

[別紙 2]

審査の結果の要旨

興梠 貴英

本研究では動脈硬化病変形成に重要な役割を果たす血管細胞のトランスクリプトーム解析を DNA microarray 技術の一つである GeneChip を用いて行い、下記の結果を得ている。

1. 単球およびそれを M-CSF もしくは GM-CSF でマクロファージに分化させた際に誘導される遺伝子、抑制される遺伝子を網羅的に解析したところ、既知である apolipoprotein E や lipoprotein lipase 等の遺伝子発現誘導に加え、脂質負荷のない状態ですでに脂質関連遺伝子が複数強く誘導されており、その中でも特に LXR α がマクロファージへの分化に伴い誘導されることを初めて発見した。LXR α は細胞内からのコレステロールくみ出しに関わる ABCA1 を誘導することが知られており、マクロファージ特異的に LXR α を活性化する薬剤はコレステロールの逆輸送系を活性化することによる抗動脈硬化薬となることが期待される。
2. 単球やマクロファージは継代培養を行うことが出来ず、遺伝子導入が困難であることから、それらのモデル細胞株として THP-1 および THP-1 を PMA で刺激してマクロファージ様細胞に分化させた細胞(THP-1PMA)を GeneChip でトランスクリプトーム解析してモデル細胞株としての妥当性を検討した。すると単球/マクロファージと THP-1/THP-1PMA 間で共通に誘導・抑制を受けている遺伝子もあるが、遺伝子変動パターン全体としては異なる点が多いことや遺伝子発現プロファイル全体の比較をした際にも、両系統間での違いが大きいことを示した。特に LXR α は THP-1 および THP-1PMA のいずれでも発現しておらず、THP-1 系を用いて LXR α の解析を行うことは困難であることが分かった。THP-1 および THP-1PMA は単球・マクロファージのモデル細胞株として頻繁に用いられているが、本研究ではその有用性に一定の限界があり、それに注意して実験に用いるべきであることを示すことが出来た。
3. HUVEC を pitavastatin、lethal toxin、FPP、GGPP 等の薬剤で処理してトランスクリプトーム解析することにより、pitavastatin が HUVEC において KLF2、thrombomodulin 等の抗動脈硬化遺伝子の発現を誘導し、MCP-1、PAI-1、PTX3 等の動脈硬化促進遺伝子の発現を抑制することを示した。さらに、この遺伝子変動には lethal toxin によるのと共通のものが多いことや、GGPP が pitavastatin の作用を打ち消す方向に働くこと、Rho の阻害剤である C3、farnesyl transferase の阻害剤である FTI-276 が HUVEC においてほとんど遺

伝子変動を来さなかったことより、**pitavastatin** が HUVEC に対して **pleiotropic effect** を発揮するメカニズムには **Rac1/Cdc42** がなんらかの関わりを持つことを初めて系統的に示すことができた。

4. **pitavastatin** 添加による Rho ファミリー蛋白の細胞内局在変化を GFP との融合蛋白を用いて解析したところ、**Rac1** および **Cdc42** は **pitavastatin** 非添加時には細胞内全体に蛍光発光が認められるのが、**pitavastatin** を添加することにより、核のみに強く蛍光発光を認めるようになることが示された。さらに C 末端から 4 つのアミノ酸を欠失して **prenyl** 化できない変異体を作成したところ、**Rac1**、**Cdc42** の変異体は **pitavastatin** 非添加時にも核のみに強く蛍光発光を認める結果となり、第四章の結果と考え合わせて、**Rac1**、**Cdc42** が核内に移行することが、**pitavastatin** の **pleiotropic effects** 発現に重要な役割を果たしていると推測し、**Rac1**、**Cdc42** の C 末端 4 つのアミノ酸欠失体をアデノウィルスで HUVEC に発現させ、**GeneChip** でトランスクリプトーム解析したところ、3. で注目していた **KLF2**、**thrombomodulin** の発現誘導を認めることができ、**Rac1**、**Cdc42** の核内移行が **pitavastatin** の **pleiotropic effects** 発現に一定の役割を果たしていることを初めて示すことができた。今後、**Rac1**、**Cdc42** がこのような遺伝子変動を引き起こす分子メカニズムを詳細に解析することにより、血管内皮細胞に対して直接的に抗動脈硬化作用を及ぼす薬剤の開発が進むことが期待される。

以上、本論文において **GeneChip** を用いたトランスクリプトーム解析を行うことにより、単球からマクロファージへの分化の際に動脈硬化発症と密接に関連している **LXR α** が強く誘導されることを示したこと、**THP-1** を単球/マクロファージの細胞株として用いる際の限界を具体的に示したこと、**pitavastatin** が血管内皮細胞において **pleiotropic effects** を及ぼす機序に **Rac1/Cdc42** が関わっており、さらにそれらの核移行が遺伝子発現に影響を及ぼしていることを初めて報告した。これらの結果は動脈硬化発症のメカニズムの解明に重要な貢献をなし、さらに将来の新しい治療法への手がかりを示していると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。