

審査の結果の要旨

氏名 戸 澤 英 人

本研究は動脈硬化症等の慢性炎症性疾患において重要な役割を演じていると考えられるIL-4/Stat6シグナルにおける炎症性因子の転写活性化機構について明らかにするため、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）においてIL-4刺激による転写因子STAT6の活性化を介したシグナル伝達系にてVCAM-1等の転写活性化機構について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. IL-4が血管内皮細胞においてどのような経時的変化を引き起こしているのかを網羅的に解析するため、DNAマイクロアレイ解析を行った。HUVECに対してIL-4刺激を行い、1、2、4、8、16時間後の転写量を刺激前の状態と比較した。2倍以上の増加が観られた遺伝子が1時間で26、2時間で47、4時間で60、8時間で76、16時間で124種類あった。また、常に発現誘導されるグループと、ある程度誘導された後に誘導が抑制され、その後再び徐々に発現誘導されるグループの2つに大別された。
2. IL-4によって特異的に活性化することが知られている転写因子STAT6の、血管内皮細胞におけるIL-4刺激時の経時的な挙動を調べるためHUVECをIL-4で刺激し、15分、30分、1時間、2時間、4時間後に分画を行い、細胞質画分と核画分を得てSTAT6をはじめ、各種に対する抗体でWestern Blottingを行うことによってIL-4によるSTAT6の核移行の経時的変化を追った。その結果、STAT6は刺激15分後細胞質では刺激前と比較して減少し、その後増加していた。また、核におけるSTAT6は15分後大きく増加し、その後徐々に減少していた。さらにリン酸化STAT6に関して調べると、細胞質におけるリン酸化STAT6は15、30分後で増加し、その後減少していた。また、核内においても同様な傾向が観られた。これらのことから核におけるSTAT6はリン酸化STAT6の動向と同調していることがわかり、STAT6はIL-4によるリン酸化が起こることにより核内に移行していることが示唆された。また、TNF- $\alpha$ 刺激によって核内に移行し、転写の活性化に作用することが知られているp65に関してもIL-4刺激による動向を調べてみたが、p65の核移行や量の変化は観られなかった。よって、HUVECにおけるIL-4刺激によるシグナル伝達ではp65を介さないことが考えられた。
3. STAT6の下流にある遺伝子を同定するため、STAT6のノックダウンにより、どのような遺伝子がIL-4刺激での発現誘導を抑制されるのか、また、逆に常時活性型STAT6（STAT6VT）の強制発現下でどのような遺伝子が発現誘導されるのかをDNAマイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。その結果、STAT6によって特に顕著に影響を

受けた遺伝子としてCCL26、POSTN、PMCH、SOCS1、VCAM1、CISH、HAS3、SELP、ARG99(TMTC1)といった遺伝子が挙げられ、これら9遺伝子はSTAT6の下流にあると考えられた。

4. IL-4刺激によって核移行したSTAT6がゲノム上のどの部位に結合し、STAT6下流の遺伝子の転写に関与しているのかを解析するために、HUVECをIL-4で刺激し、その1時間後に細胞を固定化、回収し、抗STAT6抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験を行い、ChIP-Seq法を用いてゲノム上におけるSTAT6結合部位について網羅的な解析を行った。この結果、上述したIL-4/Stat6シグナル下流にあることが示唆された9遺伝子全ての遺伝子近傍にSTAT6結合可能性を示すピークが得られた。よってこのChIP-Seq法による解析結果は妥当なものであると考えられ、上に挙げた9遺伝子がSTAT6下流にあることを強く示唆するものである。
5. ChIP-Seq法によるSTAT6結合領域の網羅的解析の結果、VCAM-1遺伝子近傍には転写開始点から上流-16 kb、-11 kb、第8イントロン(int 8)の3領域にピークが観られ、これらの領域はenhancerであることを示すヒストンH3の4番目のリジンのモノメチル化(H3K4me1)も観られている。この領域についてreal-time PCRによるChIP-PCR法で実際にSTAT6が結合していることが確認できた。そこで、レポーターベクターpGL3-Basicを基に、Luciferase遺伝子の近位にVCAM-1 core promoterを組み込んだレポーターベクターを作製し、さらにその上流に-16 kb領域、-11 kb領域、もしくはint 8領域の各領域を組み込んだレポーターベクターを用いてHUVECにおいてLuciferase Reporter Assayを行い、各領域の転写活性化機能について検討を行った。その結果、常時活性化型STAT6(STAT6VT)の強制発現下で-16 kb領域を組み込んだ場合にのみルシフェラーゼ活性が上昇し、-16 kb領域のSTAT6依存的な転写活性化機能が示された。
6. -16 kb領域についてさらに詳細に検討するため、-16 kb領域に存在する2箇所のSTAT6コンセンサス配列にそれぞれ変異を入れたコンストラクトを用いてSTAT6VTの強制発現下、同様な実験を行った。その結果、VCAM-1転写開始点のより近位に位置するSTAT6コンセンサス配列に変異を入れた場合には活性がベースラインにまで下降した。一方転写開始点から遠位に位置するSTAT6配列に変異を入れた場合には活性はほぼ半減した。また、STAT6VTの代わりにIL-4刺激を行って同様な実験を行った場合には近位のSTAT6配列に変異を入れると活性がベースラインにまで下降し、遠位のSTAT6配列に変異を入れると顕著な差は観られなかった。以上の結果から、どちらのSTAT6配列もSTAT6依存の転写活性化機能に関与すると考えられるが、特に近位のSTAT6配列が重要であると言える。この領域はenhancerとして機能していることが考えられることから、STAT6は-16 kb領域のenhancerに結合し、VCAM-1の転写活性化を引き起こしていると考えられた。

以上、本論文はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC における IL-4/Stat6 シグナルによる転

写活性化機構の解析から、IL-4によって発現誘導される VCAM-1 の転写開始点上流-16 kb 領域に STAT6 依存性 VCAM-1 転写活性化機能があることを明らかにした。本研究はこれまで未知であった IL-4 による VCAM-1 の発現誘導機構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。