

Title	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in the vasculature, attenuates NF- $\kappa$ B activation
Author(s)	鷹見, 洋一
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48899">https://hdl.handle.net/11094/48899</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	鷹見 洋一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 21554 号
学位授与年月日	平成 19 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in the vasculature, attenuates NF- $\kappa$ B activation (血管における新規脱ユビキチン化酵素 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 は NF- $\kappa$ B 活性を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 金田 安史 (副査) 教授 堀 正二 教授 祖父江憲治

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

超高齢化社会において健康長寿を阻む心血管病の要因となる動脈硬化症に対して、新規治療標的分子をターゲットとした新しい治療法の開発が望まれている。我々は動脈硬化の新規治療標的分子の単離を目指し、独自に開発した HVJ(Hemagglutinating Virus of Japan)-E ベクターを用いた遺伝子機能スクリーニング法を用いて、ヒト血管内皮細胞由来の cDNA ライブラリーから細胞増殖抑制および NF- $\kappa$ B 活性抑制作用を有する分子を探索した結果、脱ユビキチン化酵素 (DUB) である Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) を得た。UCHL1 遺伝子は脳に特異的に発現し、ユビキチンシステムの異常を介してパーキンソン病の原因となることが知られている。近年、ユビキチンシステムが動脈硬化の病態形成に重要な役割を果たしていることが示された。しかしながら、血管における DUB の機能についての検討はなされていない。そこで、本研究では、血管における UCHL1 の機能ならびに新規治療用分子としての可能性についての検討を行った。

## 〔 方法ならびに成績 〕

## ① UCHL1 の血管での発現調節の検討

Northern blot 及び western blot、免疫染色にて、UCHL1 はヒト血管内皮細胞 (EC) 及び血管平滑筋細胞 (SMC) に発現を認め、real time PCR による mRNA の定量ではコントロールに比し、TNF- $\alpha$  刺激による有意な発現の上昇を認めた。組織免疫染色では神経細胞および血管に UCHL1 の発現が確認されたほか、ラット総頸動脈のバルーン障害後の新生内膜においては発現の上昇を認め、real time PCR にて偽手術に比し約 25 倍の有意な上昇が確認された。また、頸動脈内膜剥離術を施行された症候性患者より得られたヒト頸動脈の動脈硬化部位においても UCHL1 の発現が認められた。つまり、UCHL1 は血管で発現し、さらに傷害部位での発現上昇が認められた。

## ② UCHL1 の血管内皮細胞での機能解析

EC にて UCHL1 を過剰発現させると、TNF- $\alpha$  刺激下における NF- $\kappa$ B 活性上昇は有意に抑制され、細胞免疫染色では NF- $\kappa$ B の構成要素である p65 の TNF- $\alpha$  刺激による核移行を抑制した。また、TNF- $\alpha$  刺激による EC での eNOS

蛋白の減衰は、UCHL1 の過剰発現により抑制された。NF- $\kappa$ B により制御される下流の iNOS、Mn-SOD、HO-1、接着分子 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin) の TNF- $\alpha$  による発現増加は、UCHL1 の過剰発現により有意に抑制された。NF- $\kappa$ B 活性抑制の機序として、EC に UCHL1 を過剰発現させると western blot にて TNF- $\alpha$  刺激下の I $\kappa$ B- $\alpha$  の蛋白発現がコントロールに比し増加しており、UCHL1 を過剰発現した群で有意にユビキチン化された I $\kappa$ B- $\alpha$  が減じていることから、UCHL1 の脱ユビキチン化作用による I $\kappa$ B- $\alpha$  の安定化が示唆された。すなわち、UCHL1 は I $\kappa$ B- $\alpha$  を安定化させることにより NF- $\kappa$ B の活性を抑制し、抗炎症作用を有すると考えられた。

### ③ UCHL1 の血管平滑筋細胞での機能解析

EC と同様に SMC においても、UCHL1 の過剰発現は TNF- $\alpha$  刺激下の NF- $\kappa$ B 活性上昇を有意に抑制し、下流の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6、MMP-9 の TNF- $\alpha$  による発現増加を有意に抑制した。一方、siRNA により UCHL1 の発現を SMC において抑制すると、逆に TNF- $\alpha$  刺激下の NF- $\kappa$ B 活性上昇を認めた。以上により、UCHL1 は SMC においても NF- $\kappa$ B 活性を制御していることが示された。

### ④ ラット頸動脈傷害モデルでの検討

更に *in vivo* における UCHL1 の機能を検討するために、ラット総頸動脈バルーン傷害血管に HVJ-liposome 法を用いて UCHL1 を遺伝子導入した。その結果、バルーン障害後 1 週間目の新生内膜ではコントロールに比し、UCHL1 の遺伝子導入群において活性型 p50 や活性型 p65、ICAM-1、MMP-9 の発現は減少し、バルーン障害後 2 週間目では有意に新生内膜の形成は抑制された。すなわち、UCHL1 を傷害血管に過剰発現させると、血管リモデリングが抑制されることが示された。

## [ 総括 ]

本研究では、血管における DUB の存在を初めて示したほか、NF- $\kappa$ B の活性抑制による抗炎症作用の証明により、動脈硬化や血管リモデリングにおけるユビキチン・プロテアソーム系の重要性が明らかになった。また、UCHL1 はラットの頸動脈傷害モデルにおいて、傷害血管における新生内膜形成を NF- $\kappa$ B 活性低下を介して抑制したことから、血管におけるユビキチン・プロテアソーム系を標的とした新規の動脈硬化治療法の可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

ユビキチン化は異常蛋白の除去、シグナル伝達などの様々な機能に参与している。本研究ではヒト内皮細胞の cDNA ライブラリーの機能スクリーニングから血管に存在する脱ユビキチン化酵素、UCHL1 を同定した。UCHL1 はヒト頸動脈動脈硬化病変に発現し、ラットバルーン障害後の総頸動脈の新生内膜に著明な発現の上昇を認めた。UCHL1 を過剰発現すると、NF- $\kappa$ B 活性が抑制され、バルーン障害血管での新生内膜形成が抑制された。NF- $\kappa$ B 活性抑制の機序として脱ユビキチン化作用による I $\kappa$ B- $\alpha$  の安定化が示唆された。一方、siRNA にて UCHL1 の発現を抑制すると、逆に NF- $\kappa$ B 活性上昇を認めたことより、UCHL1 は血管にて NF- $\kappa$ B 活性調節により抗炎症作用に寄与している可能性がある。本研究は初めて血管における脱ユビキチン化酵素の発現や機能、動脈硬化治療の標的分子としての可能性を示した報告であり、学位論文に値する。