

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 澤城 大悟

本研究は狭心症等虚血性心疾患の原因となる動脈硬化等血管リモデリングにて中心的役割を果たすとされている **KLF5** の平滑筋細胞増殖促進効果につき *in vitro* 及び *in vivo* にて解析し以下の結果を得ている。

1. アデノウイルスを用いてラットバールーン血管障害後に **KLF5** 及び **control** 群を強制導入し新生内膜の増生について免疫染色・新生内膜形成についての形態計測を行った所、有意に **KLF5** 導入群での増生を認めた。(**KLF5** group: intima/media ratio 1.39+/-0.23SD, empty/Sp1 group: I/M ratio 0.70+/-0.23SD)。 **KLF5** 群では PCNA 染色を用いた増殖細胞比率が有意に empty 群、Sp1 群に比して増加していた。 **KLF5** の血管リモデリングに於ける細胞増殖効果が特異的に示された。
2. 初代継代細胞ラット大動脈平滑筋細胞への導入・強制発現では **KLF5** 群で顕著に細胞増殖促進効果を認め、また BrdU の取り込み率も著明に上昇しており DNA 合成促進が示された。同様にフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析においても **KLF5** 導入群において S 期 (DNA 合成期) に存在する細胞比率が飛躍的に上昇しており **KLF5** 強制導入により細胞周期が促進される事が伺われた。
3. 更には **KLF5** 強制導入を行った細胞群では細胞周期を S 期へと進行させる事により促進することが知られている cyclin D1 の発現上昇が蛋白・mRNA 双方にて確認され、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは **KLF5** の用量依存的な cyclin D1 への

発現増強効果が確認された。Cyclin D1 プロモーター領域の欠失変異体を用いた検討では Sp1 モチーフ部位でのレポーター活性に有意差を認め Sp1 モチーフを *cis*-element ととして KLF5 は cyclin D1 への転写活性を増強すると判断された。更にラット血管平滑筋細胞において血清刺激の有無を条件として KLF5 によるクロマチン免疫沈降を行った所、KLF5 は cyclin D1 プロモーターと増殖刺激がある場合に相互作用する事が想定された。以上より KLF5 は SMemb や PDGF-A を介した血管平滑筋の形質転換及び cyclin D1 の直接的な転写増強による細胞増殖効果の両面より血管リモデリング促進を行うと想定された。

4. RNA 干渉を用いた gene silencing の検討では細胞増殖、細胞周期促進ともに KLF5 の knock down によりコントロール群に比して低下、減少を認めており、RNA 干渉による KLF5 を標的とした治療的介入は血管平滑筋等の増殖が主体となる病態において有効である可能性が高い事が示された。

以上、本論文は血管リモデリングにおける KLF5 の寄与についてラットバルーン障害モデル、血管平滑筋細胞への導入効果の解析より cyclin D1 への直接的転写活性促進による細胞周期・増殖促進が主体であることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった血管リモデリングにおける平滑筋細胞増殖のメカニズム、更にはそれを標的とした治療法の開発に繋がる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。