

氏 名（本籍）	なか 中	やま 山	まさ 雅	はる 晴
学位の種類	博 士（医 学）			
学位記番号	医 博 第 1 6 3 8 号			
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻			
学位論文題目	マクロファージと血管内皮細胞におけるアドレノ メデュリンの発現の検討			

（主 査）

論文審査委員 教授 白 土 邦 男 教授 柳 澤 輝 行

教授 伊 藤 貞 嘉

論文内容要旨

研究目的

アドレノメデュリンは52個のアミノ酸で構成されるペプチドで、強力な血管拡張作用を示す。血管平滑筋細胞の増殖と遊走を抑制するという報告があるが、動脈硬化におけるアドレノメデュリンの発現の検討は行われていなかった。本研究ではマクロファージにおけるアドレノメデュリンの発現の検討、その誘導機構、またヒト大動脈標本を用いた動脈硬化病変での発現の検討を行った。また、アドレノメデュリンは心筋梗塞患者で血中値が高いことが報告されているが、その機序は不明であった。本研究では培養血管内皮細胞を用いて、低酸素によるアドレノメデュリンの誘導もあわせて検討した。

結果と考察

正常細胞であるヒト末梢血単球およびそれ由来マクロファージにおけるアドレノメデュリンの発現をノーザンブロットと培養液中のアドレノメデュリン免疫活性測定により確認した。その発現はリポポリサッカライド刺激またはマクロファージへの分化に伴い増加し、マクロファージの活性化とアドレノメデュリンの誘導との関連が示唆された。さらにヒト大動脈標本を用い、動脈硬化病変においてアドレノメデュリンがマクロファージに *in vivo* で発現していることを免疫染色により確かめた。続いて、アドレノメデュリンの誘導機構を単球系ヒト白血球細胞 THP-1 を用いて検討した。THP-1 細胞もホルボールエステルによりマクロファージ様細胞に分化する過程でアドレノメデュリンの産生増加が見られる。その誘導は転写阻害剤のアクチノマイシン D あるいはプロテインキナーゼ C 阻害剤のスタウロsporin の同時投与により抑制され、転写レベルでの誘導とプロテインキナーゼ C を介した機構が示唆された。次にヒトアドレノメデュリン遺伝子をクローニングし、その5'側プロモーター上流4.5kbの領域について一過性発現法により検討を行い、アドレノメデュリン遺伝子のホルボールエステル応答部位を-70から-33の領域と同定した。その領域はAP-2結合配列を多数含んでおり精製AP-2蛋白が結合すること、そのDNA蛋白複合体はAP-2の共通配列を含む合成オリゴにより競合することをゲルシフト法により確かめた。アドレノメデュリン遺伝子のホルボールエステル応答におけるAP-2の関与が示唆され、マクロファージの分化に伴うアドレノメデュリンの発現に役割をもつと考えられた。

次に、ヒト冠動脈内皮細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞とを低酸素下培養し、アドレノメデュリンの発現が増加することをノーザンブロットと培養液中のアドレノメデュリン免疫活性測定にて確認した。低酸素と同様の効果を示すといわれるコバルトの投与によってもアドレノメデュリンの

産生増加は認められた。低酸素と通常培養下ではアドレノメデュリン mRNA の半減期に差は認められず、アドレノメデュリンの低酸素による増加は mRNA の安定性の増大によらないことが示唆された。また、ヒトアドレノメデュリン遺伝子を用いてプロモーターアッセイを行った結果、ヒトアドレノメデュリン遺伝子における低酸素応答には複数のエレメントの関与している可能性、あるいは1.7kb より上流に制御エレメントが存在している可能性が考えられた。

以上より活性化されたマクロファージにおいてアドレノメデュリンの産生増加が見られることと低酸素刺激により血管内皮細胞でアドレノメデュリンの産生が増加することを示した。動脈硬化巣においてはその平滑筋細胞の増殖と遊走を阻害して抗動脈硬化作用を、また低酸素下では低酸素を代償すべく血流を増すために血管拡張作用をそれぞれ発揮するものと思われ、アドレノメデュリンの発現の誘導は生体の防御機構のひとつと考えられた。

審査結果の要旨

血管拡張性ペプチドであるアドレノメデュリンには血管拡張作用のほか、利尿作用、平滑筋細胞の増殖・遊走抑制作用など多岐にわたる機能がある。また、心不全や心筋梗塞患者のアドレノメデュリン血中値が有意に上昇するなど循環器疾患に関連が深いことが示唆されている。しかしながら、動脈硬化との関連や、低酸素における発現動態については検討されてこなかった。本研究者は、動脈硬化とアドレノメデュリンとの関連を調べる目的で、マクロファージにおけるアドレノメデュリンの発現を培養細胞レベルと生体レベルで確認するとともに、血管内皮細胞における低酸素によるアドレノメデュリンの発現の増加を検討している。

本研究において用いられた方法と結果は以下の通りである。

- (1) マクロファージに分化するヒト白血病細胞株において、ホルボールエステルによる分化に伴ってアドレノメデュリンの発現が増加することをノーザンブロット解析と培養液中の免疫活性測定により確認した。
- (2) ヒト末梢血中の単核細胞においても同様にマクロファージに分化する際、またリポポリサッカライドにより活性化する際にアドレノメデュリンの発現が増加することをノーザンブロット解析と培養液中の免疫活性測定により確認した。
- (3) 免疫染色によりヒト大動脈動脈硬化病変においてマクロファージに一致したアドレノメデュリンの発現を示した。
- (4) ヒト白血病細胞株を用いて、ホルボールエステルによりマクロファージに分化する過程でのアドレノメデュリン遺伝子の応答部位を一過性発現法とゲルシフト法を用いて同定した。応答部位は-70 から-33 の領域であることを同定し、さらに AP-2 蛋白の関与が示された。
- (5) ヒト冠動脈内皮細胞と臍帯静脈内皮細胞を用いて、低酸素によるアドレノメデュリンの発現が増加することをノーザンブロット解析と培養液中の免疫活性測定により示し、その発現機構をヒトアドレノメデュリン遺伝子を用いてプロモーターアッセイを行って、低酸素応答に複数の制御エレメントが関わることを示した。

これらの結果は、動脈硬化病変におけるアドレノメデュリンの発現や、低酸素によるアドレノメデュリンの誘導を示したはじめての報告である。マクロファージ由来のアドレノメデュリンが動脈硬化病変形成に関与すること、また低酸素下の血管内皮細胞が代償性にアドレノメデュリンという血管拡張物質を産生することを示した点で意義深い。アドレノメデュリンは動脈硬化や引き続き臓器虚血・低酸素進展時の防御機構のひとつとして重要と考えられ、本論文はこれらの病態生理の理解に資するものであり、臨床的にも意義深い。よって本研究は学位論文に十分値するものとする。