

氏名	もりもとまさふみ 森本将史
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2441号
学位授与の日付	平成14年3月25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	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Lysophosphatidylcholine Induces Early Growth Response Factor-1 Expression and Activates the Core Promoter of PDGF-A Chain in Vascular Endothelial Cells. (血管内皮細胞における lysophosphatidylcholine による Egr-1 の誘導を介した PDGF-A 主要プロモーター領域の活性化機構について)
論文調査委員	(主査) 教授 野田 亮 教授 内山 卓 教授 橋本 信夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

動脈硬化病変部位や酸化 LDL などの動脈硬化惹起性リポ蛋白中で著明な増加がみられるリン脂質 lysophosphatidylcholine (lyso-PC) は、動脈硬化病変形成に重要な役割を果たす VCAM-1, ICAM-1 などの接着分子や PDGF, HB-EGF などの血管平滑筋細胞増殖因子の発現を血管内皮細胞において転写レベルで誘導することが知られているが、これらの転写制御機構はこれまで明らかではなかった。

本研究では、培養血管内皮細胞において lyso-PC が、虚血や傷害による転写制御に関わるとされる転写因子 Early growth response factor (Egr)-1 の発現を誘導し、それを介して PDGF-A chain のプロモーター上流領域を活性化する機構を明らかにした。

まずノザンプロット解析により mRNA レベルにおいて lyso-PC が一過性に Egr-1 を誘導し、それに引き続いて PDGF-A が誘導されることを明らかにした。更に核 run-off アッセイにてその発現が転写の誘導によることを示した。また核抽出物のウエスタンプロット解析により Egr-1 蛋白が核内で増加することも確認した。次に lyso-PC による PDGF-A 遺伝子の転写制御機構を解析するため、すでに他の刺激により Egr-1 の結合と転写活性に重要であることが報告されている 55~71塩基上流領域 (oligo A) の関与を検討した。すなわち、oligo A とルシフェラーゼ遺伝子とを結合したコンストラクトを導入し lyso-PC によるルシフェラーゼ活性を測定したところ、コントロール群に比べ約 5 倍の活性の増加がみられた。一方 oligo A に無作為的にグアニン(G)を挿入する変異を加えたところ、lyso-PC による活性の増加が消失したことから、この領域が lyso-PC による転写活性に重要であることが示された。さらに、放射標識された oligoA を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、lyso-PC により誘導されるシフトバンドが確認された。このシフトバンドは、過剰量の非標識 oligoA および抗 Egr-1 抗体の添加によって消失したことから、lyso-PC により発現が誘導された Egr-1 は、55~71塩基上流領域 (oligo A) に特異的に結合することが示された。また、lyso-PC による Egr-1 の発現誘導は、MEK1 の特異的阻害剤によって抑制されるものの、p38MAPkinase の阻害剤では抑制されないことをウエスタンプロット法で示した。すなわちこの誘導発現は MEK1/extracellular signal-regulated kinase pathway を介するものであり、p38MAP kinase には依存しないことを示した。

以上の結果より、培養血管内皮細胞において、lyso-PC が Egr-1 の発現を誘導し、それが PDGF-A chain 遺伝子の上流領域を活性化する一連のメカニズムが明らかとなった。Egr-1 は頸動脈動脈硬化病変においても発現の増加が確認されており、また TGF- $\beta$ , FGF, TF, ICAM-1 等、動脈硬化に関わるとされる様々な遺伝子の転写制御にも重要な役割を担うことが示されていること、更に動脈硬化病変での平滑筋細胞の形質変換の鍵を握る転写因子 BTEB-2 の転写制御にも主要な役割を担うことなどから、近年動脈硬化病変形成過程において中心となる転写因子である可能性が示唆されている。これらの知見から、酸化 LDL 主要リン脂質である lyso-PC による転写因子 Egr-1 の発現誘導は、高コレステロール血症

と動脈硬化形成過程に関わる一連の遺伝子発現の鍵となる転写機構の一つである可能性が考えられ、動脈硬化の治療・予防法の開発のターゲットとなる可能性があるものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

閉塞性脳血管障害の主要原因である粥状動脈硬化病変において酸化LDL等の動脈硬化惹起性リポ蛋白中で増加するリン脂質 lysophosphatidylcholine (lyso-PC) は、platelet derived growth factor (PDGF)-A をはじめとする血管平滑筋細胞増殖因子の発現を誘導することが知られているが、その転写制御機構は明らかでなかった。

本研究では、培養血管内皮細胞を用い lyso-PC が MEK1/ERK pathway を介し転写因子 Early growth response factor (Egr)-1 の発現を誘導し、この転写因子を介して PDGF-A chain のプロモーター上流領域を活性化する機構を明らかにした。まずノザンブロット解析と核 run-off アッセイにより lyso-PC が一過性に Egr-1 mRNA の転写新生を誘導することを示し、ウェスタンブロット解析によりその誘導を蛋白レベルでも確認した。またこの発現誘導は MEK1 の特異的阻害剤で抑制されることがら、この経路が MEK1/ERK pathway を介することを示した。次に PDGF-A プロモーター領域中で Egr-1 の結合に重要と予想される55~71塩基上流領域 (oligo A) を用いて lyso-PC 刺激によるルシフェラーゼ活性を測定したところ、約5倍の活性増加がみられ、さらに放射標識した oligo A を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、lyso-PC 誘導シフトバンドが確認され、このバンドは抗 Egr-1 抗体添加によって消失した。この結果から lyso-PC により誘導された Egr-1 は、oligo A に特異的に結合し転写活性に関与する可能性が示された。

以上の研究は、高コレステロール血症と動脈硬化形成過程に関わる一連の遺伝子発現の鍵となる転写機構の解明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13年12月17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。