

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 血管細胞遺伝子の網羅的発現解析による動脈硬化発症機構の解明
および動脈硬化治療の研究

指導教官 永井 良三教授
東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻

氏 名 興梠 貴英

日本人の死因として、虚血性心疾患は年々増えつつあり、その対策を練ることは急務と考えられる。

虚血性心疾患のほとんどは冠動脈の動脈硬化によって起こると考えられるが、動脈硬化の発生と進展には様々な血管細胞、とりわけ、単球、マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞が重要な役割を果たしており、これまでも数多くの研究がなされてきた。本研究では近年用いることができるようになった DNA マイクロアレイ技術を用いて、単球、血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルおよびそれらに薬剤を加えたときの遺伝子発現パターンの変化を調べ、それを通じて動脈硬化に重要な遺伝子の抽出および解析を行うことにより動脈硬化の発生機序や新たな治療方法への洞察を得ることを目的とした。

初期動脈硬化病変において、マクロファージが脂質を大量に貯め込んだ泡沫細胞が認められることは以前より病理学的に知られてきた。またこのマクロファージは末梢血単球由来であると考えられている。このため、まず、単球およびそれを M-CSF もしくは GM-CSF で刺激してマクロファージに分化させたものを GeneChip™ を用いて網羅的に解析することで、単球からマクロファージに分化する際に重要な遺伝子、特に動脈硬化に関わる遺伝子の新規発見を目的とした。その結果、浮遊細胞であり、無刺激のままであれば約 72 時間でアポトーシスを起こす単球から、接着細胞であり、長期間生存するマクロファージに分化することを反映して、接着関連、アポトーシス関連の遺伝子の変動が認められたほか、apolipoprotein E, lipoprotein lipase, stearoyl-coenzymeA desaturase, LXR α 等の脂質関連遺伝子が分化に際し誘導される遺伝子上位 20 個の 6 つを占めた。特に、LXR α は核内受容体遺伝子としてマクロファージ分化時に最も強く誘導されてくる遺伝子で、その後の他の研究者らの報告により、細胞内からのコレステロールくみ出しに関わる ABCA1 の転写制御に関わることが分かり、マクロファージ特異的に作用する LXR α のアゴニスト薬はコ

レステロールの逆輸送系を促進し、動脈硬化予防・治療薬となりうることが示唆されている。

単球やマクロファージは継代培養を行うことはできず、またベクター遺伝子導入も困難であることより、遺伝子発現解析を行うためには細胞株を用いる必要がある。小児白血病患者より樹立された THP-1 細胞は通常の培養条件では浮遊細胞として単球様の性質を示し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激することにより接着細胞となり、マクロファージ様の性質を示すため、これまでも単球・マクロファージ系の細胞として頻用されてきた。そこで、THP-1 およびそれを PMA で刺激した細胞の遺伝子発現変化を網羅的に解析することにより、単球からマクロファージへの分化機構を研究する細胞として用いることが出来るかどうかを検討した。その結果、遺伝子の変動パターン、もしくは単球・THP-1 間、マクロファージ・PMA 刺激 THP-1 間にはそれぞれ類似の遺伝子も認められるが、全体としての類似性はそれほど高くないことが分かった。単球からマクロファージに分化する際に特に注目していた LXR α については THP-1 における発現も PMA 刺激に伴う誘導も認められず、これらのことより THP-1 を用いて単球・マクロファージの分化機構の解明を行うに当たっては十分な注意が必要であることを示した。

