

Title	Identification of oxidative stress-regulated genes in rat aortic smooth muscle cells by suppression subtractive hybridization
Author(s)	坂本, 賢哉
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41843">https://hdl.handle.net/11094/41843</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	坂本賢哉
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15270 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Identification of oxidative stress-regulated genes in rat aortic smooth muscle cells by suppression subtractive hybridization. (ラット大動脈平滑筋細胞における酸化ストレスにより制御される遺伝子の Suppression Subtractive Hybridization を用いた同定)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二  (副査) 教授 谷口 直之 教授 荻原 俊男

## 論文内容の要旨

## 【目的】

近年、動脈硬化性疾患の危険因子、すなわち高血圧、高脂血症、糖尿病、肥満などに共通して認められるファクターとして酸化ストレスが注目されている。高血圧におけるアンギオテンシンⅡによる NADPH oxidase の活性化、高脂血症における酸化 LDL の血管壁への蓄積、糖尿病における glycation の亢進やポリオール経路の亢進、肥満症における TNF- $\alpha$  の増加などは、その原因あるいは結果として酸化ストレスが関与することが報告されている。酸化ストレスは直接的に、または酸化 LDL の血管壁への蓄積を介して間接的に血管内皮細胞傷害、血管平滑筋細胞増殖を引き起こし、動脈硬化の発症・進展に関与している可能性が考えられている。この背景には酸化ストレスによる血管壁細胞における遺伝子発現の異常に関与している可能性が想定されており、実際にこれまで血管壁細胞において活性酸素による protooncogene や growth factor 等の因子の誘導が報告されている。本研究では血管平滑筋細胞において活性酸素によって発現誘導される新たな動脈硬化に関連する因子を検索・同定し、酸化ストレスによる動脈硬化の発症・進展における分子メカニズムを明らかとせんとした。

## 【方法ならびに成績】

## 1. suppression subtractive hybridization (SSH) 法による発現誘導遺伝子の同定

過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 200  $\mu M$  で3時間刺激した血管平滑筋細胞 (VSMC) と刺激を加えない VSMC より、それぞれ poly (A)<sup>+</sup>RNA を抽出した。この mRNA を template にし、double strand cDNA を合成した。 $H_2O_2$  (200  $\mu M$ ) で刺激を加えたものを tester cDNA、刺激を加えないものを driver cDNA として SSH 法を行った。148個の subtracted cDNA が得られ、そのうち89個が独立したクローンと考えられた。これらをプローブとして Northern blotting を行ったところ、8個のクローンが実際に活性酸素により誘導されることが確認された。sequence analyses の結果、3つが既知の因子すなわち fibronectin、p105 coactivator および ECA39であり、残り5つは未知の因子であった。

活性酸素による遺伝子発現の誘導が確認された遺伝子についてその時間および濃度依存性を Northern blotting により検討した。 $H_2O_2$  (200  $\mu M$ ) 刺激により fibronectin は約1時間をピークに増加し、p105 coactivator および ECA39は24時間まで発現が増加することが確認された。またこれら3つの因子は、いずれも  $H_2O_2$  200  $\mu M$  まで濃度依存性に発現が増加した。

## 2. protein kinase C (PKC) 系の関与の検討

活性酸素による遺伝子発現の誘導に protein kinase C (PKC) が関与する可能性を検討するため、VSMC を100 nM 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) で24時間前処理し、desensitizationを確認後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM) で刺激し、それぞれの mRNA の発現を Northern blotting により検討した。PKC down-regulation 後の活性酸素刺激により、fibronectin、p105 coactivator および ECA39 のいずれも発現が誘導され、これら3つの因子の活性酸素による発現誘導が PKC 非依存性であることが明らかとなった。

## 3. ラット頸動脈バルーン傷害動脈硬化モデルを用いた p105 coactivator の発現の検討

in vivo における動脈硬化の進展に p105 coactivator が関与する可能性を検討するため、動脈硬化病変における発現を検討した。すなわち、SD ラット (400g、12-16w) を sodium pentobarbital (45mg/kg) 麻酔下で、左総頸動脈に 2F フォガティールカテーテルを用いてバルーン傷害を施行した。バルーン傷害後14日目に、総頸動脈を取り出し p105 coactivator の発現の有無を免疫組織染色により検討した。その結果、傷害後14日目の左総頸動脈において、著明に新生内膜の肥厚を認め、新生内膜に存在する細胞の核を中心に p105 coactivator が染色された。

## 4. c-myb 遺伝子転写活性に対する p105 coactivator および pim-1 の関与の検討

p105 coactivator は serine/threonine kinase を code する protooncogene Pim-1 と complex を形成することにより VSMC の増殖に重要とされる転写因子 c-Myb の転写活性を上昇させることが知られている。そこで、c-Myb のターゲットである bcl-2 遺伝子の promoter 領域を luciferase 遺伝子の 5' 上流に組み込んだ reporter gene construct を HeLa 細胞に lipofection 法により遺伝子導入した。さらに、c-Myb、p105 coactivator および Pim-1 または Pim-1 の dominant negative (DN-pim-1) の各 cDNA を過剰発現させ48時間培養した後、細胞抽出物を得て luciferase assay を行った。bcl-2 遺伝子の promoter 活性は、c-Myb、p105 coactivator 及び Pim-1 を細胞内に発現させることにより約12倍に上昇した。これに対して、c-Myb、p105 coactivator および DN-Pim-1 の細胞内発現では約2倍の上昇に留まった。これらより c-myb、p105 coactivator および pim-1 は協調して、c-myb の下流に存在する bcl-2 遺伝子の promoter 活性を活性化することが示され、さらに、DN-pim-1 の c-myb 転写活性に対する抑制作用が示された。

### 【総括】

SSH 法によって、ラット VSMC において活性酸素に反応し発現誘導される3つの既知の因子 (fibronectin、p105 coactivator、ECA39) と、5つの未知の因子を同定した。既知の因子は動脈硬化の進展に関与する、もしくは関与する可能性のあるものであった。fibronectin、p105 coactivator および ECA39 の遺伝子発現は、活性酸素の濃度および時間依存性に誘導されるが PKC 非依存性であり、活性酸素によるこれらの遺伝子発現誘導は PKC 以外の経路を介していると考えられた。また、p105 coactivator はラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける新生内膜の細胞の核を中心に染色され、新生内膜形成に関与する可能性が示された。さらに、p105 coactivator/pim-1/c-myb というカスケードが動脈硬化の発症・進展に関与する可能性が示され、DN-pim-1 の動脈硬化治療における潜在的有用性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

酸化ストレスによる動脈硬化の発症・進展における分子メカニズムを明らかにするため、血管平滑筋細胞において酸化ストレスにより発現誘導される新たな動脈硬化に関連する因子を suppression subtractive hybridization 法を用いることにより検索・同定した。中でも p105 coactivator はラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける新生内膜で強く発現していることを免疫組織学的に証明し、同因子が新生内膜形成に関与する可能性を示した。さらに、p105 coactivator と complex を形成する原癌遺伝子 Pim-1 が、血管平滑筋細胞の増殖に重要とされる転写因子 c-Myb の転写活性を亢進させ、その dominant negative (DN) pim-1 が c-Myb の転写活性を抑制することを示した。

以上より、p105 coactivator/pim-1/c-myb というカスケードが動脈硬化の発症・進展に関与する可能性が示され、また DN-pim-1 の動脈硬化治療における潜在的有用性を示唆したものであり、学位の授与に値するものと考えられた。