

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590381

研究課題名(和文)酸化ストレス応答のマスター転写因子Bach1を標的とした心血管疾患治療の開発

研究課題名(英文)Bach1 as a therapeutic target for ischemic cardiovascular diseases

研究代表者

石田 隆史(Ishida, Takafumi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師

研究者番号：40346482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス応答の負のマスター転写因子Bach1の発現を抑制することが、虚血性心血管疾患に対する新たな分子標的治療になり得るか否かを検討することを目的とした。Bach1ノックアウトマウスにおいては、心筋梗塞後の左室重量、左室拡張末期径、線維化が野生型に比して減少していた。次に、マウスにおいて下肢虚血モデルを作成し、si-Bach1を虚血肢に投与したところ、si-Bach1投与群の方が虚血肢における血流は増加し、毛細血管密度は高かった。以上よりRNA干渉などによってBach1の発現を抑制することが、心筋梗塞後の病的リモデリングや閉塞性動脈硬化症に対する新たな治療法となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bach1 is a stress-responsive transcriptional factor that orchestrates the expression levels of cytoprotective factors, including heme-oxygenase (HO)-1. In the present study, we investigated the effect of suppression of Bach1 expression on cardiac remodeling after myocardial infarction and limb ischemia in mice. Adverse cardiac remodeling and fibrosis after myocardial infarction was significantly attenuated in Bach1-deficient mice. Intramuscular administration of siRNA against Bach1 accelerated blood flow perfusion and capillary density in a hindlimb ischemia model. These results suggest that Bach1 expression can be a therapeutic target in ischemic cardiovascular diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：心血管疾患

1. 研究開始当初の背景

我が国では冠動脈疾患、脳卒中などの動脈硬化を基礎とする心血管疾患の罹患が増え続けている。急性冠症候群に対する冠動脈の再灌流療法後の虚血再灌流傷害や、動脈硬化、冠動脈形成術後再狭窄には、酸化ストレスが関わっていることが知られている。

生体内の酸化ストレス量は種々の酸化ストレスの生成系と抗酸化分子による消去系のバランスにより調節されている。種々の抗酸化分子のうち、HO-1、Thioredoxin reductase (TR)、NADP(H) quinone reductase 1 (QR1)、フェリチンなどは antioxidant response element (ARE) により転写調節を受けている。定常状態では ARE に負の転写因子 Bach1 が結合しており、これらの遺伝子の発現は抑制されているが、酸化ストレスが増加すると Bach1 が ARE から離れ、代わりに正の転写因子 Nrf2 が ARE に結合することにより抗酸化分子の転写が活性化される。このようにこれらの抗酸化分子の発現は Bach1-Nrf2 システムにより精緻に制御されている。我々はこれまでに Bach1 による HO-1 の発現制御が虚血再灌流傷害、動脈硬化、圧負荷による心肥大などの心血管疾患の発症に深く関与していることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、酸化ストレス応答の負のマスター転写因子 Bach1 を RNA 干渉にて発現抑制することにより抗酸化遺伝子を協調的に発現させることが、心血管疾患に対する新たな分子標的治療になりうるか否かをモデル動物を用いて検討することである。

3. 研究の方法

心筋梗塞モデル

Bach1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスにおいて、全身麻酔下を開胸し、左前下降枝を結紮することにより心筋梗塞を作成した。その後毎週心エコーにて左室収縮能、

拡張末期径などを計測し、4 週間後にと殺し左室重量、繊維化などを検討した。

下肢虚血モデル

Bach1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスにおいて、右大腿動脈を結紮することにより、後肢の虚血モデルを作成した。モデル作成時に、虚血側に Bach1 に対する siRNA を筋注した。対照群にはノックダウン作用を全く持たない siRNA (control-siRNA) を筋注した。1 週間毎にレーザードップラーにて血流を測定し、3 週間後にと殺し、毛細血管密度、筋肉繊維径などを測定した。

