

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

平成14年3月15日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 許 欣
所属機関名 大阪大学大学院
指導責任者氏名 笠山 宗正
職 名 講 師
所 在 地 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
電 話 06-6879-3837(直通)

1. 研究テーマ 核内受容体による血管内皮細胞のサイトカンや接着分子発現制御

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

1. 笠山宗正、許欣、大月道夫：性ホルモンによる血管内皮細胞の接着分子発現制御。第74回日本内分泌学会学術総会シンポジウム、2001年、横浜市。
2. 許欣、大月道夫、山本浩靖、斎藤博、住谷哲、幸原晴彦、笠山宗正：グルココルチコイドレセプター (GR) による標的遺伝子特異的NF- κ B活性阻害とその機構。第74回日本内分泌学会学術総会、2001年、横浜市。
3. 合屋佳世子、大月道夫、許欣、笠山宗正：2型糖尿病患者の頸動脈硬化進展と血清可溶性VCAM-1に与えるベラプロストナトリウムの作用。第16回日本糖尿病合併症学会、2001年、大阪市。
4. 合屋佳世子、許欣、大月道夫、笠山宗正：血管内皮細胞のVCAM-1発現に及ぼすベラプロストナトリウムの作用。第38回日本糖尿病学会近畿地方会、2001年、大阪市。

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Otsuki, M., Saito, H., Xu, X., Sumitani, S., Kouhara, H., Kurabayashi, M., and Kasayama, S.: Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF- κ B binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis*, 158: 121-128, 2001.
2. Otsuki, M., Saito, H., Xu, X., Sumitani, S., Kouhara, H., Kishimoto, T. and Kasayama, S.: Progesterone, but not medroxyprogesterone, inhibits vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 243-248, 2001.

3. 今後の研究計画

我々は内皮細胞における核内受容体による IL-6、VCAM-1 などの炎症性因子の遺伝子発現制御に関する研究を行っています。これまでの検討結果では、核内受容体によって炎症性因子の転写抑制作用には、核内受容体 - 遺伝子間に特異性が存在することを明らかにしました。これまでに、炎症性分子の遺伝子転写抑制に対する核内受容体の特異性とそのメカニズムを明らかにした報告はありません。我々は、このような特異性が、標的遺伝子のプロンモーター構造の微細な差異によって、また核内受容体 - 転写因子間相互作用に関与する転写共役因子の特異性によってもたらされるとの仮説を立てています。今現在と今後、核内受容体の発現量の変化また転写共役因子の発現量の変化によって、核内受容体による VCAM-1 および IL-6 遺伝子の転写抑制作用の強度が変化するかどうかを検討致したいです。

4. 指導責任者の意見

許 欣 君は、現在大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座の大学院 2 年生であり、日夜医学研究に勤しんでいる。主要な研究テーマは、血管壁に生じる炎症性疾患の発症メカニズムを解明しその有効な抑止的治療法を開発することである。許 君はその研究態度たるや非常に真面目でかつ勉学意欲の高い優秀な学生である。これまでは、特に血管内皮細胞における接着分子の発現制御に関する研究を進めており、核受容体リガンドやプロスタサイクリン誘導体が抗動脈硬化的に作用する分子機構を明らかにしてきた。これらの研究成果は、筆頭研究者あるいは共同研究者として既にいくつかの学会や論文で発表しており、他機関の研究者ともディスカッションできるようになっている。性格も明るく、日々の生活においても教室の他の医学研究者や事務職員とも協調してうまくやっている。これほどまで優秀な留学生をいまだかつて見たことがない、というのが私の正直な感想である。

指導責任者氏名 筭山 宗正 ④

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

血管内皮細胞における IL-6・VCAM-1 プロモーター活性 に及ぼす PPAR α の作用

研究者氏名： 許 欣
中国所属機関 中国医科大学付属第三病院内科
日本研究機関 大阪大学医学系研究科分子病態内科学
指導責任者 講師 笠山 宗正
共同研究者名 大月 道夫, 斉藤 博, 住谷 哲, 幸原 晴彦

