

## 審査の結果の要旨

氏名 太田 樹

本研究は血管形成において重要な役割を果たしている TGF- $\beta$ の作用機構を明らかにするため、二つの異なる TGF- $\beta$ I 型受容体である ALK-1 と ALK-5 をリコンビナントアデノウイルスによりヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に発現導入し、*in vitro* での血管内皮細胞に与える影響を検討するとともに、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて TGF- $\beta$ の標的遺伝子とその発現調節機構の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HUVEC に活性型の ALK-1 と ALK-5 をアデノウイルスにより発現導入し、細胞増殖アッセイおよび DNA 断片化アッセイを行った結果、ALK-5 により細胞増殖が抑制され、アポトーシスが誘導されることが示された。これに対して ALK-1 では ALK-5 と比較して増殖抑制効果は弱く、またアポトーシスの誘導は認められなかった。同様に HUVEC に ALK-1 と ALK-5 を発現導入して行ったマトリゲル上のネットワーク形成アッセイおよびコラーゲンゲル内の管腔形成アッセイにおいては ALK-5 によりいずれも強い形成抑制効果が示されたが、ALK-1 による明らかな形態的变化は認められなかった。ALK-1 と ALK-5 はともに TGF- $\beta$ シグナルを伝える TGF- $\beta$ I 型受容体であるが、血管内皮細胞の増殖、アポトーシス、分化における *in vitro* での作用は全く異なることが示された。
2. HUVEC においてアデノウイルス感染後 8 時間から 48 時間まで ALK-1 および ALK-5 蛋白が発現していること、またそれぞれのシグナル伝達因子である Smad1/5/8 および Smad3 がリン酸化、活性化されていることがイムノブロットにより示された。
3. 活性型 ALK-1 および ALK-5 のアデノウイルスを HUVEC に感染後 48 時間で RNA を分離し、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる解析が行われた。7000 の遺伝子の中から ALK-1 によって発現誘導された遺伝子 46 個、ALK-5 によって発現誘導された遺伝子 52 個、ALK-1 によって発現抑制された遺伝子 54 個、ALK-5 によって発現抑制された遺伝子 49 個が示された。ALK-1 と ALK-5 により調節される新しい TGF- $\beta$ 標的遺伝子が多数同定され、構造的機能的に全く異なる発現調節を受けていることが示された。ALK-1 により Smad6, Smad7, Id1, Id2, STAT1 などの転写因子、ヒト遺伝性出血性毛細血管拡張症の原因遺

伝子である Endoglin, IL-1 受容体に類似する IL1RL1 が特異的に発現誘導されること, またケモカイン受容体の CXCR4, 細胞相互作用に重要な Ephrin-A1, Plakoglobin が発現抑制されることが示された. これに対して ALK-5 では細胞外基質に関連する  $\beta$  IG-H3 や LTBP1, 平滑筋細胞に関連する SM22  $\alpha$  や Caldesmon 1, 細胞接着因子の Connexin 37, 血管形成に関与する増殖因子 PIGF が特異的に発現誘導されること, また血管内皮細胞特異的な接着因子である Claudin 5 や細胞-細胞外基質相互作用に重要な Integrin  $\beta_5$  が発現抑制されることが示された. この他静脈系内皮細胞に発現する Eph-B4 が ALK-1 により発現量が増加すること, 動脈系内皮細胞に発現する Ephrin-B2 の発現量は弱く, ALK-1 および ALK-5 により調節を受けないことが認められた. また TGF- $\beta$  および ALK-5 の標的遺伝子である PAI-1 は ALK-5 により発現誘導が認められなかった.

4. ノーザンプロットにより HUVEC において Smad6, Smad7, Id1, Id2, STAT1, Endoglin, IL1RL1 の各遺伝子が ALK-1 により特異的に誘導されることが示され, マイクロアレイの結果と一致することが示された. Eph-B4, Ephrin-B2, PAI-1 についてもマイクロアレイの結果と相関していることが示された.

5. 定量的リアルタイム PCR では Smad6, Smad7, Id1, Id2, Endoglin の遺伝子について ALK-1 による特異的な誘導が認められ, マイクロアレイおよびノーザンプロットの結果と一致することが示された. PAI-1 については ALK-5 による有意な発現の増加は認められなかった. TGF- $\beta$  により処理した HUVEC から RNA を分離し, 同様に定量的リアルタイム PCR による検討が行われたが, ALK-1 によって誘導された Smad6, Smad7, Id1, Id2 については TGF- $\beta$  によっても同様に発現が誘導されることが示された. Endoglin および PAI-1 については TGF- $\beta$  による発現誘導は認められなかった.

以上, 本論文はヒト臍帯静脈血管内皮細胞において TGF- $\beta$ I 型受容体である ALK-1 と ALK-5 を発現導入して *in vitro* のアッセイおよびマイクロアレイによる解析を行い, 血管内皮細胞における ALK-1 と ALK-5 の作用と遺伝子発現調節機構が大きく異なることを明らかにし, また新しい多数の TGF- $\beta$  標的遺伝子を同定した. 本研究はこれまで不明な部分が多かった TGF- $\beta$  による血管形成のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ, 学位の授与に値するものと考えられる.