

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 前島 崇司

動脈硬化は脳卒中や心筋梗塞の発症に深く関与して7おり、この動脈硬化の発症、進展には血管内皮機能の変化が関わっているということが報告されている。HMG-CoA Reductase を阻害するスタチンは血中 LDL-C 低下薬として広く世界に用いられている薬剤であるが、スタチンには血中 LDL-C を低下させる以外にも抗動脈硬化作用いわゆる pleiotropic effect を有していると報告がなされている。しかし、スタチンの pleiotropic effect に関わる転写変化の全体像には不明な点が多いのが実情である。そこで、本研究の目的は、スタチンの血管内皮細胞におけるグローバルな転写制御のメカニズムの解明、特に、抗動脈硬化作用を有する遺伝子の活性化の機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

HMG-CoA Reductase 阻害剤であるピタバスタチン ($1\mu\text{M}$) を血管内皮細胞である HUVEC に4時間処理をして DNA microarray 解析を行った。その結果、Thrombomodulin や eNOS といった血管機能改善効果を有する遺伝子を含めて 25 種の遺伝子がピタバスタチンによる有意に発現増強されることが明らかとなった。ピタバスタチンにより発現増強される 25 種遺伝子の中で転写調節因子である Krüppel Like Factor 4 (KLF4) ならびに Krüppel Like Factor 2 (KLF2) が上位遺伝子であった。そこで、ピタバスタチンによる KLF2 ならびに KLF4 について解析を行った。ピタバスタチン ($1\mu\text{M}$) により HUVEC において KLF2、KLF4 は時間依存的に発現上昇することが明らかとなった。KLF2 および KLF4 は2時間より発現増強することが明らかとなった。また、マウス大動脈弓部においてもピタバスタチンは KLF2 mRNA の発現を増強させることが明らかとなった。次にピタバスタチンの転写制御における KLF2 ならびに KLF4 の役割について解析をすると、ピタバスタチンにより発現増強された Thrombomodulin や eNOS をはじめとした 23 種の遺伝子の多くは KLF2 もしくは KLF4 siRNA 処理により発現増強作用が減弱することが明らかとなった。さらに KLF4 siRNA 処理によりピタバスタチンにより誘導される KLF2 発現増強作用が減弱されることも同時に明らかとなった。

最後にスタチンによる KLF2 発現増強機序の解析を行った。KLF2 プロモーター解析を行った結果、ピタバスタチンによる KLF2 発現増強作用には KLF2 Promotor 領域に MEF2 タンパクが結合することが重要であることが確認された。また、HUVEC には MEF2A, C, D が発現していることを免疫ブロッティングにより確認したので、MEF2A, C, D siRNA 実験

を行った。その結果、MEF2A, C, D 3 種類の MEF2 タンパクがピタバスタチンによる KLF2 発現増強作用において冗長的に作用していることが明らかとなった。次に、MEF2 タンパクの転写調節能を活性化させる経路の解析を行った。その結果、ピタバスタチンは ERK5 (EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 5) のリン酸化を 2 時間より誘導し活性化させることが明らかとなった。(活性型 ERK5 は MEF2 タンパクの転写調節能を活性化させると報告されている。) また、ERK5 siRNA 処理によりピタバスタチンによる KLF2 の発現増強作用が減弱することが明らかとなった。さらに、ERK5 の上流にあると考えられている MEK5 DN を強制発現させ MEK5 の機能を抑制させると、ピタバスタチンによる KLF2 発現増強作用が減弱することが明らかとなった。以上のことからピタバスタチンにより KLF2 は MEK5-ERK5-MEF2A, C, D 経路により発現増強されることが明らかとなった。さらに、この MEK5-ERK5-MEF2A, C, D 経路は KLF2 だけでなくピタバスタチンにより発現が増強される KLF4 および 23 遺伝子の発現増強機序に重要であることが siRNA 実験より明らかとなった。

以上の結果から、HUVEC においてピタバスタチンにより KLF2 ならびに KLF4 を MEK5-ERK5-MEF2 経路により発現を増強させ、KLF2 ならびに KLF4 が血管内皮機能改善効果作用に寄与していることが明らかとなった。ピタバスタチンによる KLF2 および KLF4 の発現増強作用はピタバスタチンの血管内皮細胞における pleiotropic effect の一端を担っていると考えられた。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。