

平成21年4月10日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591922  
 研究課題名（和文）誘導型 NO 合成酵素の発現調節に関わるエストロゲン受容体  $\alpha$  と  $\beta$  の相反する作用の解析  
 研究課題名（英文）Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ .  
 研究代表者  
 堤 誠司 (TSUTSUMI SEIJI)  
 山形大学・医学部・助教  
 研究者番号：50323168

研究成果の概要：エストロゲンは二つのエストロゲン受容体(estrogen receptor: ER)  $\alpha$  と  $\beta$  を介して心血管系組織に直接作用を示す。以前我々が行った研究で、ER  $\beta$  ノックアウトマウスでは、誘導型 NO 合成酵素(inducible NOS: iNOS)が発現されないため、血管障害や高血圧を呈した。今回は、ER  $\alpha$  と ER  $\beta$  による iNOS の遺伝子発現調節の相違について解析を試みた。その結果、血管平滑筋細胞における ER  $\alpha$  と ER  $\beta$  の発現が異なると、iNOS の発現も異なることが判明し、ER  $\beta$  では iNOS 発現促進的に、ER  $\alpha$  では iNOS 発現抑制的に働く事が確認された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：エストロゲン、エストロゲン受容体、血管平滑筋細胞、誘導型 NO 合成酵素、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

心血管系疾患による死亡は、欧米諸国と同様に我が国でも男女の死因の第一位であり、女性の心血管疾患の発症は、閉経前は男性に比べ低率であるが閉経を境にして男性と同様の増加を示す(Barrett-Connor E. et al. JAMA. 1991;265:1861-1867)。この原因としてエストロゲン(E2)分泌が減少することにより、血管の保護作用が低下するこ

とが一因と考えられており、その重要な因子の一つに一酸化窒素(NO)がある(Chen Z. et al. J Clin Invest. 1999;103:401-406)。

心血管系におけるNOの作用は、血管平滑筋の弛緩作用、血管平滑筋増殖抑制、白血球・血小板凝集抑制作用、活性酸素産生抑制など、生理的機能維持にはもちろん、敗血症性ショックによる低血圧などの病態形成においても重要な

役割を果たしている。(Lowenstein C.J. et al. Ann Intern Med. 1994;120:227-237)。

NOはNO合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) により産生され、NOSには3つのタイプ(神経型:neuronal NOS (nNOS)、誘導型:inducible NOS (iNOS)、内皮型:endothelial NOS (eNOS)) が存在する(Nathan C. et al. Cell. 1994;78:915-918)。

血管平滑筋細胞においては、種々のサイトカインやステロイドホルモンによりiNOSが刺激され、NOが産生されるがその機序は十分に解明されていない。我々は今まで、E2による心血管系の作用について(Doshida M. et al. J Biol Chem. 2006;281:24270-8, Takahashi K. et al. J Endocrinol. 2003;178:319-329, Mori-Abe A. et al. J Endocrinol. 2003;178:417-426)、および神経細胞の神経突起伸長作用(Du B. et al. J Endocrinol. 2004;183:605-615)などエストロゲン受容体(ER)を介する細胞保護作用のシグナル伝達について解析してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管平滑筋細胞培養系において、ERを介するiNOSの発現に関わる転写調節機序を解明することを目的とし、下記の実験を行う。

- (1) iNOS promoterを細胞に導入し、ERに応答する責任領域を解析する。
- (2) ERを発現していない細胞株を用い、2種類のER (ER $\alpha$ ,  $\beta$ ) の発現ベクターと、上述のルシフェラーゼレポーターベクターを遺伝子導入し、いずれのタイプの受容体が、どのようにiNOSの発現調節に関わっているかを明らかにする。
- (3) ERを介したiNOS発現調節に関与する、血管平滑筋細胞に特異的な転写因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) NO産生量及びNOS活性の測定

血管平滑筋細胞をエストロゲン及びER antagonistであるICI 182,780を添加した培養液で培養し、その培養上清に含まれるNOを、Griess法を用いて測定する。また、L-Arginineが酸化反応によりL-Citrulline

に変換されNOが産生されることを利用してNOS活性を測定する。これらの実験によりERを介した系でNO産生及びNOS活性が亢進するか否かを確認する。

呈色反応であるGriess法は分光光度計を用い、NOS活性測定は液体シンチレーターを用いて測定するが、両方とも現有の設備で対応できる。尚、血管平滑筋細胞を培養する際の培養液はフェノールレッド不含及び血清に含まれるステロイドホルモンや成長因子の影響を排除するためcharcoal/dextran treated FBSを含むDMEMを用いる。

### (2) iNOSタンパクの検出

血管平滑筋細胞においてNO産生の促進が確認された場合、その原因がiNOSの発現促進によるものか、あるいはiNOSタンパクが翻訳後修飾を受け活性が上昇したのかを検証するため、抗iNOS抗体を用いたウェスタンブロッティング法でiNOSタンパクの発現を確認する。

iNOSタンパクの発現量が少なく検出が困難であると考えられる場合は、2' 5' ADP Sepharose 4Bを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行うか、免疫沈降法を用いて検出感度を高める必要がある。

