

広大科研

19

17590493

0100454007

ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1の誘導能からみた 抗酸化ストレス防御能の臨床的評価

(課題番号 17590493)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C))

研究成果報告書

平成19年4月

研究代表者 小園 亮次
(広島大学病院・講師)

広島大学図書

0100454007



はしがき

心筋梗塞や脳卒中はわが国の死因統計の上位を占めており、これら動脈硬化性疾患の早期診断、予防の重要性が増している。動脈硬化の初期像としての血管内皮機能障害、動脈硬化進展のメカニズム、あるいは心不全の進展において“酸化ストレスの過剰”のはたす役割は極めて大きいと考えられている。酸化ストレスを理解し、評価し、治療や予防に役立てることは臨床検査医学研究の最重要課題であるといっても過言ではない。酸化ストレスという言葉はあいまいに用いられることが多いが、狭義では細胞内の活性酸素種(ROS)の総量を指している。ROSは細胞内代謝において常時発生しており、同時に superoxide dismutase などの酵素や蛋白により絶えず消去される。したがって、酸化ストレス過剰は、ROS産生能の亢進かROS消去能の低下で説明されなければならない。ROS産生系については従来、レニン・アンジオテンシン系などの研究が盛んに行われてきたが、一方、ROS消去能についての研究は一步立ち遅れていると思われる。ROS消去能とはすなわち酸化ストレス防御能であり、動脈硬化性疾患に対する耐性の個人差を防御能の差で説明できる可能性がある。そこで我々が着目したのはヘムオキシゲナーゼ(HO)-1である。

HO-1は細胞内遊離ヘムを分解して一酸化炭素(CO)とビリルビンに分解する酵素である。ヘムは細胞内に数多く存在するヘム蛋白の反応中心として酸素の受け渡しに欠かせない分子であるが、いったん蛋白から遊離すると強力な細胞障害性をもつ。HO-1の酵素反応で生じるCOは血中でヘモグロビンと強く結合するため毒物としての印象が強いが細胞内ではNOと類似(構造も類似している)の抗炎症作用を発揮する。もう一方の産物であるビリルビンはスカベンジャー作用を有する。つまりHO-1は細胞障害性の強い細胞内の遊離ヘムを2つの細胞保護因子に変換する酵素であると解釈できる。

本研究課題では、このHO-1に焦点をあて、この分子が予想通り、循環器疾患の成因に深い意義をもち、臨床に応用可能であることが確認された。

このような実り多い研究の機会に恵まれたこと、さらに研究を支えてくれた大学院生 矢野陽子、Andrei Brydun、渡 雄一郎、山本佳征、奥原宏一郎、三戸森児 の各氏、また事務処理を担当していただいた青山径子氏に感謝します。

研究代表者 小園亮次

広島大学図書

0100454007



研究組織

研究代表者：小園亮次（広島大学病院・^{大学院}講師）
研究分担者：大島哲也（広島大学・^{大学院}医歯薬学総合研究科・助教授）
研究分担者：神辺眞之（広島大学・^{大学院}医歯薬学総合研究科・教授）

研究協力者：五十嵐和彦（東北大学大学院・医学系研究科・教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,900,000	0	1,900,000
平成18年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,000,000	0	3,000,000

