

論文の内容の要旨

論文題目 心血管細胞のストレス応答機構と液性因子による修飾

転写因子BTEB2/ KLF5及び液性因子Klothoの
心血管リモデリングにおける役割の検討

指導教官 循環器内科学 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10年 4月入学

医学博士課程

循環器内科学専攻

氏名 天 木 幹 博

要旨

心血管細胞は常に変動する外的ストレスにさらされ、遺伝子発現や細胞の性質を変化させている。心血管リモデリングはストレスに対する生体の適応現象とも考えられるが、同時に病態進展と密接に結びついている。心臓リモデリングは、心筋梗塞後心拡大や高血圧による心肥大等で認められるが、過度に進むと逆に心機能を悪化させる。血管リモデリングは、細胞増殖、細胞遊走、細胞外マトリックスの産生分解などの過程を含む血管壁の構造の変化であり、動脈硬化症、PTCA後再狭窄等で認められる。これらの機序については細胞内シグナルに注目した研究が主として行われてきたが、遺伝子転写制御レベルでの解明は進んでいない。我々は、心血管リモデリングの分子機構に関し、特に血管平滑筋細胞の活性化に着目した研究から、転写因子BTEB2/KLF5を単離同定した。BTEB2/KLF5は、血管傷害に応答して新生内膜を形成する平滑筋細胞に強い発現を認める。In vitroの検討では胎児型ミオシン重鎖遺伝子等の発現を亢進させる転写因子であることが分かっており、ストレス応答としての心血管リモデリングの転写制御に機能している可能性が考えられる。しかしin vivoでのBTEB2/KLF5の意義は解明されていない。そこで本研究では、BTEB2/KLF5遺伝子ノックアウトマウスを新たに樹立し、転写因子BTEB2/KLF5の心血管リモデリング応答における意義を明らかにすることを第一の課題とした。

一方、心血管リモデリングは多くの液性因子によって修飾されている。アンギオテンシンII (Ang II)、エンドセリン等のリモデリングを正の方向に修飾する一連の因子と、アドレノメデュリン、NO等に代表されるリモデリングを負の方向に修飾する一連の因子があ

る。老化関連遺伝子*klotho*は老化に伴う組織リモデリングを修飾する液性因子と考えられている。*klotho*はトランスジェニックマウス開発中に、動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、肺気腫等ヒトに見られる多彩な老化特徴を示すマウスから老化抑制遺伝子として単離された。しかし*Klotho*の分子機構は全く不明である。そこで本研究では*Klotho*の心血管リモデリング修飾における分子機構の解明を第二の課題とした。

BTEB2/*KLF5*ノックアウトマウスの作成にあたっては、エクソン2-3をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。Southern blot法にてgerm line transmissionを示す2ラインを確認し以後の解析に用いた。ホモ接合体は発生早期に致死であった。ヘテロ接合体 (BTEB2/*KLF5* +/-) は、野生型と比較して有意に体重減少を認める他は外見上異常が認められなかった。BTEB2/*KLF5* +/-の大動脈は、野生型と比較して大動脈壁が薄く外膜の発達不良を認めた。胸部大動脈を摘出し、大動脈リング標本において薬剤による反応を検討したところ、12ヶ月齢の加齢マウスにおいては、アセチルコリン、アドレノメデュリンに対する血管弛緩反応、エンドセリン-1、Ang IIに対する血管収縮反応とも野生型に比べ低下していた。次に病態モデルを作成して、傷害に対するBTEB2/*KLF5* +/-の心血管リモデリング応答の変化を検討した。大腿動脈内膜剥離血管傷害モデルでは、BTEB2/*KLF5* +/-マウスにおいて、新生内膜肥厚が有意に抑制されていた。また、大腿動脈カフ傷害モデルでは、BTEB2/*KLF5* +/-において、炎症に伴う線維性組織の増殖、新生内膜形成、外膜における反応性微小血管の形成が低下していた。更に、下肢動脈結紮モデルで血流回復を測定したところ、BTEB2/*KLF5* +/-では血流回復の遅延が認められ、BTEB2/*KLF5*が虚血に伴う血管新生に関与している可能性が示された。

次に心リモデリングの検討として、持続的Ang II負荷実験を行ったところ、野生型では心筋細胞の肥大と間質の線維化、冠動脈周囲の線維化が認められたが、BTEB2/*KLF5* +/-マウスでは、いずれの反応も著明に低下していた。

以上の結果はBTEB2/*KLF5*が、臓器傷害後に誘導される線維芽細胞、平滑筋細胞、免疫系細胞の活性化と増殖、その結果としての肉芽形成、線維化、血管新生、ひいては臓器リモデリングを制御している重要な転写因子であることを示している。一方、腸間膜動脈虚血再灌流傷害モデルを作成し、急性傷害への応答を検討したところ、BTEB2/*KLF5* +/-マウスでは傷害性変化が強く現れ、急性傷害に対する応答においては、BTEB2/*KLF5*が保護的に働いている可能性も示唆された。

次に我々は*Klotho*について検討を進めた。*klotho*遺伝子欠損マウスホモ接合体では、動脈硬化の自然発症がみられた。一方ヘテロ接合体は、定常状態では動脈硬化性変化は認めないが、大動脈リング標本におけるAch投与に対する血管拡張作用は野生型と比べ低下しており、また、尿中のNO代謝産物は野生型と比較し著明に低下していた。こうした結果から*Klotho*蛋白は血管に対して、一酸化窒素(NO)産生を介した内皮機能制御に関与する可能性が考えられた。

*Klotho*の作用機序を更に検討するために膜型*Klotho*の全長を発現するアデノウイルス及

びpartialのアデノウイルスを作製した。klotho遺伝子変異マウスヘテロ接合体に、膜型klotho遺伝子を組み込んだアデノウイルスを筋注によって投与したところ、膜型Klothoの全長では野生型と同程度まで内皮弛緩反応の改善がみられ、N末274アミノ酸を発現するpartialのものでは改善がみられなかった。

次に我々は、Klothoの血管内皮細胞における機能を調べるため、アデノウイルスのヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）への導入実験を行った。まず、Klothoの培養血管内皮細胞生存への影響を検討するために、MTS assayを施行した。しかし、アデノウイルスを導入したHUVECではKlothoの発現に関わらず、MTS値の上昇を生じてしまった。Aktシグナルの検討でも、アデノウイルス蛋白自体によるHUVEC活性化を生じてしまった。以上の結果よりアデノウイルスを用いた評価は困難であると考えられたため、次にバキュロウイルスを利用した蛋白発現系を用いることを試みた。ウイルス膜にKlothoが発現したバキュロウイルスを用い、HUVECにおけるAktリン酸化シグナルの変化に差は見られなかった。次にセンダイウイルスを用いてKlothoを導入してシグナルの検討を行った。コントロールと比較してeNOSのリン酸化の増強が認められ、Klothoの細胞内シグナルはeNOSのリン酸化を介している可能性が示された。培養細胞での情報伝達メカニズムの解析については更なる検討が必要である。

本研究では、遺伝子改変マウスを用いた検討から、BTEB2/KLF5が傷害応答としての心血管リモデリングを正の方向に転写制御していることを明らかにした。一方Klothoは、液性因子として機能し、血管内皮機能を改善することでリモデリングを抑制する方向に修飾している可能性を示した。今後、BTEB2/KLF5を中心とした転写制御と、液性因子Klothoの情報伝達経路との関係を更に明らかにする必要がある。同時にこうした分子機構の理解が、心血管リモデリングを制御する新たな治療法の可能性を開くものと期待される。