

学位論文の要旨

|   |    |    |       |
|---|----|----|-------|
| 学位の種類   | 博士 | 氏名 | 中西 啓介 |
| <p>学位論文題目</p> <p><b>CREB activation by MAPKAPK3 and FHL is a key signal that induces intimal hyperplasia</b></p> <p>(MAPKAPK3とFHL5によるCREBの活性化は内膜肥厚を引き起こす主要なシグナルである)</p> <p>共著者名</p> <p>齋藤幸裕, 東 信良, 笹嶋唯博</p> <p>未公表</p> <p>(Circulation Research投稿中)</p> <p>研究目的</p> <p>閉塞性動脈疾患において自家静脈を用いたバイパス術は血行再建法として有用だが, 内膜肥厚による再狭窄やグラフト不全は再手術の原因となる. 内膜肥厚は血管中膜層の平滑筋細胞が遊走, 増殖して形成されると考えられている. これまで多くの治療用分子が細胞, 動物レベルで検討され報告されているが, 一つとして実際の臨床で有効性を認めたものはない. 例えばE2Fデコイによる臨床研究は第Ⅲ相試験まで終了したが, 静脈グラフトの開存率を改善するには至らなかった. これまでの経緯を踏まえ, 本研究ではヒトの静脈グラフトを解析することから始め, 内膜肥厚に対し抑制効果のある新たな分子を同定, 解析し, 動物モデルでその治療効果を明らかにすることを目的とした.</p> <p>材料・方法</p> <p>1、細胞</p> <p>ヒト大動脈平滑筋細胞 (VSMC), BHK21細胞を使用した.</p> <p>2、網羅的遺伝子解析</p> <p>当科で施行した下肢バイパス術後半年で狭窄を来した患者から, 自家静脈バイパスグラフトを採取した. 修復に使用した上肢静脈の一部, グラフト正常部, グラフト狭窄部の3検体からmRNAを採取し, マイクロアレイによる解析を行った. (旭川医科大学倫理委員会の承認のもと被験者から書面による同意を得ている.)</p> |    |    |       |

### 3, 細胞増殖能, 遊走能の評価

細胞増殖の検討はMTS assay (modified MTT assay) もしくは*c-fos* promoter assayで評価した. 細胞遊走能はmodified Boyden chamber法を使用した.

### 4, 細胞内シグナルの解析, dominant-negativeによる実験

CREBの活性化はCRE/luciferase construct (CRE/luc)によるreporter gene で評価し, CREB活性化機序はgel shift assayとWestern blotで検討した. CREBの dominant-negativeはKCREBとCREB133の2種を使用した.

### 5, マウス大腿動脈ワイヤ擦過モデルと遺伝子導入

引用文献1の通りマウス大腿動脈をワイヤで擦過後にKCREB遺伝子を内腔に充填し, 超音波導入法により血管壁に遺伝子導入した. 術後3週で大腿動脈を採取し, 内膜肥厚の評価を行った.

### 6, 統計学的検討は, 2群間はstudent *t* testを使用し, 多群間は分散分析

(Dennett' s testあるいはTukey' s test) を使用した.

## 成 績

### 1, ヒト静脈グラフトサンプルの遺伝子解析とスクリーニング

マイクロアレイの結果から静脈グラフト狭窄部で特異的に高発現となっている2種の遺伝子を解析することとした. ひとつはSer/Thr protein kinase familyの一種であるmitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 (MAPKAPK3)で, もうひとつは転写因子のcyclicAMP response element binding protein(CREB) familyのco-activatorであるfour and a half LIM domains 5 (FHL5)であった.

### 2, VSMCに対する効果と機序の検討

MAPKAPK3とFHL5はそれぞれ単独でもVSMCの増殖能, 遊走能を増加させるが, 2種を同時に導入した場合, 単独の場合よりも増加した. またCRE/luc reporter assayでも同様の結果であった. さらにMAPKAPK3はリン酸化によりCREBを活性化するが, FHL5はCREBに直接結合することで活性化することが明らかとなった.

