

心臓病の基礎的研究事業
動脈血栓性疾患(Atherothrombosis)の制圧を目指した基礎的臨床的研究

研究代表者: 学校法人東海大学医学部内科学系 教授
後藤信哉

《研究の概要》

本邦においても、また世界においても、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓性死亡は悪性腫瘍とならんで成人の死因、quality of life 低下の最大の原因である。これらの疾患は組織を灌流する血管の血栓性閉塞と、その後の虚血により臓器傷害により発症する。われわれは原因となる血管の血栓性閉塞、虚血による心筋傷害の発症メカニズムを解明し、それらの効率的な阻害による新たな治療ターゲットの探索を目指して、臨床医、生化学者、生理学者、薬理学者、遺伝子工学者からなる学際的な研究グループを形成して、基礎的、臨床的見地からの総合的な研究を推進した。

心筋虚血は、冠動脈内の動脈硬化巣の破綻部位に形成された血栓が原因となる。われわれはヒト血液と人工的な血流負荷装置を用いた *ex vivo* 研究、マウス精巣動脈を塩化鉄で損傷した動物実験モデルを用いて動脈血栓の形成メカニズムの詳細を検討した。特に、高速レーザー共焦点顕微鏡とピエゾ素子を用いて血栓形成過程、単一血小板のリアルタイムイメージング装置を開発したことにより従来とは異なるコンセプトを明確に打ち出すことができた。すなわち、血管壁の損傷部位に集積した血小板は血流によるずり応力に抗して活性化状態を維持する。最初の、ずり応力に抗した血小板の粘着、凝集には von Willebrand 因子が必須の役割を果たすことを示した。さらに、血栓を形成した血小板は活性化状態を維持することが必要であること、そのためには血小板内への持続的なカルシウム流入と、それによる GPIIb/IIIa の活性化状態の維持が必須であることを示した。さらに、この継続的なカルシウム流入は血小板表面の ADP 受容体 P2Y₁₂ により調節されていること、P2Y₁₂ を阻害すれば、血栓を形成する血小板が継続的に活性化状態を維持することができなくなること、結果として血小板血栓が崩壊することを示した。血栓形成における von Willebrand 因子の重要性については、ヒト心筋梗塞症例を対象とした研究により、実際のヒトにおいて心筋梗塞を惹起する血栓内にも血小板とともに von Willebrand 因子が局在することを示した。また、活性化血小板周囲では凝固系が活性化することを示した。

虚血心筋には自らを虚血傷害から守る機構が存在する。中でもミトコンドリアにおけるカルシウムイオン (Ca²⁺) 活性化 K⁺(mitoKCa²⁺) チャンネルの開口により虚血心筋傷害保護作用を期待できることは重要な内因性の虚血心筋保護機構である。mitoKCa²⁺ チャンネルを開口させる因子としてプロテインキナーゼA (PKA) が重要であること、また、女性ホルモン (estradiol) が mitoKCa²⁺ チャンネルを活性化させることを見出し、女性では男性よりも虚血心筋保護能力が強いこと、薬理的に内因性の虚血心筋保護能力を増強できる可能性を示した。

原因となる冠動脈の血栓性閉塞と虚血性心筋傷害の間にも関係がある可能性がある。われわれは血小板が活性化とともに様々な生理活性物質を局所放出することを示した。CD40 ligand 以外の可溶性蛋白が免疫、炎症調節作用を有する樹状細胞を特異な様式に分化させることも報告した。活性化血小板のプロテオミクスにより、血栓と虚血心筋傷害の関連を示せる可能性を示唆した。

後藤信哉 東海大学医学部 研究の統括

教授

新村健 慶應義塾大学医学部 生理活性物質による細胞内シグナリングの検討

講師

石田英之 東海大学医学部 イメージング技術の開発、改良

教授

佐藤俊明 千葉大学大学院医学研究院 細胞内シグナルの薬理的検討

準教授

足立健 慶應義塾大学医学部 質量分析技術を用いた微量分析(2005年度、2006年度)

講師

江藤浩之 東京大学医科学研究所 ES細胞を用いた(2006年度)

講師

I. 研究目的

日本人の死因の第二位、第三位を占める心疾患と脳血管疾患の大半は、心臓、脳を灌流する冠状動脈、脳動脈の血栓性閉塞により惹起される心筋梗塞、脳梗塞である。無症状で進行する動脈壁の経年的変化である動脈硬化(atherosclerosis)に対して、重要臓器の急速な虚血性症状を伴う心筋梗塞、脳梗塞などは、動脈血栓症(atherothrombosis)という単一の疾患概念に統一される(動脈硬化と動脈血栓症を統一的に理解するアテローム血栓症という概念もあり得る)。血管の動脈硬化を基盤とする動脈血栓症の有病率は加齢とともに増加する。動脈血栓症(atherothrombosis)は、急速な高齢化が進行する日本社会で、日本人の生命と quality of life を障害する最大の医療、保健上の課題である。

