

学位論文題名

Induction of Plasminogen Activator Inhibitor-1  
in Endothelial Cells by Basic Fibroblast Growth Factor  
and its Modulation by Fibrin Acid

(血管内皮細胞における bFGF の PAI-1 発現誘導、  
及びフィブリン酸の影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

I. 背 景

動脈硬化症の発症、進展において慢性炎症機転と血栓制御機構との関係が注目される。PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type-1)は血液線溶系で t-PA (組織プラスミノゲンアクチベータ), u-PA (ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ) に対し阻害的に作用し、プラスミノゲンがプラスミンに変換する系を抑制することにより、線溶系を抑制する。PAI-1 は動脈硬化巣やバルーン傷害後の新生内膜 (血管内皮細胞、平滑筋細胞) で豊富に発現し、動脈硬化領域での易血栓性に関与する。また肥満、糖尿病、高脂血症、不安定狭心症の患者で血中 PAI-1 濃度の増加を認める。PAI-1 の増加は細胞外マトリクスの集積を促進することにより内膜肥厚の形成に関与し、動脈硬化を促進すると考えられる。

塩基性線維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF) はマクロファージ、血管内皮細胞、平滑筋細胞から産生され、血管内皮細胞の増殖、遊走、及び平滑筋細胞の増殖を促進し、内皮細胞傷害後の修復に関与するとともに、著明な血管新生作用を有する。

高脂血症治療薬 Fibrin acid (フィブリン酸) は患者血中 PAI-1 レベルを低下させる。核内レセプター Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) はリガンドであるフィブリン酸により活性化される。PPAR $\alpha$  の活性が PAI-1 の発現にどのような影響を与えるかは確認されていない。

II. 目 的

本研究の目的は、血管内皮細胞における線溶系の生理的調節分子 PAI-1 の発現に細胞増殖因子 bFGF が関与する分子機構を明らかにし、更に PPAR $\alpha$  を活性化するフィブリン酸が PAI-1 の発現にどのような影響を与えるかを検討する。

III. 方 法

細胞はヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞株(ECV304)を使用した。これらの細胞を bFGF (0.1-100ng/ml) で刺激し、PAI-1 の発現変化を mRNA レベル(Northern blotting)、及び蛋白レベル(Western blotting)で検討した。細胞内シグナル伝達系を調べるため、bFGF 刺激 1 時間前に各種 inhibitor を投与し、mRNA レベルで PAI-1 の発現変化を測定した。PAI-1 のプロモータ領域での活性変化をルシフェラーゼアッセイによ

り検討した。プロモータ領域での転写因子活性同定のため、5'deletion mutantを作成し発現調節領域を解析した。また PAI-1 プロモータの Ets-1 様蛋白結合領域に point mutation を施したベクターを作成し、PAI-1 の活性変化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。転写因子 Ets-1 様蛋白の核内移行及び転写領域への結合を Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) により検討した。PPAR $\alpha$  を活性化するフィブリン酸で前処置した場合の PAI-1 発現変化を転写レベル、mRNA レベル、蛋白レベルで検討した。

#### IV. 結 果

HUVEC を bFGF (100ng/ml) で刺激すると、PAI-1 の mRNA 発現は増加した。培養上清中の蛋白発現変化は、bFGF 刺激 (0.1-10ng/ml) で容量依存性に PAI-1 蛋白の発現増加を認めた。ECV304 を用いた場合も PAI-1 の mRNA は bFGF 刺激に対し容量依存性に発現増加を認め、培養上清中の蛋白発現も bFGF 10ng/ml まで容量依存性に増加を認めた。次に、細胞内シグナル伝達系を調べた結果 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) kinase の inhibitor である PD98059 により PAI-1 の発現は抑制された。しかし、PKC inhibitor である GF109203X や、チロシンキナーゼの inhibitor である genistein では明らかな抑制は認めなかった。また、actinomycin D を用い bFGF による PAI-1 mRNA の半減期を調べたが、bFGF は明らかに mRNA の変性には影響は与えていなかった。

ヒト PAI-1 プロモータ領域において PAI-1 発現に関与する転写因子同定のため、deletion mutant を作成し未刺激状態でのルシフェラーゼ活性を測定した。-313bp までルシフェラーゼ活性が上昇し、それより短いベクターでは活性が減少した。bFGF 10ng/ml で刺激すると、全長(Full)では約 1.7 倍の活性上昇を示した。ベクターを短くしていくと -260bp で bFGF による活性上昇が消失した。以上より -313 から -260bp の間に bFGF による活性上昇部位が存在すると考えられた。この領域にある Ets-1 様転写因子結合領域の oligonucleotides を用いて EMSA を行った結果、bFGF 刺激により Ets-1 様蛋白の転写領域への結合増加を認めた。また Ets-1 様蛋白結合領域に point mutation を加えたベクターを用いたプロモータアッセイでは、bFGF で刺激しても活性上昇は認められなかった。

転写因子を修飾するとされる PPAR $\alpha$  のリガンドであるフィブリン酸を投与しても Ets-1 様蛋白のプロモータ領域への結合には明らかな抑制は認められなかった。しかしフィブリン酸投与により転写レベル、mRNA レベル、蛋白レベルで control 及び bFGF 刺激時に容量依存性に PAI-1 の発現は抑制された。

