

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 西村 剛

本研究は、血管の発生・分化、及び動脈硬化などの血管疾患形成において重要な役割を果たす血管平滑筋細胞の分化調節を明らかにするため、ジンクフィンガーを持つ転写因子である δ EF1/ZEB1の機能の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ラットの各組織より採取した RNA のノーザンブロットにより、 δ EF1 が心臓、大動脈・頸動脈、脳、骨格筋、肺に発現していることが示された。ラット頸動脈の免疫染色では、健康頸動脈及びバルーン傷害後 2 週間が経過し新生内膜が形成された頸動脈のいずれでも、特に後者では新生内膜には発現せず、中膜平滑筋細胞に δ EF1 が発現していることが示された。マウス胚性腫瘍細胞(P19)の一連でレチノイン酸刺激により平滑筋細胞へ分化する A404 細胞では、その分化の過程で、平滑筋 α -アクチン・平滑筋ミオシン重鎖の発現に先駆けて δ EF1 の発現が増加することが示された。
2. 平滑筋細胞におけるプロモーターアッセイで、 δ EF1 は、平滑筋分化の指標となる平滑筋 α -アクチン、平滑筋ミオシン重鎖、SM22 α の転写調節領域に対し、転写促進作用を示した。平滑筋細胞でアデノウィルスベクターにより δ EF1 を強制発現すると、内因性の平滑筋 α -アクチン、平滑筋ミオシン重鎖の発現が増加した。 δ EF1 ノックアウトマウスの大動脈より抽出した RNA の RT-PCR では、 δ EF1 ホモノックアウトマウスは野生型マウスに比して平滑筋 α -アクチン、平滑筋ミオシン、SM22 α の発現が少なく、逆に非平滑筋ミオシン重鎖(SMem)の発現が増加しているとの傾向が示された。

3. 平滑筋ミオシン重鎖の転写調節領域において、 δ EF1 は転写開始点近傍の E box および CACCT 配列に結合することが *in vitro* で合成した δ EF1 蛋白による gel shift assay で認められ、この部位に変異を導入することにより、 δ EF1 の転写促進作用が減弱することがプロモーターアッセイで示された。
4. 平滑筋 α -アクチンの転写調節領域では、転写開始点より 163 塩基上流にある THR (TGF- β 1 hypersensitivity region)に δ EF1 が結合することが、平滑筋細胞の核抽出液を用いた gel shift assay で示された。この部位に変異を導入すると、 δ EF1 の転写促進作用が減弱し、また、平滑筋 α -アクチンプロモーターの TGF β に対する反応性も損なわれることが、平滑筋細胞におけるプロモーターアッセイで示された。TGF β は平滑筋細胞の分化を誘導すると報告されているが、TGF β の細胞内信号伝達系を構成する Smad3 と δ EF1 との結合が免疫沈降で見られ、プロモーターアッセイでは、Smad3 と δ EF1 が協調して平滑筋 α -アクチンの転写を促進することが示された。更に RNA 干渉により δ EF1 の発現抑制を行うと、TGF β による平滑筋 α -アクチン発現誘導が損なわれ、 δ EF1 は TGF β による平滑筋細胞の分化誘導に関与すると考えられた。
5. δ EF1 の作用が CArG box にも依存していることと、 δ EF1 が CArG box に結合する serum response factor (SRF)と協調して平滑筋 α -アクチンの転写を促進させることがプロモーターアッセイで示された。*in vitro* 合成の SRF 及び δ EF1 蛋白を用いた gel shift assay では、 δ EF1 は直接 CArG box に結合せず、SRF と複合体を形成して CArG box に結合すると考えられる結果が得られた。
6. ラットの頸動脈にバルーン傷害を加えた後、アデノウィルスベクターを血管内腔に注入する実験で、対照となる強制発現遺伝子を持たないアデノウィルスを注入した頸動脈と比べ、 δ EF1 を強制発現させると、有意に新生内膜の形成が抑制されることが示された。

この処置を行った頸動脈から採取した RNA の $\Delta EF1$ の発現が対照群の頸動脈において傷害後減少し、徐々に回復すること、平滑筋 α -アクチン・平滑筋ミオシン重鎖の発現は $\Delta EF1$ 強制発現群でも対照群同様、傷害後減少するが、対照群より速やかに回復する傾向にあることが示された。

7. $\Delta EF1$ ヘテロノックアウトマウスと野生型マウスで大腿動脈ガイドワイヤー傷害を行い、 $\Delta EF1$ ヘテロノックアウトマウスは野生型マウスより顕著な内膜増殖を起こすことが示された。ラット頸動脈の結果と併せ、生体内でも平滑筋細胞において $\Delta EF1$ の発現が増すと、分化指標遺伝子の発現が誘導され、増殖能は減弱され、平滑筋細胞は分化した状態になると考えられる結果を得た。
8. $\Delta EF1$ の平滑筋細胞増殖抑制作用に関しては現在研究中であるが、平滑筋細胞における $\Delta EF1$ 強制発現により $P21^{waf1}$ の発現が増加すること、RNA 干渉によって $\Delta EF1$ 発現抑制を行うと $TGF\beta$ による $P21^{waf1}$ の発現誘導が損なわれることが示された。 $\Delta EF1$ は $P21^{waf1}$ を介して細胞周期を調節し、平滑筋細胞の増殖を抑制しているものと考えられる。

以上、本論文は転写因子 $\Delta EF1$ が他の転写因子と協調することにより、平滑筋細胞の分化を誘導することを明らかにした。本研究は現在未知な点が多く存在する平滑筋細胞の分化誘導機序の解明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。