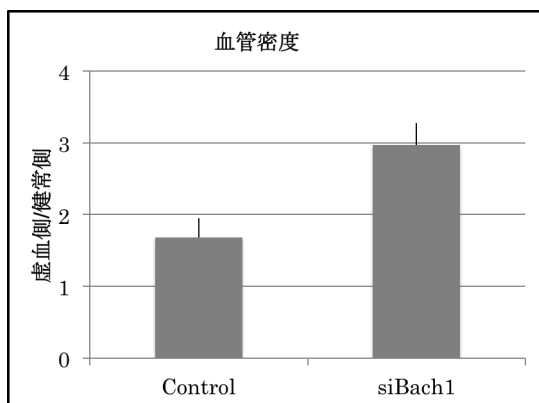
4. 研究成果

1) まず、Bach1 の心筋梗塞後の左室リモデリングにおける役割を検討した。Bach1 ノックアウト (KO) マウスにおいては心筋梗塞後の左室重量、左室拡張末期径、線維化が野生型マウスに比して有意に減少していた。また、Bach1 の標的遺伝子の一つである HO-1 の発現は著名に増加しており、Type I コラーゲン、ANP の発現は有意に減少していた。以上の結果から Bach1 の発現を低下させることにより心筋梗塞後の病的左室リモデリングを抑制し得る可能性が示唆された。

2) その機序を明らかにするために Bach1-KO マウスの心臓における遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析した。その結果、HO-1 以外にもいくつかの興味深い遺伝子の発現が Bach1-KO マウスの心臓において増加していた。

3) アテロコラーゲンをを用いることにより下肢へ siRNA が効率よく導入されることが明らかになった。マウスの下肢に si-Bach1 とアテロコラーゲンの複合体を筋注したところコントロール siRNA 投与群に比して、Bach1 の発現は減少し、Bach1 の標的遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現は有意に増加した。マウスにおいて下肢虚血

モデルを作成し、si-Bach1-アテロコラーゲン複合体を虚血肢に筋注したところ、虚血肢における血流はコントロール siRNA 投与群に比して有意に増加していた。3 週間後にと殺し、虚血筋における毛細血管密度を検討したところ、si-Bach1 投与群の方が有意に多かった ($p < 0.05$, 下図)。これらのことから、RNA 干渉による Bach1 のノックダウンが下肢虚血に対する新たな血管新生療法として有用である可能性が示唆された。



実臨床においては、重症の心筋梗塞後の病的リモデリングによる虚血性心筋症や閉塞性動脈硬化症において Bach1 を標的とした RNA 干渉が新規の治療法となる可能性があるが、さらに siRNA の導入効率を向上させる必要があること、特に全身投与で十分 siRNA を患部に到達させることができるか否かが今後の課題である。

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 5 件)

1. Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu N-A, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y, Tashiro S

Reorganization of Damaged Chromatin by the Exchange of Histone Variant H2A.Z-2.

Int Journal Radiation Oncol Biol Phys. (in press)

査読有

2. Ishida T, Ishida M, Tashiro S, Yoshizumi M, Kihara Y.

Role of DNA damage in cardiovascular disease.

Circ J. 2013;78:42-50. 査読有

3. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Ishida M, Ishida T, Yoshizumi M.

Induction of Timp1 in smooth muscle cells during development of abdominal aortic aneurysms.

Hiroshima J Med Sci. 2013;62:63-7. 査読有

4. Kisaka T, Ozono R, Ishida T, Higashi Y, Oshima T, Kihara Y

Association of elevated plasma aldosterone-to-renin ratio with future cardiovascular events in patients with essential hypertension.

J Hypertens. 2012;30:2322-30 査読有

5. Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J,

Miyamori I, Takahashi M, Ishida T, Hirata K,

Yamamoto TT, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M.

Species differences of macrophage very

low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression.

Biochem Biophys Res Commun.

2011;407:656-62. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Takafumi Ishida, Mari Ishida, Satoshi Tashiro,

Chiemi Sakai, Hitomi Uchida, Kiyoshi

Miyagawa, Masao Yoshizumi, Yasuki Kihara

Oxidative stress induces DNA double-strand breaks and activates DNA damage response in

vascular smooth muscle cells: A possible mechanism for atherosclerosis progression

American Heart Association Basic

Cardiovascular Sciences 2011 Scientific Sessions,

New Orleans, LA, USA July 18-21, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 隆史 (ISHIDA, TAKAFUMI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：40346482

(2)研究分担者

石田 万里 (ISHIDA, MARI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：30359898