### (3) iNOS、ER $\alpha$ 及びER $\beta$ 遺伝子発現の検討

ERを介した系によりiNOSタンパクの発現に影響されると確認された場合、この作用が遺伝子発現調節を受けた結果であるか否かを検証するため、各薬剤を添加して培養した血管平滑筋細胞よりmRNAを抽出し、定量的RT-PCRを行いiNOS mRNAの発現量を確認する。同時にER $\alpha$ 及びER $\beta$  mRNAの発現も確認し、iNOS mRNAと各ER mRNA発現に相関関係があるか否かを検証する。

尚、血管平滑筋細胞の種類により各ER mRNA発現に相違が存在する可能性があり、数種類の細胞で同様の実験を行った上で結果を検討する必要がある。

### (4) iNOS promoter活性の検討

エストロゲンがiNOS 遺伝子の発現を誘導(あるいは抑制)するのであれば、その制御はiNOS遺伝子promoter活性の変化を測定することにより解析することができる。

供与されている完全長(8.3 kb)及び様々の長さのiNOS promoter領域を含む欠失変異型ルシフェラーゼリポーターベクターを用いて次の実験を行う。

①血管平滑筋細胞に完全長のiNOS promoterを持つリポーターベクターを遺伝子導入し、promoter活性を測定する。複数の血管平滑筋細胞においてER mRNAの発現とiNOS promoter活性に相関関係があるか否かについても検討する。

②各ERとiNOS promoter活性の関係を検討するため、両ERを持たないCOS-7細胞および、ER $\alpha$ を持たない(Takahashi K. et al. J Endocrinol. 2003;178:319-329)ラット血管平滑筋細胞A10にER $\alpha$ あるいはER $\beta$ 遺伝子発現ベクターと、完全長或いは欠失変異型iNOS promoter-ルシフェラーゼリポーターベクターを共に遺伝子導入し、各ERが単独、及び共に作用した場合のpromoter活性を測定する。尚、導入したER $\alpha$ 或いはER $\beta$ が確実に発現しているか否か、抗ER $\alpha$ 抗体・抗ER $\beta$ 抗体を用いウエスタンブロッティング法にて確認する。

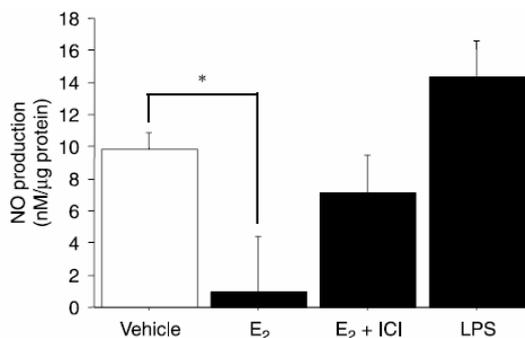
③iNOS promoter活性は生物発光・化学発光測定装置(ルミノメーター)を用いて測定する。

④測定された発光強度は実験に用いたタンパク濃度で標準化するか、 $\beta$ ガラクトシダーゼプラスミドを同時に遺伝子導入し $\beta$ -gal活性を計測する方法、或いはウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドを導入して発光強度を測定し、内部コントロールとする。

⑤エストロゲンに応答する責任領域が現有の5種類のリポーターベクターで推定された後、当該領域をさらに短い断片にして組み込んだリポーターベクターを作成し、応答領域の絞込みを行う。

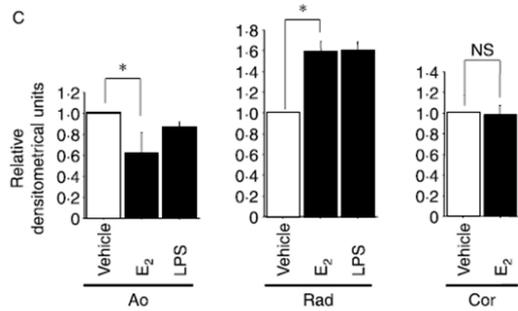
#### 4. 研究成果

##### (1) エストロゲンによるNO産生の抑制。



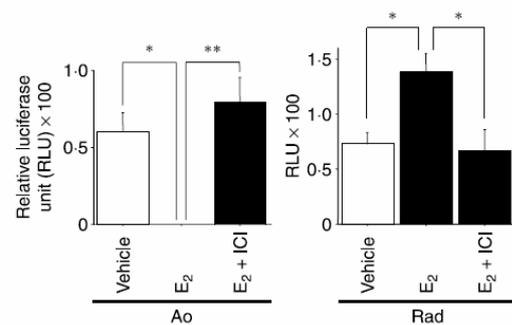
大動脈血管平滑筋細胞ではエストロゲンによりNO産生が抑制され、ICI182,780はその抑制を解除した。