要旨

血管内皮細胞におけるサイトカインや接着分子発現の増強は、血管壁における炎症の分子的基盤のひとつと考えられている。PPAR α が血管平滑筋細胞における IL-6 産生と血管内皮細胞における VCAM-1 発現を抑制することが報告されているが、その作用機構は不明であった。我々は、培養血管内皮細胞において、Feno の処理により IL-6 産生および VCAM-1 発現が低下することを判明しました。レポーター遺伝子を用いた解析により、これら炎症性分子の発現低下は少なくとも一部は遺伝子の転写レベルでの抑制に基づくことが判明した。また、EMSA による解析結果より、Feno は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合を阻害することが明らかとなった。Feno は、TNF- α 刺激時の NF- κ B p65 蛋白の核内移行に対しては影響を与えなかったことから、NF- κ B の活性化阻害における Feno の作用点は NF- κ B の核内移行後のステップにあると考えられた。PPAR γ のリガントである Pio は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合に影響を及ぼさなかったことから、Feno の作用は PPAR α を介したものであると考えられた

Key Words Endothelial cells, PPAR-alpha, IL-6, VCAM-1, .

緒言：

種々の炎症性疾患においては、血管内皮細胞におけるサイトカインや接着分子の発現が増強し、これらは血管壁における炎症の分子的基盤のひとつと考えられている。したがって、これら炎症性分子の発現抑制は抗炎症薬のターゲットとして有用であると思われる。実際に、強力な抗炎症薬のひとつであるグルココルチコイドは種々のサイトカインや接着分子の発現を抑制することが報告されている^{1,2}。このようなグルココルチコイドの作用は、グルココルチコイドレセプター(GR)を介した標的遺伝子の転写抑制によると考えられている³。最近では、GR 以外の他の核レセプターのリガントによるこれら炎症性分子の発現抑制も明らかにされている^{4,5}が、その分子機構の詳細については不明の点が多い。

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α は核レセプタースーパーファミリーに属する受容体であり、種々の脂肪酸やフィブラート剤により活性化される。すでに、PPAR α が血管平滑筋細胞における IL-6 産生と血管内皮細胞における VCAM-1 発現を抑制することが報告されている^{5,7}が、その作用機構は不明であった。今回、我々は血管内皮細胞における IL-6 と VCAM-1 遺伝子のプロモーター活性に及ぼす PPAR α の作用についての解析を行った。

対象と方法：

細胞培養：ウシ大動脈由来内皮細胞(BAEC)は 10%FCS を含む DMEM 培養液で、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)は 10%FCS、2 ng/ml bFGF を含む MCDB131 培養液で培養した。

レポーターアッセイ：IL-6 レポーター遺伝子(-179/+12 hIL-6-LUC：大阪大学審良静男博士より供与)または VCAM-1 レポーター遺伝子(-258/+40 hVCAM-1-LUC：群馬大学倉林正彦博士より供与)を、SuperFect (QIAGEN)を用いて BAEC に移入した。2 時間後に細胞をフェノプラート(Feno)で 24 時間処理し、その後 TNF- α (20 ng/ml)で刺激した。刺激 4 時間後(VCAM-1 レポーター)または 8 時間後(IL-6 レポーター)に細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

EMSA (electrophoretic mobility-shift assay) : HUVEC を Feno またはピオグリタゾン(pio)で 24 時間処理した後 TNF- α で刺激し核蛋白を抽出した。ヒト IL-6 プロモーターおよびヒト VCAM-1 プロモーター領域の NF- κ B 結合配列を含む標識オリゴヌクレオチドを作成し、これに対する結合を解析した⁸⁾。

免疫染色 : HUVEC を 2%パラホルムアルデヒドで固定した後 200 倍希釈の抗 NF- κ B p65 抗体(Santa Cruz)を加え、ビオチン化 IgG 抗体で処理した後 Vectastain 社 ABC kit を用いて免疫染色を行った。

結 果

BAEC に IL-6 レポーター遺伝子を移入し、IL-6 プロモーター活性に及ぼす Feno の効果について検討した(図 1A)。TNF- α の刺激により IL-6 のプロモーター活性は 16 倍に増加した。Feno はこの活性を濃度依存性に抑制した。Feno 単独では IL-6 プロモーター活性に影響しなかった。また、TNF- α は VCAM-1 プロモーター活性を約 20 倍に増加させたが、Feno の処理によりこの活性は有意に抑制された(図 1B)。

IL-6 遺伝子と VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域には、各々 1 ヶ所および 2 ヶ所の NF- κ B 結合配列が存在する^{9,10)}。そこで、Feno がこれらプロモーター領域への NF- κ B の結合を阻害するか否かについて EMSA による解析を行った(図 2)。その結果、Feno は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーターに対する NF- κ B の結合を阻害した。Pio はこの NF- κ B 結合を阻害しなかった。

