

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 血管炎症における calcineurin の役割

指導教官 後藤淳郎助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

内科学専攻

氏名 里中 弘志

背景・目的

最近 serine/threonine protein phosphatase である calcineurin が心肥大の形成に重要な役割を果たすことが明らかにされた。心肥大の促進因子により calcineurin は  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodullin 依存性に活性化され、心肥大形成に関わる各種遺伝子の転写を促すことが報告されている。一方 calcineurin の血管での役割についてはまだ十分には知られていないが、血管平滑筋細胞で calcineurin の強制発現により形質変換の重要なマーカーである non-muscle myosin heavy chain B (NMMHCB) 遺伝子の発現が促されること、また calcineurin の経路は angiotensin II による NMMHCB 発現の活性化にも関与することが示されている。これより calcineurin は血管でも重要な役割を果たしている可能性が示唆される。本研究では calcineurin 血管平滑筋細胞での MCP-1 の発現および血管炎症への calcineurin の関与について検討した。

方法

- 1) ヒト calcineurin A の C 末端 calmodulin 結合部位を欠失した constitutively active mutant (CalA $\Delta$ C) を発現するアデノウイルス (AdCalA $\Delta$ C) を作成した。
- 2) ラット培養血管平滑筋細胞に AdCalA $\Delta$ C を感染させ real time PCR 法で MCP-1 mRNA の発現を、ELISA 法で MCP-1 蛋白の発現を検討した。angiotensin II (AngII) 刺激下で cyclosporin A (CyA) 投与の MCP-1 発現に及ぼす影響についても同様に検討した。
- 3) CalA $\Delta$ C 発現下での MCP-1 promoter (2.6kb) 活性を luciferase assay により評価した。AdCalA $\Delta$ C 感染時の MCP-1 mRNA の安定性を actinomycin D 投与により検討した。
- 4) ラット大腿動脈の内腔を wire で損傷し、血管壁での MCP-1 mRNA 発現、新生内膜形成、マクロファージ浸潤への CyA 投与の効果を検討した。

## 結果

### 1. calcineurin の血管平滑筋 MCP-1 mRNA 発現への影響

calcineurin A の constitutively active mutant を発現するアデノウイルスベクター AdCalA  $\Delta$  C をラット培養平滑筋細胞に感染させ、MCP-1 mRNA の発現を real time PCR 法にて評価した。AdCalA  $\Delta$  C 10 MOI の感染により MCP-1 mRNA の発現は、AdGFP によるコントロール感染に比べ有意に増加した。CyA  $10^{-6}$  mol/L の 24 時間前投与で、AdCalA  $\Delta$  C 感染による発現の増加は有意に抑制された。

### 2. AngII 刺激下での血管平滑筋 MCP-1 mRNA 発現への CyA の影響

血管平滑筋細胞を AngII ( $2 \times 10^{-7}$  M) で 8 時間刺激すると MCP-1 mRNA の発現は有意に増加し、CyA の 24 時間前投与によりこの増加は有意に抑制された。AdMEK6AA 感染および valsartan  $10^{-7}$  mol/L の前投与でも AngII 刺激での MCP-1 mRNA 発現増加は有意に抑制された。以上より AngII による MCP-1 mRNA 発現活性化への calcineurin の関与の可能性が示された。

### 3. calcineurin の血管平滑筋 MCP-1 promoter 活性への影響

ルシフェラーゼ遺伝子上流に 2644bp の MCP-1 promoter を組み込んだレポータープラスミドを血管平滑筋細胞へ transfection した。CalA  $\Delta$  C を発現するプラスミドを同時に cotransfection しても promoter 活性の増加は認められなかった。AngII 刺激でも promoter 活性は有意に増加し、valsartan の前投与および MEK6AA を発現するプラスミドの cotransfection によって増加は有意に抑制された。一方 AngII 刺激下で CyA の前投与によっても promoter 活性は抑制されなかった。これらの結果から calcineurin は少なくとも一部は mRNA 安定化により MCP-1 の発現を増加させる可能性が考えられた。

### 4. 血管平滑筋 MCP-1 mRNA の安定性への calcineurin の影響

AdCalA  $\Delta$  C および AdGFP 感染 3 日後の血管平滑筋細胞に actinomycin D を投与し MCP-1 mRNA の安定性を評価した。MCP-1 mRNA の半減期は AdGFP 感染時の 0.7 時間に比べ AdCalA  $\Delta$  C 感染時には 1.8 時間へと延長がみられた。AdCalA  $\Delta$  C 感染細胞に CyA を前投与すると MCP-1 mRNA の安定化は抑制された。また AngII 刺激によっても MCP-1 mRNA は安定化され、CyA 前投与により安定化の効果は抑制された。これらの結果から calcineurin は少なくとも一部は mRNA 安定化により MCP-1 の発現を増加させることが示唆された。

### 5. 血管平滑筋 MCP-1 蛋白発現への calcineurin の影響

血管平滑筋細胞に AdCalA  $\Delta$  C および AdGFP を感染させ 3 日後に新たに培養液を交換し、incubate された培養液中の MCP-1 蛋白量を ELISA 法で測定した。AdCalA  $\Delta$  C を感染した細胞では、incubation 開始 8 時間後より AdGFP 感染に比べて MCP-1 蛋白量の有意な増加がみられ 16 時後も増加が持続した。CyA の 24 時間前投与により AdCalA  $\Delta$  C 感染による MCP-1 蛋白発現の増加は完全に抑制された。また AngII の 12 時間刺激でも培養液中 MCP-1 蛋白量は有意に増加し、この増加は CyA の 24 時間前投与で完全に抑制された。

## 6. CyA による wire 傷害後新生内膜形成の抑制

ラットの大腿動脈内腔をワイヤで傷害したモデルで CyA の効果を検討した。傷害から 3 日後、血管壁で MCP-1 mRNA 発現量は傷害していないコントロールに比べ有意に増加しており、CyA (10mg/kg/日) の投与は増加を有意に抑制した。傷害から 14 日後の新生内膜形成は CyA 投与群で非投与群に比べ有意に抑制された。マクロファージの浸潤は主に新生内膜にみとめられ、浸潤マクロファージ数は CyA 投与群で有意に抑制された。

### 考察

本研究では calcineurin の強制発現により血管平滑筋細胞で MCP-1 の mRNA および蛋白の発現が増加することを示した。また AngII による MCP-1 発現の増加が CyA 投与で抑制されたことから、AngII などの内因性 agonist が calcineurin 依存性の経路により MCP-1 発現を活性化する可能性が示された。血管平滑筋での calcineurin の強制発現により MCP-1 promoter 活性は増加せず、少なくとも一部は mRNA の安定化の機序を介すると考えられる。またラット大腿動脈内腔を wire で傷害したモデルで、CyA 投与により血管壁での MCP-1 mRNA の発現、マクロファージの浸潤、新生内膜の形成が抑制され、in vivo の系で calcineurin が MCP-1 の発現を介して血管炎症を促進する可能性が示された。calcineurin が動脈硬化や angioplasty 後再狭窄など血管炎症性疾患を制御する上で新たな標的となる可能性が示された。