##### (2) 細胞種による異なるiNOS発現。



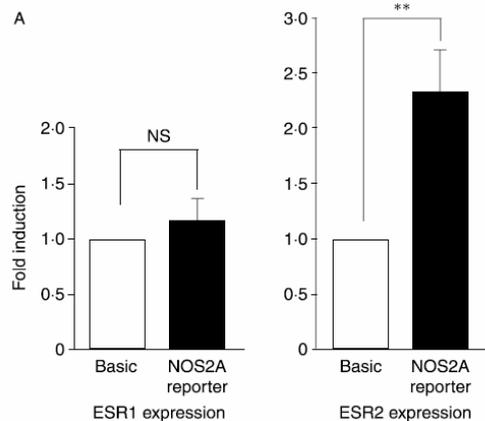
血管平滑筋細胞の種類によりER $\alpha$ とER $\beta$ 遺伝子の発現が異なり、ER $\alpha$ が優位に発現していた大動脈血管平滑筋細胞はエストロゲンによりiNOS発現が抑制され、ER $\beta$ が優位に発現していた橈骨動脈血管平滑筋細胞はエストロゲンによりiNOS発現が促進された。

##### (3) iNOS promoter活性の相違。



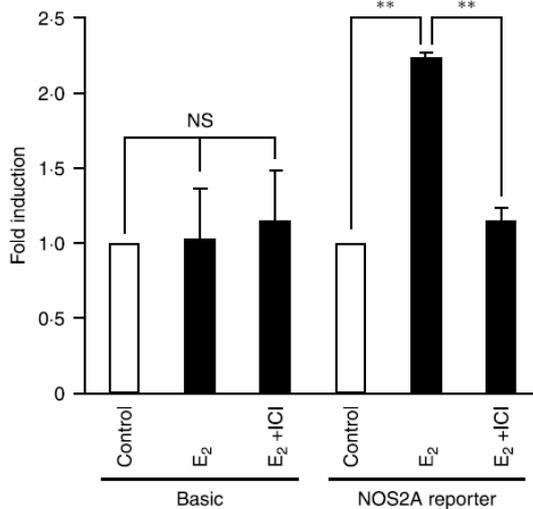
完全長のiNOS promoter活性は大動脈血管平滑筋細胞では抑制され、橈骨動脈血管平滑筋細胞では促進された。

##### (4) COS-7細胞におけるER $\alpha$ と $\beta$ の相違。



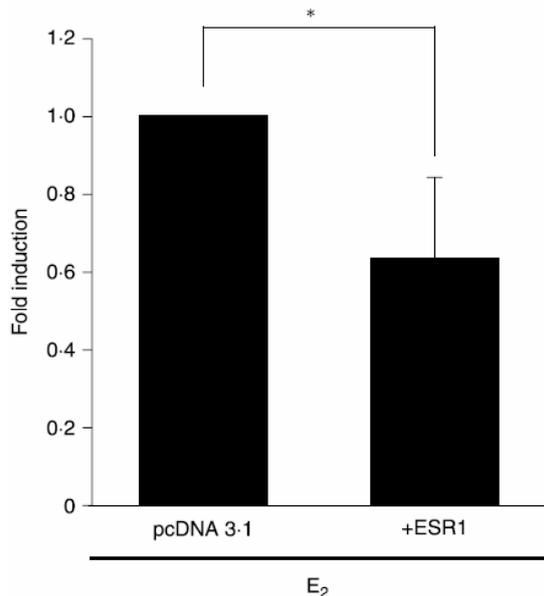
ER $\alpha$ が導入されたCOS-7においては、iNOS promoter活性の変化は認められなかったが、ER $\beta$ が導入されたCOS-7においてiNOS promoter活性が促進した。

(5) ERβのみを有するA10細胞での活性。



A10細胞においては、iNOS promoter活性がエストロゲン刺激により上昇し、ICIによってその作用が阻害されることが確認された。

(6) A10細胞に対するERαの作用。



A10細胞に存在しないERαを導入し、エストロゲンで刺激したところ、iNOS活性の低下が認められた。

(7) ゆえに、以上の結果より、iNOS promoter領域において、ERαとERβは各々異なる転写活性を有することが判明した。iNOS発現においてE2がERβを介してNO産生亢進に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Tsutsumi S, Zhang X, Takata K, Takahashi K, Karas RH, Kurachi H, Mendelsohn ME.

J Endocrinol. 2008 Nov;199(2):267-73. Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2. (査読有り)

②Kawagoe J, Ohmichi M, Tsutsumi S, Ohta T, Takahashi K, Kurachi H. Endocrinology. 2007 Dec;148(12):6092-9.

Mechanism of the divergent effects of estrogen on the cell proliferation of human umbilical endothelial versus aortic smooth muscle cells. (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 誠司 (TSUTSUMI SEIJI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50323168

(2) 研究分担者

高橋 俊文 (TAKAHASHI TOSHIFUMI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：20302292

倉智 博久 (KURACHI HIROHISA)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40153366

(3) 連携研究者

なし。