

氏名(本籍)	本宮綱記(愛媛県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5955号			
学位授与年月日	平成23年12月31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	低分子量G蛋白質ADP-ribosylation factor 6による腫瘍血管形成制御			
主査	筑波大学教授	博士(理学)	入江賢児	
副査	筑波大学准教授	医学博士	高野晋吾	
副査	筑波大学助教	博士(理学)	山下年晴	
副査	筑波大学助教	博士(生命科学)	大庭良介	

論文の内容の要旨

(目的)

低分子量G蛋白質のADP-ribosylation factor 6 (Arf6)は、主に細胞膜やエンドソームに局在し、様々な接着分子や細胞膜受容体のトラフィッキング、アクチン細胞骨格の再構築などを制御する。Arf6ノックアウト(Arf6^{-/-})マウスは胎生中期から後期にかけて死亡し、肝臓の形成不全を呈することが解っている。Arf6^{-/-}マウスの肝臓では、肝細胞増殖因子(HGF)依存的な肝細胞の運動が抑制されており、それにより肝臓形成が十分に進行しない。このような報告から、個体においてArf6は特に肝臓の発達に重要な分子であることが明らかとなっていた。しかし、Arf6は胎仔期から成体にわたって全身の組織、細胞にユビキタスに発現する分子であり、肝臓の発達以外にも個体において様々な生理機能を有していることが予想された。実際、血管内皮細胞を用いた*in vitro*の解析では、Arf6は血管内皮細胞の遊走を制御していることが報告されており、血管形成に関与している可能性が示唆されていた。本研究では、血管内皮細胞特異的Arf6コンディショナルノックアウト(EC-Arf6 cKO)マウスが作製され、個体の血管形成におけるArf6の機能が解析された。

(対象と方法)

In situ hybridization法により、血管におけるArf6 mRNAの発現が検討された。定法に従ってArf6遺伝子のターゲティングが行われ、EC-Arf6 cKOマウスが作製された。ホールマウント免疫染色により、Arf6の胎仔血管形成への関与が検討された。B16メラノーマ細胞、ルイス肺癌細胞を用いて、腫瘍移植実験により、Arf6の腫瘍血管新生への関与が検討された。*In vitro*チューブ形成アッセイ、大動脈リングアッセイによって、Arf6の関与する血管誘導シグナルが検討された。細胞遊走実験、細胞免疫染色によって、Arf6の欠失が血管内皮細胞の機能に与える影響が検討された。細胞表面ビオチン化実験、ウエスタンブロッティングによってArf6の欠失がβ1 integrinの挙動に与える影響が検討された。Arf6の活性化を誘導する因子cytohesinの阻害剤を用いて、Arf6の活性化を薬理的に阻害した際に、腫瘍血管形成が抑制されるか否かが検討された。

(結果)

Arf6 mRNAは血管内皮細胞に強く発現していることが明らかにされた。作製したEC-Arf6 cKOマウスは、血管内皮細胞特異的にArf6の発現が抑制されており、遺伝子ターゲティングが成功していることが確か

められた。EC-*Arf6* cKO マウスには、胎仔期の血管形成に若干の遅延が認められた。EC-*Arf6* cKO マウスは成体まで一見して正常に発達し、生殖能力も正常であった。EC-*Arf6* cKO マウスでは、腫瘍血管形成が顕著に阻害され、腫瘍の増大が抑制されていた。血管内皮細胞において、*Arf6* は HGF の誘導する血管新生を制御することが明らかにされた。*Arf6* を欠失した血管内皮細胞は、HGF 依存的な細胞遊走が抑制されていた。また、HGF 依存的なスプレッディングおよび接着斑の形成が阻害されていた。*Arf6* を欠失した血管内皮細胞では、HGF 依存的な $\beta 1$ integrin の細胞膜へのリサイクリングがほぼ完全に抑制されていた。また、 $\beta 1$ integrin のリサイクリングによって $\beta 1$ integrin 自身の蛋白質発現が上昇し、細胞遊走が亢進することが示された。*Arf6* を欠失した血管内皮細胞では、 $\beta 1$ integrin のリサイクリングが抑制されているため、 $\beta 1$ integrin の発現上昇も阻害されていた。Cytohesin 阻害剤 SecinH3 を投与した野生型マウスでは、腫瘍血管形成および腫瘍の増大が抑制された。

(考察)

血管内皮細胞の *Arf6* は、胎仔期の血管形成においては必須の因子ではないが、腫瘍血管形成において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。これは、*Arf6* が HGF 依存的な腫瘍血管形成において機能しているためであると考えられた。また、*Arf6* は HGF 依存的な $\beta 1$ integrin のリサイクリングを制御することが明らかにされ、血管内皮細胞における *Arf6* の機能が示された。さらに cytohesin 阻害剤 SecinH3 を投与したマウスでは、腫瘍血管形成が抑制され、腫瘍の増大が遅延したことから、*Arf6* および *Arf6* 関連因子は抗腫瘍剤の標的分子になり得ると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、血管内皮細胞において *Arf6* は HGF 依存的な $\beta 1$ integrin のリサイクリングを制御することにより、血管内皮細胞の遊走を促進し、個体における腫瘍血管形成に関わっていることが明らかにされた。また、個体において薬理的に *Arf6* 機能を阻害することで、腫瘍血管形成および腫瘍の増大が抑制されることが示された。これらの本研究成果は、腫瘍血管形成における *Arf6* の機能を解明する上で重要な知見であり、高く評価される。

平成 23 年 11 月 8 日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。