慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 Increases Vascular Endothelial Growth Factor Expression Through Sp1 Transcription Factor in Endothelial Cells
Sub Title	DDAH2(ジメチルアルギニン-ジメチルアミノヒドロラーゼ-2)は転写因子Sp1を介して血管内皮細胞におけるVEGF (Vasculaz Endothelial Growth Factor)の発現を充進する
Author	長谷川, 一宏
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.21-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0021

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 Increases Vascular Endothelial Growth Factor Expression Through Sp1 Transcription Factor in Endothelial Cells

(DDAH2（ジメチルアルギニンージメチルアミノヒドロラーゼ－２）は転写因子Sp1を介して血管内皮細胞におけるVEGF（Vascular Endothelial Growth Factor）の発現を亢進する)

長谷川　一宏

内容の要旨

一酸化窒素合成酵素の内因性阻害物質asymmetrical dimethylarginine（ADMA）はdimethylarginine dimethylaminohydrolase1,2（DDAH1,2）により代謝される。ADMAを代謝し、NO活性を亢進するDDAHは抗動脈硬化・降圧作用を持ち、一方で血管新生因子のvascular endothelial growth factor（VEGF）発現を亢進し血管新生作用を持つ。ある条件においてNOはVEGF発現を惹起し、DDAHのVEGF発現亢進もNOによると推察される。しかし、DDAHによるNO亢進とVEGF誘導の関連を示した既報は無く、その機序並びに生理学的意義につき検討した。

実際の方法は培養血管内皮細胞としてBAEC（bovine aortic endothelial cells）とHUVEC（human umbilical vein endothelial cell）を使用し、DDAH1,2の発現ベクターをtransfectし、VEGFmRNA発現・蛋白濃度測定・Proliferation assay・Migration assayを施行した。さらにDDAH1,2ベクターとpromoter下流にLuciferaseを持つベクターもしくはSp1結合部位に変異を生じたVEGFベクターを共発現し、Luciferase assayを施行した。この際、NOS阻害薬前投与による活性変化も検討した。次にtransfectした細胞のnuclear extractを採取し、Sp1プローブ使用のGel shift assay・Sp1抗体を使用したウェスタンブロット・Sp1抗体とリン酸化スレオニン抗体使用の免疫沈降を施行した。

結果としてDDAH2によりVEGF mRNA（2.19±0.26倍）・蛋白発現亢進（1.52±0.21倍）が認められ、血管内皮細胞増殖・遊走が亢進した。DDAH2によるVEGFプロモーター活性化はNOS阻害剤前投与で抑制されなかった。機序としてSp1蛋白発現亢進（1.3±0.2倍）、Sp1スレオニン残基リン酸化亢進（1.7±0.1倍）を介したSp1蛋白結合亢進が考えられた。PKA阻害薬投与はSp1スレオニン残基リン酸化を阻害し、VEGFプロモーター活性を低下し、Sp1siRNA投与はVEGFpromoter活性亢進を阻害した。

今回の結果が示す通りDDAH2はPKAを介しSp1蛋白スレオニン残基リン酸化を亢進し、Sp1蛋白発現も亢進する。その結果、NO非依存性にVEGFプロモーター活性・蛋白発現が亢進し、血管内皮増殖・遊走を惹起する。NOは報告例によりVEGF発現を亢進もしくは抑制する場合も有るが、本研究によりDDAH2がNOを介さずにVEGF発現を亢進させ、血管内皮の増殖、遊走を惹起する事が明らかになり、DDAH2の血管新生における意義が示唆された。

論文審査の要旨

NO合成酵素（NOS）の内因性阻害物質AsymmetricDimethylarginineはDDAH 1,2により代謝される。DDAH2は血管内皮細胞でVEGF発現を増加すると報告されたが、その機序は不明であった。今回、DDAH2がPKAと結合し、Sp1蛋白スレオニン残基リン酸化を惹起し、また核内Sp1蛋白発現を誘導し、NO非依存性にVEGF蛋白発現を亢進させる機序を解明した。

まず審査では本研究においてDDAH2はVEGF産生を亢進させ、DDAH1ではその作用が見られなかったが、これはマウスDDAHcDNAを組み込んだベクターをHUVEC（ヒト）、BAEC（ウシ）にtransfectionしたための生物種の差異が影響しているのではないかという討論があった。VEGF測定ELISAはウシあるいはヒトVEGFの測定が可能である事、DDAH1,2は酵素活性としては同一で、transfectionの有意性はDDAH1,2蛋白及び酵素活性の上昇を確認したと回答された。又、NOS阻害薬のL-NAME投与が無効であったことからNO非依存性のVEGF誘導機構が存在するとしているが、L-NAME投与で培養上清NO濃度が低下する事を確認する必要があるとの指摘があった。またL-NAMEによるNOS uncouplingの結果、酸化ストレスが上昇する事が実験結果に影響した可能性についても指摘があった。これに対しては過去の論文を参照し、培養血管内皮細胞上清中NO低下を来たすL-NAMEの濃度を採用した事、活性酸素阻害剤を併用投与するとDDAH活性自体にも影響するため指摘された可能性の除外は難しい事が回答された。更に、DDAH2は血管内皮細胞の遊走・増殖を約1.3倍・1.4倍増殖させるに留まり、生体においてはどれだけ意義があるか、あるいは実際DDAH2により亢進したVEGFは動脈硬化を促進させるかにつき討議があった。これに対して現在DDAH2過剰発現マウスを開発し、in vivoでの解析を行なっていると回答された。今回使用した細胞の結果から、DDAH2のVEGF発現に対する効果が全身の血管内皮細胞で同様に認められるかにつき討議がされた。血管内皮ではDDAH2がDDAH1に比して発現が高いとの既報があるが、血管部位による差異を検討した既報は無く、今後の課題であると回答された。更に、PKAとDDAH2との蛋白蛋白結合がDDAH2酵素活性自体を変化させ、Sp1スレオニン残基リン酸化、Sp1蛋白発現上昇を惹起した可能性もあり、さらに詳細な分子生物学的検討が望まれるとの指摘があった。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、DDAH2のVEGF発現に対する新たな制御機構を明らかにし、今後の治療標的となる可能性を示した点において、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　伊藤　裕
内科学　池田　康夫　　病理学　岡田　保典
医化学　末松　誠
学力確認担当者：
審査委員長：池田　康夫

試問日：平成18年12月18日