

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮細胞のプラスミノゲン・アクチベーター産生に及ぼす
流れずり応力の効果

指導教官 安藤 譲二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 曾我部 隆彰

1. 研究の背景と目的

血管内皮細胞は、血管系の恒常性維持や機能制御において中心的な働きを担っている。内皮細胞の機能調節には、ホルモンやサイトカインといった生理活性物質に加えて、血流に起因する流れずり応力という物理刺激が大きく関与していることが、近年の研究で明らかにされてきた。内皮細胞には流れずり応力を感知する機構が備わっており、その強度や性質に応じて細胞応答を変化させることが知られている。生体において、内皮細胞に負荷される流れずり応力は一様でなく、流れの方向に定常性のある層流が負荷されている部位と、時間的・空間的に非定常な乱流が負荷されている部位が存在する。これらの性質の異なる流れ刺激に応答した内皮細胞の機能変化について解析を行うため、本研究室では、培養内皮細胞に層流、または乱流を負荷したときの遺伝子応答を、DNA マイクロアレイ法を用いて包括的に検討した。流れずり応力応答性の遺伝子の中には、血管のリモデリングに関連する遺伝子が数多く含まれていた。その中でも、線溶系因子ウロキナーゼ型プラスミノゲン・アクチベーター (uPA) について、層流により発現が減少し、一方で乱流により増大するという興味深い結果が得られた。uPA は、血管組織中でプラスミン活性を発揮することで、マトリクスメタロプロテアーゼなどとともに細胞外基質を分解し、細胞遊走を必要とする血管新生や、創傷治癒、動脈硬化などに働く。特に、乱流発生部位に好発と言われている粥状動脈硬化病変では、内皮細胞、平滑筋細胞、

およびマクロファージにおいて uPA の発現が亢進しており、血管内腔の狭窄を引き起こす内膜肥厚形成には、中膜からの平滑筋の遊走および増殖が起きていることから、uPA が動脈硬化の進展に関わる重要な因子であることが示唆されてきた。しかしこれまで内皮細胞において、流れずり応力による uPA の発現様式や制御については、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、培養内皮細胞に層流または乱流を定量的に負荷し、uPA の発現パターンとその制御機構について詳細な検討を行った。

2. 方法

層流性の流れずり応力負荷には、平行平板型装置を用いた。細胞の付着したガラス板上を培養液が平行に灌流し、ポンプの出力により流量を増減させることにより、方向と強さに定常性のある流れずり応力を定量的に負荷することができる。乱流性の流れずり応力負荷には、回転円錐型装置を用いた。5° の角度を持つ円錐盤を、培養液を含む培養皿の中で回転させると、遠心力によって 2 次流が発生し、時間的・空間的に非定常な流れを負荷することができる。流れずり応力の強度は、層流、乱流ともに 1.5 dynes/cm²で行った。

ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAECs) をガラス板上で培養し、層流、または乱流を 48 時間まで負荷した。細胞から経時的に total RNA を抽出し、逆転写した cDNA を鋳型に、uPA の mRNA レベルを real-time PCR 法で定量した。また、流れ負荷時に培養液中に分泌された uPA の蛋白量を、ELISA 法により定量した。

uPA の転写活性を測定するために、nuclear run-on assay、および luciferase reporter assay を行った。nuclear run-on assay では、層流、または乱流を負荷した細胞の核を用いて *in vitro* 転写反応を行い、uPA の mRNA を、メンブレンに固定した uPA の DNA と結合させることで検出した。luciferase reporter assay では、uPA のプロモーター領域を持つ luciferase ベクターをウシ胎児大動脈内皮細胞に導入し、層流、または乱流を負荷した。発現した luciferase の活性を、ルミノメーターを用いて定量した。また uPA プロモーターの deletion analysis により、流れずり応力に応答する転写因子結合領域の特定を行った。

uPA のプロモーター、あるいは 3'非翻訳領域 (3'UTR) に結合する因子を検索するために、gel shift assay を行った。流れ負荷を行った細胞から核蛋白を抽出し、プロモーター領域のプロローブと結合させることで、転写調節に関わる因子を特定した。また細胞から細胞質蛋白を抽出し、3'UTR をプロローブにした結合反応を行い、mRNA の安定性調節に関わる因子の検討を行った。

