

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 相澤 健一

本研究は、最近同定された転写因子 KLF5 が PDGF-A 遺伝子の活性化を介し心血管リモデリングに重要な役割を演ずるメカニズムを、様々な分子生物学的手法を用いて主に転写レベルで詳細に解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. PDGF-A プロモータの欠失変異体を用いた解析により、まず KLF5 が PDGF-A プロモータを活性化し、さらにその反応領域は近位プロモータ-71~-55 であることを見いだした。ゲルシフトアッセイにより同領域に KLF5 が結合した。クロマチン免疫沈降アッセイにより細胞内で PDGF-A プロモータに KLF5 が結合することを確認した。アデノウイルス発現ベクターにより KLF5 を培養線維芽細胞に過剰発現させたところ、PDGF-A mRNA の発現が誘導された。さらに、siRNA による細胞内 KLF5 ノックダウンにより PDGF-A の発現が特異的に低下した。したがって PDGF-A が KLF5 の真の標的遺伝子であり、細胞レベルでも PDGF-A の発現を正に制御していることが示された。
2. 細胞内の様々なストレス刺激が、核内の作用因子 KLF5 を如何に制御するか解明するために KLF5 のコファクターとシグナルが検索された。免疫沈降法により細胞内で KLF5 と p300 が結合し、RI を用いたパルスラベル法により細胞内で KLF5 が p300 によりアセチル化されることが示された。KLF5 は p300 により相乗的に PDGF-A プロモータを活性化した。KLF5 の 369 番目のアミノ酸残基をリジンからアルギニンに置換し、p300 によってアセチル化されない KLF5 の変異体が作成された。アセチル化変異型 KLF5 は野生

型 KLF5 に比べ、p300 による PDGF-A プロモータの相乗的活性化作用が約 30%低下していた。つまり、KLF5 は p300 によるアセチル化刺激を受け、転写活性化を正に制御することが示された。

3. 免疫応答反応における KLF5 の役割が検索された。KLF5 と NF- κ B を共発現させると PDGF-A プロモータは相乗的に活性化し、免疫沈降法により KLF5 と NF- κ B は細胞内で結合することが示された。さらに、欠失変異体を用いた解析により、KLF5 と NF- κ B の相乗作用が生じるために重要な PDGF-A プロモータ上のエレメントは KLF5 の作用部位と一致することが示された。実際、ゲルシフトアッセイにより PDGF-A プロモータ上で KLF5 と NF- κ B が相互作用することが確認された。したがって、NF- κ B による炎症応答には KLF5 を介している可能性が示された。
4. 上記の知見より、KLF5 の転写活性化能を抑制できれば、KLF5 活性化による心血管組織のリモデリングを抑制することが期待された。この仮説に基づき、KLF5 の転写活性化能を調節する化合物が検索された。そのうち RAR のアゴニストである Am80 は KLF5 の転写活性化能を抑制した。実際、Am80 はマウスカフ障害モデルにおいて新生内膜形成を抑制し、動物モデルでもその効果が確認された。

以上、本論文は KLF5 が、活性化刺激や組織リモデリングを受けて心血管障害時に細胞が反応する際の急性反応を司る主要な因子であることを位置づけた。さらに、KLF5 の転写活性化を抑制する化合物を見出し、KLF5 活性化によるリモデリングを抑制する可能性を示した。本研究は心血管リモデリングにおける病態生理の解明、ひいては新規治療薬開発につながる可能性を有する非常に貢献度の高い研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。