

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 武田 憲彦

本研究は血管内皮細胞に特異的に発現し、低酸素応答及び血管新生に重要な役割を演じていると考えられる転写因子EPAS1の働きに注目し、成熟した血管新生のメカニズムを解析することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 血管内皮細胞における EPAS 1 の働きを解析するため、その下流遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。アデノウイルスを用いて EPAS 1 をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に過剰発現させ、誘導される遺伝子を解析した結果、Vascular endothelial growth factor (VEGF) I 型受容体である Flt-1 を含む 130 個の遺伝子が誘導されることが判った。Flt-1 も EPAS1 同様、血管内皮細胞に特異的に発現し、低酸素により誘導されることが示されているが、EPAS1 により Flt-1 mRNA 発現が誘導されることをノーザンブロットにて確認した。更にその誘導には Flt-1 プロモーター領域 -965bp の HIF-1 結合配列に EPAS1 が直接結合し、プロモーター活性を上昇させることがレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイにて示された。
2. 多くの細胞の低酸素応答は EPAS1 と高い相同性を有する HIF-1 α により制御されている。低酸素による血管内皮細胞での Flt-1 発現誘導が HIF-1 α を介したのか、EPAS1 を介したのかを検討するために siRNA を用いて両者をノックダウンして解析を行った。その結果、血管内皮細胞における低酸素での Flt-1 発現誘導には HIF-1 α ではなく EPAS1 が主の役割を果たしていることが示された。
3. EPAS1 の血管新生における働きを *in vivo* において解析する為、マウス皮膚

創傷モデルを用いて検討したところ、EPAS1により血管新生が亢進した結果、創傷治癒過程が促進されることが示された。更に創部における遺伝子発現を検討したところ、VEGF, Flt-1, Tie2 および platelet-derived growth factor (PDGF) A/B 発現が誘導されていることが判った。

4. 血管新生に重要な役割を果たす VEGF は EPAS1 により誘導される遺伝子の一つであるが、VEGF と EPAS1 の血管新生における役割を比較した。VEGF および EPAS1 投与により、創部における血管内皮細胞の増殖は共に亢進したが、VEGF により誘導された血管の多くは壁細胞マーカー (Smooth muscle α -actin) 陰性であるのに対し、EPAS1 により誘導された血管は壁細胞を伴う成熟した血管であることが示された。つまり EPAS1 は VEGF と異なり、成熟した血管新生を促進すると考えられた。
5. EPAS1 により成熟した血管が誘導されるメカニズムの解析するため、EPAS1 の下流遺伝子として同定された Flt-1 の役割に注目した。マウス Flt-1 に対する中和抗体を経静脈的にマウスに全身投与したところ、EPAS1 による創傷治癒促進効果は減弱した。更に中和抗体を投与した組織では、幼若な血管内皮細胞の増生は認めるものの、その多くは壁細胞を伴わない未熟な血管新生であることが示された。このことから EPAS1 は Flt-1 を介して成熟した血管新生を誘導すると考えられた。

以上、本論文では血管の低酸素応答に重要な役割を果たす転写因子 EPAS1 が VEGF およびその I 型受容体 Flt-1 発現を誘導することにより、成熟した血管新生を促進することを明らかにした。本研究は、将来的に生理的な血管を再生する治療を行う際に重要である新生血管が成熟するプロセスの解明に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。