

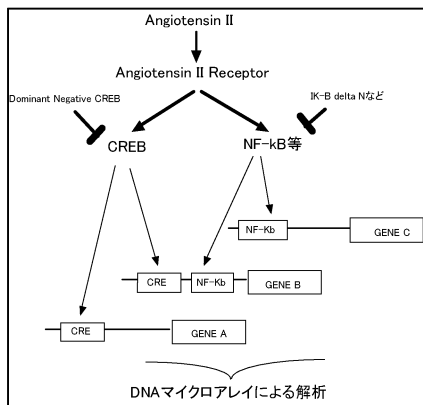
# アンジオテンシンII受容体欠損マウスにおける遺伝子発現のプロファイリング

●市来俊弘

九州大学医学部附属病院 循環器内科

## ＜研究の目的と進め方＞

目的—レニン・アンジオテンシン系(RAS)を阻害する薬物は心不全や心筋梗塞、腎不全の治療に極めて有効であることが近年の大規模臨床試験により明らかとなってきた。つまり、RASの最終産物であるアンジオテンシンII(AII)は心血管系や腎臓における病変形成に重要な役割を果たすと考えられる。従ってAIIが心血管系において、どのような遺伝子発現を制御するかを明らかにすることは、循環器疾患や腎疾患の発生や進展の機序を理解するために極めて重要な課題である。本研究の目的は(1)AII受容体の活性化により発現が変化する遺伝子を解析し、心血管病変形成に関わる遺伝子を同定する。(2)AIIが発現制御に関与する遺伝子を包括的に検討すること、AIIが活性化する転写因子がどのような組み合わせによって遺伝子発現を制御するのかを検討する。転写因子の協調的な遺伝子発現制御機構を解明する。さらに転写因子を用いた心血管病の遺伝子治療の可能性を検討することである。



進め方—(1)に対してはAII受容体ノックアウトマウスの心臓などにおける遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより検討する。

(2)に対しては、血管平滑筋細胞に優勢抑制型転写因子をアデノウイルスベクターにより過剰発現させた後にAIIで刺激する。そして特定の転写因子に制御される遺伝子を、DNAマイクロアレイを用いて包括的に同定する(上図参照)

## ＜研究開始時の研究計画＞

(1) AIIタイプ1受容体(AT1)およびタイプ2受容体(AT2)のノックアウトマウスの心臓よりmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを検討する。野生型マウスの心臓の遺伝子発現プロファイルを対照として比較・検討する。

(2) 平滑筋細胞にアデノウイルスを用いて優勢抑制型変異転写因子を過剰発現させた後、AIIにより刺激しmRNAを抽出する。遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイにより解析する。LacZを発現するアデノウイルス

(AdLacZ)を感染させた後にAIIにより刺激したときの遺伝子発現プロファイルを対照として、AIIによって遺伝子発現が制御される遺伝子を同定する。

(3) 優勢抑制型変異転写因子の過剰発現がAIIによる血管平滑筋細胞の肥大に及ぼす影響を検討する。アデノウイルスを用いて、バルーン傷害後の血管に優勢抑制型変異転写因子を導入し、新生内膜の形成の程度を検討する。

## ＜研究期間の成果＞

(1) 心血管系に主に存在するアンジオテンシンII受容体であるタイプ1受容体のノックアウトマウスにおける遺伝子発現を正常対照と比較した。約2300個の遺伝子発現について解析し、ノックアウトマウスと正常マウスとの間で2倍以上発現が変化する遺伝子を同定した。その結果タイプ1受容体のノックアウトマウスの心臓において発現が亢進している遺伝子47個、低下している遺伝子104個を同定した。タイプ1受容体のノックアウトマウスの腎臓において発現が亢進している遺伝子20個と、低下している遺伝子125個を同定した。

(2) AIIによる遺伝子発現のプロファイリングと優勢抑制型変異CREBの影響。ヒト培養平滑筋細胞における遺伝子発現プロファイルとAII刺激時のプロファイルをDNAマイクロアレイにより決定した。約3400個の遺伝子発現を検討したところ約7%に相当する220個の遺伝子発現の増加を認めた(2.4倍以上)。アデノウイルスベクターを用いてcAMP response element binding protein(CREB)と呼ばれる転写因子の優勢抑制型変異体をあらかじめ過剰発現した細胞をAIIで刺激したところ、誘導された遺伝子発現のうち40%の遺伝子発現が有意に抑制された。

