

氏名（本籍）	小林 里美
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7424 号
学位授与年月	平成 27 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	低酸素応答転写因子（Hypoxia Inducible Factor）HIF-3 α による血管新生制御メカニズムの解明
主査	筑波大学教授 薬学博士 熊谷 嘉人
副査	筑波大学准教授 博士（薬学）鈴木 裕之
副査	筑波大学准教授 博士（医学）小原 直
副査	筑波大学助教 博士（医学）西村 健

論文の内容の要旨

（目的）

低酸素環境は胚発生や器官形成、ガンを代表とする様々な病態で発生する。低酸素応答転写因子（Hypoxia Inducible Factor; HIF）ファミリーはそのような低酸素環境下において活性化し、血管新生や造血、代謝変換など、低酸素応答に関わる様々な標的遺伝子の発現を制御する。HIF ファミリーの内、HIF-1 α と HIF-2 α は強力な転写因子として低酸素応答の中心的な役割を担う一方、HIF-3 α は転写活性化ドメインを一つ欠失している活性の弱い転写因子である。この特徴から、HIF-1 α あるいは HIF-2 α と同時に HIF-3 α を発現させると HIF-3 α はパートナー分子 Arnt を奪い、標的遺伝子の転写活性が低下する。しかし、この HIF-3 α の持つ転写抑制作用の実際は不明である。また、HIF-3 α が持つ細胞への機能も明らかでない。本研究は HIF-3 α による遺伝子発現制御機構と細胞機能に対する役割を解明することを目的として行った。

（対象と方法）

先行研究において、HIF-3 α 機能的ノックアウト(KO)マウスは肺胞形成に伴う血管リモデリングに異常を呈した。また、HIF-3 α は肺血管内皮細胞に発現していたことから、肺の血管内皮細胞に着目し、研究対象とした。野生型(WT)マウスおよび HIF-3 α KO マウスの肺からフローサイトメーターを用いて血管内皮細胞(ECs)を含む集団を単離し、血管新生能に対する HIF-3 α の機能、標的遺伝子およびその制御機構について検討を行った。血管新生能についてはセルカウント、*in vitro* tube formation assay、*in*

vitro wound scratch assay を行い、分子メカニズムについては定量的リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法、クロマチン免疫沈降法およびレポーターアッセイを用いて解析した。

(結果)

成体肺由来 ECs において HIF-3 α の発現に低酸素誘導性は見られず恒常的に発現していた。また、WT ECs と比較して HIF-3 α KO ECs の血管新生能（細胞増殖能、管腔形成能、細胞遊走能）は酸素濃度の変化に関わらず低下しており、HIF-3 α KO ECs に HIF-3 α を遺伝子導入すると血管新生能は上昇した。遺伝子発現解析の結果、HIF-3 α は VE-cadherin 遺伝子の発現を酸素濃度に関わらず抑制していることが分った。さらに HIF-3 α KO ECs に VE-cadherin 中和抗体を添加しその機能を抑制すると血管新生能が上昇し、リン酸化 Akt も増加した。最後に HIF-3 α がどのように標的遺伝子の発現を抑制しているか、分子メカニズムの解明を試みた。他の HIF- α と HIF-3 α を共発現させると VE-cadherin のプロモーター活性が低下した。また、HIF-3 α KO ECs において、VE-cadherin 遺伝子のプロモーター領域に対する HIF-2 α と転写因子 Ets-1 の相互作用が増加していた。遺伝子発現解析とクロマチン免疫沈降法の結果、WT ECs において HIF-2 α と Ets-1 遺伝子は HIF-3 α によって発現抑制されていることが示唆された。

(考察)

本研究により、肺由来血管内皮細胞において HIF-3 α は血管新生能を促進する作用を有することが明らかとなった。接着因子 VE-cadherin は血管新生に極めて重要なシグナル経路 VEGF/Flk 経路を抑制する。HIF-3 α は VE-cadherin の発現を適正レベルまで抑制し、血管新生能の活性化に寄与していることが考えられる。その生物学的意味は不明だが、肺血管内皮細胞の恒常性に関与している可能性が挙げられる。さらに、HIF-3 α による遺伝子発現機構として、タンパクレベルで他の HIF- α の転写活性化能を抑える経路と、HIF-2 α や Ets-1 といった他の転写因子の発現を転写レベルで抑制し、下流の標的遺伝子を酸素濃度に関わらず強力に抑制するという二つの経路が存在することが明らかとなった。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究の特色は、内在性の HIF-3 α の機能解析のために遺伝子改変マウスから標的の細胞を単離・培養し解析に使用している点である。その結果、HIF-3 α の持つ血管新生能に対する作用と標的遺伝子、遺伝子発現抑制機構の一端を明らかにした。

平成 26 年 12 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。