研究発表

1. 学会誌など

- ①. A. Brydun, Y.Watari, Y.Yamamoto, K.Okuhara, H.Teragawa, K.Chayama, F.Kono, T.Oshima, R. Ozono. Reduced Expression of Heme Oxygenase-1 in Patients with Coronary Atherosclerosis. *Hypertens Res*, vol 30: 2007 (in press)
- ②. Miyoshi M., Nakano Y., Sakaguchi T., Ogi H., Oda N., Suenari K., Kiyotani K., Ozono R., Oshima T., Yoshida T., Chayama K. Gene delivery of paraoxonase-1 inhibits neointimal hyperplasia after balloon-injury in rabbits fed a high-fat diet. *Hypertens Res*. Vol 30: 85-91: 2007
- ③. Y.Oishi, R.Ozono, M. Yoshizumi, M. Akishita, M.Horiuchi, T.Oshima. AT2 receptor mediates the cardioprotective effects of AT1 receptor antagonist in post myocardial infarction remodeling. *Life Sci*, vol. 80 82-88. 2006
- ④. Y. Yano, R. Ozono, Y. Oishi, M. Kambe, M. Yoshizumi, T. Ishida, S. Omura, T. Oshima, K. Igarashi: Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes Cells*, vol. 11 :791-803. 2006
- ⑤. T. Shirakawa, R. Ozono, F. Kasagi, T. Oshima, N. Kamada, .M. Kambe: Differential impact of family history on age-associated increase in the prevalence of hypertension and diabetes in male Japanese workers. *Hypertens Res*, vol. 29, 81-87: 2006
- ⑥. S. Omura, H. Suzuki, M. Toyofuku, R. Ozono, N. Kohno, K. Igarashi: Effects of genetic ablation of bach1 upon smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis after cuff injury. *Genes Cells*, vol.10, 277-285, 2005
- ⑦. T. Oshima, R. Ozono, Y. Yano, Y. Oishi, H. Teragawa, Y. Higashi, M. Yoshizumi, M. Kambe: Association of Helicobacter pylori infection with systemic inflammation and endothelial dysfunction in healthy male subjects. *J Am Coll Cardiol*, vol. 19;45, 1219-1222, 2005

総説

- ①. 小園亮次、大島哲也： 頸動脈エコーと血管内皮機能検査による動脈硬化性疾患の早期診断 医科器械学 第76巻 12号 873-882, 2006
- ②. Ozono R. New biotechnological methods to reduce oxidative stress in the cardiovascular system: focusing on the Bach1/heme oxygenase-1 pathway. *Curr.Pharm.Biotechnol.* 2006;7(2):87-93.
- ③. 小園亮次,大島哲也： 特集 早期診断と臨床検査__早期診断に有用な検査とその利用法__循環器疾患,日本内科学会雑誌,第94巻,2502-2507,2005

- ④. 小園亮次: 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査「ドーパミン」. 日本臨床, 第65巻(Suppl 8),389-390,2005

2. 口頭発表

シンポジウム

- ①. 小園亮次:「ヘムオキシゲナーゼ(HO)に着目した酸化ストレスの臨床診断と動脈硬化性疾患」日本臨床検査医学会・第三回中国四国合同地方会「シンポジウム生活習慣病と検査」臨床病理 (印刷中)
- ②. 小園亮次: レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系と心不全. 第24回日本臨床化学会・夏期セミナー シンポジウム「心不全の臨床化学的アプローチ」,臨床化学, 34 suppl 121,2005