(3) CREBの優勢抑制型変異体の過剰発現はAIIによる培養平滑筋細胞の[3H]-Leucineの取込みを有意に抑制した。またこの分子をラット頸動脈バルーン傷害モデルに導入したところ新生内膜の形成が約30%抑制された。これはアポトーシスの増加と増殖の抑制の二つの効果を介したものと考えられた。

CREBはAIIによる平滑筋細胞の増殖に関与する遺伝子を制御する転写因子と考えられた。

同様の結果をトロンビン刺激や活性酸素による刺激でも確認した。

## ＜国内外での成果の位置づけ＞

血管系におけるCREBに関する一連の研究によりアメリカ心臓病協会の学会誌のひとつである、Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology誌のInvited Review Articleを書く機会を得た。The role of cAMP Response Element Binding Protein in Cardiovascular Remodeling, ATVB in press.

我々が発表したCirculation誌の論文(Circulation. 2003;108:1246-1252)に対してはEditorial Commentが加えられた(Circulation. 2003;108:1164-1166)。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

DNAマイクロアレイを用いた実験からはAII受容体ノックアウトマウスで発現が変化している遺伝子あるいは培養平滑筋細胞においてAIIが発現を誘導する遺伝子がある程度同定した。しかし、マイクロアレイが高価で実験回数に制約があり、例えば経時変化などを十分に解析することができなかった。また解析技術も未熟であった。そのため、AII受容体ノックアウトマウスの心臓での遺伝子発現プロファイルのデータに関しては、論文化することができなかった。

CREBの下流にある遺伝子については、マイクロアレイのデータから、標的遺伝子を見つけ、いくつかの論文をまとめることが出来た。しかし、NF-kBの標的遺伝子については解析までいかなかった。これは主にマンパワーの問題に起因する。したがって優勢抑制型転写因子の過剰発現を組み合わせて遺伝子発現プロファイルを検討することから標的遺伝子のプロモーター領域のcisDNA elementを予想し、データベースと比較することはできなかった。

またAIIの刺激は余り強くなく、予想外に誘導される遺伝子の数は少なかった。選択したマイクロアレイにも問題があったと思われるが、そのなかで、心血管領域に関連すると思われる遺伝子はさらに少なかった。また個々の遺伝子が平滑筋細胞や内皮細胞の機能にどのように関わるかを解析する実験にかなり手間どり、論文発表までに時間を要した。

#### 〈今後の課題〉

AIIによって活性化され、CREBの下流にある遺伝子について解析できていないものがまだ残っているので、心血管系における機能が比較的分かりやすいものから解析を進める。

またAIIによって活性化される他の転写因子の機能についても、解析を継続する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Ono H, Ichiki T, Fukuyama K, Iino N, Masuda S, Egashira K, Takeshita A. cAMP-response Element-binding Protein Mediates TNF $\alpha$ -induced Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 24:1634-1639.
2. Tokunou T, Shibata R, Kai H, Ichiki T, Morisaki T, Fukuyama K, Ono H, Iino N, Masuda S, Shimokawa H, Egashira K, Imaizumi T, Takeshita A. Apoptosis induced by inhibition of cAMP response element binding protein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2003 ; 108 : 1246-1252
3. Ichiki T, Tokunou T, Fukuyama K, Iino N, Masuda S, Takeshita A. cAMP response element binding protein mediates reactive oxygen species-induced c-fos expression. *Hypertension*. 2003 42:177-183
4. Funakoshi Y, Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Iino N, Takeshita A. Critical role of cAMP response element-binding protein (CREB) for angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2002;277:18710-18717.
5. Tokunou T, Ichiki T, Takeda T, Funakoshi Y, Iino N, Shimokawa H, Egashira K, Takeshita A. Thrombin-induced interleukin-6 expression through cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1759-1763

6. Tokunou T, Ichiki T, Takeda T, Funakoshi Y, Iino N, Takeshita A. cAMP response element binding protein (CREB) mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1764-1769