博士（医学）　山　本　友希代

学 位 論 文 題 名

TNF-alphaおよびステロイド投与による ヒト培養血管内皮細胞の遺伝子発現への影響

学位論文内容の要旨

全身性自己免疫疾患では多くの場合，炎症性血管病変を伴いその疾患病態に深く関与することが知られている．その血管の炎症病態の解析ため，生体外の血管モデルとしてヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC)がしばしば用いられている．

我々は今回，自己免疫疾患の治療薬として最も汎用されているステロイドホルモンを用いて，HUVECに対するステロイドの直接的な遺伝子発現調節に対する影響を検討するため，デキサメサゾンの添加によるHUVECの遺伝子発現について免疫関連遺伝子を中心にcDNAアレイを用いて解析した．また，炎症サイトカインとして TNF-alpha を用いて刺激したHUVECへのステロイド投与の影響も検討した．

方法と結果

1．cDNAアレイ解析

抽出した全RNAはGene Navigator cDNA Array System（TOYOBO）を用いて，621遺伝子がスポットされたcDNA Array Filter Human Immunologyにて発現遺伝子の解析を行った．HUVEC約1X10^6個に10^{-6}Mデキサメサゾン，または100 u/mlリコンビナントヒトTNF-alpha を添加し，48時間刺激したものを刺激細胞として用いた．対照には未刺激の細胞を用いた．また，TNF-alpha 刺激に対するステロイドの影響を見るため，TNF-alpha で48時間刺激したHUVECを培養液にて3回洗浄した後，10^{-6}M デキサメサゾンを添加した．対照には無添加にてさらに48時間培養した細胞を用いた．

デキサメサゾンあるいはTNF-alphaで刺激したHUVECで共通する発現増加傾向を示したのは，intercellular adhesion molecule (ICAM)-1，Bcr，heme oxygenase 2，cathepsin B，R-Ras，MCP-1，plasminogen activator inhibitor (PAI)-1遺伝子などがあった．TNF-alphaで刺激をした後にデキサメサゾンを加えた場合にもこれらの遺伝子は増加傾向にあったものがほとんどであった．

一方，デキサメサゾンによる刺激で減少した遺伝子としては Fas ligand，pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)，C/EBP beta などが挙げられた．しかし，TNF-alphaによる刺激を受けた細胞群では，これらの遺伝子はすべて上昇する傾向にあった．一方，TNF-alpha 単独刺激によって遺伝子発現が減少する遺伝子として insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) 4，bone morphogenetic protein 4 (BMP)-4，thrombin R (PAR)の3つが認められた．

2．リアルタイム半定量RT-PCR解析

各培養細胞から抽出した5μgの全RNAより6 merのランダムプライマーを用いて逆転写

を行い，cDNA を作製した．リアルタイム PCR 反応は，cDNA 10ng にフォワードとリバースプライマーを 5 pmole づつ 10μl の QuantiTect SYBR Green PCR (キアゲン)反応液とともに添加し，添付の説明書に添って以下の温度設定にて PCR 反応を行った．95℃15 分，その後 95℃30 秒，60℃30 秒，72℃1 分を 40 サイクル行った後，95℃15 秒，60℃15 秒，95℃15 秒行った．

cDNA アレイで発現の増減が認められた遺伝子を確認するため 4 検体について検討した．さらに 1 検体のみであるものの，cDNA アレイ解析と同様の培養条件に加えてデキサメサゾンと TNF-alpha 同時刺激および TNF-alpha 刺激後デキサメサゾンを添加せず 48 時間培養した細胞群も対照として加えた．

cDNA アレイにおいてデキサメサゾン単独刺激による発現量の上昇がみられた遺伝子は，リアルタイム PCR の結果では個体差があり必ずしも有意差が得られなかった．しかし，PAI-1 の発現量は増加が確認され，TNF-alpha との組み合わせにより相加的に増加する傾向にあった．TNF-alpha 単独刺激では ICAM-1 と MCP-1 が強い発現上昇を示し cDNA アレイの結果とよく相関したが，デキサメサゾン単独刺激によるこれらの遺伝子の発現量は cDNA アレイで認められたような有意差は得られなかった．ICAM-1 の発現は，TNF-alpha とデキサメサゾンの同時投与ではデキサメサゾンによる抑制は見られなかったが，TNF-alpha 刺激後にデキサメサゾン添加 48 時間培養した細胞群では添加無しの細胞群より減衰傾向にあった．MCP-1 では TNF-alpha とデキサメサゾンを同時刺激した細胞群の発現量は TNF-alpha 単独刺激した細胞群よりやや低い傾向にあったが，TNF-alpha 刺激後デキサメサゾン添加し培養した細胞群は ICAM-1 のような減衰傾向は認められなかった． 一方，TNF-alpha 刺激後無添加で 4 8 時間培養した結果から，TNF-alpha 刺激による ICAM-1 と MCP-1 の遺伝子発現の増加への効果はおおよそ半減することが明らかとなった．