口演

- ①. Watari Y. Ozono R. Yamamoto Y. Brydun A. Okuhara K. Mito S. Igarashi K. Oshima T. The Effect of Gene-targetting of Transcriptional Factor Bach1 on Atherosclerosis. 21th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Oct .2006, Fukuoka, Japan
- ②. Yamamoto Y. Watari Y. Horiuchi M. Akishita M. Chayama K. Oshima T. Ozono R. Angiotensin II Type 2 (AT2) Receptor Modifies Vascular Remodeling after Injury by Promoting Apoptosis and Inhibiting Proliferation of Vascular Cells in the Media. 21th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Oct .2006, Fukuoka, Japan.
- ③. Mito S. Ozono R. Brydun A. Yamamoto Y. Igarashi K. Oshima T. Yoshizumi M. Genetic ablation of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene, leads to myocardial protection against pressure overload in mice. 60th Annual Fall Conference and Scientific Session of the Council for High Blood Pressure Research, American Heart Association. October 2006, San Antonio, TX
- ④. Watari Y. Ozono R. Brydun A. Yamamoto Y. Okuhara K. Igarashi K. Chayama K. Oshima T. Gene ablation Bach-1 leads to suppression of the development of atherogenesis in Apolipoprotein E and Bach1 double knockout mice (ApoE^{-/-} Bach1^{-/-}). 60th Annual Fall Conference and Scientific Session of the Council for High Blood Pressure Research, American Heart Association. October 2006, San Antonio, TX
- ⑤. Brydun A. Watari Y. Yamamoto Y. Okuhara K. Kono F. Teragawa H. Oshima T. Chayama K. Ozono R. Reduced expression of heme oxygenase-1 in patients with coronary artery disease. 60th Annual Fall Conference and Scientific Session of the Council for High Blood Pressure Research, American Heart Association. October 2006, San Antonio, TX
- ⑥. Yano, Y. Ozono, R., Oshima, T. Igarashi, K.: Genetic ablation of *bach1*, a critical transcriptional repressor of heme oxygenase-1, prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. Scientific Sessions 2005, American Heart Association, November 2005, Dallas, TX.
- ⑦. Ozono, R., Shirakawa, T., Oshima, T., Kasagi, F., Kamada, N., Kambe, M.: Differential impacts of familial predispositions on the age-associated increase in the occurrence of hypertension and diabetes in Japanese workers. Fifteenth European Meeting of Hypertension, June 2005, Milan, Italy.
- ⑧. Oshima, T., Ozono, R., Watari, Y. Yano, Y., Yamamoto, M.: Beneficial effect of T-type calcium channel antagonist on endothelial function in patients with essential hypertension. Fifteenth European Meeting of Hypertension, June 2005, Milan, Italy.
- ⑨. Ozono, R., Brydun, A., Kono, F., Okuhara, K., Oshima, T., Kambe, M., Igarashi, K.: Hemeoxygenase (HO)-1 Expression, oxidative stress, inflammatory cytokines, and coronary heart disease (CHD). Fifteenth European Meeting of Hypertension, June 2005, Milan, Italy.

全国学会

- ①. Mito S, Ozono R, Igarashi K, Oshima T, Yoshizumi M. Genetic ablation of Bach1, transcriptional repressor of heme oxygenase-1, leads to myocardial protection against pressure overload in mice. 第70回日本循環器学会総会・学術集会 2006年3月 名古屋
- ②. 奥原宏一郎, 小園亮次, 神辺眞之, 大島哲也, 矢野陽子, 井上一郎, 栗栖智, 吉栖正生: ヒト心筋梗塞におけるストレス誘導性ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1活性上昇の証明. 第28回日本高血圧学会総会, 2005 10月 旭川
- ③. Brydun,A, 小園亮次, 矢野陽子, 奥原宏一郎, 五十嵐和彦, 末田泰二郎, 神辺眞之, 大島哲也: 抗ストレス防御因子ヘムオキシゲナーゼ-1の遺伝子誘導能と冠動脈疾患重症度の関連. 第28回日本高血圧学会総会, 2005, 10月 旭川
- ④. Yano,Y., Ozono,R., Oshima,T., Kambe,M., Igarashi,K.: Genetic ablation of *bach1*, a critical transcriptional repressor of heme oxygenase-1, prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. 第69回日本循環器病学会, 2005 3月 横浜
- ⑤. Brydun,A., Ozono,R., Kono,F., Okuhara,K., Oshima,T., Kambe,M., Igarashi,K.: Relationship between HO-1 upregulation capacity in PBMC and severity of coronary hear disease. 第69回日本循環器病学会, 2005 3月横浜

3. 出版物

- ①. 小園亮次 よくわかる病態生理シリーズ 第2巻 循環器疾患(編集 岡田隆夫) 9章 高血圧(200-216頁) 日本医事新報社 2006年10月19日発行
- ②. 小園亮次 健康管理と臨床検査—早期診断を目指して—(監修 神辺眞之, 渡辺清明)第2章 高血圧 2. 高血圧早期診断—血圧評価法の実際とピットフォール. 宇宙堂八木書店, 東京, 2005, 42-46(頁).

