

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮細胞における転写因子 GATA の役割の解析

氏 名 梅 溪 通 久

本論文では、血管内皮細胞における転写因子 GATA の役割の解析を扱った。動脈硬化をはじめとした炎症性疾患において、リンパ球と血管内皮細胞との細胞接着は、リンパ球の血管外遊走の最初のステップであり、この分子生物学的解析は炎症性疾患の新規治療法開発につながる重要な意義を持つ。そこで、本研究は、単球と血管内皮細胞との細胞接着の分子および遺伝子転写レベルにおけるメカニズムを解明することを目的とした。

まず、多くの因子やステップを経て行われる細胞接着という現象を分子・遺伝子レベルで解析する手段を得ることを目的として、ヒト単球系細胞株 U-937 とヒト血管内皮細胞 HUVEC とを用いて細胞接着の定量的な測定が可能であり、かつ化合物の細胞接着阻害作用のスクリーニングに有効性の高い細胞接着測定系を構築した。また、遺伝子発現の変化を検討するために、感度及び定量性がともに高い RNase Protection Assay 法により mRNA 量を測定した。RNA 調製法も定量法に合わせ、多くの RNA 試料を簡便に調製、定量できるシステムを構築した。このシステムにおいて、HUVEC における細胞接着分子 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) mRNA 発現量は TNF α 刺激による最大発現量の状態で total RNA 換算 1 μ g から 5 μ g まで直線的な比例関係を得た。本法を用いることにより、多種の mRNA を同時にしかも迅速に定量できることが可能となった。

本法を用いて HUVEC における VCAM-1 mRNA 発現誘導の時間経過を測定した結果、通常の培養条件では VCAM-1 mRNA の発現は認められなかったものの、TNF α 、IL-1 β 、PMA、もしくは LPS のいずれの刺激によっても発現誘導がみられ、刺激後 2 – 4 時間で発現量がピークに達し、12 時間ではいずれの刺激によっても発現がみられず、VCAM-1 mRNA が刺激により惹起される一過性の発現パターンを示すことが明らかとなった。

次に、今回構築した細胞接着測定系を用いて、単球の炎症部位への遊走を抑制し、その結果として炎症を抑える薬物の開発を目的に低分子化合物のスクリーニングを行なった。その結果、細胞接着を阻害する新規低分子化合物 K-7174 を得た。K-7174 は、TNF α や IL-1 β 、もしくは PMA により誘導された VCAM-1 の発現を特異的に、また濃度依存的に阻害した。mRNA 発現レベルにおいても、TNF α による VCAM-1 mRNA 発現誘導を特異的、および濃度依存的に抑制し、さらに VCAM-1 mRNA の安定性には影響しなかった。ゲルシフトアッセイによる解析の結果、K-7174 は VCAM-1 遺伝子プロモーター上に存在する転写因子結合部位のうち、GATA 結合部位に対する転写因子の結合を特異的に抑制した。炎症において活性化することが知られている NF κ B 結合部位を含む GATA 以外の結合配列に対しては K-7174 は影響を及ぼさなかった。この K-7174 による GATA 結合抑制作用は濃度依存性を有しており、K-7174 は HUVEC において GATA の結合が既に報告されているエンドセリン-1 前駆体遺伝子プロモーター領域に存在する GATA 配列に対する結合をも濃度依存的に抑制した。K-7174 は GATA 結合配列への結合を直接競合的に抑制する作用を示さなかったことから、K-7174 は GATA タンパクの DNA 結合活性の発現に作用するものと考えられた。これらの結果から、炎症性サイトカインの VCAM-1 誘導における転写因子 GATA の重要性が示唆され、また NF κ B 活性には影響せずに VCAM-1 発現を抑制する K-7174 は、新規の作用機序を持つ有望な抗炎症剤であると考えられた。

次に、血管内皮細胞における細胞接着分子 VCAM-1 の発現誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった転写因子 GATA の作用を詳細に検討し、血管内皮細胞における内皮特異的な機能の発現メカニズムの解明を試みた。GATA タンパクに対する特異抗体を用いた研究によって、主に GATA-6 が、また他にも GATA-2、GATA-3、GATA-4 が TNF α による VCAM-1 発現誘導に関与していることが明らかにされた。また GATA-4 と GATA-6 を含む複合体の存在も示唆された。HUVEC における GATA タンパクの役割を解析するために、まず遺伝子導入効率が低いことが知られている HUVEC への高効率遺伝子導入法を決定した。この実験条件に基づいて GATA-2、GATA-3、GATA-4、および GATA-6 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製し、HUVEC に導入してそれぞれの GATA タンパクの発現を抑制した結果、GATA-6 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが最も強く VCAM-1 発現誘導に対して抑制作用を示し、GATA-6 の存在が VCAM-1 の発現誘導に対して必要条件であることが明らかとなった。さらに、GATA-3 を HUVEC

に過剰発現させたところ、VCAM-1 の発現が抑制されたことから、GATA-3 が VCAM-1 発現に対して抑制的に働くことが示された。これらの結果から、血管内皮細胞において、GATA タンパクがそれぞれ異なる機能および炎症性サイトカインに対する反応性を持ち、VCAM-1 発現誘導における転写調節に GATA-3 が抑制的に、一方で GATA-6 が促進的に働き、TNF α 刺激により VCAM-1 遺伝子プロモーター領域 GATA 配列における結合に GATA-3 から GATA-6 への構成成分の変化がおこることにより、VCAM-1 の遺伝子発現が開始されるという新たな転写メカニズムが存在することが明らかとなった。

本研究において、内皮細胞での VCAM-1 誘導における GATA ファミリータンパク群の重要性と、GATA タンパクの結合活性の制御が炎症をはじめとした内皮機能不全状態に対する有用な治療法のアプローチとなる証拠が示された。今回得られた化合物 K-7174 は GATA タンパクの生理的役割の解明のための強力なツールとして有用であるだけでなく、新規作用機序を有する抗炎症剤として臨床に用いる薬物のリード化合物としても有望である。本研究は様々な炎症反応の場である血管内皮細胞における分子レベルおよび遺伝子転写調節に関して新たな知見を提供するものであり、動脈硬化をはじめとした炎症性疾患に対する新規治療法を開発するための基礎研究として極めて意義深いものである。