

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 曾 我 部 隆 彰

本研究は血管内皮細胞において、動脈硬化の進展に重要な働きを持つ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) の発現に及ぼす流れずり応力の効果について明らかにすることを目的として、内皮細胞に性質の異なる流れずり応力を負荷し uPA 遺伝子の発現調節機構について解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 培養ヒト冠状動脈細胞 (HCAECs) に層流性のずり応力を負荷したところ、uPA の mRNA レベルが低下し、一方で乱流性のずり応力によって mRNA レベルは増加することが示された。さらに HCAECs からの uPA 蛋白の分泌量についても、層流によって減少し乱流によって増大することを明らかにした。
2. HCAECs の核における uPA 遺伝子の転写量を nuclear run-on assay により測定したところ、層流によって uPA 遺伝子の転写活性はコントロールの約 60%まで低下し、一方で乱流によっては転写活性は変化しなかった。uPA 遺伝子のプロモーター領域を持つルシフェラーゼベクターをウシ胎児大動脈内皮細胞に導入して luciferase reporter assay を行ったところ、層流でプロモーター活性は低下したが、乱流では有意な変化はなかった。これにより、uPA 遺伝子の転写活性は層流により低下し、乱流では変化しないことを示した。
3. ルシフェラーゼベクターを用いた deletion analysis の結果、uPA プロモーターの転写開始点から上流-782~-537 bp の領域に、層流によって負の制御を受ける部位があることが示された。この中に存在する転写因子 GATA の結合モチーフに塩基置換による変異を導入したところ、層流によるプロモーター活性の低下が見られなくなった。そこで GATA 結合モチーフを含む領域でプローブを作製し gelshift assay による検討を行ったところ、転写因子 GATA がこの領域に結合し、さらに層流によってその結合量が増加することが明らかとなった。また GATA 抗体を用いた supershift assay を行い、uPA プロモーターに結合するサブタイプは GATA6 であることが示された。これにより層流によって転写因子 GATA6 が uPA 遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写活性を負に制御することを明らかにした。

[別紙 2]

4. HCAECs にアクチノマイシン D を添加し新規の mRNA 合成を停止させて uPA の mRNA の代謝速度を測定したところ、層流を負荷した HCAECs では uPA の mRNA の半減期はコントロールの約 2 時間から 1 時間に早まった。一方で乱流を負荷した HCAECs では半減期は 4 時間以上に延びた。これにより uPA の mRNA の安定性は層流により低下し、乱流により上昇することを明らかにした。

5. mRNA の安定性に関わるとされる 3'非翻訳領域 (3'UTR) に結合する調節因子について検討するため、3'UTR に存在する調節領域の RNA プローブを作製し UV cross-linking assay を行ったところ、アデニンとウリジンの繰り返し配列 (AU-repeat) に約 45 kDa および 40 kDa の因子が結合することが示された。さらに 45 kDa の因子は層流により AU-repeat から解離し、一方で 40 kDa の因子は乱流によって結合量が増加した。従って uPA の mRNA の安定性は、AU-repeat への二つの調節因子の結合量によって調節されている可能性が示された。

以上より、本論文は血管内皮細胞が層流あるいは乱流にともなう流れずり応力を異なる刺激として感知し、それぞれの性質に依存した複数のシグナル経路を介して、動脈硬化の進展に関わる uPA 遺伝子の発現をそれぞれ逆に制御することを明らかにした。この結果は、動脈硬化が血管の分岐部などの乱流発生部位に好発し、その部位では uPA の発現が上昇しているという臨床的知見を支持するものであり、流れずり応力が生体においても重要な働きを担っていることを示した。従って本研究は、医学の進展に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。