研究成果

はじめに

酸化ストレスの過剰は高血圧、糖尿病、高脂血症といった生活習慣病に共通した病態である。酸化ストレスの過剰はまた内皮依存性血管拡張反応の低下をひきおこし、動脈硬化の進展、さらに心筋梗塞や脳梗塞発症の重要な要因となる。したがって、酸化ストレスの臨床評価は生活習慣病の実地臨床にきわめて有用である。しかし、現状の酸化ストレス検査は、ストレスにより不可逆的に変性した代謝産物の蓄積を定量しているにすぎず、生活習慣病の状態の把握や予後の予測に特異的な情報を与えるものではない。一方、酸化ストレス状態は酸化ストレスを生じる刺激とこれを消去する能力とのバランスで決まるため、酸化ストレス防御能を評価することで、動脈硬化性疾患に対する耐性の個人差を説明できる可能性がある。我々は代表的な抗ストレス防御因子であるヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 機能の低下が動脈硬化や心不全の発症要因であることを確認し、HO-1 誘導能の個人差が冠動脈疾患と関連があることを見出した。また、この HO-1 誘導能の個人差は、一部その遺伝子多型により規定されている。本シンポジウムでは HO-1 の臨床検査への応用について議論する。

酸化ストレスと HO-1

細胞内では reactive oxygen species (ROS) が恒常的に産生され、そして消去されており、そのバランスで redox state つまり酸化ストレス状態が決定する(図1)。細胞内の多くの蛋白は、配列中のジスルフィド(S-S)結合の酸化・還元状態などから細胞内の redox state を感知する機能を有しており、酸化された状態と還元された状態で蛋白の機能が変換する。酸化ストレスの過剰は、最終的には転写レベルでさまざまな遺伝子群の発現プログラムの変化をうながし、細胞の状態を変化させる。多くの生活習慣病や動脈硬化の背景に、このような酸化ストレスの過剰による遺伝子群発現パターンの変化が存在していると考えられており、酸化ストレス状態の把握は臨床的にも重要な意義をもつ。

酸化ストレス状態を臨床的に検査する方法は、まだまだ未開であるといわざるをえない。従来最も広くおこなわれてきたのは、酸化ストレスの結果不可逆的変性をうけた脂質(酸化 LDL など)、アラキドン酸(8-isoprostane など)、あるいは核酸(8-OHdG など)の蓄積を血中や蓄尿で測定する方法である(図1)。これらは簡便におこなえる半面、特異性や感度に問題がある。一方、酸化ストレス状態が ROS の産生と消去のバランスから決定することを考えればそれぞれのメカニズムに注目する考えが生まれる。産生系の研究の代表はレニンアンジオテンシン系であり、高血圧をはじめ多くの病態でアンジオテンシン II の過剰を伴う酸化ストレスが存在すると考えられている。一方、消去系は superoxide dismutase (SOD) や catalase などの酵素や、トコフェロールなどの非酵素系の抗酸化因子の存在が古くから知られている割に、比較的研究の知見が少ない。

HO は細胞内に生じるフリーの heme を分解して一酸化炭素(CO)と biliverdin を生成する酵素である(図2)。HO には少なくとも2つのアイソザイム HO-1 と HO-2 が存在し¹、HO-1 は細胞に対するストレスに反応して発現が誘導される inducible form であり、HO-2 は constitutive form である。HO-1 は基質に対する感度が HO-2 に勝り、活性も数倍大きいいため HO-1 が生体に与える影響がより大きい。HO の産物である biliverdin は直ちに bilirubin に変換されスカベンジャー作用を発揮する。一方血中でヘモグロビンと強く結合する CO は毒物としての印象が強いが細胞内では NO と類似の抗炎症作用を発揮することがわかってきた(図3)。すなわち細胞障害性の強い free heme は HO-1 により分解・解毒され、2つの細胞保護因子に変換される²。細胞内 free heme はいかなる場合に上昇するのか、またその意義も未解明であるが、free heme 濃度はストレス時に増加し HO-1 の発現増加をはじめとした抗ストレス因子を活性化する細胞内ストレスの mediator ではないかと考えている^{2,3}。以上より、ストレス誘導性の HO-1 の発現増加は、SOD や catalase のような ROS の直接消去と異なる経路を介する抗ストレス防御反応の主役であると考えられる。事実、虚血をはじめあらゆる細胞ストレスで HO-1 の著しい発現上昇が見られることは確実で、HO-1 を欠損するマウスでは生体防御反応や⁴、虚血に対する細胞の耐性が著しく低下する^{5,6}ことが観察されている。

