

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 清末 有宏

本研究は動脈硬化進展過程において重要な役割を演じていると考えられる血管平滑筋細胞におけるアルドステロン(Aldo)によるオステオポンチン(OPN)転写活性亢進機序を明らかにするため、ラット血管平滑筋細胞(rVSMC)を各種条件下で Aldo により刺激をし、種々の解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 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ミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬であるエプレレノン(Eplr)添加によって有意に減弱した。
2. 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、-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 glucocorticoid response element (GRE)があり、その GRE を完全に欠損した promoter では Aldo 刺激による活性化能を喪失していた。GRE のコンセンサス部位のみを欠損している promoter にも活性化能はなかったが、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。
3. GRE への Aldo-MR 複合体の結合を確認するため EMSA を行った。10⁻⁷M 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 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。10⁻⁷M Aldo 24 時間刺激の前に 1 時間の 10⁻⁵M Eplr 前処置を行うとバンドの減弱を認めた。コルチコステロンの 24 時間刺激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。
4. 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 10⁻⁷M 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。
5. 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。
6. 麹菌に遺伝子導入し 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。

以上、本論文はラット平滑筋細胞において Aldo による OPN 遺伝子転写活性亢進機序の解析から、Aldo-MR 複合体が特定の GRE に結合し活性亢進をもたらすことが示唆された。また OPN 蛋白自体の c-Src 系活性化作用が示された。本研究により OPN の血管炎症・動脈硬化進展作用機序が詳細に示され、将来的に抗 OPN 薬が抗動脈硬化薬としての作用を有し臨床応用できる可能性が考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。