

氏名	あべ 充
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2736 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	GATA-6 is involved in PPAR $\gamma$ -mediated activation of differentiated phenotype in human vascular smooth muscle cells (GATA-6はヒト血管平滑筋細胞における PPAR $\gamma$ を介した分化型形質の活性化に関与する)
論文調査委員	(主査) 教授 中尾 一和 教授 瀬原 淳子 教授 北 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) は、リガンド活性化型転写因子であり且つ核内ホルモン受容体スーパーファミリーの一員である。最も研究されているアイソフォームである PPAR $\gamma$  は、糖や脂質の恒常性及び種々の細胞の増殖や分化への関与が示唆されている。健常部では分化型形質を示す血管平滑筋細胞は、動脈硬化巣や血管形成術後の新生内膜において脱分化型 (増殖型) へのフェノタイプ変換を認め、動脈硬化進展に寄与すると考えられている。

PPAR $\gamma$  リガンドは血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、*in vivo* にて LDL 受容体欠損マウスやアポ E-knockout マウスの動脈硬化進展を抑制すると報告されている。しかしこれらの作用の正確な機序は不明であり、又血管平滑筋細胞のフェノタイプ変換に与える影響もよくわかっていない。一方、Znフィンガーを 2 つ有する DNA 結合転写因子である GATA-6 は GATA 転写因子群の中で唯一血管平滑筋細胞で発現し、血管平滑筋細胞の分化誘導及び保持への関与が報告されている。そこで本研究では、PPAR $\gamma$  リガンドの血管平滑筋細胞の分化誘導及び保持への効果及びそれにおける GATA-6 の役割について検討した。

この目的の為に培養ヒト血管平滑筋細胞に PPAR $\gamma$  の内因性リガンドとされる 15-deoxy-delta (12, 14)-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) とチアゾリジン誘導体であるトログリタゾン (tro) を投与した。1  $\mu$ M の 15d-PGJ<sub>2</sub> 又は 5  $\mu$ M の tro の投与にて、ヒト血管平滑筋細胞の増殖は抑制された。一方、増殖型血管平滑筋細胞を 15d-PGJ<sub>2</sub> 又は tro で刺激しウエスタンブロット法を施行したところ、増殖抑制効果を認めた濃度よりも低い濃度にて、主要分化マーカーである平滑筋ミオシン重鎖及び平滑筋  $\alpha$ -アクチンの発現亢進を認めた。増殖型ヒト血管平滑筋細胞に 15d-PGJ<sub>2</sub> を投与したところ、transient transfection assay にて PPAR 依存性転写の促進を、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて内因性 PPAR $\gamma$  の DNA 結合能の増強を認めた。これらは PPAR $\gamma$  を不活性化するとされるプロスタグランジン F<sub>2</sub>  $\alpha$  (PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ ) の同時投与にて阻害された。増殖型ヒト血管平滑筋細胞を用いて免疫染色にて評価すると、15d-PGJ<sub>2</sub> の投与にて平滑筋ミオシン重鎖の発現は亢進し、それは PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  の同時投与により阻害された。ヒト血管平滑筋細胞に 15d-PGJ<sub>2</sub> 又は tro を投与したところ、野生型平滑筋ミオシン重鎖のプロモーター活性を増加させた。この増加は GATA-6 結合部位の変異により消失した事から、平滑筋ミオシン重鎖の発現亢進には GATA-6 を介した転写レベルでの調節が強く示唆された。増殖型血管平滑筋細胞の核蛋白を用いて EMSA を施行すると、15d-PGJ<sub>2</sub> 又は tro の投与にて平滑筋ミオシン重鎖プロモーター内への内因性 GATA-6 の結合能が増強したが、この作用は PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  の同時投与により消失した。

以上より、15d-PGJ<sub>2</sub> 又は tro の投与にて PPAR $\gamma$  を介した経路の活性化を認め、ヒト血管平滑筋細胞の増殖抑制及び増殖型血管平滑筋細胞の分化型形質誘導効果を認めた。平滑筋ミオシン重鎖のプロモーター解析にて、その効果の少なくとも一部は DNA 結合因子 GATA-6 を介した転写レベルで調節されていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) リガンドは血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖抑制や *in vivo* の抗動脈硬化作用が報告され、一方転写因子 GATA-6 は VSMC の分化誘導及び保持への関与が報告されている。そこで本研究では、PPAR $\gamma$  リガンドの VSMC 分化誘導と保持効果及び GATA-6 の関与について検討した。

ヒト VSMC に PPAR $\gamma$  の内因性リガンドの 15d-PGJ2 やチアゾリジン誘導体のトログリタゾン (tro) を投与すると、増殖抑制、平滑筋ミオシン重鎖及び  $\alpha$ -アクチンの発現亢進、PPAR 依存性転写の促進や内因性 PPAR $\gamma$  の DNA 結合能の増強を認めた。平滑筋ミオシン重鎖のプロモーターは GATA 結合部位に依存して活性化され内因性 GATA-6 の DNA 結合能も増強したが、これらの作用の一部は PPAR $\gamma$  を不活性化するプロスタグランジン F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) の同時投与により消失した。

以上より、15d-PGJ2 又は tro の投与にて PPAR $\gamma$  を介した経路の活性化とヒト VSMC の増殖抑制及び分化型形質誘導を認め、平滑筋ミオシン重鎖のプロモーター解析にて、その効果の一部は GATA-6 を介した転写レベルで調節されていると考えられた。

以上の研究は VSMC 分化誘導の分子生物学レベルでの解明に貢献し、動脈硬化に対する新たな治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年2月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。