ストレス誘導性の HO-1 発現の調節は転写レベルで調節されているが、HO-1 発現調節機構の詳細が明らかにされている^{2,7}。HO-1 プロモータには MARE と呼ばれるストレス応答性のシス配列が存在、bZIP タイプの転写因子がダイマーを形成して結合する。転写因子 Nrf2 が Maf 蛋白といわれる転写因子とダイマー形成すると HO-1 の発現は活性化されるが、一方、転写因子 Bach1 がおなじ Maf 蛋白とダイマー形成してこのエレメントに結合すると、HO-1 の発現はほとんど完全に OFF となる⁷。通常状態では Bach1 がこのエレメントに優先的に結合するため Nrf2 による HO-1 誘導はおこらない。しかし酸化ストレス刺激が細胞内に生じた場合 Bach1 のエレメントへの結合がはずれ、核外に放出されるため Nrf2 による HO-1 の誘導が無制限となり、結果的に HO-1 発現が増加する。したがって、HO-1 発現は Bach1 によって抑制的に制御されている。

これらの in vitro の観察に一致して Bach1 のノックアウトマウスでは、HO-1 の発現が恒常的に増加している。我々は、この Bach1 ノックアウトマウスを用いて、心筋虚血・再灌流に対する組織耐性を調べた。Bach1 ノックアウトマウスでは梗塞範囲が大幅に低下し、この効果は HO-1 の阻害剤の投与で消失した⁵(図4)。同様に Bach1 ノックアウトマウスは後負荷の増加(高血圧)あるいは心筋梗塞後の心筋の肥大反応、心筋間質の線維化反応が小さく、結果として心臓リモデリング(心不全)をおこしにくいことが明らかになった。Bach1 欠損のこの効果も HO-1 の阻害薬で消失する。このほか Bach1 ノックアウトマウスと動脈硬化モデルマウスであるアポE欠損マウスとの交配実験により Bach1 の欠損と HO-1 の発現増加は

ラク形成性動脈硬化の抑制作用もあることが観察された。これらの結果は HO-1 の発現がよければ、それだけ心血管系の保護作用が働くことを示唆する。HO-1 の発現量の測定は心不全や動脈硬化の早期診断や予防に、また HO-1 を発現導入すれば、これらの疾患の治療に有用であることが期待される。我々の成績によれば転写因子 Bach1 は HO-1 の発現に特異的かつ決定的な影響力を持つことが明らかなので、Bach1 の阻害法の工夫により臨床応用への道が開かれる。

我々は、HO-1 発現能の個人差を検討するため、いくつかの方法を試みた。

(1) 血中ビリルビン濃度

急性心筋梗塞(AMI)のまず、AMIの際、心筋細胞内で HO-1 の発現が増加しているはずで、それが心筋逸脱酵素のように血中に流出した HO-1 の分解産物ビリルビンの血中濃度の増加としてとらえることができないかを検討した。その結果、予想通り、血中ビリルビン濃度はAMIから約1日後をピークとして一過性の上昇を認めることがわかり(図5)、ヒトの心臓においてもマウスやラットと同様、虚血に誘導され HO-1 の発現が増加することが示唆された。ビリルビン上昇の度合いが大きい症例(すなわち HO-1 が強く発現)は、冠動脈造影で、側副血管の発達が良好であることが観察され、HO-1 と angiogenesis の関連性が考えられた。しかし、ビリルビン上昇度と慢性期の心機能、冠動脈病変の重症度などの相関関係はみいだせなかった。