#### V. 考 案

血管内皮細胞において bFGF は PAI-1 発現を誘導し易血栓性と動脈硬化促進に関与することが示唆された。bFGF は細胞膜チロシンキナーゼ受容体を介し細胞内に刺激が伝達され、細胞内伝達系では MAP kinase 系の ERK を介したリン酸化が細胞内シグナル伝達に関与していることが示唆された。ヒト PAI-1 プロモータ領域には、転写開始点 0 から -747bp までに SREBP, AP-1, Ets-1, C/EBP 様転写因子結合部位を認めるが、bFGF 刺激時のプロモータ活性発現調節には転写因子として Ets-1 様蛋白が転写開始点 -313~-260bp に結合し転写活性を上昇させていることが示唆された。フィブリン酸により誘導される PPAR $\alpha$  は、内皮細胞において Ets-1 様蛋白の核内移行、及び転写因子への結合を抑制しないが PAI-1 の発現を転写レベル、mRNA レベル、蛋白レベルで抑制した。PAI-1 の発現亢進は線溶系の抑制、及び血管壁での蛋白分解の抑制作用を促し、血管リモデリング、血管繊維化、動脈硬化に重要な役割を果す可能性が示された。また PAI-1 レベルが低下すると蛋白分解が過剰となり、新生血管構築における細胞の接着を阻害することにより血管新生を抑制すると考えられる。この様に血管内皮細胞において bFGF は PAI-1 発現を誘導するが、PAI-1 の発

現の増減が血管新生の微妙なコントロールに作用することにより、プラークの発達や動脈硬化の促進に関与していると考えられる。

## VI. 結 語

血管内皮細胞において bFGF は PAI-1 発現を増加した。またフィブリン酸は PAI-1 の発現を抑制した。bFGF は、線溶系を介して血栓症、虚血性心疾患、及び動脈硬化症の進展に関与することが示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 口 秀 明  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

## Induction of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Endothelial Cells by Basic Fibroblast Growth Factor and its Modulation by Fibrin Acid

(血管内皮細胞における bFGF の PAI-1 発現誘導、  
及びフィブリン酸の影響に関する研究)

動脈硬化症の発症、進展において慢性炎症機転と血栓制御機構との関係が重要な意義を持っている。血管内皮細胞における血液線溶系の生理的調節分子 PAI-1(plasminogen activator inhibitor type -1)の発現に塩基性線維芽細胞増殖因子 bFGF (basic fibroblast growth factor)が関与する分子機構を明らかにし、更に PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ )を活性化するフィブリン酸が PAI-1 の発現にどのような影響を与えるかを検討した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞株(ECV304)を培養し、これらを bFGF で刺激し、Northern blot 法で PAI-1mRNA 発現を、また Western blot 法で培養上清中の PAI-1 蛋白発現を測定した。bFGF 刺激は、ヒト血管内皮細胞において PAI-1 の mRNA 発現、及び培養上清中の蛋白発現を容量依存性に増加させた。細胞内シグナル伝達系を調べるため、各種インヒビターを投与し mRNA レベルで PAI-1 発現を測定した。bFGF 刺激は MAP kinase 系の ERK (extracellular signal-regulated protein kinase)を介したリン酸化が関与していた。PAI-1 のプロモータ領域での活性変化をルシフェラーゼアッセイにより検討した。bFGF 10ng/ml で刺激すると、全長のルシフェラーゼベクターでは約 1.7 倍の活性上昇を示した。ヒト PAI-1 プロモータ領域において、bFGF 刺激による PAI-1 発現に関与する転写因子同定のため、5'deletion mutantを作成し未刺激状態でのルシフェラーゼ活性を測定した。-313bp までルシフェラーゼ活性が上昇し、それより短いベクターでは活性が減少した。bFGF 10ng/ml で刺激すると、-260bp より短いベクターでは活性上昇が消失した。以上より-313 から-260bp の間に bFGF による活性上昇部位が存在すると考えられた。この領域にある Ets-1 様蛋白結合

領域に point mutation を施したベクターを作成し、PAI-1 の活性変化をルシフェラーゼアッセイにより測定すると、bFGF で刺激しても活性上昇は認められなかった。この領域にある Ets-1 様転写因子結合領域の oligonucleotides を用いて EMSA を行った結果、bFGF 刺激により Ets-1 様蛋白の転写領域への結合増加を認めた。フィブリン酸は PPAR $\alpha$  を活性化するとされているが、フィブリン酸で前処置した場合、EMSA の結果では、Ets-1 様蛋白のプロモータ領域への結合には明らかな抑制は認められなかった。しかしフィブリン酸投与により転写レベル、mRNA レベル、蛋白レベルで control 及び bFGF 刺激時に容量依存性に PAI-1 の発現は抑制された。以上の結果より、動脈硬化領域において、血管内皮細胞に発現する bFGF は PAI-1 の発現を亢進させ、線溶系の抑制、及び血管壁での蛋白分解の抑制作用を促し、血管リモデリング、血管繊維化、動脈硬化に重要な役割を果たすと考えられた。また、フィブリン酸は PAI-1 の発現を抑制する効果が認められ、血栓症、虚血性心疾患、及び動脈硬化症の進展を抑制する可能性が示唆された。

口頭発表に際し、長嶋教授からゲルシフトアッセイのスーパーシフトについて、フィブリン酸による PAI-1 プロモータでの活性抑制の分子メカニズムについて、及び bFGF の血管傷害修復のメカニズムと PAI-1 との関係についての質問がなされた。北畠教授から PAI-1 発現量とプラークの形態の関係について、PAI-1 の発現と動脈硬化進行の関係について、PAI-1 の血中濃度と冠動脈病変の進行程度の相関、及び臨床上的動脈硬化の指標としての PAI-1 の役割についての質問がなされた。また、川口教授から HUVEC と ECV304 との細胞系の違い及び実験系全体の意義について、内膜肥厚に関する PAI-1 及び血栓の関与について、PAI-1 の血管平滑筋への増殖作用についての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去の実験データや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、動脈硬化の解明と動脈硬化病変治療への新しいアプローチとして意義のあるものとして高く評価され、今後この分野における更なる研究の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。