

論文の内容の要旨

論文題目

リゾホスファチジルコリンにより誘導される 転写因子 *KLF2* の発現制御機構について

氏名 白旗 里志

1. 序論

動脈硬化の発症には、血中に存在する低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein (LDL)) が酸化変性した酸化低比重リポ蛋白 (oxidized low density lipoprotein (酸化 LDL)) と酸化 LDL 由来の脂質酸化物が重要な役割を果たしていると考えられている。

当研究室において、酸化 LDL を構成する各成分をヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)) に添加し、その遺伝子発現変動を DNA microarray による網羅的解析を行った。その結果、酸化 LDL を構成する成分の 1 つである Lysophosphatidylcholine (LysoPC) 特異的に、転写因子 *Kruppel like factor 2 (KLF2)* の発現が誘導されることを見いだした。

LysoPC は、リゾリン脂質である phosphatidylcholine (PC) を基質として *Secretory phospholipase A2 (sPLA2)* により酸化されリポ蛋白から分泌される。LysoPC の生理作用として、敗血症に対する抵抗性の増加など免疫に関与する作用と、接着因子の増加、肺における好酸球の浸潤促進など炎症を促進する作用が現在までに知られている。

転写因子 *KLF2* は、CACCC 配列を認識する *Specificity Protein / Kruppel like factor (Sp / KLF)* ファミリーの 1 つであり、遺伝子欠損マウス (胎生致死約 14 日) の表現形から血管形成に必須であると考えられている。動脈硬化好発部位では *KLF2* の発現が見られず、炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ などにより発現が抑制され、また抗動脈硬化作用を持つ高脂血症用薬剤であるスタチンや血流による Shear Stress (剪断応力) などにより発現が誘導される。機能としては、*Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)* や *Thrombomodulin* の発現を誘導し、接着分子である *Vascular cell adhesion molecule1 (VCAM1)* や *E-Selectin* の発現を抑制する。これらのことから *KLF2* は抗動脈硬化作用をもつ遺伝子の 1 つだと考えられている。

以上のことから、脂質酸化物の 1 つである LysoPC による *KLF2* の発現誘導の機構を明らかにすることは、動脈硬化発症機構の解明および動脈硬化治療薬を設計する上で意義があるものと考え、プロモーター解析を行うことにした。

2. LysoPC により誘導される転写因子 *KLF2* の mRNA および蛋白発現量の測定

まず Real-time PCR 法および Western blotting 法を用い、LysoPC 刺激を行った際の

mRNA レベルおよび蛋白レベルにおける *KLF2* の発現を確認した。HUVEC を LysoPC 30 μ M で刺激し、*KLF2*-mRNA 発現量の経時変化を測定したところ、約 1 時間後に発現量が最大になった。*KLF2* の蛋白発現量は刺激後 約 2 時間で最大になった。また 1 時間刺激後の *KLF2*-mRNA 発現量変化における LysoPC 濃度依存性を測定したところ、20 μ M 以上で *KLF2* の発現が誘導された。

3. 転写因子 *KLF2* のプロモーター領域にある LysoPC 刺激に応答する DNA 配列の探索および結合蛋白の同定

KLF2 のプロモーターにおける LysoPC 刺激に応答する領域を同定する為、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、LysoPC 刺激による発現誘導に重要な配列は、2 つの TATA 配列を含む -177b から -27b の領域にあることがわかった。各 TATA 配列に変異・欠損を加えると野生型と比較して、LysoPC 刺激によるルシフェラーゼ活性の上昇が抑制された。従って LysoPC 刺激による *KLF2* の発現誘導には 2 つの TATA 配列が重要なことが明らかとなった。

EMSA におけるスーパーシフトの結果から、転写因子 *MADS-box transcription enhancer factor 2* (*MEF2*) ファミリーに属する何らかの蛋白が *KLF2* プロモーター領域 -136bp から -127bp に結合することがわかった。また転写因子 *Cyclin D-binding myb-like protein 1* (*Dmp1*) が *KLF2* プロモーター領域 -108bp から -97bp に結合することがわかった。HUVEC におけるルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、*KLF2* プロモーター領域にある *MEF2* 結合配列あるいは *Dmp1* 結合配列に変異を加えると、LysoPC によるルシフェラーゼ活性の上昇が抑制されることがわかった。これらのことから転写因子 *MEF2* ファミリーと転写因子 *Dmp1* が、LysoPC による *KLF2* の発現誘導に関与していることが明らかとなった。

4. *KLF2* の発現に与える *MEF2*, *Dmp1* の影響

MEF2 ファミリーには *MEF2A*, *MEF2B*, *MEF2C*, *MEF2D* の 4 つが存在する。蛋白の DNA 結合領域におけるファミリー間のアミノ酸配列相同性は非常に高く、同じ DNA 認識配列に結合する。特に *MEF2C* 遺伝子欠損マウスは胎生致死であり、その表現形から血管形成に重要であることが報告されている。また *Dmp1* は *p14* (Alternative Reading Frame (*Arf*)) のプロモーター領域に結合し、*p53* を中心とするシグナル経路において重要な役割を果たすことが報告されている。その為、*Dmp1* の遺伝子欠損マウスでは腫瘍発生率が高く、2 年以内になんらかの癌により死に至ることが報告されている。

そこで *MEF2A*, *MEF2C* ($\gamma^{+/+}$) を過剰発現するアデノウイルスによる過剰発現系および *MEF2A*, *MEF2C* ($\gamma^{+/+}$), *MEF2D*, *Dmp1* を標的とした siRNA による抑制系を構築し、HUVEC において LysoPC による *KLF2* の発現誘導に与える影響を解析した。

その結果、*MEF2A* および *MEF2C* ($\gamma^{+/+}$) を過剰発現しても LysoPC による *KLF2* の発

現誘導には影響を与えないことがわかった。siRNAにより *MEF2A*, *MEF2C* ($\gamma^{+/+}$) の発現を抑制した場合も影響がなかった。*MEF2D* の発現を抑制すると *KLF2* の発現誘導が抑制されることを見いだした。また *Dmp1* を抑制すると *KLF2* の発現が促進されることを見いだした。

これらのことから *MEF2D* が LysoPC による *KLF2* の発現誘導を活性化することが明らかとなった。

5. 転写因子 *KLF2* にいたるシグナル経路の探索

各種阻害剤を用い *KLF2* の発現を制御するシグナル経路の探索を行った。その結果、*Protein Kinase D* (*PKD*) の活性を阻害する Go6976 により、LysoPC による *KLF2* の発現誘導が抑制された。これらのことから、*KLF2* の発現誘導には Go6976 感受性のなんらかの因子が関与することが明らかとなった。

また Go6976 により LysoPC 刺激により引き起こされる *Dmp1* の修飾が抑制されることを見いだした。

6. 総括

抗炎症および血液凝固能遺伝子群を制御する転写因子 *KLF2* が脂質酸化物 LysoPC により発現誘導されることが明らかとなった。転写因子 *MEF2D* が活性化因子として作用し、内皮細胞における *MEF2* ファミリー間の機能が異なることが示された。また転写因子 *Dmp1* が *KLF2* の発現を抑制することが明らかになった。そして、*KLF2* の発現誘導には *PKD* 阻害剤により抑制されるシグナル経路が重要であることが示唆された。

本研究は、動脈硬化発症機構の解明および動脈硬化治療薬を設計する上で、新たな知見をもたらす意義あるものである。