静脈系の血栓が血流のうっ滞を契機に形成されるのに対して、動脈系では、脂質に富んだ柔らかい動脈硬化巣の破綻が血栓形成の契機となる。活性化凝固因子が血流により希釈される動脈血流の条件下では、血流に抗して血管壁に粘着し、活性化しつつ生理活性物質を局所放出する血小板が血栓形成の初期段階において必須の役割を演じる。従来、血栓形成に至る血小板の機能は、血小板を ADP、トロンビンなどの活性化物質により刺激したのち攪拌した際に惹起される血小板凝集により評価していた。われわれは、血栓形成における血小板の役割として血小板による血栓形成のみならず、生理活性物質、微粒子の局所放出、接着蛋白の発現を介して炎症、凝固反応に与える影響を重視すべきと強調していた。凝固、炎症におよぼす効果も含めて血小板の役割を包括的に解明し、新たなメカニズムによる抗血栓薬の開発につなげることを本研究の一つの目標とする。

臓器を灌流する血管が血栓性に閉塞した場合、その灌流域の組織は虚血、壊死に陥る。しかし、虚血、壊死の範囲を規定する因子は単純に閉塞血管の灌流域に限定されない。性ホルモン、オキシトシンなど全身を循環するホルモンが虚血傷害に関与する。血小板は活性化とともに CD40 ligand、セロトニンなど多くの生理活性物質を局所放出する。放出された生理活性物質もまた虚血性の心筋傷害に関与する可能性がある。プロテオミクス、ES 由来血小板作成技術を用いて、血小板由来の生理活性物質による心筋傷害の発症メカニズム解明の端緒をつけたい。そのため、虚血性心筋傷害の発症メカニズムもさらに

詳細に検討する必要がある。虚血になりミトコンドリアのエネルギー産生が減少する際には、ATP, ADP 産生、分解の比率も変化し、虚血心筋周囲の生化学的環境も大きく変化する。特に、ミトコンドリアの mitoKCa²⁺チャンネルの機能と心筋傷害の関係を薬理学的手法を用いて検討し、虚血心筋保護のための新たな方法の探索につなげたい。

血小板を主体として形成されるアテローム血栓症の発症メカニズム、さらに、虚血と好気性代謝の変化に引き続く心筋の虚血性傷害の発症虚血傷害メカニズムの解明を通じて、人類最大の懸案であるアテローム血栓症の制圧に貢献したい。豊富な動脈血流の存在下での閉塞血栓の形成メカニズム、引き続く臓器灌流不足に伴う虚血性傷害の発症メカニズムの解明を目指して臨床医学、基礎医学の専門家を結集して横断的な研究チームを作り動脈系の血栓形成と虚血性臓器傷害の発症メカニズムを包括的に解明することを本研究の目的とする。

II. 研究計画、材料、方法

A. 血小板血栓の形成メカニズム、血小板が局所放出する生理活性物質の血栓形成過程における役割の検討(後藤、石田、江藤、足立)

われわれは高速共焦点顕微鏡とピエゾモーターを用いて、人工的な血流条件下における血小板血栓の形成過程、血小板自体、血小板内カルシウムイオン濃度のリアルタイム動的イメージング技術の確立を目指し研究を行った。イメージング技術については石田を中心に研究期間内に継続的な改善を行った。初年度の研究により血栓自体の3次元構造のリアルタイムイメージングが可能となった。(Goto S, et al. *J Am Coll Cardiol*, 2004)。本方法を用いて、血小板表面上の GPIIb/IIIa とフィブリノーゲン、von Willebrand 因子(VWF)の結合を阻害する GPIIb/IIIa 受容体阻害薬が単に血栓の形成を阻害するのみならず形成された血小板血栓を不安定化させて崩壊させる効果を有することを報告した(Goto S, et al. *J Am Coll Cardiol*, 2004)。これらの方法論上の改善を踏まえて、1)活性化血小板の放出する血栓の安定化にかかわる微量物質の同定、2)血小板血栓の3次元形態のリアルタイムイメージングとカルシウムイオン濃度の同時イメージングの併用による活性化血小板放出生理活性物質の血栓安定作用メカニズムの解明、3)血栓の安定化にかかわる活性化血小板表面で形成されるトロンビンの役割の解明、4)血栓の安定化を阻止することによる新たな抗血栓療法の開発、のための実験を計画し実行した。具体的にはヒト血液を用いた *ex vivo* の血栓モデルによる実験と、初年度に確立したマウス精巣動脈塩化鉄損傷モデルによる *in vivo* 実験を並行してすすめた。*ex vivo* 実験は後藤が、*in vivo* 実験は石田が中心となって研究を遂行した。血小板血栓を安定化させる内因性因子の解明は質量分析の手法を用いて足立が行った。さらにプロテオミクスの研究を発展させるためプロテインアレイを用いた検討を追加した。ES 細胞由来血小板を用いた研究を *ex vivo* 実験にて検証することにより、さらに研究の質の向上を図った。

