

審査の結果の要旨

氏名 廖海孫 (Haisun Liao)

本研究は、アテローム性動脈硬化の発症において重要な役割を果たすマクロファージスカベンジャー受容体クラスAの発現の分子機構を明らかにし、同時に、アテローム病巣において集積するクラスAスカベンジャー受容体発現マクロファージがアポトーシスに抵抗性を示す事と、その誘導にどのような関連があるかを明らかにするための解析を行い、下記の結果をえている。

1. マクロファージへの新規の高効率遺伝子導入法を開発。

マクロファージ系細胞における遺伝子発現の検討に大きな問題となるのは、マクロファージ系細胞に高効率で遺伝子導入を行うことが困難なことである。マクロファージ系細胞への一連の遺伝子導入条件の検討を行い、至適DNA濃度(50ug/ml)、ポレーション時のRPMI1640の使用、960uF, 400V、室温(冷却をさける)という条件により従来より20倍の導入遺伝子発現効率の向上をえた。

2. クラスAスカベンジャー受容体のプロモーターの解析。

上記の条件において、まずクラスAスカベンジャー受容体のプロモーター領域の解析を行い、マウスの培養マクロファージ系細胞において、-630から+50の配列中に上流6kbまででのもっとも促進的効果を示すエレメントが存在することを明らかにし、-504から-485の領域にマクロファージ特異の転写調節領域があり、ここにある蛋白がマクロファージ特異に結合することをDNAフットプリント、ゲルシフトアッセイで証明した。

3. IL-6によるクラスAスカベンジャー受容体転写活性調節の分子機構。

IL-6は炎症性の急性蛋白の発現を促進し、ある種のリンフォーマやハイブリドーマでは生存保持因子として働く。まずマクロファージ系細胞での作用を検討したところ、IL-6はクラスAスカベンジャー受容体のリガンドである蛍光標識アセチルLDLの取り込みを著しく抑制することを発見した。次にIL-6が濃度依存的に1型およびII型の

両方のクラスAスカベンジャー受容体mRNAの発現を抑制することを発見した。そこでマクロファージ系細胞への遺伝子導入法を用いて-630から+50の配列のルシフェラーゼをレポーターとした転写活性がIL-6により抑制されることを証明した。とくにAP-1/etsシスエレメント活性が抑制されることがわかった。

4. クラスAスカベンジャー受容体発現によるマクロファージのアポトーシス抑制。

動脈硬化に集積したマクロファージ系細胞はその病巣で一部増殖活性を示すなどアポトーシス抵抗性が知られている。培養ヒト単球系細胞THP-1細胞をフォルボルエステル処理しマクロファージ系細胞へ分化させ、クラスAスカベンジャー受容体を発現させるとNaFの5mMまでのアポトーシス誘導において生存率が有意に上昇する。CHO細胞はクラスAスカベンジャー受容体を過剰に発現させると強固に培養ディッシュにEDTA抵抗性に接着する。この条件下でNaFによるアポトーシス誘導を試みると受容体細胞は生存率の有意な上昇を示した。スカベンジャー受容体過剰発現CHO細胞は、酸化LDLまたは7ketocholesterolにより誘導されるアポトーシス対しても抵抗性になり生存率が有意に上昇した。

クラスAスカベンジャー受容体ノックアウトマウスの腹腔マクロファージで検討すると、上記の濃度範囲で生存率は有意に低下し、クラスAスカベンジャー受容体のアポトーシス抑制活性はクラスAスカベンジャー受容体の機能に依存することが強く示唆された。

クラスAスカベンジャー受容体欠損マウスではアテローム病巣サイズは顕著に縮小することが知られている。本研究は、マクロファージへの高効率遺伝子導入法を開発し、それを用いて、クラスAスカベンジャー受容体の転写調節機構を解析し、アポトーシス抵抗性への関与と、炎症性サイトカインによるその発現抑制は、動脈硬化発症におけるクラスAスカベンジャー受容体のあらたな関与のメカニズムに新たな理解をもたらした。以上より学位の授与に値するものと考えられる。