層流、または乱流を負荷した細胞にアクチノマイシン D (Act-D) を添加し、経時的に total RNA を回収し、競合的 PCR を行うことにより uPA の mRNA の安定性を定量した。

3. 結果

3-1) 流れずり応力による内皮細胞の uPA 発現変化

HCAECs に層流を負荷すると、uPA の mRNA 量は 12 時間でコントロールの $22.7 \pm 8.55\%$ まで減少し、48 時間後も $81.1 \pm 11.1\%$ に抑えられていた。一方、乱流を負荷した場合には、mRNA 量は 24 時間で最大 $284 \pm 33.25\%$ まで増強され、48 時間後も 200% 以上を保っていた。次に、uPA の蛋白分泌量を検討したところ、コントロールにおいては 24 時間後に最大で $16.6 \pm 1.43 \text{ ng/mL} \cdot 10^6 \text{ cells}$ であった (図 1)。層流を負荷すると、uPA 分泌量は 12 時間後に最大で $3.42 \pm 1.72 \text{ ng/mL} \cdot 10^6 \text{ cells}$ にとどまり、常にコントロールを下回った。一方、乱流を負荷した場合は顕著な uPA 分泌増加を示し、12 時間で最大 $35.8 \pm 4.5 \text{ ng/mL} \cdot 10^6 \text{ cells}$ となり、常にコントロールの 2 倍以上の分泌量を示した。従って、uPA の mRNA の発現量と蛋白の分泌量は良く一致し、ともに層流で減少し、乱流で増大した。

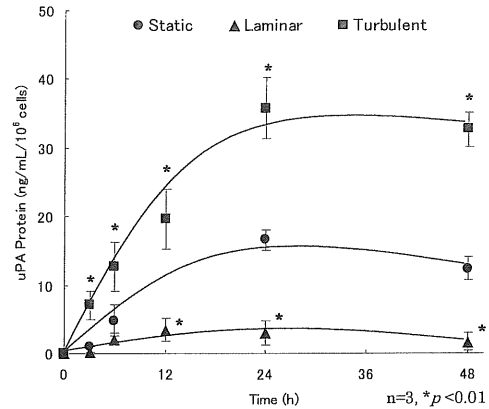


図1. 内皮からのuPA分泌

3-2) 流れずり応力による uPA 遺伝子の転写調節

nuclear run-on assay により uPA の転写活性を測定したところ、層流を負荷した HCAECs では、活性が $70.2 \pm 16.4\%$ まで低下した。一方で乱流を負荷した時の活性は、 $95.2 \pm 29.1\%$ で変化がなかった。さらに luciferase reporter assay により、層流負荷による uPA の転写活性は、コントロールの $69.3 \pm 7.65\%$ まで減少した (図 2 uPA(-2345))。続いて uPA プロモーターの deletion analysis を行い、転写開始点の上流-782 から-537 bp の領域に、uPA の転写活性を抑制