1) 活性化血小板が放出する、血栓の安定化にかかわる微量物質の同定(足立、後藤)

予備実験にて、活性化血小板が放出する ADP, CD40 ligand, von Willebrand 因子が血栓安定化効果を有すること、血栓の安定化は細胞内カルシウムイオン増加に依存していることを示した(Goto S, et al. 投稿中)。カルシウムは種々のシグナルを活性化し、低分子量蛋白質の生成、局在、放出を制御する。こ

れらを包括的に分析するため、血小板を動脈血流によるずり応力に曝露した時に放出される物質をプロテオミックスの手法(2次元電気泳動+質量分析)、およびプロテインアレイにより同定し、血栓の安定化にかかわる因子を網羅的に検討する。同時に血小板の膜分画蛋白を比較し、新たな血小板の相互作用にかかわる蛋白の同定を試みる。蛋白以外の物質として一酸化窒素(NO)にも注目する。NOは血小板内カルシウムを強力に低下させる(Adachi T, et al. Hypertension, 2001)。また、近年血小板内の内皮型NO合成酵素(eNOS)の生理作用が着目されている。NOドナー、およびNO阻害剤L-NAMEを投与し、新たに同定した蛋白の放出、および膜蛋白の局在に与える効果を検討する。

2) 血小板血栓の3次元形態のリアルタイムイメージングとカルシウムイオン濃度の同時イメージングの併用による活性化血小板放出生理活性物質の血栓安定作用メカニズムの解明(後藤、石田)

初年度に施行した予備実験にて、ADPは血小板内へのカルシウムイオンの流入を増加させることにより、CD40 ligandは血小板からのカルシウム流出を低下させることにより血栓を安定化させることを示した。初年度の成果を踏まえて、次年度は血栓の3次元イメージングとカルシウムイオン濃度のリアルタイムイメージングを併用し、von Willebrand因子、セロトニン、カテコラミン、フィブリノーゲン、その他1)の研究で検出した微量物質の血栓安定化メカニズムを明らかにする。

3) 血栓の安定化にかかわる活性化血小板表面で形成されるトロンビンの役割の解明(後藤、石田)

血小板が活性化すると膜表面上に陰性荷電したリン脂質が発現しトロンビンが形成される。ex vivo flow chamber、マウス精巣動脈のin vivo血管損傷モデルを用いて血小板と、活性化血小板周囲のトロンビン産生の同時イメージングを行う。3次元イメージングとカルシウムイオン濃度の

4) 血栓の安定化を阻止することによる新たな抗血栓療法の開発(後藤、石田)

1)-3)の研究による血栓の安定化に関与する血小板由来の因子とその作動メカニズムの理解に基づき、血栓を不安定化させることにより閉塞血栓の形成を予防する新しい抗血栓薬を開発したい。具体的にはADP、カテコラミン、CD40 ligandなどと血小板受容体の結合を阻害することにより、あるいはその後引き続く血小板内カルシウムイオン濃度の上昇を阻害することにより目的を達することができると想定している。

B. 内因性虚血障害防護機能の解明とそれを増幅させることによる新たな虚血性心筋障害発症予防法の開発(佐藤、新村、足立)

初年度の研究により、心筋細胞のミトコンドリア内膜にあるCa²⁺活性化K⁺(mitoKCa²⁺)チャネルの開口により虚血心筋傷害保護作用を期待できること、mitoKCa²⁺チャネルを開口させる因子としてプロテインキナーゼA(PKA)が重要であること(Sato T, et al. 印刷中)、また、女性ホルモン(estradil)がmitoKCa²⁺チャネルを活性化させることを見出し、加齢、閉経は虚血性心筋傷害を増悪させる因子となることを示した。これらの研究成果に基づき、1)mitoKCa²⁺チャネル開口作用を有する薬物の虚血性心筋傷害発症予防効果の有無の検討とそのメカニズムの解明、2)虚血再灌流心筋傷害と虚血条件付け現象発現における細胞内情報伝達系の相違、3)加齢心、閉経動物心における虚血性傷害を改善する新たな治療法の開発、を目的として研究を継続した。具体的には、mitoKCa²⁺チャネルを開口させる因子に関する薬理学的研究は佐藤が、卵巣摘出ラット、加齢ラットにおける薬理学的、栄養学的虚血耐性能回復方法の検討は新村が行う。また、足立が中心となり、虚血時の心筋からの細胞外放出蛋白質、細胞膜に移行する虚血耐

