

第8号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	宮城 秀考
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
<p>Transcriptional Regulation of VEGFA by the Endoplasmic Reticulum Stress Transducer OASIS in ARPE-19 Cells</p> <p>（ヒト網膜色素上皮細胞 ARPE-19 における、小胞体ストレス変換分子 OASIS による血管内皮増殖因子 VEGFA の転写制御）</p>			
論文審査担当者			
主査 教授 安井 弥			
審査委員 教授 平川 勝洋			
審査委員 准教授 鎌田 英明			
〔論文審査の要旨〕			
<p>小胞体ストレスは、酸化ストレスや虚血、遺伝子変異などにより生じる折り畳み不全タンパクが小胞体内腔に蓄積することで生じる。過剰な小胞体ストレスは細胞死が誘導される。哺乳類の細胞は小胞体ストレスに対する防御機構を持っており、小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response：UPR）と呼ばれる。小胞体膜上には小胞体ストレスを感知するセンサータンパクがあり、その下流で固有の分子を活性化させ、翻訳の抑制、シャペロン誘導、異常タンパクの分解を促進して、小胞体ストレスを軽減することで細胞の恒常性を保っている。血管内皮増殖因子 Vascular endothelial growth factor A（VEGFA）は血管新生の鍵となる分子であり、生理的な血管新生だけでなく、血管新生を伴う疾患の病態形成においても重要である。眼科領域では、加齢黄斑変性を初めとするいくつかの疾患に VEGFA が関与することがよく知られている。従って、VEGFA の転写制御機構を解明することは、これらの疾患の治療法開発にとって重要になる。最近、小胞体ストレス及びその応答機構が、VEGFA の転写制御に関わることがわかってきた。小胞体ストレス下で UPR 関連の転写因子である XBP1 や ATF4 が VEGFA のプロモーター領域に結合し、VEGFA mRNA を転写誘導する。しかし、XBP1 や ATF4 を欠損した細胞においても、VEGFA の発現抑制は部分的に留まることから、既報に示されたものとは別の転写制御経路の存在が考えられる。</p>			

さらに、ヒトの網膜における VEGFA の発現制御機構についても十分理解されているとは言えない。

本研究では、ヒト網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 を用い、小胞体ストレス下での VEGFA 転写制御機構の解明を試みた。ARPE-19 細胞内の UPR 関連転写因子の発現を RT-PCR 及びウエスタンブロットで調べた。また、VEGFA の転写開始点から約 6-kbp 上流までを含むプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを作成し、プロモーター解析を行った。

ARPE-19 細胞を、小胞体ストレス誘導剤である Thapsigargin や Tunicamycin で刺激すると、刺激時間依存的に VEGFA mRNA が誘導された。また、ARPE-19 細胞では UPR 関連の転写因子である XBP1、ATF4、ATF6、OASIS が発現しており、いずれも小胞体ストレス下で活性化していた。どの転写因子が VEGFA の発現誘導に関わっているかを調べるため、ARPE-19 細胞に発現していた 4 つの転写因子の発現ベクターと共に VEGFA のレポーターベクターを細胞に導入し、プロモーター活性を測定した。その結果、これらの転写因子の中で、OASIS が最も VEGFA のプロモーター活性を上昇させた。次に、OASIS が作用する領域を特定するために、6-kbp のプロモーター領域を順次欠失させたレポーターベクターを作成し、それぞれを OASIS の発現ベクターと共に細胞に導入し、プロモーター活性を測定した。その結果、OASIS が VEGFA 遺伝子の -709~-437bp の領域に作用することがわかった。OASIS は cyclic AMP-responsive element (CRE) 様配列に結合することが既によく知られている。VEGFA プロモーターの -709~-437bp の領域内に存在する CRE 様配列に変異を導入したレポーターベクターを作成し、プロモーター活性を測定した結果、OASIS は -509~-506bp の CRE 様配列に作用することがわかった。さらに、Flag 標識した OASIS を過剰発現させた ARPE-19 の細胞溶解液を、抗 Flag 抗体でクロマチン免疫沈降を行い、-509~-506bp の CRE 様配列を含む領域を PCR で増幅したところ、特異的バンドが検出された。この結果から、OASIS は直接この領域に結合することが明らかになった。

今回の研究で、ヒト網膜色素上皮細胞において、OASIS が VEGFA のプロモーター領域に直接結合し、VEGFA を転写誘導することを初めて明らかにした。今後はヒト網膜内での詳細な VEGFA 転写制御機構の解明が急がれる。

以上の結果から、本論文は網膜色素上皮細胞における VEGFA の転写が、小胞体ストレストランスドューサー OASIS により転写誘導されることを示し、このことは VEGFA を原因とする疾患の根本的治療法の開発に、新たな可能性を拓くものと考えられる。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。