

審査の結果の要旨

氏名 脇谷健司

本研究は、正常、および、病的な血管新生において、中心的な血管新生因子と考えられている血管内皮特異的増殖因子 (VEGF) の発現誘導機序、および、VEGF 受容体の1つである Flt-1 チロシンキナーゼの内皮細胞特異的な発現調節のメカニズムについて、分子生物学的解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. VEGF の発現誘導因子として、あらたに、非 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-型腫瘍プロモーターの1つであるオカダ酸 (okadaic acid) を見出した。すなわち、各種培養細胞培養液中に、オカダ酸を生理的濃度で添加したところ、数時間後に VEGF mRNA 量の 5-10 倍の上昇がみられ、培養上清中の VEGF タンパク量も著明な増加を認めた。
2. オカダ酸による VEGF 遺伝子発現誘導は、TPA によるそれとは異なって、比較的緩やかな時間経過で起こり、PKC に非依存的であった。また、中和抗体を用いた実験からは、オカダ酸による VEGF 遺伝子活性化のメカニズムとして、オカダ酸の腫瘍プロモーション作用の内因性メディエーターとして注目される腫瘍壊死因子 (TNF- α) によるオートクリンの機序は否定的であった。
3. オカダ酸と同様に、1型および2A型のプロテインフォスファターゼ (PP1、PP2A) の特異的阻害剤であるトウトマイシン (tautomycin) にも、高濃度での VEGF mRNA の誘導作用が認められた。トウトマイシンには、オカダ酸のような強力な腫瘍プロモーション作用や TNF- α の誘導作用は認められないことから、オカダ酸による VEGF 遺伝子発現誘導は、その腫瘍プロモーター活性や TNF- α の誘導能よりも、むしろ、プロテインフォスファターゼ、ことに、PP2A 活性の抑制に関連しているものと思われた。
4. VEGF 受容体の、内皮細胞特異的な発現の分子機構を解明する目的で、VEGF 受容体の1つ *flt-1* (VEGFR1) 遺伝子の 5'-隣接領域を単離し、*flt-1* mRNA を発現する 293E1 細胞や内皮由来の細胞株を用いて chloramphenicol acetyl

transferase (CAT) アッセイを行ったところ、転写開始点より上流、約 200 bp の間に細胞特異的な転写調節領域が存在することが判明した。さらに、この領域に存在する転写因子結合モチーフに点変異を導入した結果、*flt-1* 遺伝子の細胞特異的な転写活性には、転写開始点の上流、約 50 bp 附近に隣接して存在する 1 つの cAMP response element (CRE) と 1 つの Ets モチーフの synergistic な作用が必要であることを見出した。

5. ゲルシフト法によって、293E1 細胞や内皮細胞の核抽出液中に、これら CRE と Ets モチーフのそれぞれに特異的に結合するタンパク性因子の存在が確認された。鳥類の発生初期の内皮細胞や、ヒトの腫瘍血管において、Ets ファミリーに属するタンパクの 1 つ、c-Ets-1 の高発現が報告されているが、本研究に用いた 293E1 細胞や培養内皮細胞にも c-Ets-1 タンパクの存在が認められ、*flt-1* 遺伝子の内皮細胞特異的な発現調節機構として、転写調節因子 c-Ets-1 による活性化が考えられた。
6. ヒト内皮由来の細胞に VEGF を作用させると、まず、*c-ets-1* mRNA の、ついで *flt-1* mRNA の発現誘導を認めた。個体発生や腫瘍組織での血管新生においては、VEGF とその受容体は、リガンド、レセプターの両者とも、発現レベルが上昇しており、転写調節因子 c-Ets-1 を介するポジティブフィードバック機構は、血管新生における、VEGF とその受容体 Flt-1 の協調的な高発現を説明するモデルの 1 つであると考えられた。

以上、本論文は、非 TPA-型腫瘍プロモーターであり、1 型および 2A 型のプロテインフォスファターゼの特異的阻害剤であるオカダ酸が、VEGF の発現誘導因子の 1 つであることを認め、また、VEGF 受容体の 1 つである Flt-1 の内皮細胞特異的な発現に、転写因子 c-Ets-1 が関わることを明らかにした。

本研究は、主要な血管新生調節系である VEGF とその受容体遺伝子の発現調節機構にあらたな知見を加え、血管新生の分子機構の解明に貢献をなすところ少なくとも、学位の授与に値するものと考えられる。