

学 位 論 文 題 名

低酸素下における VEGF と Angiopoietin-like4の 相互制御機構

学位論文内容の要旨

固形癌では、腫瘍の増大に血管の形成が間に合わず、血液の供給が不足となり、組織内の癌細胞は低酸素下にあるとされている。一方、最近の研究では多くの増殖因子が血管新生を調節しており、それらの発現する時期、部位、量が巧妙に調節され血管のネットワークが形成されると報告されている。そこで、低酸素下で発現が亢進する血管調節因子を発見する目的で DNA microarray を行った。その結果、低酸素下での発現が正常酸素分圧下での発現と比較して 10 倍以上に亢進する亢進した遺伝子を 30 個、2 倍以上に発現が亢進した遺伝子を 200 個以上同定した。今回その中で最も発現が亢進していた ANGPTL4 (Angiopoietin-like4) という遺伝子に着目しました。

ANGPTL4 は血管新生に関して促進的に働くという報告と、抑制的に働くという報告があり、一致した見解は得られていない。これらの報告を詳細に検討してみると、ANGPTL4 単独では促進的な効果を示すが、血管内皮成長因子 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 誘導性の血管新生に対しては抑制的に作用することが推測された。したがってこれらの結果から、ANGPTL4 の血管新生に対する効果は存在する環境により変化していると考えられ、腫瘍組織のように VEGF と ANGPTL4 と両方存在するような環境下では ANGPTL4 は血管新生に抑制的に働いていると考えられた。また VEGF が ANGPTL4 の発現を誘導することも報告されており、両者の間にはクロストークが存在することが考えられた。

ANGPTL4 と VEGF はいずれも低酸素下で低酸素誘導性転写因子 HIF-1(Hypoxia Inducible Factor 1) によって発現が亢進することが報告されており、また VEGF が ANGPTL4 の発現を亢進することも報告されている。そこで本研究では ANGPTL4 が VEGF の発現に与える影響とそのメカニズムについて解析することを目的とした。

まず低酸素下における ANGPTL4 mRNA の発現を解析した。Hela 細胞、Miapaca2 細胞、PCI43 細胞、BxPC3 細胞、HSC3 細胞、TT 細胞という 6 つの癌細胞株をそれぞれ正常酸素分圧下、低酸素下で 24 時間培養した後、細胞から total RNA を抽出し、ANGPTL4 mRNA の発現を real-time PCR 法で測定した。その結果、各癌細胞株において正常酸素分圧下に比べ、低酸素下では ANGPTL4 mRNA の発現が亢進した。

低酸素下における ANGPTL4 mRNA の発現の経時的変化を解析した。MiaPaca2 細胞を低酸素下で 0、2、4、6、8、24 時間培養後の ANGPTL4 mRNA の発現を Real time PCR 法で測定した。その結果、低酸素培養開始 4 時間後から発現が亢進

し、24 時間後まで徐々に発現量が増加した。

低酸素下における ANGPTL4 タンパクの発現を解析した。MiaPaca2 細胞を正常酸素分圧下と低酸素下で 24 時間培養した後、細胞ならびに培養上清からタンパクを抽出し、抗 ANGPTL4 抗体を用いた Western blotting 法で検出した。その結果、正常酸素分圧下と比較して、低酸素下では細胞内ならびに培養上清中への ANGPTL4 タンパクの発現は増加した。以上の結果より、低酸素下では ANGPTL4 の発現が亢進し、最終的にはタンパク分泌が亢進していると考えられた。

次に、ANGPTL4 の発現が VEGF mRNA の発現に与える影響を検討した。まず ANGPTL4 発現ベクターを Hela 細胞にトランスフェクションし、一過性に過剰発現させた場合の VEGF mRNA の発現を Real-time PCR 法で解析した。その結果、正常酸素分圧下、低酸素下のいずれの条件においても ANGPTL4 を過剰発現させると control vector をトランスフェクションした場合と比較して VEGF mRNA の発現は低下した。一方、Hela 細胞に ANGPTL4 siRNA をトランスフェクションし、発現を knock-down させると、正常酸素分圧下、低酸素下のいずれの条件においても VEGF mRNA の発現は亢進した。以上の結果から、ANGPTL4 は VEGF mRNA の発現を調節することが示唆された。

