

## 論文の内容の要旨

論文題目 血管平滑筋細胞におけるアルドステロンによる

オステオポンチン遺伝子転写制御機序の解析

指導教員 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 清末有宏

### <背景>

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系は高血圧を初めとする様々な病態を引き起こす原因となっている。アンジオテンシン II (Ang II)は強力な血管収縮作用を有し高血圧・動脈硬化などをもたらす。アルドステロン(Aldo)は Ang II の刺激により副腎皮質球状層で産生されナトリウム再吸収を促進し循環血漿量を増加させ高血圧の原因となる。近年 MR 拮抗薬であるスピロノラクトンやエプレレノン(Eplr)が心不全患者の生命予後改善効果をもたらすことが証明されたが、その機序を解析する過程において、MR が遠位尿細管のみならず、血管平滑筋を含め心血管系組織などの非上皮系組織にも広く分布し、Aldo も Ang II と同様に催炎症作用や組織線維化などを介して直接心血管

疾患の予後悪化に関与することが明らかになってきた。

オステオポンチン(OPN)は分泌型糖蛋白質で、近年動脈硬化巣近傍で OPN 濃度が上昇していることが報告され、また各種細胞系で Aldo 刺激での OPN 転写活性亢進が報告された。原発性アルドステロン症患者において血圧が同程度の本態性高血圧患者よりも OPN 血中濃度が有意に上昇していることが報告された。これらの報告から Aldo の血管炎症惹起作用・動脈硬化進展作用の一部は OPN を介している可能性がある。

従って Aldo による催炎症作用の詳細を検討するためには、OPN 遺伝子転写活性亢進の細胞内機序の解明が重要であるが、動脈硬化進展において主要な標的細胞である血管平滑筋細胞に関して現在まで報告がない。また分泌された OPN 蛋白そのものの細胞に対する直接作用についても報告がない。そこでラット血管平滑筋細胞(rVSMC)における Aldo 刺激による細胞内 OPN 転写活性化機序、非ゲノム作用について検討する。さらに OPN の rVSMC に対する作用を検討する。

#### <方法>

OPN 遺伝子転写活性に対する Aldo 刺激の用量依存性を確認するため、rVSMC を  $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$ M の濃度で 24 時間刺激した。また時間依存性を確認するため  $10^{-6}$ M で 1.5~24 時間刺激した。total RNA を抽出し OPN mRNA 発現量を quantitative RT-PCR により解析した。選択的 MR 阻害薬である Eplir による OPN

転写活性化抑制効果確認のため、同様の実験を 1 時間  $10^{-5}$ M Eplr で前処置した後に行った。

OPN promoter 領域の転写活性化寄与領域を同定するため luciferase reporter assay により promoter deletion analysis を行った。全長 OPN promoter (-2284) および 5'側を転写開始部位から -1599, -1300, -795, -536 とした deleted promoter の  $10^{-7}$ M Aldo 刺激後の luciferase 活性を測定した。

転写因子結合部位として目標とする範囲に存在する CREB(-1460 から -1453)、GRE(-1404 から -1386) および GRE consensus 配列(-1394 から -1386) を欠損した配列を有する plasmid を作成し、luciferase 活性を測定した。

electrophoretic-mobility shift assay (EMSA) により核抽出物の転写因子結合部位への結合を確認した。GRE 配列および変異 GRE 配列の probe を作成した。また各種刺激後の rVSMC の核抽出物を作成し EMSA を実施した。

Aldo 刺激による OPN 遺伝子転写活性亢進における非ゲノム作用関与の有無を検討するため c-Src および extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化を観察した。rVSMC を Aldo  $10^{-7}$ M で 10-120 分刺激した。また c-Src の選択的阻害剤である PP2 を  $10^{-5}$ M の濃度で 30 分間前処置後に同様の刺激を行った。それぞれ蛋白抽出し Western blot 法を用いた。

OPN の rVSMC に対する生理活性を検討するため、OPN siRNA を用いて発現抑制を試みた。

rat OPN 蛋白の rVSMC に対する作用を確認するため、rat OPN 蛋白を麴菌に

遺伝子導入し合成し rVSMC を 24 時間刺激し Western blot 法により評価を行った。

#### < 結果 >

rVSMC に対する 24 時間の Aldo 刺激は用量依存的および時間依存的に OPN 遺伝子転写を増加した。Aldo による OPN 遺伝子転写活性化は Eplr 添加によって有意に減弱した。

deleted promoter assay において -1599 までの欠損 promoter は完全長 promoter と同等の活性化を認めたが ( $1.83 \pm 0.55$  倍、 $p=0.019$ )、-1300 より短い deleted promoter では有意な活性化はみられなかった。転写因子結合部位として -1404 に GRE があり、その GRE を完全に欠損した promoter では Aldo 刺激による活性化はみられず、さらに GRE のコンセンサス配列のみ欠損した promoter も同様に活性化能を失っていた。同範囲内に存在する CREB を欠損しても活性化は抑制されなかった。

