

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮細胞増殖因子による内皮活性化における転写因子Egr-3の役割

氏 名 末弘 淳一

内皮細胞は血管内膜を構成する細胞で、血液に接することからサイトカイン、ケモカイン、増殖因子といった刺激に常に曝されている。このような周囲環境の変化に対して内皮細胞は自らの機能を変化させることで柔軟に対応し、血管の恒常性を維持している。しかしながら、病的環境下で過度の刺激を受けた際には、内皮細胞は機能不全に陥り異常活性化状態となる。その結果、炎症、動脈硬化、腫瘍血管新生といった疾患を誘発する。これら疾患が起こる過程では多くのシグナル経路が活性化され遺伝子発現を伴うことが知られている。本研究室の南らは腫瘍血管新生における遺伝子発現の変化を検討するため、臍帯静脈内皮細胞HUVECにVEGF, Thrombin, TNF- α をそれぞれ作用させることで活性化し、初期（1時間）、中期（4時間）、後期（12時間）の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。VEGF, Thrombin, TNF- α 全てに共通して有意に2倍以上誘導されるもののなかにEgrファミリー遺伝子であるEgr-1, Egr-3が含まれ、内皮活性化に何らかの役割を果たすことが示唆された（図1）。EgrはC2H2型ジンクフィンガーを有する転写因子ファミリーであり、増殖因子やストレス刺激で早期に、かつ一過性に誘導されることが知られている。1985年にForsdykeらがプロトタイプであるEgr-1を同定して以降、Egr-2, Egr-3, Egr-4という4つのメンバーが報告された。EgrはC末端領域に3つのジンクフィンガーを持ち、DNA配列GCG(T/G)GGGCGへ結合し転写調節を行っている。現在までにEgr-1は動脈硬化、血管新生に関わることが示されているが、一方でEgr-3と内皮機能との関連については報告がなく明らかとなっていない。そこで本研究はVEGF刺激下の血管内皮細胞に着目し、転写因子Egr-3の機能解析を行うことを目的とした。

