

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 The role of Id in the VEGF induced activation and angiogenic properties of human endothelial cells: Implication for the pathogenesis of rheumatoid arthritis

和訳 VEGF によるヒト血管内皮細胞の活性化および血管新生における Id の役割: 関節リウマチの病態との関連

指導教官 徳永勝士教授

東京大学医学系研究科

平成 13 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 櫻井大祐

### 要旨

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は関節を病変の主座とした、免疫異常を伴う慢性炎症性疾患である。RA の関節病変は、始めに滑膜において炎症性浮腫が起こり、続いてリンパ球が浸潤、好中球が遊走し、滑膜表層細胞が増殖、重層化してパンヌスを形成する。これに加えて血管新生も RA 滑膜組織における病態形成の初期段階から観察される。滑膜組織の増生は、滑膜下層細胞の主要構成要素であるマクロファージ様細胞と線維芽細胞様細胞の血管新生を伴う増殖、および表層細胞の過形成と、炎症性細胞の浸潤によって説明されているが、その病態の機序は未だ明らかにされておらず、その分子レベルでの解明が必務とされている。

本研究の目的は病変の主座である RA および OA 関節滑膜の遺伝子発現動向を直接的に観察することにより、RA の病因、病態に関連する遺伝子を検出し、機能的な解析を加えることによって、RA 病態への理解、および新たな治療へ向けた基礎を築くこととした。

### Chapter 1

今回、RA 滑膜に優先的に発現する遺伝子を検出する目的で、変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 患者滑膜を対照とした differential display (DD) 法による検討を行い、RA で発現増強が見られる遺伝子の一つに *ID1* があることを見出した。この結果が複数の患者間において共通した現象か否かを確認し、さらに、その機能の関連性が

ら *ID1* 以外の *ID* ファミリー遺伝子の発現を検討する目的で、RA13 検体、OA6 検体における *ID1*、*ID2*、*ID3*、*ID4* 発現量を半定量的 RT-PCR 法によって測定した。滑膜組織でごく弱い発現しか観察できなかった *ID2* 遺伝子以外は、それぞれ RA 滑膜において 8.6 倍 (*ID1*)、3.3 倍 (*ID3*)、2.1 倍 (*ID4*) と統計学的に有意な発現の増加が認められた。Id1、Id3 について免疫組織染色によるタンパク質レベルでの発現確認と、滑膜組織での局在の検討を行った。結果、Id1、Id3 ともに滑膜組織で陽性染色像が見られ、RA 滑膜でより強く染色された。以上のことから RA 滑膜組織内において Id の優先的な発現が見られ、その発現は血管内皮細胞に局在するということがわかった。

## Chapter 11

Id がノックアウトマウスの研究から血管形成、血管新生に重要な働きをする遺伝子であることと chapter 1 の結果から、RA 滑膜内の血管内皮細胞内に Id が過剰発現することは RA の滑膜組織で典型的に見られる炎症や血管新生への Id の関与を示しているという仮説を立てた。この仮説を検証する目的で、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて Id の機能解析を行なうことによって、RA の病態上重要である慢性炎症、血管新生と Id の血管内皮細胞中での働きとの関連を検討した。

まず、Id が生理的な関節リウマチ滑膜の状況において、血管新生に関与するか否かを検討するために、関節リウマチ滑膜内で発現が亢進する複数種のサイトカインによる Id3 の発現誘導を検討した。VEGF および TGF $\beta$  で血管内皮細胞を刺激したときに Id1、Id3 の有意な発現増強が認められた。この結果から、上記の因子による血管新生誘導シグナル系路に Id が位置することが示唆された。一方 IL-1、IL-8、TNF $\alpha$  といった血管新生促進因子では Id の発現は誘導できなかった。

