

学位論文題名

Hepatocyte Growth Factor Regulates
E Box-Dependent Plasminogen Activator Inhibitor
Type 1 Gene Expression in HepG2 Liver Cells

(HepG2細胞における肝細胞増殖因子による E Box 依存症プラスミノゲン
アクチベータインヒビター 1 遺伝子発現調節機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

背景

プラスミノゲンアクチベータインヒビター1 (plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1)は線溶系の重要な生理的阻害因子であり, 循環血液中 PAI-1 濃度の増加は心血管疾患の危険因子と捉えられている. 凝固・線溶系の異常は, インスリン抵抗性患者における心血管疾患罹患率および死亡率の増加と関連する.

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF)は血管新生作用を有する内皮増殖因子である. 血清 HGF 濃度は多くの心血管疾患の重症度と相関し, また, インスリン抵抗性患者において血清 HGF 濃度が上昇することが知られている. 培養肝細胞において HGF は PAI-1 発現を促進することから, HGF は線溶系に作用し, 心血管疾患の病態形成に関与する可能性が示唆される.

インスリン抵抗性患者において PAI-1 レベルが上昇するが, その調節機構は完全には解明されていない. インスリン抵抗性患者によくみられる脂肪肝の程度と血清 PAI-1 レベルは相関することから, 肝臓は循環血液中 PAI-1 レベルを規定する重要な臓器と考えられる.

本研究の目的は, 肝細胞における, HGF による PAI-1 発現に関わる分子生物学的機構を解明し, 動脈硬化性血栓症に対する新たな治療法の開発に寄与することである.

方法と結果

ヒト肝細胞由来細胞株 HepG2 を HGF で刺激したところ, 細胞培養液中の PAI-1 濃度は用量依存性に増加した(0.5ng/ml で 2.3 ± 1.3 倍, 5ng/ml で 3.5 ± 1.3 倍, 50ng/ml で 7.9 ± 2.7 倍, 100ng/ml で 11.1 ± 5.6 倍, ウェスタンブロット法, $n=3$). また, HGF 刺激により HepG2 細胞 PAI-1 mRNA 発現は有意に増加した(0.5ng/ml で 1.7 ± 0.4 倍, 50ng/ml で 3.3 ± 0.9 倍, ノーザンブロット法, $n=3$). さらに, マウスに HGF (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を静脈内投与したところ, 肝臓における PAI-1 mRNA 発現は有意に増加した(1.4 倍, リアルタイム PCR 法).

HGF による PAI-1 mRNA の増加は, mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 特異

的阻害薬 U0126 および receptor tyrosine kinase 阻害薬 genistein により抑制された。一方、protein kinase C 経路阻害薬 GF109203X および phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬 LY294002 では抑制されなかった。

ルシフェラーゼアッセイでは、HGF による PAI-1 遺伝子プロモーター(-829~+36bp 領域)活性の上昇が認められた(2.0±0.3 倍, n=5)。短縮プロモーターによる検討で、HGF 応答領域は -171~-120bp に存在すると考えられた。PAI-1 プロモーター -158~-153bp に E Box 配列(5'-CACATG-3')が存在する。この E Box に点変異を導入すると、HGF による PAI-1 プロモーター活性の増加は有意に抑制された。このことから、この E Box が HGF 応答配列であると考えられた。

Electrophoretic mobility shift assay による検討の結果、この E Box 配列には転写因子 upstream stimulatory factor(USF)-1 および USF-2 の二量体が結合し得ることが明らかになった。

USF は DNA と結合する際にリン酸化を必要とすることから、HGF による USF のリン酸化を検討した。HGF で刺激した HepG2 細胞の核抽出液を USF-1 特異的抗体で免疫沈降し、抗リン酸化セリン抗体を用いてリン酸化 USF-1 を検出したところ、HGF は MAPK および tyrosine kinase 経路を介して USF-1 をリン酸化することが明らかになった。