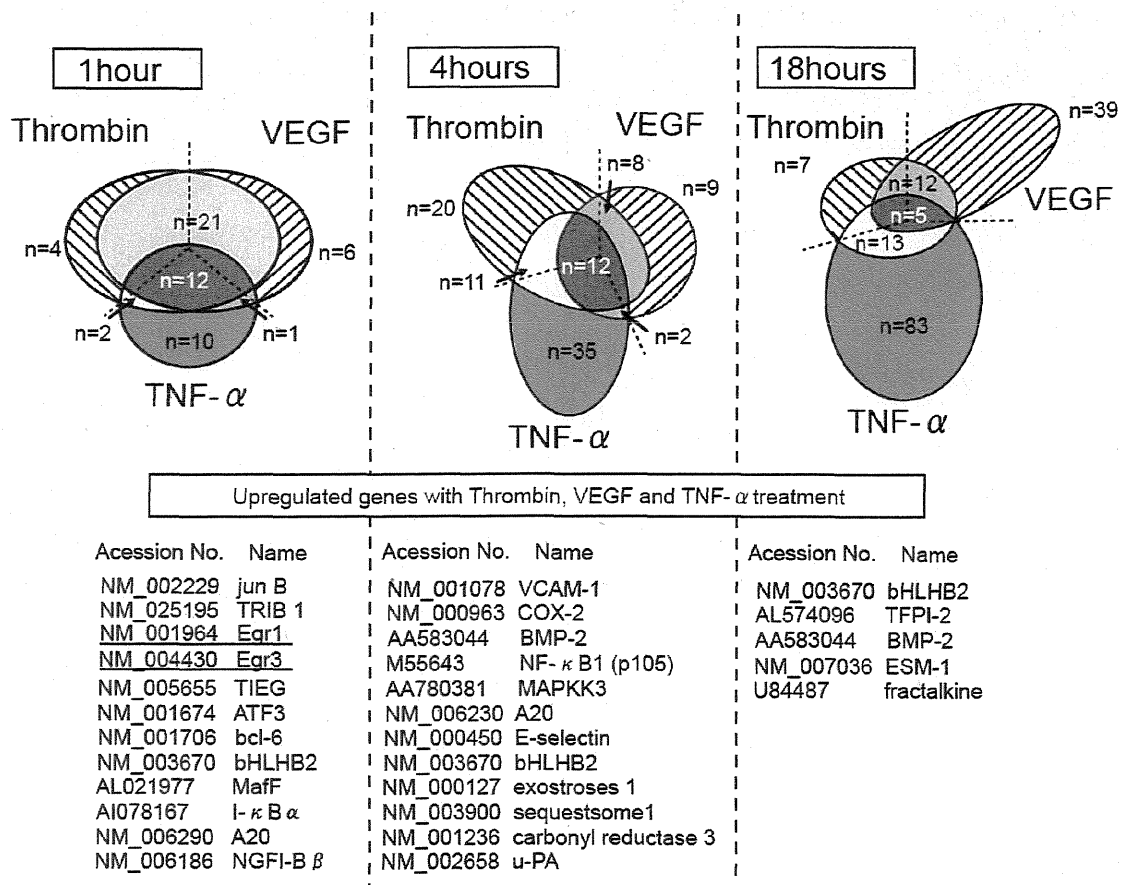


図1 炎症性刺激Thrombin, VEGF, TNF α をHUVECに作用させた際、初期（1時間）、中期（4時間）、後期（18時間）において誘導される遺伝子数、及び全ての因子で共通して誘導される遺伝子名。

初めに臍帯静脈、冠動脈、肺動脈、真皮微小血管を由来とする内皮細胞で50ng/mL VEGF刺激後のEgr-1、及びEgr-3 mRNAの時間発現をリアルタイムPCRで検討した。Egr-1 mRNAは刺激後30-45分をピークとし、刺激前と比較して30-120倍の誘導であった。一方、Egr-3 mRNAは刺激後45-60分をピークとし、180-440倍の誘導であった（図2A）。なお、全ての内皮細胞でEgr-1、Egr-3の誘導が見られた。次に、タンパク質レベルでの経時的発現をウェスタンブロット法により検討した。VEGF刺激後0、1、2、4時間に回収した各抽出液100ugを用いたところ、Egr-1は刺激後1時間ピークの一過性誘導を示した。一方、Egr-3は刺激後2時間をピークとし、Egr-1に比してより持続的な発現を示した（図2B）。このような誘導の違いが何に起因するかを検討するため、シグナル経路の化学阻害剤を用いて誘導経路の検討を行ったところ、Egr-1はVEGFR-2、