性シグナルに関わる蛋白質をプロテオミックスの手法を用い網羅的解析を行い、虚血耐性の新たな機構の同定を試みた。

1) Ca²⁺活性化 K⁺チャネル(mitoKCa)開口作用を有する薬物の虚血性心筋障害発症予防効果の有無の検討とそのメカニズムの解明(佐藤、新村)

ラット、マウスの単離心筋細胞虚血モデル、ラット、マウスの摘出灌流心モデルを用いて、平滑筋細胞において mitKCa²⁺チャネルを開口効果が確認されている estradiol の虚血心筋保護効果とそのメカニズムにかかわる細胞内情報伝達機構を検討する。Estradiol の虚血心筋保護効果に関しては卵巣摘出ラットを用いた *in vivo* 実験でも確認する予定である。MitoKCa²⁺チャネルの機能を修飾する因子として、PKA を活性化する adrenomedullin を用いて同様の実験的研究を行う。初年度の予備実験にて estradiol と adrenomedullin の mitoKCa²⁺チャネル活性化効果を示唆する結果を得ているため、本研究は短期間で具体的成果につながる可能性が高い。さらに、本邦で開発され抗不整脈治療に用いられている bepridil は、sarcolemmal KATP チャネル遮断作用に加えて mitoKATP チャネルの開口作用を併せ持つ事を見出している。Bepridil の虚血心筋保護作用の有無を動物実験で確認し、さらにその作用メカニズムの詳細を解明する。

2) 虚血再灌流心筋傷害と虚血条件付け現象発現における細胞内情報伝達系の相違 (新村、佐藤、足立)

初年度の研究により非受容体型 tyrosine kinase である c-src を欠損したマウスでは虚血条件付けによる虚血心筋保護機構が傷害されている一方で、虚血耐性はむしろ増強されていたこと、adiponectin antisense 過剰発現マウスでは逆に心虚血耐性が低下したが、虚血条件付けによる心筋保護機構は維持されていることを確認した。これらの成果を踏まえて、引き続き遺伝子操作マウスを用いて、c-src tyrosine kinase や adiponectin 下流に位置する AMP-activated protein kinase (AMPK) 修飾による、新たな虚血心筋保護方法の開発を目指す。

C. 虚血性心筋傷害にかかわる液性因子に関する検討 (佐藤、新村、江藤、足立)

初年度の研究により、心筋細胞のミトコンドリア内膜にある Ca²⁺活性化 K⁺(mitoKCa²⁺)チャネルの開口により虚血心筋保護作用を期待できること、mitoKCa チャネルを開口させる因子としてプロテインキナーゼA(PKA)が重要であること(Sato T, et al. Circulation 2005)、また、エストラジオールが mitoKCa チャネルを、オキシトシンがミトコンドリア KATP チャネルをそれぞれ活性化し、これらホルモンが虚血性心筋傷害を軽減することを明らかにした。引き続き次年度の研究により、虚血性心筋傷害におよぼす細胞内情報伝達機構を明らかにした。冠動脈を閉塞する過程で活性化する血小板が局所放出する物質の、虚血性心筋傷害に及ぼす効果と、そのメカニズムの解明を目指して研究を勧めていきたい。具体的には、活性化血小板から放出する物質が mitoKCa²⁺チャネルに与える影響に関する薬理学的研究は佐藤が、加齢ラットを用いた *in vivo* 実験は新村が行った。足立は、活性化血小板の放出する生理活性物質の同定を試み 2次元蛋白泳動法を用いて活性化血小板から放出される未知と思われる蛋白質を3種同定しつつある。江藤はその蛋白を欠損した血小板を作るために ES 細胞由来の血小板の作成法を確立した。

III 研究成果

A. 血小板血栓の形成メカニズム、血小板が局所放出する生理活性物質の血栓形成過程における役割の検討(後藤、石田、江藤、足立)

3年間の研究期間内に、動脈血流条件下にて血小板が血栓を形成する過程を動的にイメージングする方法を確立し、年度ごとに進化させた。すなわち、初年度には血小板塊の3次元イメージング、次年度には単一血小板の動的イメージング、第三年目にはカルシウムイオン濃度の変化のイメージング技術を開発した。ヒト血液と人工血流の条件のみならず動物モデルにおいても血栓のリアルタイム3次元イメージング法を確立した。さらに個別の研究成果を研究テーマごとに示す。

1) 活性化血小板が放出する、血栓の安定化にかかわる微量物質の同定(足立、後藤)