(2) HO-1 遺伝子上流のGTリピート多型

HO-1 遺伝子 5' 側上流にGTリピートがあり、リピート数の多型性が HO-1 の発現に関連していると考えられている。一般住民におけるリピート数の頻度は二相性でリピート数22と33付近にピークをもつことが知られている。リピート回数26を境にアリルをLong(L)とShort(S)アリルに分類するのが一般的で、Lアリル保持者では動脈硬化性疾患の頻度が高いという報告がなされていた。我々は冠動脈疾患を疑い冠動脈造影をおこなった患者を SS、SL、および LL ゲノタイプを分類し、冠動脈疾患の頻度を調べたがゲノタイプごとに明らかな冠動脈疾患の頻度の差は認められなかった⁸。

(3) 末梢血単核球の HO-1 mRNA 発現の検討

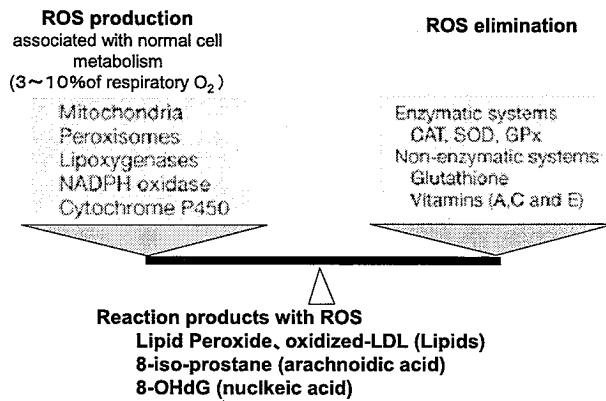
単球はマクロファージに分化し動脈硬化巣の形成に役割を演じている。末梢血単球における HO-1 mRNA 発現量と冠動脈疾患の関連を検討した。ここで、HO-1 発現量はヘミンとの incubation により最大限刺激後の増加量(Δ HO-1 mRNA)、つまり HO-1 発現予備能を評価した⁸。 Δ HO-1 mRNA は個人内で再現性が良好(CV=7.2%)で、LLアリル保持者においては低値を示したので、HO-1 発現能の少なくとも一部は遺伝的に決定されると考えられた。冠動脈疾患を疑われて冠動脈造影を受けた患者111名において、単核球(単球と HO-1 mRNA 発現が同等と確認している)の Δ HO-1 mRNA を測定したところ、 Δ HO-1 mRNA はAHAの方法による冠動脈硬化スケールと有意に逆相関した(図6)。同様な相関関係は患者を0-3枝病変に分けた場合にも認められ、HO-1 の誘導能の低下が冠動脈疾