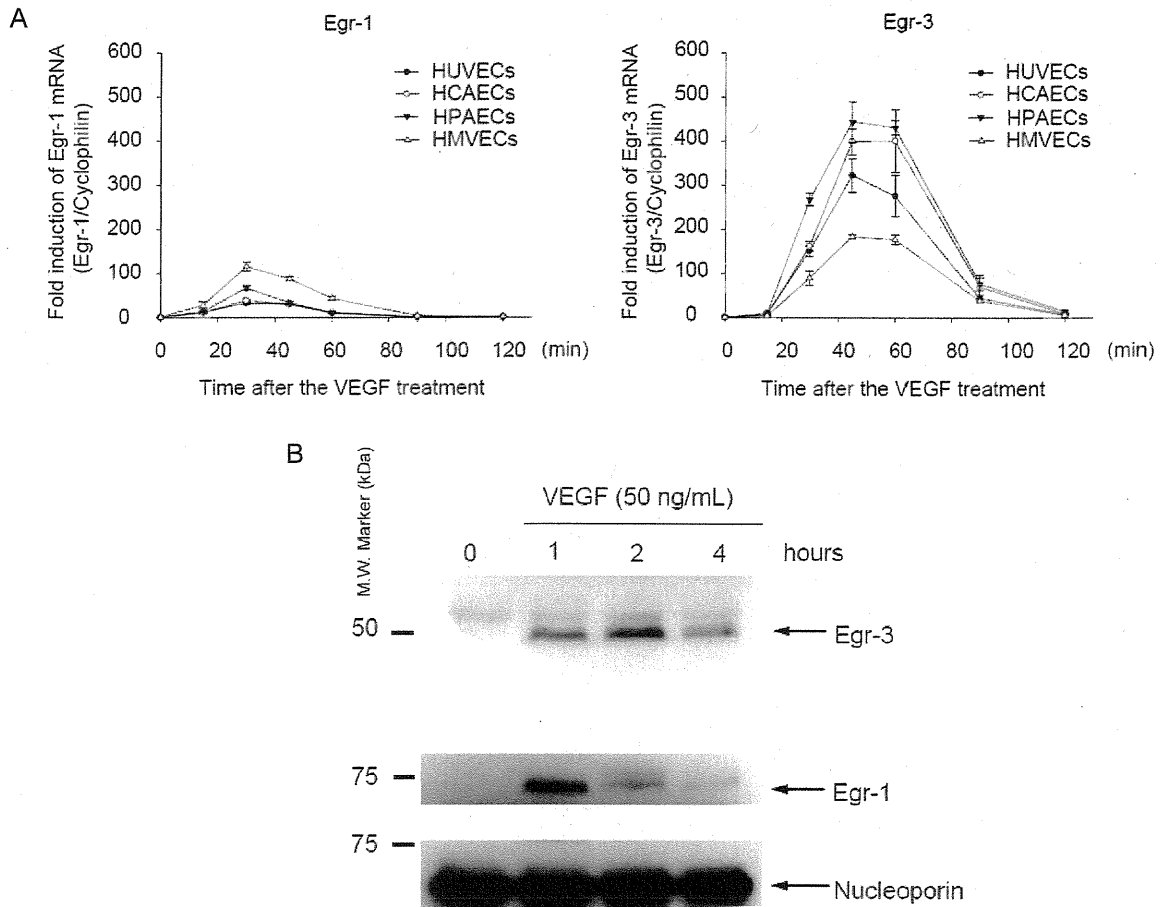


図2 臍帯静脈，冠動脈，肺動脈，真皮微小血管由来の内皮細胞におけるVEGF誘導Egr-1, Egr-3 mRNA(A), 及び臍帯静脈内皮細胞におけるEgr-1,Egr-3タンパクの時間発現(B).

MEK1/2, Ca⁺⁺, JNKを介し, Egr-3はVEGFR-2, MEK1/2, Ca⁺⁺, JNK経路に加え, PI3K, Calcineurin, PKC, PKAを介していた. 誘導経路の相違がみられたことから, Egr-3の5' flanking regionをクローニングし, ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った. 異種間で相同性の高い転写開始点上流2544bpを全長とし, 5' 末端から段階的に削っていくことにより責任領域を検討した. 全長では未刺激時と比してVEGFにより活性が13倍上昇するのに対し, 515-37bpを削ったところで活性が有意に低下した. この責任領域にどのような転写因子の結合配列が存在するかをコンピュータ予測したところ, 上流側よりNFAT, CRE, SRE, CRE配列が順に配置することが示された.

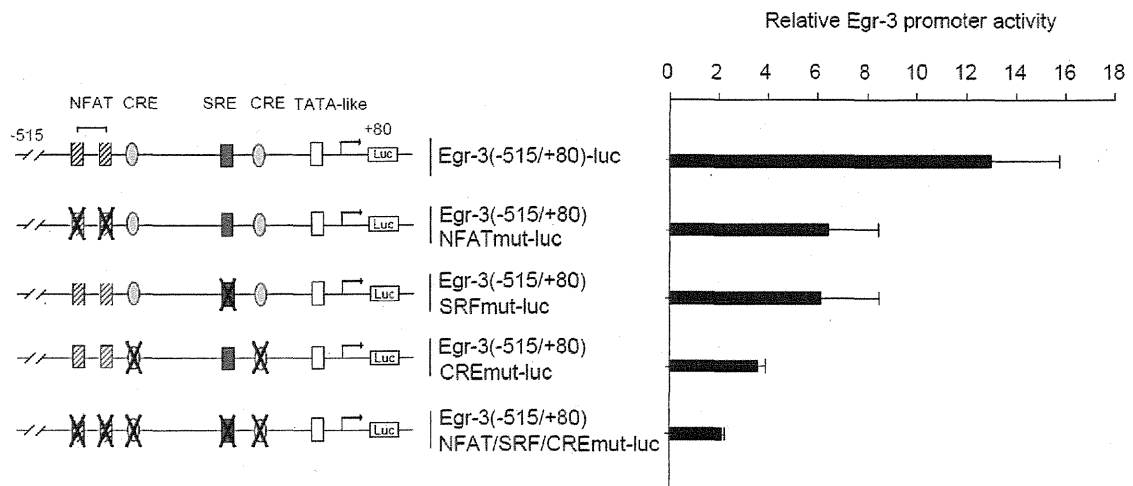


図3 Egr-3プロモータに存在する転写因子結合領域と変異レポーターベクターを用いた活性の検討. 未刺激状態を基準としてVEGF刺激(4時間)後のレポーター活性を示している.