血小板を動脈血流によるずり応力に曝露した時に放出される物質のプロテオミックスを施行した。活性化とともに血小板がケモカインである RANTES を発現することを示した。さらに RANTES の放出量を定量化するため ELISA 法により確認した。本研究成果を論文投稿すべく準備中である。さらに、江藤が ES 由来血小板誘導法を確立し、後藤との共同により ES 由来血小板の機能評価系を確立した (*Nishikii, et al. Blood, in press*)。本法を用いることにより、今後、血小板活性化と関連する各種生理活性物質をノックアウトした血小板の作成とその機能評価が可能になる。本邦の確立は大きなインパクトになる。

2) 血小板血栓の3次元形態のリアルタイムイメージングとカルシウムイオン濃度の同時イメージングの併用による活性化血小板放出生理活性物質の血栓安定作用メカニズムの解明(後藤、石田)

東海大学において開発した高速共焦点レーザー顕微鏡技術を用いて、血流条件下にて血栓を形成する血小板の活性化過程を動的にイメージングした。同時に、血小板内カルシウムイオン濃度を計測し、個別の血小板の活性化動態の維持と血栓の安定化には血小板へのカルシウム流入が必須の役割を演じることを示し報告した (*Goto S, et al. J Am Coll Cardiol, 2006*)。

3) 血栓の安定化にかかわる活性化血小板表面で形成されるトロンビンの役割の解明(後藤、石田)

2色蛍光イメージング技術により活性化血小板の膜表面上にて凝固系が活性化しトロンビンが産生されることを示した。同様のコンセプトを示した臨床研究成果を発表した (*Hoshiba Y, et al. JTH, 2006*)。Ex vivo 実験成果を論文投稿中である (*Tamura N, et al 論文投稿中*)。

4) 血栓の安定化を阻止することによる新たな抗血栓療法の開発(後藤、石田)

従来使用されていたアスピリン、チクロピジンと異なり、トロンビン産生を抑制する抗凝固薬が血小板血栓の安定性を損なわせる抗血小板薬となり得ることを示唆した。本研究成果も論文投稿中である (*Tamura N, et al. 論文投稿中*)

B. 内因性虚血障害防護機能の解明とそれを増幅させることによる新たな虚血性心筋障害発症予防法の開発(佐藤、新村、足立)

初年度の研究により、心筋細胞のミトコンドリア内膜にある Ca^{2+} 活性化 K^+ (mitoKCa²⁺) チャネルの開口により虚血心筋傷害保護作用を期待できること、mitoKCa²⁺ チャネルを開口させる因子としてプロテインキナーゼA (PKA) が重要であること (*Sato T, et al. 印刷中*)、また、女性ホルモン (estradiol) が mitoKCa²⁺ チャネルを活性化させることを見出し、加齢、閉経は虚血性心筋傷害を増悪させる因子となることを示した。さらに、心筋細胞のミトコンドリア内膜にある Ca^{2+} 活性化 K^+ (mitoKCa²⁺) チャネルの開口により虚血心筋保護作用を期待できること、mitoKCa²⁺ チャネルを開口させる因子としてプロテインキナーゼA (PKA) が重要

であること(Sato T, et al. Circulation 2005)、また、エストラジオールが mitoKCa チャンネルを、オキシトシンがミトコンドリア KATP チャンネルをそれぞれ活性化し、これらホルモンが虚血性心筋傷害を軽減することを明らかにした。

1) Ca²⁺活性化 K⁺チャンネル(mitoKCa²⁺)開口作用を有する薬物の虚血性心筋障害発症予防効果の有無の検討とそのメカニズムの解明(佐藤、新村)

ラット、マウスの単離心筋細胞虚血モデル、ラット、マウスの摘出灌流心モデルを用いて、平滑筋細胞において mitKCa²⁺チャンネルを開口効果が確認されている estradiol の虚血心筋保護効果とそのメカニズムにかかわる細胞内情報伝達機構を検討した。Estradiol の虚血心筋保護効果に関しては卵巣摘出ラットを用いた *in vivo* 実験でも確認した。estradiol と adrenomedullin の mitoKCa²⁺チャンネル活性化効果を示唆する結果を得た。本邦で開発され抗不整脈治療に用いられている bepridil は、sarcolemmal KATP チャンネル遮断作用に加えて mitoKATP チャンネルの開口作用を併せ持つ事を見出し、Bepridil の虚血心筋保護作用の有無を動物実験で確認した。。

2) 虚血再灌流心筋傷害と虚血条件付け現象発現における細胞内情報伝達系の相違 (新村、佐藤、足立)