GRE への Aldo-MR 複合体の結合を確認するため EMSA を行った。 $10^{-7}$ M Aldo により 24 時間刺激を行った後の核抽出物と当該 GRE 配列を有する probe と複合体を形成させると、非刺激のものに比し複合体バンドの増強が認められた。配列特異性を確認するために cold probe を用いて competition assay を行ったところ、バンドの減弱を認めた。GRE のコンセンサス配列を変異させた probe を用いると複合体バンドは減弱した。 $10^{-7}$ M Aldo 24 時間刺激の前に 1 時間の

10<sup>-5</sup>M Epl<sub>r</sub> 前処置を行うとバンドの減弱を認めた。またコルチコステロンの 24 時間刺激 (10<sup>-5</sup>M) では複合体バンドの増強は起こらなかった。抗 MR 抗体を加えて複合体を形成させるとバンドは super shift した。抗 GR 抗体では super shift は認めなかった。

Aldo 短時間刺激による c-Src および ERK1/2 のリン酸化においては、10 分から両者のリン酸化亢進を認めた。また PP2 による前処置によって、c-Src, ERK1/2 ともリン酸化が著明に阻害された。OPN 蛋白は 10<sup>-7</sup>M Aldo 2 時間刺激で発現増加し、PP2 による前処置で有意に抑制された。

OPN siRNA は Aldo による刺激がない場合は rVSMC における OPN mRNA を抑制したが、Aldo 刺激後には有意な抑制を認めなかった。

麴菌に遺伝子導入し HA タグ付き rat OPN を産生し、Anti-HA affinity Matrix を利用して精製した。この rat OPN を用いて rVSMC を刺激したところ、30 分から c-Src のリン酸化亢進を認め、90 分まで時間依存性に増強した。

#### < 考察 >

Aldo 刺激は OPN 遺伝子転写活性を用量依存性・時間依存性に亢進した。これは他の細胞系の報告と一致した。

各種刺激における OPN 転写活性亢進に関しては転写因子として AP-1, NF-κB の関与を報告するものが多い。Aldo 刺激に関する報告は少ないが、Irita らはラット腎線維芽細胞に対する Aldo 刺激において AP-1, NF-κB の関与を報

告している。今回私は rVSMC での検討を行ったが、現在までの報告と異なり、Aldo-MR 複合体形成、さらには転写因子結合部位として GRE を介する経路が重要であることを証明した。

コルチコステロン刺激では MR-DNA 複合体形成の増強は起こらなかった。また super shift assay では抗 MR 抗体のみが super shift を引き起こし、抗 GR 抗体にはそのような変化が認められなかった。この結果より、rVSMC における OPN 遺伝子活性化機構にコルチコステロンの関与は少ないと考えられた。

Aldo の非ゲノム作用として rVSMC においても 10 分から c-Src および ERK1/2 のリン酸化亢進が認められ、30 分で一旦減弱したものの再び 60 分以降リン酸化亢進が認められた。これらの亢進は PP2 によって完全に抑制された。今回 OPN 蛋白に c-Src のリン酸化能があることを示したが、蛋白レベルでの OPN 産生亢進は 2 時間以内に開始していたため、60 分以降の c-Src リン酸化亢進に関しては比較的短時間のうちに産生が亢進された OPN 蛋白の autocrine/paracrine 的作用である可能性が考えられた。

#### < 結論 >

Aldo による OPN 遺伝子転写活性亢進は用量依存的・時間依存的であった。時間依存性は 24 時間にかけて単調増加であり、非ゲノム作用を示唆するような短時間の活性化は認めなかった。エプレレノンには Aldo による活性化をよく抑制し、機序として MR を介していることが示唆された。Aldo-MR 複合体は

-1404 に存在する特定の GRE に結合し活性亢進をもたらすことが示唆された。抗 MR 抗体による super shift が認められ、GRE 配列への結合は MR が直接関与していることが示された。rVSMC における Aldo による非ゲノム作用では c-Src および ERK1/2 のリン酸化が 10-20 分および 60 分以降に認められ c-Src 系の関与が示された。60 分以降の活性化に関しては Aldo 刺激による産生 OPN 蛋白自身の autocrine/paracrine 作用によるものの関与の可能性が考えられた。