単球が血管内に潜り込んでマクロファージに分化する際に起こる最初のステップは単球と血管内皮細胞の接着であり、これもやはり動脈硬化発症に深く関わる細胞である。近年、高コレステロール血症の治療薬として用いられている HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (statin 薬) がコレステロール低下作用以上の抗動脈硬化的作用を持つことが知られており (pleiotropic effects)、特に血管内皮細胞において抗動脈硬化的な thrombomodulin や KLF2 の遺伝子発現を誘導したり、動脈硬化促進的な PAI-1 や PTX-3 の遺伝子発現を抑制する等、コレステロール低下を介さない直接的な抗動脈硬化作用がこれまでに報告されている。このような遺伝子発現の変化を起こす機序として、statin 薬によりコレステロール合成系の中間代謝産物である geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) の合成が阻害され、Rho ファミリー蛋白の翻訳後修飾である prenyl 化反応が阻害されることによる、という報告がなされており、さらに詳細に解析するためにヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を HMG-CoA 還元酵素阻害剤の一つである pitavastatin、pitavastatin および GGPP、pitavastatin および farnesyl pyrophosphate (FPP)、Rho 阻害薬である C3 transferase、Rac1/Cdc42 の阻害剤である lethal toxin (LT) で処理した後、遺伝子発現解析を GeneChip™ を用いて行った。その結果、これまで pleiotropic effect に関わると報告されている thrombomodulin, KLF2, PTX3, PAI-1 を含む pitavastatin により変動する遺伝子の多くが GGPP 添加によりその変動が抑制され、また Rac1/Cdc42 の阻害剤である LT と pitavastatin による HUVEC における遺伝子変動に類似が認められることから、pitavastatin による内皮細胞の遺伝子発現への変化は Rac1 および Cdc42 が prenyl 化されず機能を失ったためであることが示唆される結果を得た。

Rac1 や Cdc42 の prenyl 化阻害が HUVEC の抗動脈硬化遺伝子発現に重要な役割を果たしていることが示唆され、また prenyl 化阻害により Rac1、RhoA、Cdc42 の細胞膜への結合が阻

害されることが予想されたため、それぞれの細胞内局在が pitavastatin 添加によりどのように変化するかを検討した。細胞内局在はそれぞれの蛋白の green fluorescent protein(GFP)との融合蛋白発現ベクターを作成し(GFP-Rac1、GFP-RhoA、GFP-Cdc42)、HUVEC に感染させることにより解析した。感染させた細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP-Rac1、GFP-RhoA、GFP-Cdc42 はいずれも細胞内全体への分布が認められたが、pitavastatin を添加すると GFP-Rac1、GFP-Cdc42 は核への強い集積を認めようになった。いずれの低分子 G 蛋白質の prenyl 化も C 末端より 4 番目のシステイン残基に GGPP が結合することにより起こるため、それぞれのタンパクの C 末端から 4 つのアミノ酸を削除して prenyl 化できない GFP 融合蛋白発現ベクター(GFP- Δ Rac1、GFP- Δ RhoA、GFP- Δ Cdc42)を作成して HUVEC に感染させて観察したところ、pitavastatin を添加しない状態で GFP- Δ Rac1、GFP- Δ Cdc42 は核への集積を認めた。このため、GFP-Rac1、GFP-Cdc42 の核への集積は pitavastatin 添加により細胞内 GGPP が減少し、Rac1、Cdc42 の prenyl 化が阻害されたためと考えた。また、このことが遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性を考え、Rac1 および Cdc42 の C 末端 4 アミノ酸を削除したアデノウイルス発現ベクターを作成し(Δ Rac1、 Δ Cdc42)、HUVEC に感染させて GeneChip™ で遺伝子変動を解析した。HUVEC への Δ Rac1、 Δ Cdc42 の感染に伴い、pitavastatin 処理で誘導が認められる、KLF2、KLF4、thrombomodulin の発現誘導が認められ、pitavastatin による抗動脈硬化的遺伝子発現の機序の一部に、Rac1、Cdc42 の核への移行が関わっていることが示唆された。

以上のごとく GeneChip™ を用いてさまざまな血管細胞遺伝子の網羅的発現解析を行うことにより、単球・マクロファージにおける動脈硬化発症に重要な遺伝子の発見や、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の pleiotropic effect に関わる遺伝子の発現機序の解明を進めることができたが、今後は個々の遺伝子についても転写調節機構の解明を行うことにより、これらの遺伝子発現の変動が細胞内のどのようなメカニズムにより起こるのかをさらに追求していく必要があると思われる。