非受容体型 tyrosine kinase である c-src を欠損したマウスでは虚血条件付けによる虚血心筋保護機構が傷害されている一方、虚血耐性は増強されていたこと、adiponectin antisense 過剰発現マウスでは逆に心虚血耐性が低下したが、虚血条件付けによる心筋保護機構は維持されていることを確認した。引き続き遺伝子操作マウスを用いて、c-src tyrosine kinase や adiponectin 下流に位置する AMP-activated protein kinase (AMPK) 修飾による、の効果を示した

IV 考察

臨床医と生理学者、薬理学者、遺伝子工学専門家、生化学者が共同して最終的な目的であるアテローム血栓症の発症予防、虚血性心筋傷害予防法の開発を目指した学際的な研究を行った。もともとバックグラウンドの異なる研究者からなるグループでは共有できる概念、共通の言語によるコミュニケーションを確立するため会合を重ねた。また、e-mail を用いて緊密に研究の進行状況を確認しあい、相互に刺激し合って本プロジェクトを完遂した。これほどまでにバックグラウンドの異なる研究者同士が協力してプロジェクトを完遂した例は本邦では極めて珍しいと自負している。このようなことができた最大の理由は車両財団による研究助成金の交付であり、財団法人車両財団に深く感謝したい。

研究内容については3年間の間に著しく進歩した。発表成果論文数を見れば、われわれのグループが如何に活力をもったグループであるかを理解できよう。論文数のみではなく、われわれの研究グループでは発表論文の質も高く、いずれの研究者もインパクトファクターの高い、国際的な一流雑誌に研究成果を報告成果を報告することができた。一方、相互の研究者同士の連携により最終目的を達成する、という意味では共通の基盤にたち、参加研究者の全員が共著者となった論文が少ないことを問題とする立場もあるかも知れない。それでも全く異なる方向を向いていた研究者が動脈血栓症の発症とその時の心筋傷害という共通の場での議論を開始できた意義は大きい。研究期間内には具体的成果に直結しなかったため成果として具体的に記載することはできなかつたが、mitKCa チャンネルの心筋保護における意義を血栓

形成に参与する血小板に拡大しようとの共同研究も生まれている。研究代表者が、言語、知識、概念などの共有を重視し、形式的な論文における共著にとらわれず個々の研究者の自立性を重視した運営を行ったこともみかけ上、グループ全体の共同研究が少なく見える理由である。実際に各個の研究者が多数の論文を作り出した背景に、方法論の共有、知識、概念の共通化の果たした意義が大きいことをご理解頂きたい。

かつて本邦の医学研究において医局講座性によるピラミッド体制の果たした役割は大であった。一人の医局のボスに、その医局に所属する全てのマンパワーとリソースが集約されるシステムは貧しい頃の日本の科学の維持にはそれなりの意味があった。一方、豊かになった今の日本では優秀な若手を早期から独立させることが活力の維持につながる。本研究グループの主体は助教授(準教授)、講師であり、かつてであれば、それぞれの所属する医局、研究室のボスのもとでの手足としての活動を期待される立場の方々であった。幸いにして、公益法人車両財団の助成という公的なお墨付きを頂いたお陰で本研究においては、いわゆる医局、研究室のボスのコントロールを受けることなく、実際に稼働する若手中心の研究グループを作ることができたことが豊富なアウトカムにつながった。本研究は、本邦にて実質的に研究の活力をあげるためにはどうすればいいかを考える貴重なモデルとなったと理解している。

研究内容の詳細については個々の論文をご参照頂きたい。基本的には心筋虚血を作り出すアテローム血栓の形成、心筋虚血に陥ったあとの心筋自体に内在する虚血傷害保護のメカニズムの解明を中心に研究が行われた。両者をつなぐために、アテローム血栓の形成に参与する血小板の放出する生理活性物質による虚血心筋傷害の修飾メカニズムの解明にまで成果を拡大した。多くの研究成果が既に論文として公刊され、またほぼ同数の論文が準備状況にある。さらに、これまでの助成により掲載されたグループの結束を維持して、血小板自体のミトコンドリアの機能の解明とその阻害による新たな抗血栓療法の開発、などさらに先端的な分野に向けての研究も始まっている。公益法人車両財団による助成は極めて大きなインパクトを残した。改めて関係各位に深謝したい。ありがとうございました。

IV 研究成果の発表

1. Saito T., Sato T., Miki T., Seino S., Nakaya H. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in electrophysiological alterations during myocardial ischemia: a study using Kir6.2 null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H352-H357.
2. Saegusa N., Sato T., Ogura T., Komuro I., Nakaya H. Inhibitory effects of AMP 579, a novel cardioprotective adenosine A1/A2A receptor agonist, on native IKr and cloned HERG current. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004;370:492-499.
3. Sato T., Saito T., Saegusa N., Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005;111:207-212.

4. Shinmura K, Tamaki K, Sato T, Ishida H, Bolli R. Prostacyclin attenuates oxidative damage of myocytes by opening mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels via the EP3 receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288: H2093-101, 2005.
5. Shinmura K, Tamaki K, Bolli R. Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K⁺ channels in both young and aged hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 285-96
6. Li M, Zhao C, Wong RNS, Goto S, Wang Z, and Liao F. Inhibition of shear-induced platelet aggregation in rat by tetramethylpyrazine and salvianolic acid B. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 31 (2004) 97–103
7. Li M, Wu W, Liu L, Liao F, Shinohara Y, Handa S, and Goto S. Specific Inhibiting Effects of Ilexonin A on von Willebrand factor-dependent platelet aggregation under high shear stress. *Chinese Medical Journal* 117: 241-246, 2004
8. Hagiwara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, Kato S, Sakamoto S, Hotta T, Handa S, and Goto S. Platelets after Exposure to a High Shear Stress Induce IL-10 Producing Mature Dendritic Cells in Vitro. *Journal of Immunology* 172: 5297-5303, 2004.
9. Goto S, Tamura N, and Ishida H. Ability of Anti-GP IIb/IIIa Agents to Dissolve Platelet Thrombi Formed on a Collagen Surface under Blood Flow Conditions. *J Am Coll Cardiol*,44:316-323, 2004
10. Goto S. Propagation of Arterial Thrombi Local and Remote Contributory Factors *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004;24:2207-2208
11. Goto S. Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents.. *Current Medicinal Chemistry* 2004;2:149-156
12. Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM. Dependence of Platelet Thrombus Stability on Sustained Activation of Glycoprotein IIb/IIIa through ADP Receptor Stimulation and Cyclic Calcium Signaling. *J Am Coll Cardiol*, 47: 155-162, 2006
13. Hoshiba Y, Hatakayama K, Tanabe T, Asada Y, and Goto S. Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelet with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Hemostasis* 3: 114-120, 2006
14. Yamashita A, Sumi T, Goto S, Hoshiba Y, Nishihira K, Kawamoto R, Hatakeyama K, Date H, , Ogawa H, and Yujiro Asada. Detection of von Willebrand Factor and Tissue Factor in Platelets-Fibrin Rich Coronary Thrombi Causing Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*, 2006;97:26 –28
15. Kimura Y, Ozawa H, Igarashi M, Iwamoto T, Nishiya K, Urano T, and Goto S. A pheochromocytoma causing limited coagulopathy with hemoptysis. *Tokai J Exp Clin Med* 30: 35-39, 2005
16. Sato T., Costa A.D.T., Saito T., Ogura T., Ishida H., Garlid K.D., Nakaya H. Bepridil, an

- antiarrhythmic drug, opens mitochondrial KATP channels, blocks sarcolemmal KATP channels, and confers cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 182-8
17. Saegusa N., Sato T., Saito T., Tamagawa M., Komuro I., Nakaya H. Kir6.2-deficient mice are susceptible to stimulated ANP secretion: KATP channel acts as a negative feedback mechanism? *Cardiovasc Res* 2005; 67: 60-68.
 19. Sato T., Saito T., Saegusa N., Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005; 111: 207-212
 21. H. Seguchi, H. Ritter, M. Shizukuishi, H. Ishida, C. Genka, H. Nakazawa, K.W. Spitzer and W.H. Barry: Propagation of Ca²⁺ Release in Cardiac Myocytes: Role of Mitochondria *Cell Calcium*. 38,1-9,2005
 22. T. Tanaami, H. Ishida, H. Seguchi, Y. Hirota, T. Kadono, C. Genka, H. Nakazawa, W.H. Barry: Difference in Propagation of Ca²⁺ Release in Atrial and Ventricular Myocytes. *Jpn J Physiol* 55,81-91,
 24. Shinmura K and Bolli R. The risk of myocardial infarction with cyclooxygenase-2 inhibitors: Letter to the Editor. *Ann Intern Med* 2005 Oct 4;143(7):615.
 25. T. Adachi, C. Schöneich, R.A. Cohen; S-Glutathiolation in redox-sensitive signaling. *Drug Discovery Today*, 2(1):39-46, 2005
 26. G.M. Kuster, Y. Ido, D.R. Pimentel, T. Adachi, D.A. Brenner, L. Xiao, R.A. Cohen, R Liao, DA Siwik, WS Colucci; Thioredoxin-1 regulates α -adrenergic receptor-stimulated hypertrophy and Ras-dependent hypertrophic signaling in adult rat ventricular myocyte. *Circulation*, 111(9): 1192-1198, 2005
 27. Jin, W. Inoue, O. Tamura, N. Suzuki-Inoue, K. Satoh, K. Berndt, M. C. Handa, M. Goto, S. Ozaki, Y. A role for glycosphingolipid-enriched microdomains in platelet glycoprotein Ib-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost* 5: 1034-40, 2007
 28. Steg PG, Bhatt DL, Wilson PWF, D'Agostino R, Ohman EM, Röther J, Liao CS, Hirsch AT, Mas JL, Ikeda Y, Pencina MJ, and Goto S for the REACH Registry Investigators. One-Year Cardiovascular Event Rates in the REACH Registry: An International Cohort of Over 68,000 Stable Outpatients with Atherothrombosis. *JAMA*, 2007;297:1197-1206
 29. Kojima H, Moroi M, Jung SM, Goto S, Tamura N, Kozuma Y, Suzukawa K, Nagasawa T. Characterization of a patient with glycoprotein (GP) VI deficiency possessing neither anti-GPVI autoantibody nor genetic aberration. *J Thromb Haemost*. 2006 Nov;4(11):2433-42.
 30. Touze E, Mas JL, Rother J, Goto S, Hirsch AT, Ikeda Y, Liao CS, Magnus Ohman E, Richard AJ, Wilson PW, Gabriel Steg P, Bhatt DL. For the REACH Investigators. Impact of Carotid Endarterectomy on Medical Secondary Prevention After a Stroke or a Transient Ischemic Attack. Results from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Stroke*,