次に、ANGPTL4 が VEGF の発現を転写レベルで制御しているかどうか解析を行った。Hela 細胞に、VEGF のプロモーター領域を Luciferase の上流に結合させたレポーターベクターを、ANGPTL4 発現ベクターとともにトランスフェクションし 24 時間培養させた後の Luciferase 活性を測定した。ANGPTL4 を過剰発現させると、正常酸素分圧下、低酸素下のいずれの条件でも VEGF のプロモーター活性は低下しました。一方、Hela 細胞に ANGPTL4 siRNA をトランスフェクションし、発現を knock-down させると、正常酸素分圧下、低酸素下のいずれの条件でも VEGF のプロモーター活性は増加した。以上の結果から、ANGPTL4 は VEGF の発現を転写レベルで調節していることが示された。

次に、ANGPTL4 による VEGF の転写制御に HIF-1 が関与しているかどうか解析を行った。まず、Hela 細胞に ANGPTL4 を一過性に過剰発現させた場合、および ANGPTL4 の発現を knock-down させた場合の HIF-1 タンパクを抗 HIF-1 抗体を用いた Western blotting 法により検出した。その結果、正常酸素分圧下、低酸素下のいずれの条件でも HIF-1 タンパク量に変化を認めなかった。

ついで ANGPTL4 が HIF-1 の転写活性に与える影響を検討した。HIF-1 の転写活性をモニターするレポーター遺伝子としては、HIF-1 結合エレメントを 5 回直列に繰り返した合成配列を Luciferase の上流に挿入したものを用いた。その結果、ANGPTL4 を過剰発現させたときの HIF-1 の転写活性は低下せず、ANGPTL4 の過剰発現による VEGF の発現低下を説明できる結果ではなかった。一方、siRNA にて ANGPTL4 の発現を knock-down させた場合の HIF-1 の転写活性は変化を認めなかった。以上の結果より、ANGPTL4 による VEGF の発現の調節には HIF-1 を介していないと考えられた。

低酸素状態になると、まず HIF-1 の発現が亢進し、それによって VEGF と ANGPTL4 の発現が亢進し、また VEGF は ANGPTL4 の発現を亢進させることがすでに報告されている。本研究から、反対に ANGPTL4 は VEGF の発現を抑制させるという Negative Feed Back 機構が働いていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 北 川 善 政
副 査 助 教 授 小 林 正 伸 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

低酸素下における VEGF と Angiopoietin-like4の 相互制御機構

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

ANGPTL4 (Angiopoietin-like4) と VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) は共に低酸素下で低酸素誘導性転写因子 HIF-1(Hypoxia Inducible Factor 1) によって発現が亢進し、また VEGF が ANGPTL4 の発現を亢進することも確認されているが、ANGPTL4 の VEGF に対する影響については未だ不明である。本研究は、ANGPTL4 と VEGF 間のクロストークの関係をより明らかにするため、ANGPTL4 が VEGF の発現に与える影響とそのメカニズムについて検討したものである。

最初に、低酸素下における ANGPTL4 mRNA の発現を解析した。Hela 細胞、Miapaca2 細胞、PCI43 細胞、BxPC3 細胞、HSC3 細胞、TT 細胞の6つの癌細胞株をそれぞれ正常酸素分圧下、低酸素下で24時間培養後、細胞から total RNA を抽出して、ANGPTL4 mRNA の発現を real-time PCR 法で測定し、全ての癌細胞株において、正常酸素分圧下に比べ、低酸素下で ANGPTL4 mRNA の発現が亢進することを確認した。次に、低酸素下における ANGPTL4 mRNA の発現の経時的変化を解析した。MiaPaca2 細胞を低酸素下で0,2,4,6,8,24時間培養した後の ANGPTL4 mRNA の発現を Real time PCR 法で測定し、低酸素培養開始4時間後から発現が亢進し、24時間後まで徐々に発現量が増加することを確認した。さらに、MiaPaca2 細胞を正常酸素分圧下と低酸素下で24時間培養した後、細胞ならびに培養上清からタンパクを抽出し、抗 ANGPTL4 抗体を用いた Western blotting 法により、低酸素下における ANGPTL4 タンパクの発現を解析し、正常酸素分圧下と比較して、低酸素下では細胞内ならびに培養上清中で ANGPTL4 タンパクの発現が増加していることを明らかにした。