患のメカニズムに関与していると考えられる。

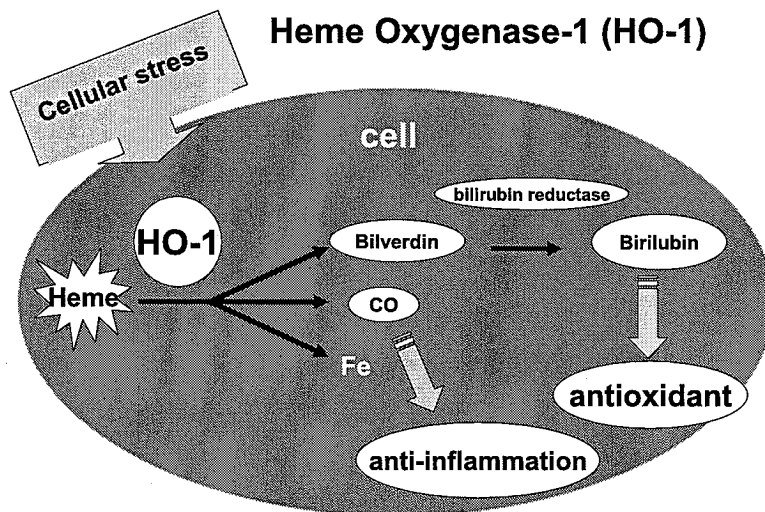
おわりに

HO-1 の発現増加が、心血管のストレス耐性を強めるメカニズムは十分に解明されていない。今後はHO-1 分解産物であるCOとビリルビンの作用を解明していく必要がある。少なくともCOは抗炎症作用、ビリルビンは抗酸化ストレス作用を有することが明らかになっているが、炎症や酸化ストレスが動脈硬化をはじめ心不全などの病態において根源的な役割を演じていることを考えれば、HO-1 誘導の効果が心血管保護の意味で非常に多岐にわたることもうなずける。臨床検査の観点では、HO-1 の発現プロファイルを把握することが循環器疾患のハイリスクグループの検出や疾患予防、予後の予測、あるいは治療効果の判定などに非常に有用であると思われる。

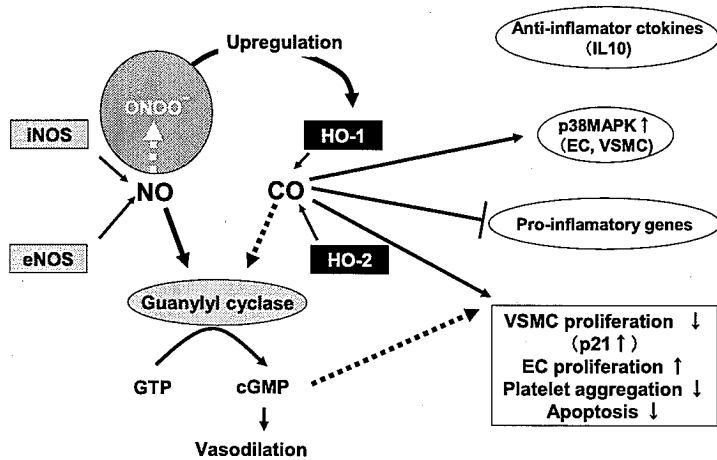
Assessment of Oxidative Stress



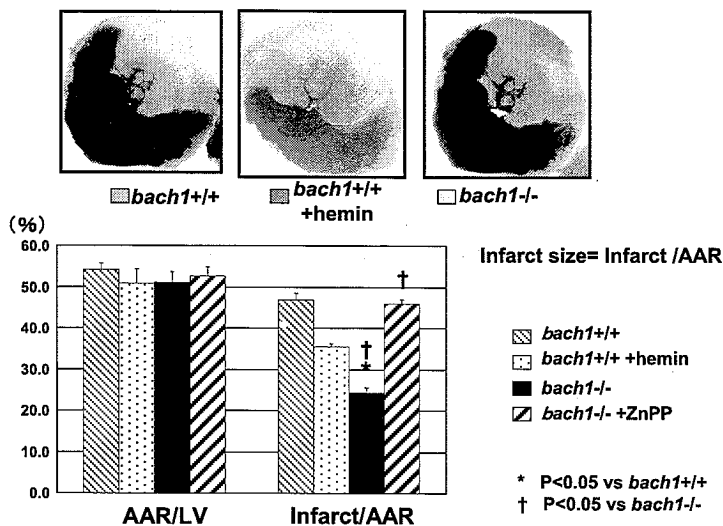
☒1 Oxidative stress is determined by a balance between production and elimination. Most of the oxidative stress markers are irreversible end-products of oxidative reaction.



☒2 Hemeoxygenase (HO)-1. HO-1 degrade heme into CO and bilberdin. Bilverdin is rapidly converted to bilirubin. Both of CO and bilirubin exert cytoprotective actions. Another product ferrous ion is instantly sequestered to ferritin, producing no cytotoxic reaction. (Figure quoted from Ref 2)



☒ 3 Carbon monoxide (CO) and nitric oxide (NO). Anti-inflammatory and anti-atherosclerotic actions of CO are listed (Figure quoted from Ref 2). The actions of CO and NO show some resemblance. CO compensates NO action in case that the cytoprotective action of NO is diminished because of its interaction with reactive oxygen species.