そこで、これらの転写因子結合領域に変異を加えたコンストラクトを作成し検討を行ったところ、野生型プラスミドに比してNFAT, SRE配列変異によりそれぞれ 50%, CRE配列変異により70%活性が損なわれ、全てに変異を加えた場合には90%活性が損なわれた(図3). 次に、ゲルシフトアッセイにより転写因子の結合を検討した. NFAT結合領域をプローブとして作製し、VEGF刺激1時間後の核抽出液をプローブと混合することで、タンパクDNA複合体が形成された. さらにコールドプローブによりこのバンドは消失し、コールド変異プローブによりバンドの消失が見られないことから、NFAT配列特異的にタンパクが結合していることが示された. 各種抗体によりスーパーシフトを確認したところ、NFATc1, NFATc2抗体によりスーパーシフトが見られた. 以上よりNFATc1, NFATc2が特異的に結合していることが示された. 同様の検討により、SRF, CREBもこれら領域に特異的に結合していた. 以上より、VEGFにより活性化されたNFAT, SRF, CREBが協調してEgr-3を誘導していることが明らかとなった.

次に、siRNAを用いたEgr-3のノックダウンにより、標的遺伝子の探索を行った。ウェスタンブロット法によりVEGF刺激下でEgr-3のノックダウンを検討したところ、検出限界以下まで抑制されることが確認された。Egr-3をノックダウンしたHUVECからtotal RNAを回収し、マイクロアレイによりトランスクリプトーム解析をおこなった。独立した2回のデータを用いてVEGFにより1.5倍以上誘導、かつsiEgr-3により抑制された遺伝子を抽出してきたところ、刺激1時間において17遺伝子、4時間で12遺伝子が標的遺伝子として挙げられた。その中には内皮の活性化に深く関わるVCAM1, E-selectin, ETS1, TF, アクチンの再構成化に寄与し細胞遊走に関わるSSH1, RND1が含まれていた(図4)。