考察

1. ステロイドの内皮細胞への直接的影響を検討するために HUVEC をモデルに cDNA アレイ解析を行った結果，デキサメサゾン刺激は多数の遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性があることを示した．
2. デキサメサゾン刺激による HUVEC の遺伝子発現の変動は大部分が発現亢進であり，そのなかには細胞増殖関連遺伝子が多数含まれた．
3. リアルタイム RT-PCR によりデキサメサゾン刺激が血栓形成促進因子である PAI-1 遺伝子の発現を亢進していることを確認した．デキサメサゾンによる PAI-1 発現の経路についてはいまのところ明らかではない．しかし，今回の結果から TNF-alpha とは異なる経路を介している可能性が考えられた．
4. TNF-alpha 刺激で増加した HUVEC の ICAM-1 と MCP-1 の発現に対して，デキサメサゾンはそれぞれ異なる経路を介して抑制性に働く可能性が示唆された．ICAM-1 のプロモーター領域には GRE が存在しないことから，デキサメサゾンは ICAM-1 の発現に間接的に作用していると思われた．MCP-1 の発現は TNF-alpha とデキサメサゾンの同時投与によって抑制の傾向が認められ，デキサメサゾンが競合的に働いている可能性が示唆された．

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　吉　木　　敬
副　査　教　授　長　島　和　郎
副　査　教　授　上　出　利　光

学位論文題名

TNF-alphaおよびステロイド投与による ヒト培養血管内皮細胞の遺伝子発現への影響

申請者は自己免疫疾患の多くに伴う炎症性血管病変について着目し、ヒト培養臍帯静脈血管内皮細胞を用いてステロイドおよびTNF-alphaによる遺伝子発現への影響についてcDNAアレイ解析を用いて比較した。その後リアルタイムPCRを用いて確認した。

cDNAアレイでは、デキサメサゾンおよびTNF-alphaによる刺激、また、TNF-alpha刺激後にデキサメサゾンを投与した3種類の刺激細胞群について解析を行い、多くの遺伝子に上昇が認められた。減少を示した遺伝子は、デキサメサゾンおよびTNF-alpha刺激についてそれぞれ3種の異なる遺伝子だった。

その後、リアルタイムRT-PCRによって発現の変動が認められた遺伝子について確認を行った。その結果、ステロイドとTNF-alphaによってPAI-1遺伝子の発現が上昇した。このことから線溶阻止因子であるPAI-1の上昇が血栓形成の亢進につながる可能性を示した。TNF-alphaによってICAM-1およびMCP-1の発現が上昇することが本研究によって確認され、これらに対するデキサメサゾンの抑制性はそれぞれ異なる経路を介している可能性を示した。

発表の後、副査の上出利光教授と以下のような質疑応答があった。問：cDNAアレイとオリゴを用いたアレイについて欠点と利点は何か。また、今回の実験にcDNAアレイを用いた理由ななぜか。答：PCRによるcDNAの増幅によってより発現の差がみられることがcDNAアレイの利点である。オリゴのアレイは用いたことがないためわからない。cDNAアレイを用いたのは教室でもっとも用いられているためであり、PCRによって増幅できるためである。問：今回使用した細胞群の状態はどうだったか。答：細胞は増殖期のものを用い、デキサメサゾンおよび、TNF-alphaによる刺激により、細胞が増殖し、未刺激のものより増殖性が高かった。また、TNF-alpha刺激後にデキサメサゾンを加えたものは更に増殖性を増した。問：細胞増殖期末期の細胞と発現を比べた事はあるか。答：今回は行っていない。問：今回の実験結果はこの臍帯静脈の内皮細胞に特異的なのか、あるいは他の臓器の内皮細胞でも同じか。答：腎臓のepithelial cellではデキサメサゾンによる抑制は認

められなかったという報告がある。他の臓器では抑制に違いがあるようだ。問：このアレイに載せてある遺伝子はいくつか。遺伝子の配分はどのようになっているか。答：アレイフィルターには621遺伝子がスポッティングされており、そのうち３０％はT細胞で見られる遺伝子、20％は内皮細胞で発現するもの。他は総合的にみるための遺伝子である。副査の長島和郎教授と以下のような質疑応答があった。問：細胞は一回づつとってきたものだが、個人差はあるのか。答：ある。問：冠動脈などで血栓ができやすい報告はあるか。答：ある。デキサメサゾンとは関係ないが冠動脈硬化症や2型糖尿病ではPAI-1の上昇が認められる。問：ICAM-1はGREを持っていないが、デキサメサゾンはどのように抑制しているのか。答：デキサメサゾンのモノマーがNFκBのｐ65の部分で直接か、EBP 転写因子と結合し、HAT activityによる遺伝子のunwindingを抑制することによって作用することが知られている。最後に主査の吉木敬教授と以下のような質疑応答があった。問：他の臓器にある血管内皮でのこれらの遺伝子発現はどうか。答：発現していると思うが、比較はしていない。以上、質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文はステロイドおよびTNF-alphaによって変動する血管内皮細胞の遺伝子発現についてcDNAアレイを用いて網羅的に検討したところが独創的であり、これを高く評価する。今回の解析はデキサメサゾンおよびTNF-alphaによるPAI-1の上昇が血栓形成を促進することを示唆するなど、今後TNF-alphaによる炎症反応およびステロイドの炎症抑制作用の解明につながる成果である。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻病態解析学講座分子病理分野　博士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充分な資格を有するものと判定した。