次に、Id のみの刺激で HUVEC の活性化および血管新生を誘導しうるか否かを検討するために、遺伝子導入により、HUVEC に Id3 を過剰発現させた。遺伝子導入 24 時間後、陰性対照との比較では、強制発現細胞において mRNA レベルで 4.1 倍の Id3 の発現増強が観察された。Id3 強制発現細胞では 24 時間で陰性対照に比べて 1.9 倍の増殖能の上昇が見られ、VEGF 刺激後の非遺伝子導入細胞とほぼ同等の増殖を示した。Id は線維芽細胞において、p16 の発現調節を行なうことによって細胞周期を調節していることがすでに知られているが、本実験では、p16 と Id3 の mRNA レベルでの発現は逆相関の関係にあり、この機序が HUVEC においても機能していることが示唆された。

Id3 の強制発現が HUVEC の活性化を誘導できるか否かを調べるために、血管内皮細胞の活性化マーカーとして ICAM-1 と E-selectin の発現を測定した。Id3 強制発現により、mRNA レベルで ICAM-1、E-selectin 共にそれぞれ 4.8 倍および 4.2 倍の発現の上昇が見られ、細胞表面の発現も増加した。以上の結果から Id3 の強制発現のみで HUVEC の活性化が誘導しうることを示された。さらに Id3 の強制発現によって HUVEC で血管新生が誘導できるか否かを検討したところ、Id3 強制発現血管内皮細胞では遊走能が亢進しており、特に IL-1 $\beta$  や VEGF 存在下で顕著であった。Id3 強制発現により、非刺激下において、

MMP2 と MMP9 の発現量は、mRNA レベルで 3.2 倍、3.7 倍とそれぞれ上昇しており、MMP2 と MMP9 の酵素活性レベルでの上昇もザイモグラフィーにより確認したところ、両分子ともに活性が増強していた。さらにマトリゲルを用いて管腔形成を in vitro において検討したところ、Id3 強制発現細胞では VEGF 刺激無しでも十分な管腔形成が誘導された。これらの結果を合わせて考えると、HUVEC での Id の強制発現のみによって血管新生が誘導されることが明らかになった。

### Chapter III

Chapter II の結果より、Id の発現は VEGF によって誘導されることがわかった。そこで Id は VEGF 刺激によって誘導される HUVEC の細胞増殖、活性化、血管新生にとって必須であるか否かを検証した。Id1 と Id3 の発現を阻害するために RNAi を用いた。HUVEC に *ID1* と *ID3* の small hairpin RNA (shRNA) を発現するベクターを導入したところ、VEGF で誘導される *ID1* および *ID3* の発現が、ベクターの用量依存的に阻害された。このように作成した Id1/Id3 ノックダウン細胞は、VEGF で刺激しても、対照と比べると細胞増殖が有意に阻害され、ICAM-1 や E-selectin の VEGF による発現上昇も抑制された。さらに他の活性化マーカーである  $\alpha_v$  インテグリンの発現も、shRNA 非導入細胞と比較して低下していた。

次に Id1/Id3 ダブルノックダウン HUVEC において、VEGF 誘導性血管新生が阻害されるか否かを検討した。*ID1/ID3*shRNA 導入細胞では、VEGF 誘導性の遊走能の活性化が抑制された。また、Id1/Id3 ノックダウン細胞では、VEGF 刺激下において、MMP9 の産生は下がらなかったが、MMP2 の発現は有意に抑制された。VEGF 存在下における管腔形成も、*ID1* および *ID3* shRNA 導入細胞では減少した。また *ID1*、*ID3* shRNA 導入細胞における  $\alpha_2$  および  $\beta_1$  インテグリンの発現抑制も観察された。以上の結果から VEGF によって誘導される HUVEC の血管新生において Id は必須の役割を果たしていることが示された。

以上の結果から、Id は血管内皮細胞における、VEGF 誘導性血管内皮細胞の活性化や血管新生において、必須の役割を持つと考えられ、成人の組織では強い発現があまり見られないことなどから、RA およびその他血管新生を伴う疾患における、新たな治療標的となりうる可能性をもつものであることが示された。