

氏名(本籍)	た 田	なか 中	あや 礼	(広島県)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5101号			
学位授与年月日	平成21年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	<b>bHLH protein E2-2 inhibits VEGFR2 expression and blocks endothelial cell activation</b> (bHLH型タンパク質 E2-2 は VEGFR2 の発現および血管内皮細胞の活性化を抑制する)			
主査	筑波大学教授	医学博士	高橋	智
副査	筑波大学准教授	医学博士	高野	晋吾
副査	筑波大学講師	博士(医学)	小田	竜也
副査	筑波大学助教	博士(理学)	山下	年晴

## 論文の内容の要旨

### (目的)

血管新生は、発生や創傷治癒など人間の生理現象にとって重要である反面、がんなど多くの疾病に関与している。血管新生を制御するタンパク質として知られているものの1つとして Id1 がある。Id1 は、HLH ドメインを有しているが DNA 結合能力を有していない。Id1 は他の bHLH 転写因子と結合し、標的遺伝子のプロモーターへの結合を阻害することで転写を調節していると考えられているが、血管新生における Id1 のパートナー分子は未だに同定されていない。本論文の著者らの研究室では、yeast two hybrid 法により Id1 結合タンパク質を探索した結果、E2-2 という分子が同定された。E2-2 はクラス I グループの HLH 型転写因子に属するタンパク質で、E-box と呼ばれる DNA 配列に結合し、標的遺伝子の発現調節を行っている。本論文では、血管新生における E2-2 と Id1 の相互作用について検討することを目的とした。

### (対象と方法)

申請者は、COS7 細胞に E2-2 および Id1 を共発現させて免疫沈降ウエスタンブロットを行い、タンパク質間相互作用について検討した。その際、E2-2 および Id1 の変異体を作製し、両者の結合部位の同定を試みた。血管内皮細胞 MEEC に E2-2 および Id1 を遺伝子導入後、蛍光免疫染色法により E2-2 および Id1 の細胞内局在を調べた。次に、E2-2 が属する E タンパクファミリー特異的に活性化されるレポーターを用いて luciferase assay を行い、Id1 による E2-2 の機能制御について検討した。E2-2 の標的遺伝子を明らかにするため、血管内皮細胞である HUVEC および CPAE 細胞にアデノウイルスベクターを用いて E2-2 を発現させて RNA を分離し、RT-PCR 法により血管新生関連遺伝子の発現レベルを調べた。E2-2 が VEGFR2 遺伝子の発現を抑制することが明らかになったため、次に E2-2 の血管新生に対する機能を検討する目的で proliferation assay, networkformation assay, migration assay を行った。また、VEGF/VEGFR2 シグナルによる Erk1/2 のリン酸化に E2-2 が影響するか否か検討した。さらに、VEGFR2 遺伝子プロモーターをレポーターとした luciferase assay を行い、E2-2 による転写活性への作用を調べた。

(結果)

E2-2 および Id1 は、お互いの HLH ドメインを介して結合することおよび核内で共局在することを確認した。Id1 は E2-2 のもつ転写活性化作用を抑制した。E2-2 を発現させた血管内皮細胞において、VEGFR2 の mRNA レベルの低下が認められた。E2-2 を発現させた血管内皮細胞では、ネットワーク形成能、細胞増殖能の低下が認められた。さらに、VEGFR に対する細胞の遊走、VEGF シグナルによる Erk1/2 のリン酸化が抑制された。また、E2-2 は VEGFR2 プロモーターの転写活性を抑制し、そこに Id1 を加えると転写活性が回復した。さらに、E2-2 は E-box をもたない VEGFR2 プロモーターにおいても転写活性抑制作用があることを明らかにした。

(考察)

E2-2 は VEGFR2 プロモーターに作用して VEGFR2 の発現を抑制し、その結果 VEGF/VEGFR2 シグナルによる血管内皮細胞の活性化を抑制していることが示唆された。その際、プロモーター上にある E-box に結合して転写を制御するというメカニズム以外に、E2-2 が転写に影響する機構が存在することが予想される。さらに、Id1 は E2-2 と結合し、E2-2 の作用を抑制することが示された。そのことから、Id1 は E2-2 に結合し E2-2 の機能を阻害することで血管新生を促進している可能性が示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、血管新生に重要な機能を有している Id1 と相互作用をする分子として E2-2 を同定し、その相互作用の分子機構を明らかにした。また E2-2 が、VEGFR2 プロモーターに作用して VEGFR2 の発現を抑制し、その結果 VEGF/VEGFR2 シグナルによる血管内皮細胞の活性化を抑えている可能性を明らかにした。Id1 の血管新生における作用機序の詳細は明らかになっていなかったが、本論文はその作用機序を明らかにした論文として、評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。