NF- κ B の活性化には細胞質から核への移行が必須であることが明らかにされている¹¹⁾ため、NF- κ B p65 蛋白の細胞内局在に対する Feno の作用について解析した(図 3)。免疫染色法では、TNF- α の刺激によって p65 の核内移行が観察されたが、これは Feno の処理によって影響を受けなかった。

考 察

我々は、培養血管内皮細胞において、Feno の処理により IL-6 産生および VCAM-1 発現が低下することを報告した⁸⁾。レポーター遺伝子を用いた解析により、これら炎症性分子の発現低下は少なくとも一部は遺伝子の転写レベルでの抑制に基づくことが判明した。また、EMSA による解析結果より、Feno は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合を阻害することが明らかとなった。Feno は、TNF- α 刺激時の NF- κ B p65 蛋白の核内移行に対しては影響を与えなかったことから、NF- κ B の活性化阻害における Feno の作用点は NF- κ B の核内移行後のステップにあると考えられた。PPAR γ のリガントである Pio は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合に影響を及ぼさなかったことから、Feno の作用は PPAR α を介したのものであると考えられた。

PPAR α が NF- κ B の活性を阻害する分子機構の詳細は不明である。最近 Delerive ら¹²⁾は、過剰発現実験系において PPAR α が p65 蛋白と結合することを証明している。したがって、血管内皮細胞においても実際に PPAR α が p65 と結合し、標的遺伝子のプロモーターへの NF- κ B の結合を阻害しているのかもしれない。あるいは、PPAR α が NF- κ B と転写共役因子(coactivator)との結合を競合的に阻害することにより、NF- κ B の活性を低下させている可能性も想定される。

参考文献

- 1) Collart MA, et al: Mol Cell Biol, 10: 1498, 1990.
- 2) Cronstein BN, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 89: 9991, 1992.
- 3) Caldenhoven E, et al: Mol Endocrinol, 9: 401, 1995.
- 4) Caulin-Glaser T, et al: J Clin Invest, 98: 36, 1996.
- 5) Marx N, et al: Circulation, 99: 3125, 1999.
- 6) Otsuki M, et al: Arterioscl Thromb Vasc Biol, 21: 243, 2001.
- 7) Staels B, et al: Nature, 393: 790, 1998.

- 8) Xu X, et al: Endocrinology, 印刷中.
 9) Simizu H, et al: Mol Cell Biol, 10: 561, 1990.
 10) Neish AS, et al: J Exp Med, 176: 1583, 1992.
 11) Thanos D, Maniatis T: Cell, 80: 529, 1995.
 12) Delerive P, et al: J Biol Chem, 274: 32048, 1999.