37:2880-2885, 2006

31. Ohman EM, Bhatt DL, Steg PG, Goto S, Hirsch AT, Liao CS, Mas JL, Richard AJ, Röther J, Wilson PWF, on behalf of the REACH Registry Investigators. The REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry: An international, prospective, observational investigation in subjects at risk for atherothrombotic events-study design. *Am Heart J*. 2006;151:786.e1-786.e10.
32. Sato T., Costa A.D.T., Saito T., Ogura T., Ishida H., Garlid K.D., Nakaya H. Bepridil, an antiarrhythmic drug, opens mitochondrial K_{ATP} channels, blocks sarcolemmal K_{ATP} channels, and confers cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:182-188
33. Sato T., Nakaya H. P-1075 exerts diverse modulatory effects on mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels in rabbit ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:165-168
34. Sato T., Nishida H., Miyazaki M., Nakaya H. Effects of sulfonylureas on mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels in cardiac myocytes: implications for sulfonylurea controversy. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:341-347
35. Fujita H., Ogura T., Tamagawa M., Uemura H., Sato T., Ishida A., Imamaki M., Kimura F., Miyazaki M., Nakaya H. A key role for the subunit SUR2B in the preferential activation of vascular K_{ATP} channels by isoflurane. *Br J Pharmacol* 2006;149:573-580
36. J.Ying , X.Y. Tong, D. Pimentel, R.M. Weisbrod, M.P. Trucillo, T. Adachi, R.A. Cohen; Cysteine-674 of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase is required for the inhibition of cell migration by nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(4):283-90, 2007.
37. Y. Izumi, M. Yamamoto, M. Kawamura, T. Adachi, K. Kobayashi; Cross-linked poly (gamma-glutamic acid) attenuated peritoneal adhesion in a rat model. *Surgery*, in press, 2007.
38. R.A. Cohen. T. Adachi; Nitric oxide-induced vasodilatation: Regulation by physiological S-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16(4):109-14, 2006
39. S. Xu, J. Ying, B. Jiang, W. Guo, T. Adachi, V.S. Sharov, H.L. Lazar, J. Menzoian, T.V. Knyushko, D. Bigelow. C. Schöneich, R.A. Cohen; Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(6):H2220-2227, 2006
40. D.R. Pimentel, T. Adachi, Y Ido, T Heibeck, B Jiang, Lee YJ, B Jiang, JA Melendez, R.A. Cohen, WS Colucci; Strain-Stimulated Hypertrophy in Cardiac Myocytes is Mediated by Reactive Oxygen Species-Dependent Ras S-Glutathiolation *J Mol Cell Cardiol*, 41(4):613-622, 2006
41. N. Clavreul, T. Adachi, DR Pimentel, Y Ido, C. Schöneich, R.A. Cohen; S-glutathiolation by peroxynitrite of p21Ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells. *FASEB J*, 20(3):518-520, 2006.
42. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T,

- Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine* 12, 459 - 465 (2006)
43. Kadono T, Zhang XQ, Srinivasan S, Ishida H, Barry WH, Benjamin IJ: CRYAB and HSPB2 deficiency increases myocyte mitochondrial permeability transition and mitochondrial calcium uptake. *J Mol Cell Cardiol* 40, 783-9, 2006