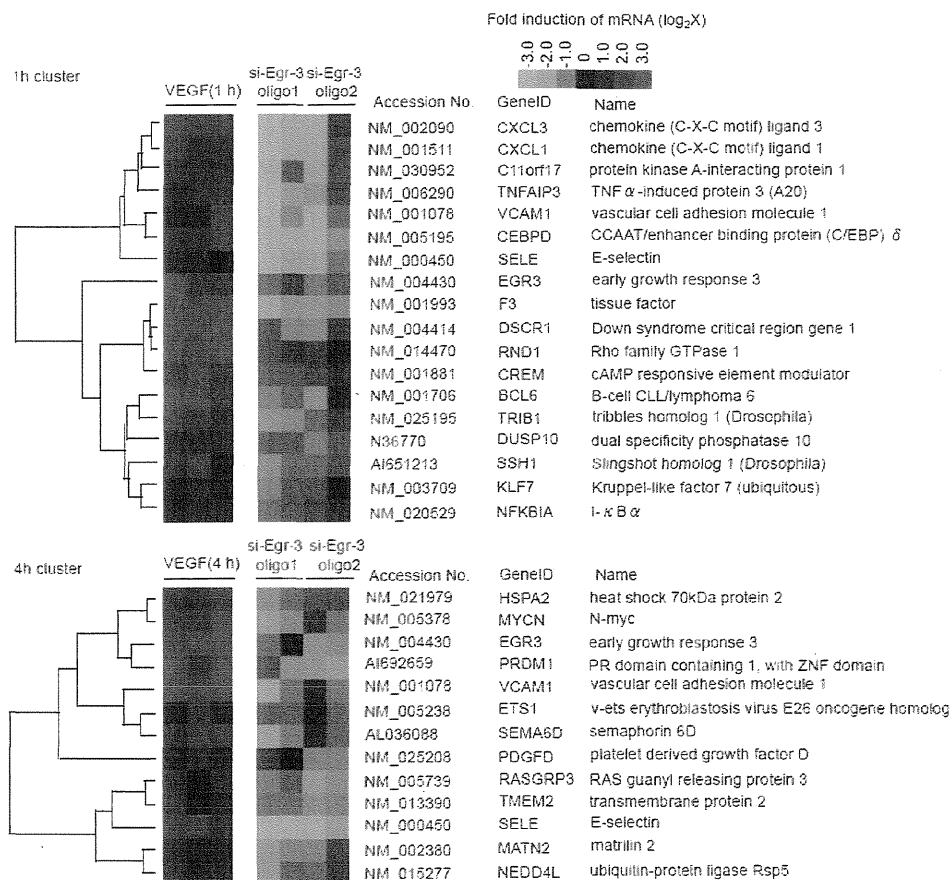


図4 Egr-3ノックダウンHUVECにおいて抑制されるVEGF誘導遺伝子. VEGF刺激1, 4時間のtotal RNAを用いてDNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。独立した2回のデータを用いて、VEGFにより1.5倍以上誘導(赤色)、かつEgr-3 siRNAにより抑制された(緑色)遺伝子を抽出してきた。

マイクロアレイより内皮活性化に関わる因子がEgr-3を介して誘導されることが示されたことから、siRNAを用いて内皮細胞活性化の機能解析を行った。増殖について検討したところ、Egr-3 siRNAによりVEGF刺激48時間後の細胞数がoligo1で80%、oligo2で60%減少した。次に、Boyden chamber, wound healing アッセイにより遊走の検討を行った。いずれのアッセイでもEgr-3をノックダウンすると遊走が有意に低下することが示された。さらに増殖、遊走機能が複合的に関わる管腔形成の検討をCollagen sandwich tube formationアッセイにて行った。コントロールではVEGF刺激により多くのチューブ状形態が観察される一方、Egr-3 をノックダウンすることでチューブ形態が損なわれた。マイクロアレイよりEgr3ノックダウンで炎症接着因子の減弱がみられたことから単球U937細胞とHUVECとの接着に関する検討を行った。VEGF刺激4時間における接着を観察したところ、コントロールでは視野全体に単球が接着するのに対し、Egr-3をノックダウンすることで接着が有意に低下した。以上の内皮細胞の機能解析から、Egr-3は増殖、遊走、管腔形成、単球接着に寄与することが示された。

次に、Egr-3の誘導を抑制可能なmiRNA発現アデノウイルス(Adv.miEgr-3)を作製し、in vivoにおける血管新生との関わりを検討した。Aortic ring アッセイにて血管新生を検討したところ、VEGF処理後14日においてコントロールでは多くの新生血管が観察されたが、Adv.miEgr-3処理時には有意に抑制された(図5)。次に、Matrigel plug アッセイにおいてヘマトキシリン・エオジン染色を施行し血管浸潤を検討した。コントロールでVEGF処理時に多くの血管がみられる一方、Adv. miEgr-3を加えたサンプルでは血管密度が有意に減少することが示された。同じマトリゲル由来の切片を血管内皮細胞のマーカーであるPECAM1で染色し、血管密度を定量したところ、Adv.miEgr-3処理時には50%低下していることが示された。このようにEgr3はVEGFを介した血管新生に寄与することから、腫瘍血管におけるEgr-3の発現を免疫組織染色により検討した。マウスメラノーマ細胞高転移株B16F10、マウス肺癌細胞株LLCより作製した固形腫瘍