次に、ANGPTL4 の発現が VEGF mRNA の発現に与える影響を検討した。まず ANGPTL4 発現ベクターを Hela 細胞にトランスフェクションし、一過性に過剰発現させた場合の VEGF mRNA の発現を Real-time PCR 法で解析し、正常・低酸素分圧下のいずれの条件にお

いても ANGPTL4 を過剰発現させると control vector をトランスフェクションした場合と比較して VEGF mRNA の発現が低下することを確認した。一方、Hela 細胞に ANGPTL4 siRNA をトランスフェクションし、ANGPTL4 の発現を抑制すると、正常・低酸素分圧下のいずれの条件においても VEGF mRNA の発現は亢進した。以上の結果は ANGPTL4 が VEGF mRNA の発現を調節していることを示している。そこで、ANGPTL4 による VEGF の発現制御が転写レベルで行なわれているかについて解析を行った。Hela 細胞に、VEGF のプロモーター領域を Luciferase の上流に結合させたレポーターベクターを、ANGPTL4 発現ベクターとともにトランスフェクションし 24 時間培養させた後の Luciferase 活性を測定し、ANGPTL4 を過剰発現させると、正常・低酸素分圧下のいずれの条件でも VEGF のプロモーター活性は低下し、一方 Hela 細胞に ANGPTL4 siRNA をトランスフェクションし、発現を抑制すると、正常・低酸素分圧下のいずれの条件でも VEGF のプロモーター活性は増加することを明らかにした。以上の結果は ANGPTL4 は VEGF の発現を転写レベルで調節していることを示している。

さらに、ANGPTL4 による VEGF の転写制御に HIF-1 が関与しているか否かの解析を行った。まず、Hela 細胞に ANGPTL4 を一過性に過剰発現させた場合、および ANGPTL4 の発現を抑制させた場合の HIF-1 タンパク量を Western blotting 法により検出し、正常・低酸素分圧下のいずれの条件でも HIF-1 タンパク量に変化が認められないことを確認した。ついで、HIF-1 の転写活性をモニターするレポーター遺伝子として HIF-1 結合エレメントを 5 回直列に繰り返した合成配列を Luciferase の上流に挿入したものを用いて、ANGPTL4 が HIF-1 の転写活性に与える影響を検討した。その結果、ANGPTL4 を過剰発現させたときの HIF-1 の転写活性は低下しておらず、ANGPTL4 の過剰発現による VEGF の発現低下を説明できる結果ではないことを確認した。一方、siRNA にて ANGPTL4 の発現を抑制させた場合の HIF-1 の転写活性には変化を認めなかった。以上の結果は、ANGPTL4 による VEGF の発現の調節に HIF-1 は関与していないことを示している。

本研究の結果は、低酸素状態になると、まず HIF-1 の発現が亢進し、それによって VEGF と ANGPTL4 の発現が亢進し、また VEGF が ANGPTL4 の発現を亢進させる一方で、ANGPTL4 は逆に VEGF の発現を抑制するという Negative Feed Back 機構が働いていることを示している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、1) 低酸素状態で ANGPTL4 を過剰発現させたときに HIF-1 の転写活性が過剰発現させない場合に比べて亢進しているのはなぜか、2) ANGPTL4 はどの部位に作用するのか、3) ANGPTL4 が VEGF の発現を抑制する目的は何か、4) がん細胞はなぜ低酸素状態で生き続けられるのか、5) angiogenesis と vasculogenesis の違いは何か、等であった。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、低酸素下で HIF-1 により共に発現が亢進し、かつ ANGPTL4 の発現を亢進する VEGF に対して、ANGPTL4 は逆にその発現を抑制すること、しかもその抑制は HIF-1 を介すものではなく、ANGPTL4 が直接 VEGF を制御しているこ

とを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。