☒ 4 Reduced myocardial infarct size after ischemia/reperfusion in *bach1*^{-/-} (knockout) mice compared with *bach1*^{+/+} (wild type) mice (Figure quoted from Ref 5). Zinc protoporphyrine (ZnPP) is an inhibitor of HO-1.

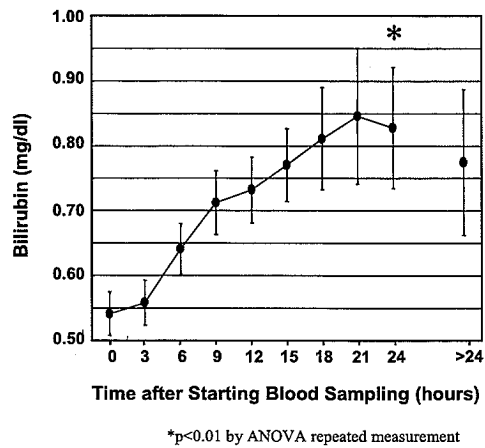
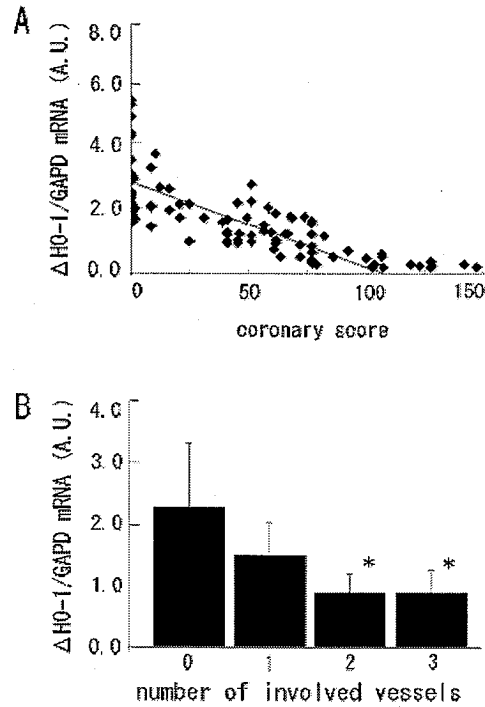


图 5 Elevation in serum level of bilirubin, a catalytic product of HO-1 mediated reaction, following acute myocardial infarction.



⊗ 6 Relationship between severity of coronary artery disease and capacity of HO-1 induction (Δ HO-1 mRNA). HO-1 mRNA was measured by realtime PCR in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients underwent coronary angiography to diagnose coronary artery disease (CAD). Δ HO-1 mRNA is the difference between the HO-1 mRNA levels before and after maximum stimulation of the cells. A. Δ HO-1 mRNA was significantly and negatively correlated with the coronary score calculated based on the angiogram. B. Similar negative correlation was found between Δ HO-1 mRNA and the severity of CAD, diagnosed considering both coronary angiogram and clinical feature. Figure quoted from Ref. 8).

Reference List

1. Maines,M.D., Trakshel,G.M. & Kutty,R.K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **261**, 411–419 (1986).
2. Ozono,R. New biotechnological methods to reduce oxidative stress in the cardiovascular system: focusing on the Bach1/heme oxygenase-1 pathway. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **7**, 87–93 (2006).
3. Shibahara,S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J. Exp. Med.* **200**, 167–186 (2003).
4. Poss,K.D. & Tonegawa,S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 10925–10930 (1997).
5. Yano,Y. , Ozono R *et al.* Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes Cells* **11**, 791–803 (2006).
6. Yoshida,T., Maulik,N., Ho,Y.S., Alam,J. & Das,D.K. H(mox-1) constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene. *Circulation* **103**, 1695–1701 (2001).
7. Sun,J. *et al.* Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* **21**, 5216–5224 (2002).
8. Brydun A *et al.* Reduced heme oxygenase-1 expression in patients with coronary artery disease. *Hypertension Research* (2007).(in press)