注：本研究は『ホルモンと臨床』（Vol.49 2001）に掲載。

作成日：2002年3月15日

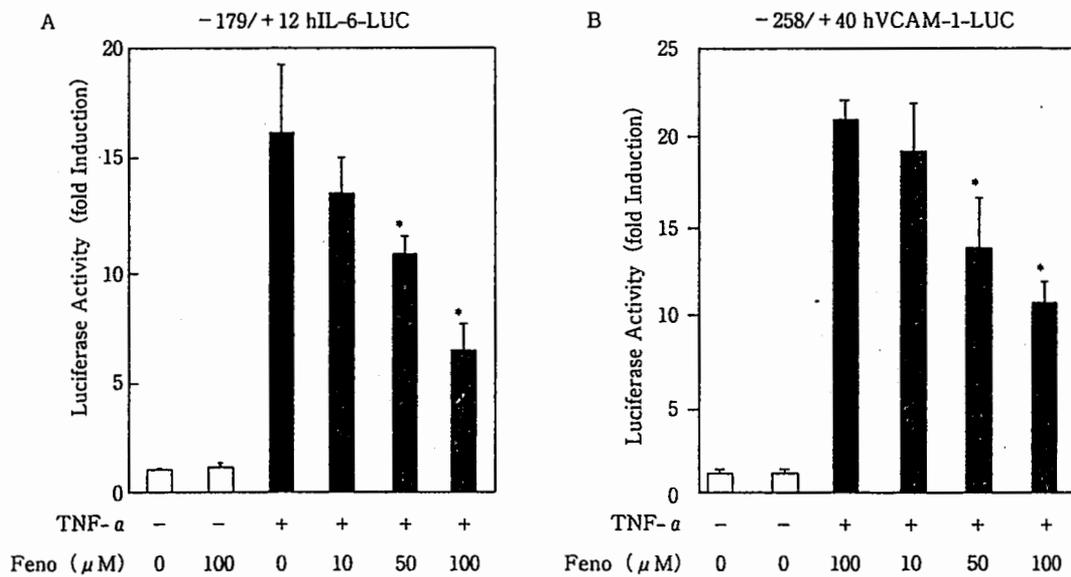
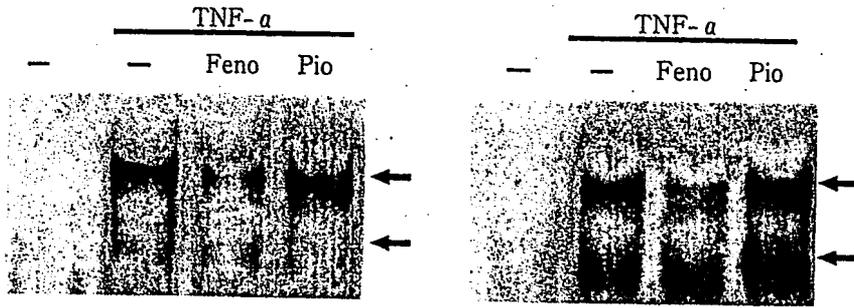


図1 IL-6プロモーター (A) および VCAM-1プロモーター (B) の活性に及ぼすフェノフィブラートの作用
 BAECにIL-6レポーター遺伝子 (-179/+12 hIL-6-LUC) または VCAM-1レポーター遺伝子 (-258/+40 hVCAM-1-LUC) を移入しフェノフィブラート (Feno) で24時間処理した後, TNF-α (20 ng/ml) で刺激し8時間 (A) または4時間 (B) 後のルシフェラーゼ活性を測定した。

A. IL-6 gene

B. VCAM-1 gene



5'-AAATGTGGGATTTCCCATG

5'-CTGCCCTGGGTTTCCCCTT-
-GAAGGGATTTCCCTCCGCC

図2 IL-6プロモーター (A) および VCAM-1プロモーター (B) へのNF- κ Bの結合に及ぼすフェノフィブラートの作用

HUVECをフェノフィブラート (Feno) またはピオグリタゾン (Pio) で処理した後, TNF- α (20 ng/ml) で刺激し4時間後に核蛋白を抽出しEMSAを行った.

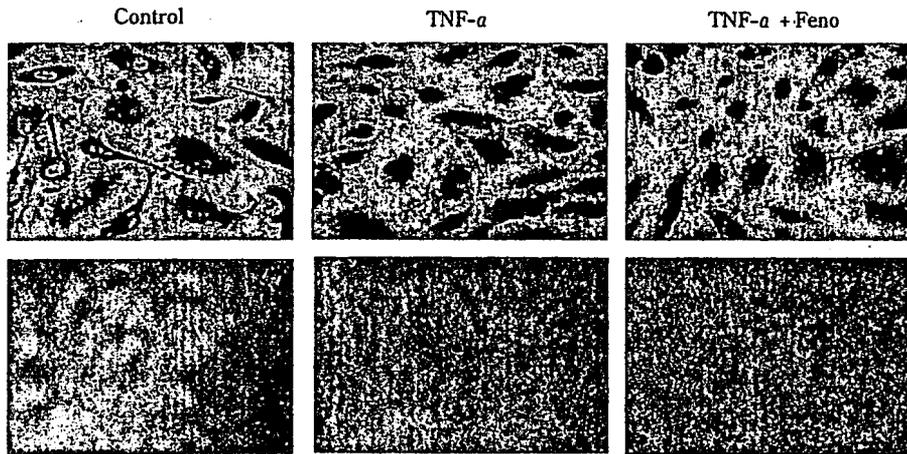


図3 TNF- α によるNF- κ B p65蛋白の核内移行に及ぼすフェノフィブラートの作用

HUVECを100 μ Mのフェノフィブラート (Feno) で処理した後 TNF- α (20 ng/ml) で刺激した. 抗NF- κ B p65抗体を用いた免疫染色を行った. 上段: blocking peptide (-), 下段: blocking peptide (+)