HepG2 細胞に USF-1 発現ベクターを遺伝子導入すると、PAI-1 遺伝子プロモーター活性は増加した。HGF による PAI-1 遺伝子プロモーター活性の増加は、転写因子 sterol regulatory element binding protein(SREBP)-1a および-1c 発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入すると抑制されたが、SREBP-2 発現ベクターの遺伝子導入では抑制されなかった。さらに、USF-1 による PAI-1 プロモーター活性増加は SREBP-1a の共発現により抑制された。このことから、SREBP-1a は PAI-1 発現において USF-1 と相互作用することが明らかになった。

考 察

HGF およびその特異的受容体である c-Met がヒト血小板にも見出されることなど、HGF と血栓性疾患の関係を示唆する報告は数多い。このことから、HGF による PAI-1 発現を制御することは心血管疾患の治療および予防に寄与すると考えられる。本研究において我々は、HGF による PAI-1 発現調節機構の一部を解明した。

HGF は c-Met に結合し、その細胞内 tyrosine kinase ドメインを活性化して多くの細胞内情報伝達物質を動員する。HGF の多面的作用は MAPK および PI-3 kinase 経路を介してもたらされることが知られている。本研究の結果から、HGF による PAI-1 遺伝子発現は、MAPK 経路を介した USF のリン酸化を経ることが明らかになった。

USF は遺伝子転写調節領域上の E Box 配列(5'-CANNTG-3')を認識する。HGF による PAI-1 遺伝子プロモーター活性の増加は、転写因子 SREBP-1a および-1c ベクターを遺伝子導入することにより抑制され、さらに、USF-1 発現ベクター遺伝子導入による PAI-1 遺伝子プロモーター活性の増加は、転写因子 SREBP-1a を共発現させることにより抑制された。SREBP は USF と同じ basic-helix-loop-helix family に属することから、転写調節領域にある E Box への結合に際して、これらの転写因子が何らかの相互作用をすることが示唆された。一方、HGF による PAI-1 遺伝子プロモーター活性の増加は、SREBP-2 遺伝子導入では抑制されなかった。これは SREBP-1 と SREBP-2 では E Box への親和性に差があるとの報告に一致する。

HGF はインスリン抵抗性において過剰発現し、USF は炭水化物や糖・脂質代謝に関わること

から、HGFによるPAI-1発現調節機構の解明は、代謝異常と動脈硬化性血栓症を新たに関連づけるものと捉えることができる。

本研究の成果は、インスリン抵抗性といった動脈硬化性血栓症の高危険群患者に対する新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 松 居 喜 郎

学 位 論 文 題 名

Hepatocyte Growth Factor Regulates E Box-Dependent Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Gene Expression in HepG2 Liver Cells

(HepG2細胞における肝細胞増殖因子による E Box 依存症プラスミノゲン
アクチベータインヒビター 1 遺伝子発現調節機構に関する研究)

プラスミノゲンアクチベータインヒビター1 (plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1)は線溶系の生理的阻害因子であり、循環血液中 PAI-1 濃度の増加は心血管疾患の危険因子と捉えられている。凝固・線溶系の異常は、インスリン抵抗性患者における心血管疾患罹患率および死亡率の増加と関連する。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF)は血管新生作用を有する内皮増殖因子である。血清 HGF 濃度は多くの心血管疾患の重症度と相関し、また、インスリン抵抗性患者において血清 HGF 濃度が上昇することが知られている。培養肝細胞において HGF は PAI-1発現を促進することから、HGF は線溶系に作用し、心血管疾患の病態形成に関与する可能性が示唆される。インスリン抵抗性患者において PAI-1レベルが上昇するが、その調節機構は完全には解明されていない。インスリン抵抗性患者によくみられる脂肪肝の程度と血清 PAI-1 レベルは相関することから、肝臓は循環血液中 PAI-1 レベルを規定する重要な臓器と考えられる。本研究の目的は、肝細胞における、HGF による PAI-1 発現に関わる分子生物学的機構を解明し、動脈硬化性血栓症に対する新たな治療法の開発に寄与することである。