### 3, CREB dominant-negativeによる抑制効果の検討

CRE/luc reporter assayでCREB dominant-negativeの効果を検討したとこ

る、CREBのリン酸化を抑制するCREB133ではFHL5の効果は抑制されず、一方DNA binding domainのmutantであるKCREBは両候補遺伝子の効果を抑制する結果となった。KCREBは増殖能、遊走能に対しても抑制効果が認められた。

4、マウス大腿動脈ワイヤ擦過モデルにおけるKCREBの内膜肥厚抑制効果の検討  
ワイヤ擦過後1週目で両遺伝子ともに内因性の発現が2.5~5倍に上昇しており、このモデルでの両遺伝子の関与が示唆された。ワイヤ擦過と同時にGFPまたはKCREBを遺伝子導入したところ、3週目で有意差をもってKCREB導入群で内膜肥厚の抑制効果が確認された。

#### 考察

本研究ではヒト静脈グラフトの遺伝子解析より、VSMCの増殖能、遊走能を増加させる2種の新たな遺伝子を発見した。この2種の遺伝子はともに共通する転写因子CREBを活性化するが、その活性化の機序は異なっていた。そのため両遺伝子の過剰発現には相加作用がある。これまでの報告から内膜肥厚に関与する機序は多岐にわたり、さまざまな経路が関与していると予測されるが、今回CREBの dominant-negativeであるKCREBの遺伝子導入で、VSMCの増殖能、遊走能が抑制され、動物モデルでも内膜肥厚抑制効果を認めた。これらの結果より転写因子であるCREBが内膜肥厚を誘導する多くの分子と連動している可能性があり、活性化CREBの調節により内膜肥厚の抑制が可能ではないかと示唆された。

#### 結語

臨床サンプルの解析から内膜肥厚を惹起する2つの遺伝子、MAPKAPK3とFHL5を同定した。共通した標的であるCREBを阻害することにより動物モデルで内膜肥厚を抑制することが可能であった。今後新たな治療戦略となる可能性が示唆された。





#### 引用文献

- 1) Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Nov;32(11):2097-104.
- 2) Maizels ET, Mukherjee A, Sithanandam G, Peters CA, Cottom J, Mayo KE, Hunzicker-Dunn M. Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol.* 2001 May;15(5):716-33.
- 3) Gian Maria Fimia, Dario De Cesare, and Paolo Sassone-Corsi . A Family of LIM-Only Transcriptional Coactivators: Tissue-Specific Expression and Selective Activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(22): 8613–8622.

#### 参考論文

なし

## 学位論文の審査結果の要旨

|  |         |     |       |
|--|---------|-----|-------|
| 報告番号   | 第 号     |     |       |
| 学位の種類  | 博士 (医学) | 氏 名 | 中西 啓介 |
| <p>審査委員長 <u>渡部 剛</u> </p> <p>審査委員 <u>長谷部 直幸</u> </p> <p>審査委員 <u>岩田 雅博</u> </p> <p>審査委員 _____ </p>  |         |     |       |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>CREB activation by MAPKAPK3 and FHL is a key signal that induces intimal hyperplasia. (MAPKAPK3 と FHL5 による CREB の活性化は内膜肥厚を引き起こす主要なシグナルである)</b></p> <p>閉塞性動脈疾患の外科的治療として行われる自家静脈を用いたバイパス術では、術後生じるグラフト血管の内膜肥厚による再狭窄が重要な問題となっている。この内膜肥厚を防ぐために、過剰な細胞増殖を抑制する様々な分子標的薬の開発が試みられてきたが、これまで臨床的な有効性を証明するに至っていない。</p> <p>本論文提出者は、この内膜肥厚の病因を解明する目的で、術後狭窄を来した自家静脈グラフトにおける遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイを用いて解析し、転写因子 CREB の活性化因子である MAPKAPK3 および FHL の発現が特異的に上昇していることを見出した。この知見を踏まえて、本論文提出者はさらに、MAPKAPK3 および FHL の発現が単離培養ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖能および遊走能を促進し、その効果がそれぞれ CREB のリン酸化あるいは直接的な相互作用によることを明らかにした。また、ワイヤ擦過によりマウス大腿動脈に内膜肥厚を誘起する動物モデルにおいても、処置後 1 週で MAPKAPK3 と FHL の発現が上昇することを確認し、このモデル作成時に CREB の DNA 結合領域変異体である KCREB を遺伝子導入すると有意に内膜肥厚が抑制できることを見出した。これらの知見は、転写因子 CREB が閉塞性動脈疾患に対する血管グラフト術後の内膜肥厚を阻止するための標的分子として有効である可能性を初めて示したもので、同疾患の治療成績の向上につながる重要な成果であると思われる。</p> <p>本研究で用いられた方法の妥当性は、適切な対照実験によって検証されており、論文の記述および図版の質・構成も得られた知見を説明するのに十分なものである。また、本論文の内容および関連領域に関して、論文提出者に試問を行ったところ、適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。以上の結果に基づき、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判定した。</p> |         |     |       |