

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|---|---|
| 藤田太輔 | 主査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 朝日 通雄 副査 教授 林 秀行 副査 教授 石坂 信和 |
| 主論文題名 Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line (トロホブラスト由来細胞株における低酸素下での血管新生関連蛋白産生の制御) | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| 《緒言・目的》 絨毛細胞には、絨毛上皮を形成する絨毛性栄養膜細胞である cytotrophoblast (CT) と syncytiotrophoblast (ST) および、脱落膜から子宮筋層に浸潤する extravillous trophoblast (EVT) の3種類がある。ヒトの正常妊娠では妊娠初期に、CTが脱落膜から子宮筋層まで浸潤する過程で EVT へと分化し、らせん動脈の血管内皮細胞や平滑筋細胞と置き換わることで、血管壁の再構築 (リモデリング) が起きて胎盤・子宮循環が確立する。この胎盤形成初期では、EVTが一時的にらせん動脈の血流を阻害するため、生理的に低酸素状態 (1-2%) であり、CTから血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に代表される様々な血管新生物質が産生されることで、さらに血管新生が誘導される。この生理的低酸素状態が、正常な胎盤形成において重要な事象であることが考えられているが、低酸素状態がどのように胎盤形成に影響するのかは明らかにされていない。endoglin は ST に発現しており、血管新生や血管の homeostasis にも重要である。これらの背景から VEGF や endoglin は正常な胎盤形成に重要な役割を担っているが、それを制御するメカニズムについては不明な点が多い。以上より絨毛細胞において低酸素条件下で VEGF や endoglin といった血管新生物質の産生が、どのようなメカニズムを介しているのかを明らかにする | |

ために、trophoblast 由来細胞株を用い分子生物学的検討を行った。

《方 法》

絨毛細胞は trophoblast 由来細胞株である BeWo 細胞を用い、以下について検討を行った。

- 1 低酸素条件下 (hypoxia ; 1% O₂) における VEGF、endoglin の産生増加について mRNA は real-time PCR 法で、蛋白は ELISA 法で検討した。
- 2 hypoxia における VEGF、endoglin の産生増加に関与する細胞内シグナル伝達経路 (AKT、ERK) のリン酸化を Western blotting 法で検討した。また、AKT inhibitor として LY294002 (LY) を、mTOR inhibitor として Rapamycin (Rapa) を、ERK inhibitor として PD98059 (PD) を添加し、AKT と ERK 経路が関与するか否かを確認した。
- 3 hypoxia で、転写因子である HIF-1 α が活性化され核内に移行しているか否かを、核内タンパクを採取し Western blotting 法で検討した。hypoxia で活性化し、核内移行した HIF-1 α が VEGF、endoglin の promoter 領域に結合しているかどうかを CHIP assay で検討した。
- 4 hypoxia による VEGF、endoglin の mRNA 発現が転写因子である HIF-1 α を介していることを確かめるために、HIF-1 α の siRNA を用いて、ノックダウンして、VEGF、endoglin の mRNA 発現が抑制されるか否かを real-time PCR 法で検討した。

《結 果》

BeWo 細胞において、

- 1 VEGF と endoglin の mRNA 発現は、hypoxia 4 時間、6 時間において、コントロール群と比較して有意に増加し、どちらも hypoxia 4 時間でピークを示した。
- 2 AKT のリン酸化は、hypoxia 6 時間後にピークを認めた。mTOR のリン酸化は、hypoxia 10 時間後にピークを認めた。ERK のリン酸化は hypoxia 6 時間から認められ、24 時間後でも維持されていた。これらの結果から hypoxia により AKT-mTOR 経路と ERK 経路が活性化していることが示唆された。

hypoxia 4 時間で発現増加した VEGF と endoglin の mRNA は、LY や Rapa、PD そして LY と PD の同時添加で抑制されたことより、AKT 経路や ERK 経路を介していることが示唆された。

- 3 hypoxia 6 時間と 10 時間で HIF-1 α の核内移行を認めた。hypoxia 2 時間で HIF-1 α が VEGF と endoglin の promoter 領域への結合が認められた。
- 4 scrambled siRNA を導入しても、VEGF と endoglin の mRNA 発現増加は影響を受けないが、HIF-1 α -siRNA を導入し HIF-1 α をノックダウンすると有意に抑制された。よって hypoxia による VEGF と endoglin の mRNA 発現亢進は、HIF-1 α を介していることが示唆された。

《結 論》

trophoblast 由来細胞株において、hypoxia により VEGF と endoglin の発現が増加するが、それは AKT-mTOR-HIF-1 α 経路と ERK-HIF-1 α 経路を介していると考えられた。この結果は、胎盤形成初期における生理的低酸素状態での血管新生物質の産生メカニズムである可能性が示唆された。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 甲第 | 号 | 氏名 | 藤田太輔 |
|--|----|---|------------|------|
| 論文審査担当者 | | | 主査教授 大槻 勝紀 | |
| | | | 副査教授 朝日 通雄 | |
| | | | 副査教授 林 秀行 | |
| | | | 副査教授 石坂 信和 | |
| 主論文題名 | | | | |
| <p>Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line (トロホブラスト由来細胞株における低酸素下での血管新生関連蛋白産生の制御)</p> | | | | |
| 論文審査結果の要旨 | | | | |
| <p>ヒトの胎盤形成初期では、trophoblast が子宮筋層に浸潤する際、一時的に子宮らせん動脈の血流を阻害するため、生理的に低酸素状態であり、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に代表される様々な血管新生物質が産生される。この生理的低酸素状態が関与する正常な胎盤形成メカニズムについては、詳細は明らかにされていない。申請者は、絨毛細胞において低酸素条件下で VEGF や endoglin といった血管新生物質が、どのようなメカニズムを介して産生されるのかを明らかにするために、trophoblast 由来(BeWo)細胞株を用い分子生物学的検討を行った。結果として BeWo 細胞において、低酸素刺激により VEGF と endoglin の発現が増加し、それらの発現増加は AKT-mTOR-HIF-1α経路と ERK-HIF-1α経路を介していることが明らかとなった。よってこれらの現象は、胎盤形成初期における生理的低酸素状態での血管新生蛋白の産生メカニズムである可能性が示唆された。本研究において得られた成果は、ヒトの胎盤形成の分子生物学的メカニズムの解明に貢献するものであると考えられる。</p> | | | | |

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Journal of Endocrinology 206(1): 131-140, 2010