

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大 内 田 理 佳

動脈硬化症をはじめとする各種血管疾患において、血管平滑筋細胞の増殖がその病態と深く関与していることが知られている。本研究は、血管平滑筋細胞の増殖機構を解明するため、血管平滑筋細胞において分化誘導剤 hexamethylene bisacetamide (HMBA) で発現誘導される HEXIM1 の機能を解析し、血管平滑筋細胞における HEXIM1 の生物学的意義を明確にすることを目的としたものであり、下記の結果を得た。

1、血管平滑筋細胞における HEXIM1 の発現と細胞内局在の検討

2-1 ヒト培養血管平滑筋細胞において、HMBA により、HEXIM1 の発現が mRNA およびタンパク質レベルで誘導された。

2-1 ヒト培養血管平滑筋細胞において、抗 HEXIM1 抗体を用いた蛍光抗体法により、HEXIM1 は核優位に点状～網状のパターンで分布することが分かった。また、HEXIM1 は、ヒトの冠動脈および心筋組織において、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞および心筋細胞に核優位に発現していた。

2-1 HEXIM1 分子内のアミノ酸 150-177 の塩基性アミノ酸に富む領域が、核局在シグナルとして機能することを明らかにした。

2、HEXIM1 の遺伝子発現制御における機能の解明

1) HeLa 細胞において、NF- κ B レポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイにより、HEXIM1 は NF- κ B 応答性の転写活性を抑制することを示した。また、HEXIM1 による NF- κ B の転写活性の抑制には、核移行シグナルのみならず、HEXIM1 のアミノ酸 332-359 の領域も必要であった。

2) HEXIM1 は、①NF- κ B の活性化刺激により惹起される I κ B α のリン酸化およびタンパク質分解、②活性化にともなう NF- κ B の核移行と in vitro における DNA 結合活性、には影響を与えなかった。GST-pull down 法により、HEXIM1 の NLS を含む N 末端領域と NF- κ B コンポーネントである p65 の N 末端領域が直接結合することを明らかにし、その相互作用が NF- κ B 転写抑制に重要である可能性を示唆した。

3、血管平滑筋細胞における HEXIM1 の機能の解明

- 1) NF- κ B レポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイにより、HEXIM1 はヒト培養血管平滑筋細胞において NF- κ B の転写活性を抑制した。
- 2) Cre loxP システムを用いた発現誘導型の組み換えアデノウイルス発現系を用いて、ヒト培養血管平滑筋細胞に HEXIM1 を強制発現させたところ、細胞あたりのウイルス数 (MOI) に依存して HEXIM1 の発現が誘導された。内因性 NF- κ B 標的遺伝子発現に与える HEXIM1 の影響を RT-PCR 法により検討した結果、glucose transporter-3 や β -actin と比較して、NF- κ B 標的遺伝子である IL-1 β 、IL-6 および VCAM-1 の mRNA 発現量は HEXIM1 の発現量依存性に抑制された。
- 3) 血管平滑筋細胞において、組み換えアデノウイルスを用いた HEXIM1 強制発現により、ウイルス感染後 5～6 日目においてコントロールの約 30% の増殖抑制が観察された。その効果は HMBA を処理した細胞とほぼ同程度であった。

以上、本論文は、HEXIM1 が NF- κ B の転写因子活性を抑制することにより、血管平滑筋細胞の増殖を負に制御している可能性を示した。すなわち、本研究は血管平滑筋細胞の分化型から増殖型への形質変換メカニズムにおける遺伝子発現制御レベルでの理解を深めるのみならず、血管平滑筋細胞が関わる各種血管疾患の病態解明に貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられた。