

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590561

研究課題名（和文）酸化ストレス防御反応を制御する転写因子 Bach1 の機能の臨床評価

研究課題名（英文）Role of transcription repressor Bach1 in cardiovascular diseases.

研究代表者

石田 隆史（ISHIDA TAKAFUMI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：40346482

研究成果の概要：本研究は酸化ストレス応答を制御する転写因子Bach1の心血管疾患における役割を研究するために行われた。1）ヒト血管平滑筋細胞および内皮細胞においてBach1がヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）の発現を制御していること、2）Bach1による転写応答、特にHO-1の発現調節が圧負荷による心肥大形成に関与していること、3）Bach1欠損はHO-1の発現を介して動脈硬化形成を抑制していること、4）Bach1が心筋梗塞後の左室リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなり、Bach1が心血管疾患の病態に深く関与していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 2008年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：酸化ストレス、動脈硬化、血管

1. 研究開始当初の背景

HO-1は酸化ストレスにより発現が誘導され、細胞内のヘムを一酸化窒素（CO）とビリルビンに変換する酵素である。COは一酸化窒素（NO）類似の作用で炎症反応を抑制し、一方ビリルビンは強力なスカベンジャー作用を発揮するため、HO-1誘導により細胞保護効果がもたらされる。我々は冠動脈造影を実施された患者の単球において酸化ストレス刺激に対するHO-1発現変化量（誘導能）が冠動脈動脈硬化のスコアと逆比例することを見出し

た。

HO-1の発現はその遺伝子の転写調節領域に存在するストレス感受性配列への転写因子の結合でコントロールされる。Nrf2などの転写因子の結合はHO-1の発現を上昇させるが同じ配列にBach1が結合するとHO-1の発現が強く抑制される。通常状態ではBach1が独占的・優先的にDNAに結合するためHO-1発現は抑制されている。一方、細胞が酸化ストレスに暴露するとBach1はこれを直接感知し核外に排出され、その結果ストレス感受性配列がNrf2な

どの因子に開放されHO-1の発現が増加することがin vitroで明らかにされている。

マウスにおけるBach1の欠損はHO-1発現の脱抑制をもたらし、HO-1基底発現だけでなく、酸化ストレス刺激によるHO-1発現上昇の程度が著しく増加させた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト血管系細胞においてもBach1がHO-1の発現誘導を制御しているか否かをまず明らかにし、次に動脈硬化、心肥大、心筋梗塞などの酸化ストレスが関与していると考えられている心血管疾患の病態においてBach1が関与しているか否かを明らかにすることであった。

3. 研究の方法

1) ヒト血管平滑筋細胞およびヒト血管内皮細胞においてBach1をsiRNAを用いてノックダウンし、HO-1のmRNAの発現をリアルタイムPCRにて測定した。

2) Bach1ノックアウトマウスにおいて、大動脈を縮搾し圧負荷による心肥大モデルを作成した。

3) Bach1ノックアウトマウスとApoEノックアウトマウスを交配させることにより、Bach1によるストレス応答の動脈硬化形成における役割を検討した。

4) Bach1ノックアウトマウスの左前下降枝を結紮し、心筋梗塞を作成した。

2)～4)においては、Bach1欠損の作用がHO-1を介するものか否かを確認するため、HOの阻害薬SnPPを投与した。

4. 研究成果

1) ヒト血管系細胞においてBach1はHO-1発現誘導の規定因子である

ヒト血管平滑筋細胞およびヒト血管内皮細胞においてBach1をsiRNAを用いてノックダウンすると、無刺激時のHO-1発現が数十倍に増加した。さらに酸化ストレスによるHO-1の発現誘導もBach1のノックダウンにより著明に増加した。これらの結果より、ヒト血管細胞においてBach1がHO-1の発現を制御していることが示された。

2) Bach1欠損は圧負荷による心肥大を抑制する

Bach1ノックアウトマウスでは圧負荷による心肥大、線維化、ANP、BNPの発現が野生型に比して減少しており、収縮能の低下も軽度であった。Heme oxygenase (HO) の

阻害薬であるSnPPの投与により、これらのBach1ノックアウトマウスの表現型は有意に打ち消された。以上のことから、Bach1による転写応答、特にHO-1の発現調節が圧負荷による心肥大形成に関与していることが示唆された。

3) Bach1欠損は動脈硬化を抑制する

Bach1ノックアウトマウスとApoEノックアウトマウスを交配させることにより、Bach1によるストレス応答の動脈硬化形成における役割を検討した。動脈硬化巣においてHO-1は強く発現しており、特にBach1ノックアウトマウスにおいて顕著であった。Bach1欠損によりApoEノックアウトマウスにおける動脈硬化巣のサイズは有意に減少した。これには過酸化脂質のマーカーである8-iso-PGの減少が伴っていた。SnPPの投与によりBach1欠損による動脈硬化巣のサイズの減少、8-iso-PGの減少とも減弱した。Bach1欠損はHO-1の発現を介して動脈硬化形成を抑制していることが明らかとなった。

4) Bach1欠損は心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制する

Bach1ノックアウトマウスに対し心筋梗塞を作成したところ、梗塞範囲、左室拡大、線維化のいずれも野生型に比して著明に抑制されていた。Bach1が心筋梗塞後の左室リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

1. Soe NN, Ishida T, Ishida M, Sawano M, Abe K, Miho N, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. Nifedipine Interferes with Migration of Vascular Smooth Muscle Cells via Inhibition of Pyk2-Src Axis

J Atheroscler Thromb. 査読有 *In press*

2. Abe K, Nakashima H, Ishida M, Miho N, Sawano M, Soe NN, Kurabayashi M, Chayama K, Yoshizumi M, Ishida T.

Angiotensin II-induced osteopontin expression in

vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1.