ヒト肝細胞由来細胞株 HepG2 を HGF で刺激したところ、細胞培養液中の PAI-1 濃度は用量依存性に増加した。また、HGF 刺激により HepG2 細胞 PAI-1 mRNA 発現は有意に増加した。さらに、マウスに HGF を静脈内投与したところ、肝臓における PAI-1 mRNA 発現は有意に増加した。HGF による PAI-1 mRNA の増加は、mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 特異的阻害薬 U0126 および receptor tyrosine kinase 阻害薬 genistein により抑制された。一方、protein kinase C 阻害薬 GF109203X および phosphatidylinositol 3-kinase 阻害薬 LY294002 では抑制されなかった。ルシフェラーゼアッセイでは、HGF による PAI-1 遺伝子プロモーター (-829~+36bp 領域)活性の上昇が認められた。短縮プロモーターによる検討で、HGF 応答領域は-171~-120bp に存在すると考えられた。PAI-1 プロモーター -158~-153bp に E Box 配列

(5'-CACATG-3')が存在する。このE Boxに点変異を導入すると、HGFによるPAI-1プロモーター活性の増加は有意に抑制された。このことから、このE BoxがHGF応答配列であると考えられた。Electrophoretic mobility shift assayによる検討の結果、このE Box配列には転写因子upstream stimulatory factor (USF)-1およびUSF-2の二量体が結合し得ることが明らかになった。USFはDNAと結合する際にリン酸化を必要とすることから、HGFによるUSFのリン酸化を検討した。HGFで刺激したHepG2細胞の核抽出液をUSF-1特異的抗体で免疫沈降し、抗リン酸化セリン抗体を用いてリン酸化USF-1を検出したところ、HGFはMAPKおよびtyrosine kinase経路を介してUSF-1をリン酸化することが明らかになった。HepG2細胞にUSF-1発現ベクターを遺伝子導入すると、PAI-1遺伝子プロモーター活性は増加した。HGFによるPAI-1遺伝子プロモーター活性の増加は、転写因子sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1aおよび-1c発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入すると抑制されたが、SREBP-2発現ベクターの遺伝子導入では抑制されなかった。さらに、USF-1によるPAI-1プロモーター活性増加はSREBP-1aの共発現により抑制された。このことから、SREBP-1aはPAI-1発現においてUSF-1と相互作用することが明らかになった。

HGFおよびその特異的受容体であるc-Metがヒト血小板にも見出されることなど、HGFと血栓性疾患の関係を示唆する報告は数多い。このことから、HGFによるPAI-1発現を制御することは心血管疾患の治療および予防に寄与すると考えられる。本研究において我々は、HGFによるPAI-1発現調節機構の一部を解明した。HGFはインスリン抵抗性において過剰発現し、USFは炭水化物や糖・脂質代謝に関わることから、HGFによるPAI-1発現調節機構の解明は、代謝異常と動脈硬化性血栓症を新たに関連づけるものと捉えることができる。

口頭発表に際し、主査の三輪教授から内因性にHGFが増加する機序、PAI-1プロモーターに他のHGF応答領域が存在する可能性、さらにUSFリン酸化の局在と意義について質問がなされた。次いで副査の松居教授から血管新生におけるPAI-1の意義、HGF遺伝子治療における血栓症の可能性について質問がなされた。最後に副査の筒井教授からインスリン抵抗性における上流メディエーターとHGFとの関連、今後の研究の方向性について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切な回答を行った。

この論文は、インスリン抵抗性における線溶不全の発症機構を報告したものとして、*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 誌で高く評価され、今後、インスリン抵抗性といった動脈硬化性血栓症の高危険群患者に対する新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

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。