

氏 名 (本 籍)	児 玉 憲 一 (広 島 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 0 7 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	Bidirectional regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene at distinct sites of its promoter by nitric oxide in vascular smooth muscle cells (一酸化窒素による血管平滑筋細胞での monocyte chemoattractant protein-1 遺伝子発現の異なるプロモーター部位を介する二方向性調節)
審 査 委 員	主 査 教 授 大 久 保 岩 男 副 査 教 授 岡 部 英 俊 副 査 教 授 小 笠 原 一 誠

論文内容要旨

※整理番号	512	(ふりがな) 氏名	児玉憲一 (こだまけんいち)
学位論文題目	Bidirectional regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene at distinct sites of its promoter by nitric oxide in vascular smooth muscle cells (一酸化窒素による血管平滑筋細胞での monocyte chemoattractant protein-1 遺伝子発現の異なるプロモーター部位を介する二方向性調節)		
<p>【背景と目的】 我々は高インスリン血症を呈するインスリン抵抗性状態で動脈硬化が発症・成立する機序の一つとして、インスリン受容体以後のシグナル分子である phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の持続的活性化の意義を報告した。血管平滑筋細胞での PI3K の持続的活性化は炎症性サイトカインである Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の発現を亢進させた。一方、インスリン抵抗性状態下の血管では抗動脈硬化作用を有する一酸化窒素(NO)の産生が低下している。そこで、インスリン抵抗性状態での血管平滑筋細胞における NO の役割を明らかにする目的で、NO による MCP-1 遺伝子の転写調節機構を検討した。</p> <p>【方法】 アデノウイルスを用いて培養ラット血管平滑筋細胞で PI3K を持続的に活性化させた。NO ドナーとして sodium nitroprusside を用いた。MCP-1 の mRNA 発現量を定量的 PCR 法で、分泌蛋白量を ELISA 法で測定した。MCP-1 のプロモーター活性をルシフェラーゼ法(Luci 法)で測定した。CCAAT enhancer binding protein (C/EBP)の結合活性をそのレポーターベクターを作成して測定した。C/EBP homologous protein (CHOP)の発現をウェスタンブロット法で測定した。MCP-1 プロモーターの CHOP 反応部位を同定するために deletion 解析と gel mobility shift 解析を用いた。同定し得た CHOP 反応部位と相同な塩基配列のオリゴヌクレオチドをデコイとして用い MCP-1 プロモーター活性に与える効果を Luci 法で検討した。</p> <p>【結果】 1) PI3K の持続的活性化により約 6 倍に増加した MCP-1 の mRNA 発現は 0.05mM の NO ドナーにより 67%低下したが、0.5mM の NO ドナーではこの低下作用は認められず、1.0mM では逆に増加した。分泌蛋白量で検討しても同様の結果を認めた。2) MCP-1 のプロモーター活性についても 1)と同様に NO 濃度依存性の変化を認め、さらにこの結果は転写因子 NF-κB の結合領域を変異させても不変であった。3) 一方、PI3K の持続的活性化により増加した C/EBP 結合活性は NO ドナー濃度依存性に低下した。4) NO ドナーにより濃度依存性に CHOP 発現が増加した。C/EBP 過剰発現により約 8 倍に増加した MCP-1 のプロモーター活性は少量の CHOP を共発現させるとこの増加は認められなくなった。しかし CHOP 発現量を増加させると再び MCP-1 のプロモーター活性が増加した。同様の結果を PI3K 活性化時にも認めた。5) 単独の CHOP 発現では発現量依存性に MCP-1 のプロモーター活性が増加した。また NO ドナー濃度依存性に MCP-1 のプロモーター活性及び遺伝子発現が増加した。6) MCP-1 プロモーターの上流域-193 base pair (bp)から-179 bp の間に CHOP 反応領域を認めた。7) この領域をデコイとして細胞内に導入すると CHOP 単独発現による MCP-1 プロモーター活性上昇と NO ドナー刺激による MCP-1 プロモーター活性上昇のいずれもが消失した。</p> <p>【考察】 PI3K の持続的活性化により誘導される MCP-1 発現の増加は、低濃度の NO により抑制されるが、過剰の NO では逆に MCP-1 発現が増加することが示された。この機構として NO により誘導された CHOP はロイシンジッパー領域を介して C/EBP の DNA 結合活性を阻害することで PI3K の持続的活性化により誘導される MCP-1 発現を抑制する一方で、CHOP は単独で転写因子として CHOP 反応領域を介して MCP-1 発現を増加させていることが示唆された。</p> <p>【結語】 PI3K の持続的活性化により誘導される血管平滑筋細胞における MCP-1 発現は NO 濃度依存性に 2 方向性に調節された。血管組織において適切な NO 濃度を維持することでインスリン抵抗性状態での動脈硬化の進展を改善できる可能性が示唆された。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	512	氏名	児玉憲一
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>インスリン抵抗性状態では血管平滑筋細胞での炎症性遺伝子発現が亢進する一方で血管内皮細胞における一酸化窒素(NO)の産生が低下している。本研究は、インスリン抵抗性状態における血管平滑筋細胞での炎症性遺伝子発現に焦点をあて、NOを補充した際の炎症性遺伝子発現の変化およびその機序について検討したものである。</p> <p>培養ラット血管平滑筋細胞において NO donor により NO を補充し炎症性遺伝子 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の発現をウエスタンブロット法、real time PCR 法、ルシフェラーゼ法で検討した。さらに NO の作用機序をルシフェラーゼ法や Electrophoretic Mobility Shift Assay 法で検討した。</p> <p>その結果、NO は比較的低濃度においては MCP-1 発現を抑制したが、逆に高濃度では MCP-1 発現を亢進させており、そのいずれにおいても C/EBP homologous protein (CHOP)が関与する可能性が示された。</p> <p>以上の研究は、インスリン抵抗性状態での動脈硬化の発症・進展に対する治療法開発に重要と考えられ、博士(医学)の授与に値するものと判定された。</p>			
(平成 17 年 8 月 31 日)			