Hypertens Res. 査読有 31;2008:987-998.

3. Watari Y, Yamamoto Y, Brydun A, Ishida T, Mito S, Yoshizumi M, Igarashi K, Chayama K, Ohshima T, Ozono R.

Ablation of the *bach1* gene leads to the suppression of atherosclerosis in *bach1* and apolipoprotein E double knockout mice.

Hypertens Res. 査読有 31;2008:783-792.

[学会発表] (計 18 件)

1. Soe NN. Role of Src and Cas in dorsal ruffling, lamellipodia and migration in vascular smooth muscle cells. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 20 日、大阪

2. Hidaka T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) enhanced angiogenesis in a rat hind limb ischemia model, VEGF-A expression and mobilization in HUVEC. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 21 日、大阪

3. Kitagawa T. Coronary plaque stabilization by intensive statin therapy decreasing serum LDL/HDL cholesterol ratio on multislice computed tomographic angiography. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 21 日、大阪

4. Hidaka T. Increased leukocyte Rho kinase (ROCK) activity and endothelial dysfunction in cigarette smoking. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 22 日、大阪

5. Utsunomiya H. Usefulness of 64-slice

multidetector-row computed tomography in the simultaneous evaluation of aortic valve area and coronary artery disease. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 22 日、大阪

6. Kitagawa T. Evaluation of coronary calcium and noncalcified plaque characteristics in patients with acute coronary syndrome by multislice computed tomography. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 20 日、大阪

7. Kunita E. Lower high molecular weight adiponectin level is associated with unstable coronary plaques as detected by multy-detector computed tomography. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 20 日、大阪

8. Tadehara F. Prediction of heart failure death in hemodialysis patients by myocardial washout rate of technetium 99m sestamibi. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 20 日、大阪

9. Utsunomiya H. Nonobstructive aortic valve calcification and cardiovascular risk factors as predictors of coronary artery atherosclerosis assessed by 64-slice multidetector-row computed tomography. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009 年 3 月 20 日、大阪

10. Utsunomiya H. Feasibility and optimization of aortic valve planimetry using retrospective ECG-gated 64-slice multidetector-row computed tomography.

第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009
年 3 月 22 日、大阪

11. Soe NN. c-Src and Its Substrates Play a
Pivotal Role in Migration of Vascular
Smooth Muscle Cells. 日本動脈硬化学会学
術集会 2008 年 7 月 10-11 日、筑波

12. 石田隆史、バトルセッション-キレーシ
ョン治療による動脈硬化予防 「キレート療法
の根拠を検証する-鉄と酸化ストレスの血管
に対する作用」第 8 回日本抗加齢医学会総会
2008 年 6 月 7 日、東京

13. Abe K. Angiotensin II-induced
Osteopontin Expression in Vascular
Smooth Muscle Cells involves Gq/11, Ras,
ERK, Src, Ets-1 and c-Fos. Scientific
Sessions of American Heart Association
Nov. 4-7, 2007, Orlando, USA

14. Soe NN. c-Src and Its Substrates Play a
Pivotal Role in Migration of Vascular
Smooth Muscle Cells. Arteriosclerosis,
Thrombosis and Vascular Biology Annual
Conference 2008, Atlanta, USA, April
16-18, 2008

15. Abe K. Role of HIF-1-dependent expression
of the VLDL receptor in the progression of
atherosclerosis. 第 72 回日本循環器学会総会・
学術集会 2008 年 3 月 29 日、福岡

16. 外間梨沙. Angiotensin II による Osteopontin
の発現には G_{q/11}, Src, Ras, ERK が関与する。
第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10 月
25-27 日、沖縄

17. 澤野真理子. Nifedipine の血管平滑筋細胞
遊走・肥大およびその細胞内シグナル伝達機構
におよぼす作用. 第 30 回日本高血圧学会総会
2007 年 10 月 25-27 日、沖縄

18. Keiko Abe. Hypoxia Induces the
Expression of Very Low-Density
Lipoprotein Receptor in Human
Macrophages and Vascular Smooth Muscle
Cells via a HIF-1 Dependent Mechanism.
日本動脈硬化学会学術集会 2007 年 7 月
13-14 日、大阪

〔図書〕(計 1 件)

石田隆史、木原康樹、先端医学社「β 遮断薬
の心筋に対する作用」β 遮断薬のすべて 第
3 版、荻原俊男、築山久一郎、松崎益徳、島
田和幸編 2009、p86-94

6. 研究組織
(1) 研究代表者

石田 隆史 (ISHIDA TAKAFUMI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 40346482

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者