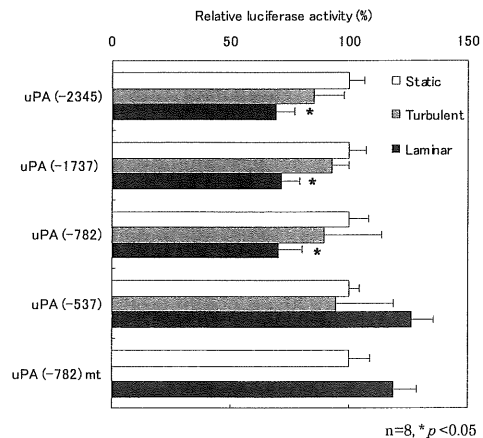


図2. uPAプロモーターの活性

する部位があることが示された。この領域においてオリゴプローブを作製し、核蛋白抽出液との結合反応を行った結果、層流により-703 から-674 bp の領域と複合体を形成する因子が存在した。この領域に転写因子 GATA の結合モチーフが存在したことから、GATA 抗体を用いた supershift assay を行ったところ、層流による複合体形成が明らかに減衰した。さらに、GATA のコンセンサス配列を持つプローブとの結合が、層流で増大した。GATA 結合部位に変異を導入した luciferase reporter assay では、uPA の転写活性が層流で抑制されなかった (図 2 uPA(-782) mt)。これらの結果から、GATA の活性化が uPA の転写を抑制することが示された。

3-3) 流れずり応力による uPA の mRNA の安定性調節

nuclear run-on assay において、乱流は uPA の転写活性を変化させなかったことから、層流とは異なる機構によって uPA の発現を調節していると考えられた。そこで、流れ負荷を行った HCAECs の転写を Act-D で停止させ、uPA の mRNA の安定性について検討した。コントロールでは、mRNA の半減期は約 130 分であった。層流を負荷した細胞では半減期は約 70 分で、安定性が低下した。乱流を負荷した細胞では約 270 分で、mRNA の安定性が有意に上昇した。mRNA の安

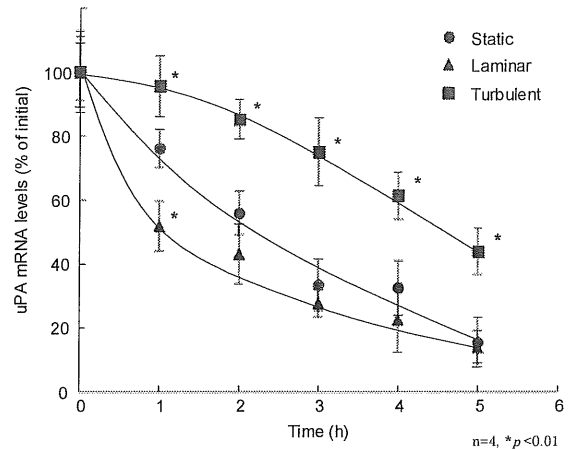


図3. uPAのmRNAの安定性

定性の調節に関わるとされる 3'UTR において、AU リピート、または安定性調節因子の結合部位をプローブに用いて、細胞質蛋白との結合反応を行ったが、コントロール、層流、および乱流で、これらの領域と複合体を形成する因子に変化はなかった。

4. 結語

4-1) HCAECs に層流を負荷すると、uPA の mRNA、および蛋白量が減少した。一方で乱流を負荷すると、uPA の mRNA、および蛋白量が増加した。乱流刺激にともなう uPA の分泌増加は、生体における乱流発生部位での uPA 発現増加と一致する結果であった。乱流が内皮細胞の機能を修飾し、uPA の産生を増大させることで、粥状動脈硬化病変の発生・進展に寄与していると考えられる。

4-2) 層流刺激により、転写因子 GATA が uPA のプロモーター領域に結合し、転写を抑制した。さらに mRNA の安定性が低下し、ともに uPA の発現量の減少に寄与した。流れずり応力に応答する転写因子としては、NF- κ B や Sp-1、Egr-1 などが知られているが、GATA を介した転写調節は、これまで報告のない新しい機構である。

4-3) 乱流による uPA 発現の増加は、mRNA の安定性の増大によるものであった。mRNA の安定性調節には、AU リピートや安定性調節因子の結合領域は関与しなかったことから、これまでに知られていない領域、あるいは機序が存在すると考えられる。

これらの結果から、内皮細胞は、uPA の発現を流れずり応力依存的に制御することが示された。さらに層流や乱流といった流れの性質の違いによって、転写活性、あるいは mRNA の安定性という全く異なる機序を介して、遺伝子の発現調節を行うことが明らかになった。以上のことから、内皮細胞には層流と乱流を異なる情報として感知し、応答する機構が備わっていると考えられる。