

## 審査の結果の要旨

氏名 末弘 淳一

本研究では VEGF 刺激で誘導される Egr-3 に着目し誘導機構、標的遺伝子、内皮機能に関する検討を行った。また、*in vivo*における役割として腫瘍血管新生における機能を検討した。

初めに、VEGF 刺激による Egr-3 の発現解析を行った。リアルタイム PCR の解析では Egr-1 mRNA は刺激により 30-45 分をピークとした一過性の誘導であるのに対し、Egr-3 mRNA は 45-60 分をピークとしており、時間発現パターンに相違がみられた。また、未刺激状態を基準とした誘導は Egr-3 の方が高いことが示された。ウェスタンブロット解析では Egr-1 タンパクは 1 時間をピークとした一過性誘導であるのに対し、Egr-3 は 2 時間をピークとした、持続的な発現パターンを示した。

次に、VEGF 刺激による Egr-3 の誘導機構を検討した。化学阻害剤を用いた検討では、Egr-3 は Egr-1 誘導に必須な KDR, MEK1/2, Ca<sup>2+</sup>, JNK, PKC に加え、PI3K, PKA, Calcineurin を介して誘導されていることが示された。新規合成タンパクの関与は見られなかった。Egr-3 プロモータ組み込んだレポーターアッセイによる責任領域の検討では、転写開始点上流 515-37 bp に含まれる NFAT, SRF, CREB 結合配列が必須であることが示された。また、NFATc1, NFATc2, SRF, CREB といった転写因子が VEGF により活性化され、Egr-3 プロモータに直接結合することにより発現調節を行っていることが明らかとなった。

Egr-3 の標的遺伝子を探索するため、siRNA を用いて Egr-3 を抑制し、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。VEGF 刺激 1 時間で 17 遺伝子、4 時間で 12 遺伝子が Egr-3 を介した誘導であることが明らかとなった。Egr-3 標的遺伝子のなかには接着因子である VCAM1 や E-selectin, 血管新生に関わる Ets-1, 血液凝固に関わる TF, 細胞遊走に関わる RND1, SSH1 が含まれた。

Egr-3 は内皮細胞活性化に関与する因子を誘導することから、siRNA を用いて Egr-3 を抑制し VEGF 刺激下での内皮機能に関する検討を行った。Egr-3 抑制により増殖、遊走といった機能が阻害され、管腔形成が損なわれた。また、炎症において生じる U937 単球細胞と内皮細胞との接着が低下した。

最後に、Ad-miEgr-3 を用いて生体内で Egr-3 の発現抑制を試み、Egr-3 抑制による血管新生、腫瘍進展に関する検討を行った。マウス内皮様 MS1 細胞において Ad-miEgr-3 は VEGF 誘導 Egr-3 を mRNA レベルで 90%抑制した。Aortic ring アッセイ、Matrigel plug アッセイにて検討したところ、Ad-miEgr-3 の導入により血管新生が阻害されることが示された。免疫組織染色による検討では、マウスメラノーマ細胞高転移株 B16F10, マウス肺癌細胞株 LLC 内の腫瘍血管に Egr-3 の発現がみられた。Ad-miEgr-3 を B16F10 固

形腫瘍に導入したところ、腫瘍進展が有意に抑制された。固形腫瘍で凍結切片を作製し PECAM1（内皮細胞のマーカー）で免疫組織染色を行ったところ、Ad-miEgr-3 導入下で血管密度の低下が観察された。Ad-miEgr-3 が血管新生を抑制し、腫瘍進展が阻害されていると類推された。

以上より、Egr-3 は VEGF による増殖、遊走、管腔形成、炎症接着といった内皮機能を多岐にわたり調節していることが明らかとなった。その結果、腫瘍進展における血管新生に寄与することが示された。本論文で示した VEGF 刺激下での内皮細胞における Egr-3 の役割は VEGF シグナルにおける新たな調節機構を示唆しており、腫瘍に対する血管新生をターゲットとした治療法に対して新たな知見を提供する。

よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。