

(99)

氏名(生年月日)	井 口 信 雄
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第1724号
学位授与の日付	平成9年3月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	アデノシンの血管内皮細胞におけるエンドセリン(ET-1)遺伝子発現の抑制について
論文審査委員	(主査)教授 細田 瑛一 (副査)教授 出村 博, 橋本 葉子

論文内容の要旨

〔目的〕

エンドセリン1(ET-1)は強力な血管収縮物質であり,また虚血および再灌流に重要な役割を果たしていると報告されている。一方,アデノシンは強力な冠拡張物質として知られ,近年は虚血耐性(プレコンディショニング)の発現に密接に関与しているものとして注目をあびている。しかしこれまでアデノシンについてET-1分泌と関連して論じられたことはなく,そのような作用を明らかにすることは臨床的にも重要である。本研究は,アデノシンが血管内皮細胞においてET-1遺伝子の転写調節をどのように修飾しているかを検討した。

〔方法〕

継代培養したウシ頸動脈内皮細胞(BAEC)をアデノシン1mMで刺激して,60,90,120分後に抽出したRNAをウシET-1 cDNAをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い,得られたET-1 mRNAのバンドを比較した。次に,アデノシンによるET-1遺伝子発現の変化が転写レベルでの調節であるのかについて検討するため,長さの異なるET-1遺伝子のプロモーター領域を含むCATのプラスミドをBAECに導入してアデノシンで刺激後,CAT mRNAの発現をRNaseプロテクションアッセイにて評価した。またゲルシフトアッセイによりET-1遺伝子のプロモーター領域への転写因子結合能の変化を評価した。

〔結果〕

アデノシン1mMによるET-1遺伝子の発現は,ノーザンプロット解析においてそのバンドは30分より抑制されはじめ90分にはコントロールの12%にまで抑制された。またこの抑制は90分がピークであり,一過性であった。次に長さの異なるET-1遺伝子上流-1.7 kb,-204bpを挿入したCATのプラスミドをそれぞれBAECに導入してアデノシン刺激を行った。RNaseプロテクションアッセイにおいて,いずれのプラスミドを用いたものでもCAT遺伝子の発現はコントロールとして導入した β ガラクトシダーゼ遺伝子と比較して60分で抑制がみられ,90分ではさらにはっきり抑制された。このことより反応部位がET-1遺伝子上流-204bp内にあることが示された。この中で重要な転写因子結合部位として知られているのはAP-1部位およびGATA部位であるが,これらに対するDNA蛋白結合能をゲルシフトアッセイで評価した。アデノシンによりAP-1部位への蛋白(転写因子)結合能を示すと思われる特異的なバンドは60,90分ともにコントロールと比較して明らかに抑制された。一方GATA部位への蛋白結合能を示すバンドはコントロールと比較して明らかな差はみられなかった。このことより,アデノシンがET-1遺伝子の転写調節領域においてAP-1部位への転写因子結合能を抑制することが明らかとなった。

〔考察〕

時間経過のはやいプロモーター活性の低下を通常のCATアッセイやルシフェラーゼアッセイで検出する

ことは不可能であり、本研究では、RNase プロテクションアッセイを用いて解析が可能となった。

本研究によりアデノシンはそれ自身のもつ血管拡張だけでなく ET-1合成の抑制という機序を介しても血管拡張を引き起こす、すなわち ET-1とアデノシンとの間のフィードバック機構の存在が示唆され、臨床的

にも意義がある。

〔結論〕

心筋細胞における虚血耐性獲得において重要な役割を果たしているアデノシンが、血管内皮細胞での ET-1遺伝子発現を抑制していることが証明された。

論文審査の要旨

本研究の目的は主要な動脈拡張物質の一つであるアデノシンが内皮細胞由来の血管収縮物質 ET-1の分泌調節に関連しているかどうかを ET-1遺伝子転写調節機能の面から明らかにすることである。

培養ウシ頸動脈内皮細胞をアデノシン1mMで刺激し30分毎に120分までの各時間に RNA を抽出し、ウシ ET-1 cDNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、ET-1 mRNA のバンドを比較した。また ET-1遺伝子のプロモーター領域に CAT を挿入したプラスミドを用いて CAT mRNA の発現を RNase プロテクションアッセイで評価した。ET-1遺伝子の発現は30分から抑制され90分で最低となりコントロールの12%となり、その後回復した。また重要な転写因子結合部位のうち GATA 部位よりも AP-1部位への結合が抑制された。

以上より心筋細胞において虚血耐性獲得に重要な役割を果たしているアデノシンが直接血管拡張作用と共に血管内皮細胞での ET-1遺伝子発現を抑制していることを証明した意義ある研究である。

主論文公表誌

アデノシンの血管内皮細胞におけるエンドセリン (ET-1) 遺伝子発現の抑制について

東京女子医科大学雑誌 第66巻 第11号
891-897頁 (平成8年11月25日発行) 井口信雄

副論文公表誌

- 1) ダイナミック SPECT を利用した¹²³I-BMIPP 心筋シンチグラフィの臨床応用. 心臓 28(Suppl 1): 17-22(1996) 小林秀樹, 井口信雄, 浅野竜太, 井上征治, 岡 俊明, 百瀬 満, 住吉徹哉, 日下部きよ子, 細田瑛一
- 2) 左室圧過剰負荷を呈する心疾患の¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィの特徴—MIBG 初期心筋撮取率の高値所見について—. 核医学 32(6): 587-592 (1995) 小林秀樹, 百瀬 満, 仁木清美, 山住令子, 井口信雄, 井上征治, 堀江俊伸, 日下

部きよ子, 細田瑛一

- 3) ¹²³I-BMIPP 心筋シンチグラフィを用いた不安定狭心症の責任冠動脈領域の同定—CCU 入室例の検討—. 核医学 33(3): 279-284 (1996) 岡 俊明, 小林秀樹, 井上征治, 浅野竜太, 半田 淳, 井口信雄, 住吉徹哉, 日下部きよ子, 細田瑛一
- 4) Denopamine が著効した高齢難治性冠攣縮性狭心症例. 呼と循 42(4): 387-391 (1994) 井上征治, 宮沢佑二, 井口信雄, 笠原信也, 児玉秋生, 春田昭二, 加藤丈二, 広沢弘七郎, 細田瑛一
- 5) 心不全を初発症状とし徐脈性不整脈を呈した不整脈源性右室異形成症 (ARVD) の1例. 呼と循 42(2): 187-191 (1994) 井上征治, 宮沢佑二, 田中 徹, 邊 泰樹, 井口信雄, 児玉秋生, 笠原信也, 広沢弘七郎, 堀江俊伸