

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 綾

本研究は血管平滑筋細胞の分化誘導過程において分化を制御する遺伝子として同定された転写因子 **Mrf-2/ARID5B** の血管新生における役割を明らかにするため、マクロファージに着目して、生体内における血管新生、培養細胞における遺伝子解析およびメカニズムの探求を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 生体内における血管新生モデルとしてマトリゲルアッセイを行った結果、**ARID5B** の **Small interfering RNA (si RNA)** を含むマトリゲルでは、マトリゲルへの血管新生が有意に低下していた。また、採取したマトリゲルプラグの免疫組織化学染色では、 α **SMA** 陽性血管平滑筋細胞の浸潤および **CD31** 陽性血管内皮細胞の遊走が有意に低下していた。一方、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞をリクルートする役割を持つマクロファージの浸潤には有意差を認めなかった。また、**ARID5B** 変異型ホモ接合体の骨髄を移植して得られた骨髄キメラマウスにおいても、同様の表現型が得られたことから、骨髄由来の免疫細胞における **ARID5B** が血管新生に重要であることが示された。
2. ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (**HUVECs**) を用いた遊走試験を行った結果、**HUVECs** の **ARID5B** 遺伝子ノックダウンでは、細胞の遊走低下は見られなかったが、**ARID5B** 変異型ホモ接合体マウスの骨髄由来マクロファージ培養上澄内では、**HUVECs** の遊走が有意に低下した。以上の実験により、骨髄細胞由来の免疫細胞における **ARID5B** の欠乏によりマクロファージから産生される血管新生因子に異常を来すことが示された。
3. 骨髄由来マクロファージにおいて、血管新生関連遺伝子に対する **cDNA** アレイシステムを用いて遺伝子発現を網羅的に調べた。その結果、**ARID5B** 変異型ホモ接合体マウスでは、血管内皮細胞由来増殖因子 **A (VEGF-A)**、塩基性線維芽細胞由来増殖因子 (**bFGF**)、**Spp1 (Osteopontin)** の発現が有意に低下していた。また、**M1/M2** マクロファージの分化マーカーである **TNF α** や **Arginase-1** といった遺伝子の発現低下も認め、マクロファージにおける **ARID5B** の遺伝子変異により、血管新生因子の産生低下、さらに、マクロファージの **M1/M2** への分化にも関与していること

が示された。

4. マクロファージにおいて、ARID5B が VEGF-A や Spp1 の発現調整をするメカニズムについて、VEGF-A および Spp1 の遺伝子プロモーター上に存在する AP-1 結合モチーフを組み込んだプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行った結果、ARID5B 遺伝子をノックダウンした NIH Swiss マウス胎仔皮膚由来線維芽細胞株 (NIH/3T3) において、ルシフェラーゼ活性が有意に低下した。さらに、ARID5B 変異型ホモ接合体マウスの骨髄由来マクロファージにおける AP-1 (c-JUN、c-FOS) の発現を調べたところ有意な低下を認めた。以上の検討により、マクロファージにおける ARID5B が、AP-1 (c-JUN、c-FOS) の発現を制御して、VEGF-A および Spp1 の発現を調節していること、そしてマクロファージにおける ARID5B の欠乏により血管新生が低下することが示された。
5. 創傷治癒モデルおよびマウススライス肺癌細胞株 (LL/2) 皮下移植モデルを行った結果、創傷治癒モデルでは ARID5B 変異型骨髄キメラマウスにおいて、新生血管の減少および上皮化の遅延を認めた。一方、LL/2 皮下移植モデルにおいては、ARID5B 変異型骨髄キメラマウスで腫瘍径が有意に大きく、ともに免疫細胞における VEGF-A 欠乏がもたらす表現型として矛盾しなかった。

以上、本論文は複数の動物モデルおよび培養細胞を用いた実験系において、マクロファージにおける転写因子 ARID5B が血管新生に重要であること、そしてそのメカニズムを明らかにした。本研究は、血管新生に関連する創傷治癒の過程、動脈硬化性疾患における慢性炎症の進展、悪性腫瘍の進展などの疾患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。