuyuki Abe, Hiroyosi Hirayama, Kennichi Yano. (June 3-6, 1999)
Cardiac hypertrophy in diabetes patients without hypertension is associated with hyperinsulinemia.
The International Conference on Diabeted and Cardiovascular Disease, Winnipeg, Canada
2. Masahiro Sugano, Keiko Tsuchida, Naoki Makino. (Nov. 7-10, 1999)
Effects of Suppressed Plasma Angiotensinogen by Antisense Oligodeoxynucleotides on Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats.
The 72th Scientific Sessions of American Heart Association, Atlanta, USA.
3. Masahiro Sugano, Keiko Tsuchida, Naoki Makino. (Nov. 7-10, 1999)
High density lipoproteins protect endothelial cells from TNF a -induced apoptosis via an inhibition of CPP32-like protease.
The 72th Scientific Sessions of American Heart Association, Atlanta, USA.
4. Matsui H, Ueda Y, Makino N. (Dec. 2-3, 1999)
Expression of triadin mRNA in atria.
The XVI Meeting of the international Society for Heart Research, Japanese Section, Fukuoka
5. Masahiro Sugano, Keiko Tsuchida, Naoki Makino. (Dec. 2-3, 1999)
Antiapoptotic effect of HDL on endothelial cells.
The XVI Meeting of the international Society for Heart Research, Japanese Section, Fukuoka

研究会

1. 牧野直樹, 菅野公浩, 畑知二, 澤田正二郎. (1998,10/24 - 25).
Angiotensinoge 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. (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)
3. 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)

4. 牧野直樹, 平山祐義, 阿部信行. (1999, 12/6)
糖尿病神経障害患者の心拍変動と自律神経機能について.
糖尿病合併症研究会 (大分市)
5. 牧野直樹. (2000, 1/13)
循環器病学における遺伝子治療の展望.
北九州循環器研究会 (北九州市)
6. 牧野直樹. (2000, 3/10)
循環器病学における遺伝子治療の現状と将来.
浜松循環薬理研究会 (浜松市)