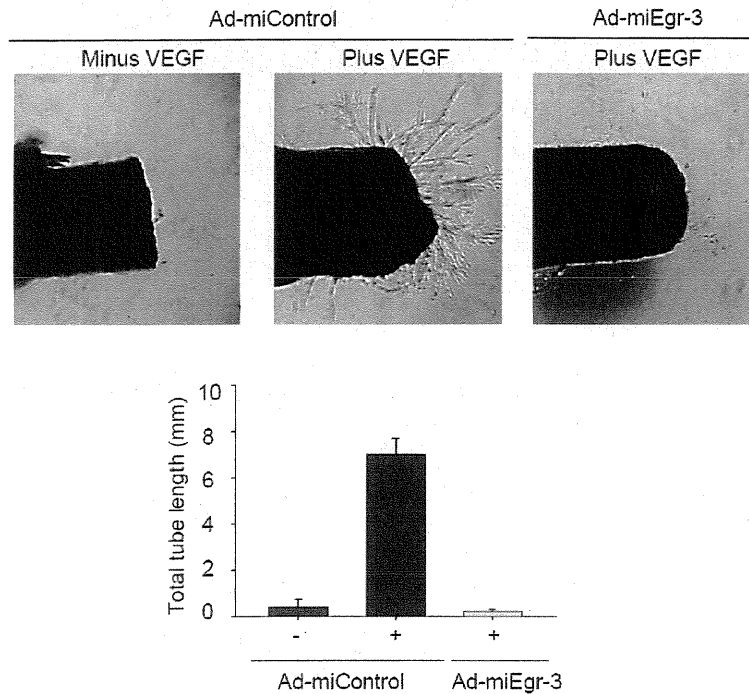


図5 Aortic ringアッセイにおけるAdv.miEgr-3による血管新生への影響. マトリゲル内にマウス大動脈を埋め込み、コントロールAdv.もしくはAdv. miEgr-3を加えたMCDB131 (VEGF有無)で培養し、10日後での大動脈からの血管新生を位相差顕微鏡で観察した. 画像解析により血管新生領域を抽出しチューブ長さを定量した.

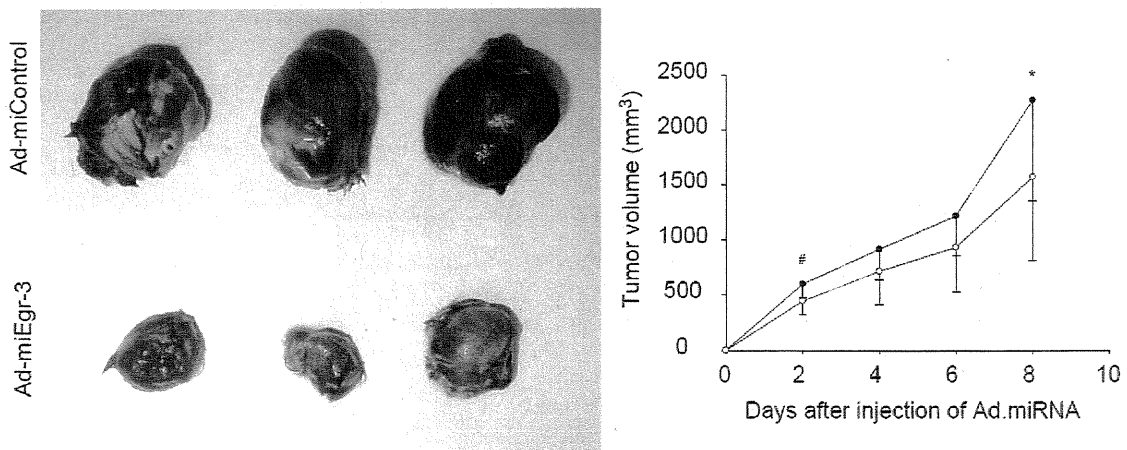


図6 マウスメラノーマ細胞高転移株B16F10を用いた固形癌モデルにAdv.miEgr-3を導入時の腫瘍進展への影響. B16F10メラノーマ細胞をC57BL/6Jマウスの皮下に注射し、固形腫瘍の形がわかる1週間くらいまで放置した. その後、 5×10^9 pfuのAdv.miRNAを固形腫瘍に直接注射し、8日後まで2日おきに腫瘍サイズを測定した(*: $p < 0.06$, #: $p < 0.01$)

内の血管にEgr-3の発現がみられた。腫瘍血管特異にEgr-3が発現することから、Adv. miEgr-3を固形腫瘍に導入し血管新生、及び腫瘍進展の抑制を試みた。B16F10細胞をマウスの肢の付け根に皮下注射し、一週間後、腫瘍にAdv. miEgr-3を注入した。その後、2日おきに腫瘍サイズを測定した。結果、ウイルス導入2日目においてAdv. miEgr-3処理により腫瘍サイズの抑制がみられた（有意差 $p=0.01$ ）。その後、コントロール、Adv. miEgr-3ともに腫瘍増殖がみられるものの、8日後において腫瘍サイズの有意な抑制が観察された（有意差 $p=0.08$ ）（図6）。さらに、8日目の腫瘍を摘出して凍結切片を作製し、PECAM1抗体にて血管密度を定量したところ、Adv.miEgr-3処理では血管密度が90%減少していることが観察された。

以上より、VEGF刺激下でNFAT, SRF, CREBにより誘導されるEgr-3は内皮細胞の活性化に寄与し、病的環境では血管新生を誘導することで腫瘍進展に深く関わっていることが示された。