

論文内容要旨

論文題目

Rho-associated kinase inhibitor-induced HIF-1 α degradation
disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine mechanism
necessary for endothelial cell migration

(低酸素環境での血管新生における Rho/ROCK 経路の関与について)

責任講座：発達生体防御学講座女性医学分野

氏名：高田 恵子

【内容要旨】

【目的】

Rho/ROCK (Rho associated kinase) 経路は VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor)-2 以下のシグナル伝達経路として関与し、血管新生を促進することが知られている。また、VEGF (vascular endothelial growth factor) は低酸素により蓄積される転写因子 HIF (hypoxia inducible factor)-1 α により転写・発現が促進されることが知られている。最近、HIF-1 α の蓄積にも Rho/ROCK 経路が関与することが renal cell carcinoma、trophoblast で報告された。血管内皮細胞においても、低酸素により HIF-1 α が蓄積することが報告されているが、その機序に Rho/ROCK 経路が関与するの否かについては明らかにされていない。今回、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、HIF-1 α の発現に Rho/ROCK 経路が関与するの否か、またそのメカニズムについて検討した。

【方法】

低酸素 (1% O₂) 下で培養した HUVEC を用いて以下の実験を行った。

- 1) Fasudil (ROCK inhibitor) の cell migration に与える影響について Boyden chamber を用いて解析した。
- 2) HIF-1 α , VEGFR-2, VEGF mRNA の発現を定量的 PCR 法で、また、タンパク発現をウェスタンブロット法および ELISA で検討した。
- 3) RhoA を siRNA 法で knock down し、HIF-1 α の発現に与える影響を解析した。
- 4) Fasudil により抑制される HIF-1 α の発現に対する proteasome inhibitor (MG132) の効果を検討した。

【成績】

- 1) 低酸素状態で促進する cell migration は fasudil の投与により抑制された。
- 2) 低酸素下では HIF-1 α , VEGFR-2, VEGF のタンパク発現量は増加したが、HIF-1 α , VEGFR-2 の mRNA レベルに変化はなかった。各タンパクの発現量は fasudil で抑制された。
- 3) Rho の knock down により HIF-1 α の発現は抑制された。
- 4) Fasudil で抑制された HIF-1 α の発現は MG132 の投与でその抑制が解除された。

【結論】

血管内皮細胞における HIF-1 α の蓄積は Rho/ROCK 経路が HIF-1 α タンパクの分解系を抑制することによることが、初めて明らかにされた。

平成 19 年 2 月 / 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：高田 恵子

論文題目：Rho-associated kinase inhibitor-induced HIF-1 α degradation disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine mechanism necessary for endothelial cell migration

審査委員：主審査委員 本山 侑一



副審査委員 比中 千史



副審査委員 久保 田 功



審査終了日：平成 19 年 / 月 / 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

血管新生に関わる研究は、癌や循環障害の諸問題の対策が念頭に置かれつつ近年精力的に行われている。Rho/ROCK 経路が血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor:VEGF) の受容体である VEGFR-2 以下のシグナル伝達経路として働き血管新生を促進すること、また VEGF は低酸素状態により誘導される転写因子 HIF(hypoxia inducible factor)-1 α の発現を促進することがこれまでに知られている。最近少し特殊な細胞である腎細胞癌細胞やトロホブラストで HIF-1 α の蓄積にも Rho/ROCK 経路が関与していることが報告され、さらに血管内皮細胞そのものにおいても低酸素状態により HIF-1 α が蓄積しているという報告がなされた。そこで、高田恵子君は血管内皮細胞における HIF-1 α の発現あるいは蓄積に Rho/ROCK 経路が関与しているか否か、関与しているとすればどのような関与のしかたをしているかを明らかにすることを目的として本研究を企画した。

研究は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を内皮細胞モデルとした培養系を用い、ROCK 阻害剤による抑制実験、siRNA 法による Rho ノックダウン実験、プロテアソーム阻害剤による HIF-1 α 分解抑制実験等によって行われた。その結果、血管内皮細胞において HIF-1 α の蓄積には Rho/ROCK 経路が関与しているが、それはこの経路が HIF-1 α タンパクの分解系を抑制することによる可能性が高いことを世界で初めて明らかにするに至った。

本研究は、そのデザイン、遂行方法、結果の考察とまとめのしかたいずれもよく考えかつ慎重に行われており、学位 (医学) 論文としてふさわしいものであると審査委員は評価した。

(1, 200字以内)