

氏名(本籍)	関根 理 (東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第441号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Insulin Activates CCAAT/Enhancer Binding Proteins and Proinflammatory Gene Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells (インスリンは血管平滑筋細胞においてphosphatidylinositol 3-kinaseを介してCCAAT/enhancer binding protein及び炎症性遺伝子発現を活性化させる)

審査委員	主査 教授	岡村 富夫
	副査 教授	上原 正巳
	副査 教授	堀江 稔

## 論文内容要旨

### 【目的】

高インスリン血症が動脈硬化の独立した重要な危険因子であることが疫学的研究から明らかにされているが、その分子機構に関しては不明な点が多い。われわれは血管平滑筋細胞 (VSMCs) において、インスリンがインスリン受容体を介するシグナル伝達を行うこと、その経路としてRas-MAP kinase系よりもIRS-1、PI3-kinase経路が主体であることを明らかにした。このことから、高インスリン血症状態では、VSMCsにおいて持続的にPI3-kinase経路が活性化されていることが予想できる。近年PI3-kinaseが、転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化を介して遺伝子発現調節を行うことが明らかとなり、高インスリン状態でも同様の機構が働いているか否かが注目される。

そこで今回、組み替え型アデノウイルスを用いて持続的にPI3-kinaseが活性化された状態でのVSMCsのシグナル伝達と遺伝子発現を検討した。

### 【方法】

1. Sprague-Dawleyラット(200-300 g)の胸部大動脈よりVSMCsを酵素法にて単離培養した。
2. 組み替え型アデノウイルスを用いてPI3-kinaseのcatalytic subunitであるp110 $\alpha$  (Myc-tagged, membrane-targeted p110: p110CAAX)または、コントロール(LacZ)をVSMCsに過剰発現した。
3. 細胞内インスリンシグナル伝達蛋白 (Akt、GSK3、ERK、JNK、p38) の発現及び活性化の程度を、Western blot法にて検討した。
4. 動脈硬化関連遺伝子(MCP-1、PAI-1、tissue factor)の発現をNorthern blot法にて検討した。
5. MCP-1遺伝子発現を調節する転写因子 (NF- $\kappa$ B、AP-1、C/EBP) のDNA結合能をElectrophoretic mobility shift法にて検討した。
6. MCP-1遺伝子の上流域約3.6kbをルシフェラーゼ発現ベクター (PGL3) に組み込み、リポフェクチン法にて細胞に遺伝子導入し、転写活性を測定した。さらに、上流域の長さや転写因子の結合配列を変異させたものを作成し、同様の検討を加えた。
7. C/EBP- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ の細胞内の局在を免疫細胞化学染色にて検討した。

## 【結果】

1. 1-10 nMのインスリンはVSMCsのMCP-1 mRNA発現を増加した。
2. p110CAAXの過剰発現はPI3-kinaseの下流のシグナルであるAktやGSK3のリン酸化を亢進したが、MAP kinase系のERK、p38、JNKのリン酸化を亢進しなかった。MCP-1のmRNA発現はコントロールレベルと比較してウイルス量依存的に約10-15倍に増加した。
3. p110CAAX過剰発現はMCP-1遺伝子上流域におけるNF- $\kappa$ BやAP-1のDNA結合能を亢進しなかった。
4. p110CAAX過剰発現は3.6kbのMCP-1プロモーター活性を2.9倍 ( $P < 0.01$ ) 増加したが、2.6 kbまで欠失させるとその増加は消失した。一方、2.3kbから2.6kbの間に存在するNF- $\kappa$ Bの結合領域を欠失あるいは変異させても、p110CAAXによるプロモーター活性の増加を認めた。
5. そこでNF- $\kappa$ B以外の転写因子の結合配列を2.6kbから3.6kbの間で検索したところ、新たに、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) が結合する流域を2箇所認め、p110CAAX過剰発現でこの領域への結合蛋白が増加した。また、このC/EBPの結合領域を変異させたところ、プロモーター活性が2.6kbの場合と同程度まで減少した。
6. C/EBPsを過剰発現させたところ、MCP-1プロモーター活性はC/EBP- $\alpha$ では変化しなかったが、C/EBP- $\beta$ 、- $\delta$ で6-7倍に上昇した。
7. p110CAAX過剰発現により、C/EBP- $\beta$ 、- $\delta$ のmRNA発現及び核内蛋白発現は有意に増加した。
8. 同様に、1-10 nMのインスリンはC/EBP- $\beta$ 、- $\delta$ の核内発現を有意に増加した。

## 【考察】

動脈硬化の進展に炎症性サイトカインの発現が重要であり、最近の疫学研究では、高インスリン血症と炎症の関連が指摘されている。我々はラットVSMCsにp110CAAXを過剰発現させることで、1-10 nMのインスリン投与と同様にPI3-kinase系シグナル伝達経路が持続的に活性化され、MCP-1などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加することを見出した。この転写調節として、従来報告されているNF- $\kappa$ BやAP-1ではなく、C/EBP- $\beta$ 、- $\delta$ の核内発現の増加が重要と考えられた。このことから、高インスリン血症で誘導されるC/EBPが炎症性サイトカインの発現を介して動脈硬化を進展させることが予想された。

## 【結語】

インスリン及びPI3-kinaseの持続的な活性化により、VSMCsにおいて、C/EBP- $\beta$ 、- $\delta$ の転写活性が亢進し、MCP-1などの炎症性遺伝子発現が増加した。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、高インスリン血症と動脈硬化進展の関係を解明するために、血管平滑筋細胞にphosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) を過剰発現させ、炎症性サイトカインに関する遺伝子発現調節機構を検討した。1-10 nMのインスリン投与と同様に、PI3K系のシグナル伝達経路の持続的な活性化により、MCP-1などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加することを見出した。この転写調節機構として、従来報告されている転写因子のNF- $\kappa$ BやAP-1ではなく、C/EBP- $\beta$ 、- $\delta$ の核内発現の増加が重要と考えられた。このことから、高インスリン血症で誘導されるC/EBPが炎症性サイトカインの発現を介して動脈硬化を進展させると考えられた。

本研究は高インスリン血症における動脈硬化進展機構に、C/EBPによる転写調節が関与することを初めて実証したもので、臨床的にも示唆に富むものである。従って、博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。