Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Shear Stress Down-regulates Gene Transcription and Production of Adrenomedullin in Human Aortic Endothelial Cells |
| Author(s) | 篠木, 信敏 |
| Citation | 大阪大学, 1999, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/41236 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 篠木信敏（しのぎ　のぶとし） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学位記番号 | 第　14789　号 |
| 学位授与年月日 | 平成11年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文名 | Shear Stress Down－regulates Gene Transcription and Production of Adrenomedullin in Human Aortic Endothelial Cells<br>（ずり応力負荷はヒト大動脈内皮細胞におけるアドレノメデュリンの発現を低下させる） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　門田　守人<br>（副査）<br>教　授　多田　道彦　　教　授　荻原　俊男 |


## 論文内容の要旨

【目的】

血管内皮細胞は血流や血圧の変化を察知するセンサーおよびトランスデュサーであると考えられている。最近，機械的刺激に応じて種々の血管作動性物質を産生し，血管のトーヌスや vascular remodeling の制御に大きく関与していることが明らかになってきた。Resnick らは PDGF－B chain の検討から，ずり応力により up－regulate を受ける遺伝子のプロモーター領域には "GAGACC" のコア配列をもつ SSRE（shear stress responsive element）が存在することを指摘した。一方，褐色細胞腫より新たに発見された血管作動性物質の1つであるアドレノメデュリン（AM）は52個のアミノ酸よりなるペプチドで，血管拡張を介した強力な降圧作用と血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を持つ血管内皮由来弛緩因子の一つである。さらに，そのプロモーター領域には前述の SSRE が存在することから，AM がずり応力反応性に血管トーヌスの制御に関与しているのではないかと考えられる。そこで，本研究は培養ヒト大動脈内皮細胞（HAoECs）にずり応力を負荷した際の AM の動態を mRNA 発現と蛋白産生の点から検討した。

【方法】

HAoECs を直径35mmの I 型コラーゲン塗布ポリスチレンシャーレで2％ fetal bovine serum（FBS）に存在下に培養した。Confluent となった HAoECs を PBS（phosphate buffered saline）で洗浄し2％ FBS を含んだ培養液を1ml加え $CO_2$ インキュベーター（37℃）内で30分間静置した後，同インキュベーター内に設置したコーン型ずり応力負荷装置で HAoECs にずり応力を負荷した。負荷終了後，位相差顕微鏡で細胞の形態を観察したのち，細胞分画と上清を分離した。上清中の AM 量の測定は抗ヒト AM 抗体を用いた radioimmunoassay（RIA）にて行った。また，細胞分画より分離した mRNA を用いてヒト AM cDNA を用いた Northern blot analysis を行った。その際，AM mRNA のバンドの濃淡をデンシトメーターで読みとり，それぞれ β－actin mRNA のコントロールバンドの濃淡で標準化した。ずり応力負荷群として，24dynes／㎠のずり応力を各々3，6，12時間負荷した群と12，24dynes／㎠のずり応力を6時間負荷した群を作成し，それぞれの対照群と比較検討した。

【成績】

ずり応力負荷後の HAoECs の形態的変化を位相差顕微鏡によって観察すると24dynes／㎠のずり応力負荷後3時間

では形態的には変化は認められなかったが，負荷後6時間では敷石状から紡錘形に変化し始め，24時間では殆どの細胞は流れに一致した配向性を示すようになった。この結果より，今回用いたずり応力負荷はHAoECsが形態学的に変化を起こすのに有効であることが確認できた。

Northern blot analysisによるずり応力負荷後のAM mRNA発現量の観察では，24dynes／㎠のずり応力負荷後3時間でコントロールに比較し38±25%に低下していた。また，負荷時間を6時間と一定にし，ずり応力を変化させた場合，静置状態に比較し12dynes／㎠，24dynes／㎠のずり応力負荷により，それぞれ31±3%，44±9%と強さ依存性に低下した。

RIAによる培養液中に分泌されたAMの蛋白質測定では，ずり応力依存性に有意な低下が認められた（contorl 8.1±1.5fmol／ml，12dynes／㎠4.5±0.6 fmol／ml（P＜0.05），24dynes／㎠3.5±0.4 fmol／ml（P＜0.05））。

【総括】

AMのプロモーター領域に“GAGACC”が存在するにも関わらず，本研究では，ずり応力によりAM mRNAの発現量は抑制され，SSREは全ての蛋白に共通にup－regulateを誘導する配列ではなく，down－regulateする場合もあることが明らかとなった。HAoECsでは，AM mRNAの発現量はずり応力負荷後3時間で低下し，蛋白産生量はずり応力依存性に低下が認められた。本研究により低ずり応力状態下のヒト大動脈内皮細胞でAMは最も発現され血管トーヌスを抑制していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞は血流や血圧の変化を察知するセンサーおよびトランスデュサーであると考えられている。最近，機械的刺激に応じて種々の血管作動性物質を産生し，血管のトーヌスやvascular remodelingの制御に大きく関与していることが明らかになってきた。ResnickらはPDGF－B chainの検討から，ずり応力によりup－regulateを受ける遺伝子のプロモーター領域には“GAGACC”のコア配列をもつSSRE（shear stress responsive element）が存在することを指摘した。一方，褐色細胞腫より新たに発見された血管作動性物質の1つであるアドレノメデュリンは52個のアミノ酸よりなるペプチドで，血管拡張を介した強力な降圧作用と血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を持つ血管内皮由来弛緩因子の一つである。さらに，そのプロモーター領域には前述のSSREが存在することから，アドレノメデュリンがずり応力反応性に血管トーヌスの制御に関与しているのではないかと考えられる。本研究は培養ヒト大動脈内皮細胞にずり応力を負荷した際のアドレノメデュリンの動態をmRNA発現と蛋白産生の点から検討した。その結果アドレノメデュリンのプロモーター領域に“GAGACC”が存在するにも関わらず，ずり応力によりアドレノメデュリンmRNAの発現量は抑制され，SSREは全ての蛋白に共通にup－regulateを誘導する配列ではなく，down－regulateする場合もあることを明らかにした。また，アドレノメデュリンの蛋白産生量はずり応力依存性に低下が認められ，低ずり応力状態下のヒト大動脈内皮細胞でアドレノメデュリンは最も発現されていることを初めて明らかにしたもので，分子生物学的に価値のあるものと評価され，博士（医学）の学位授与に値するものと認める。