

血管平滑筋細胞の形質変換に関わるMAPキナーゼ下流分子の全ゲノムの探索

●青木 浩樹 ◆吉村 耕一 ◆藤井 幸蔵

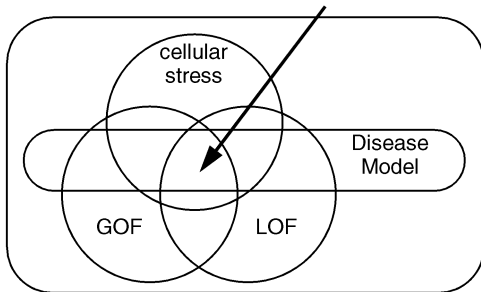
山口大学医学部

〈研究の目的と進め方〉

本研究の目的は、血管平滑筋細胞においてMAPキナーゼ系の下流で制御される遺伝子発現をゲノムスケールで解析し、平滑筋細胞の形質変換の分子病態を解明することであった。

培養血管平滑筋細胞系をモデルシステムの中心に置き、これに動物実験モデルとしてラット大動脈のバルーン傷害モデルを加え、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析を行った。

Pathway-Specific Disease-Related Genes



注目する細胞内情報伝達系について gain of function (GOF)群と loss of function (LOF)群を設定し、病態モデルと組み合わせて疾患関連遺伝子群を同定する

〈研究開始時の研究計画〉

代表的なMAPキナーゼ系のERK、p38およびJNKにより制御される遺伝子群を同定するために以下の実験を計画した。

ERK下流の遺伝子群を同定するために血小板由来増殖因子 (PDGF) によりラット大動脈平滑筋培養細胞を刺激する。以下の3実験群を設定し、RNAサンプルを調製する。PDGF群；PDGF刺激の有無、PD群；MEK阻害薬 (PD98059) の有無におけるPDGF刺激、caMEK群；活性型MEK1アデノウイルスの有無

p38下流の遺伝子群を同定するために酸化ストレスとして過酸化水素によりラット大動脈平滑筋培養細胞を刺激する。以下の3実験群を設定し、RNAサンプルを調製する。過酸化水素群；過酸化水素刺激の有無、SB群；p38阻害薬 (SB203580) の有無における過酸化水素刺激、caMKK6群；活性型MKK6アデノウイルスの有無

JNK下流の遺伝子群を同定するために酸化ストレスとして過酸化水素によりラット大動脈平滑筋培養細胞を刺激する。以下の3実験群を設定し、RNAサンプルを調製する。過酸化水素群；過酸化水素刺激の有無、dnJNK群；抑制型JNKアデノウイルスの有無における過酸化水素刺激、caMKK7群；活性型MKK7アデノウイルスの有無

血管障害の動物実験モデルとしてラット大動脈のバルーン傷害モデルを作成し、RNAサンプルを調整する。以上のRNAサンプルからDNAマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析を行う。

〈研究期間の成果〉

ERK下流で顕著に負に制御される遺伝子としてId2を同定した (成果リスト5)。JNK下流の遺伝子群として、マトリックスプロテアーゼ群が顕著に正に制御され、細胞外マトリックス生成酵素群が負に制御されることを見いだした (成果リスト1-4,6,7)。p38下流の遺伝子群の中で血管病態に関連する候補遺伝子が得られており、解析中である。

なお、研究期間後に、細胞外マトリックス代謝が病態に決定的な役割を果たす血管疾患として、大動脈瘤についてJNKの機能解析を行った。JNKの異常活性化は大動脈瘤病態の中心的役割を果たしており、JNK抑制療法により、これまで不可能と考えられていた、大動脈瘤の薬物による退縮療法の開発に成功した (成果リスト1)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

JNK下流遺伝子の同定に端を発した大動脈瘤病態に置くJNKの位置づけ、および大動脈瘤に対するJNK抑制療法は、2005年12月のNature Medicine誌に掲載され、国内外から大きな反響を得た。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初、Incyte Genomics社のヒトcDNAマイクロアレイを使用していたが、期間中に同社がマイクロアレイ事業から撤退したため、計画の変更を余儀なくされた。Affymetrix社のGeneChip RG-U34Aに変更し、研究を推進した。

〈今後の課題〉

DNAマイクロアレイ技術により、細胞内情報伝達下流の遺伝子発現プロファイルは迅速に解析できるようになった。発現プロファイルは、分子病態に置く意味付けにより有効なデータとなるが、このステップにはなお多大な労力と時間を要するため、タンパク機能の迅速かつ網羅的な解析手法、さらに生体内での遺伝子およびタンパク機能解析手法の開発が必要である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Yoshimura, K, Aoki, H, Ikeda, Y, Fujii, K, Akiyama, N, Furutani, A, Hoshii, Y, Tanaka, N, Ricci, R, Ishihara, T, Esato, , Hamano, K, Matsuzaki, M. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. NATURE MEDICINE 11:1330
2. Yoshimura, K, Aoki, H, Ikeda, Y, Akiyama, N, Furutani, A, Hamano, K, Matsuzaki, M. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase causes regression of experimental aortic aneurysms. CIRCULATION 112 Suppl:U94.
3. Yoshimura, K, Aoki, H, Yamada, M, Ikeda, Y, Akiyama, N, Funutani, A, Hamano, K, Matsuzaki, M. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase prevents development of abdominal aortic aneurysm in a

- murine model. CIRCULATION 110 Suppl:120.
- 4 . Yoshimura, K, Aoki, H, Akiyama, N, Furutani, A, Hamano, K, Matsuzaki, M. c-Jun N-terminal kinase regulates pathological extracellular matrix metabolism in abdominal aortic aneurysm in vivo. JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY 37:222.
 - 5 . Aoki, H, Yoshimura, K, Katsumura, KR, Fujii, K, Yamada, M, Ikeda, Y. Id2 regulates post-developmental phenotype of vascular smooth muscle in atherosclerosis in vivo. CIRCULATION 108 Suppl: 40.
 - 6 . Yoshimura, K, Fuji, K, Yamada, M, Ikeda, Y, Saito, S, Akiyama, N, Furutani, A, Hamano, K, Aoki, H. c-Jun N-terminal kinase governs pathological extracellular matrix metabolism in human abdominal aortic aneurysm. CIRCULATION 108 Suppl:193.
 - 7 . JNK-dependent genes in rat vascular smooth muscle cells. Gene Expression Omnibus Accession# GSE2190 (<http://www.ncbi.nih.gov/geo/>)