OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	HGF/NK4による血管内皮細胞増殖因子(VEGF)誘導性MAPキナーゼリン酸化の阻害作用
Author(s)	中林, 真理
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42678
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	中林（なかはやし）　真理（まり）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　16107　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	HGF／NK4による血管内皮細胞増殖因子（VEGF）誘導性MAPキナーゼリン酸化の阻害作用
論文審査委員	（主査） 教授　田野　保雄 （副査） 教授　金田　安史　　教授　不二門　尚

論文内容の要旨

【目的】

新生血管の発生には、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor；VEGF）が深く関与することが知られており、例えば、活動性の高い増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中のVEGFレベルが上がっていることが知られている。従って、VEGFによる血管新生を抑制することは、増殖糖尿病網膜症のような「血管新生病：angiogenic diseases」の治療において非常に有用であると考えられている。

HGF／NK4は、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor；HGF）のN末端側の分子内断片であるが、HGFのレセプターであるc−Metに結合することで、そのリン酸化を抑制し、HGFのアンタゴニストとしての作用を持つことが知られている。さらに、最近の研究で、HGFのアンタゴニストとしての作用以外にも、bFGFによる微小血管内皮細胞増殖に対し、抑制作用が認められることが明らかとなった。本研究では、ヒト血管内皮細胞を用いたin vitroの系で、HGF／NK4のVEGFに対する抑制作用を検討した。

【方法ならびに成績】

1）VEGFによるヒト血管内皮細胞の増殖・遊走作用に対するHGF／NK4の抑制作用の検討

無血清下で20時間培養したヒト血管内皮細胞に、VEGF単独、VEGFとHGF／NK4を同時に添加後、二日後に細胞数を測定した。HGF／NK4は、VEGFによる血管内皮増殖に対し、濃度依存性に抑制効果を示した（$p<0.05$）。また、遊走作用に対する抑制効果を検討するために、無血清下で20時間培養したヒト血管内皮細胞をトランスウエルに播種し、VEGF単独、VEGFとHGF／NK4を同時に添加し、5時間後に遊走した細胞数を測定したところ、VEGFによる血管内皮遊走は、HGF／NK4により濃度依存性に有意に抑制された（$p<0.01$）。

2）HGF／NK4のVEGFレセプターのチロシンリン酸化に対する作用の検討

VEGFレセプターのチロシンリン酸化に対するHGF／NK4の作用を検討するため、無血清下で20時間培養したヒト血管内皮細胞に、VEGF単独、VEGFとHGF／NK4を同時に添加後、ホスホチロシン抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロットを施行したところ、HGF／NK4はVEGFレセプターのリン酸化に対して抑制効果を示さなかった。

3）HGF／NK4のets−1タンパク合成に対する抑制作用の検討

血管新生に関与することが知られる転写因子ets−1の発現に対するHGF／NK4の抑制作用を検討するために、

無血清下で20時間培養したヒト血管内皮細胞に、VEGF単独、VEGFとHGF／NK4を同時に添加して二日後、タンパクを抽出し、ウエスタンブロットにて、HGF／NK4のets－1の発現に対する抑制効果を検討したところ、VEGFとHGF／NK4を同時に添加すると、ets－1タンパク合成は、有意に抑制された（$p<0.01$）。

4）HGF／NK4のERKのリン酸化に対する抑制作用の検討

ERKのリン酸化は血管新生に必須の細胞機能の一つである。そこで、ERKのリン酸化に対するHGF／NK4の抑制作用を検討するために、無血清下で20時間培養したヒト血管内皮細胞に、VEGF単独、VEGFとHGF／NK4を同時に添加し、10分の刺激後、タンパクを抽出し、ウエスタンブロットにて、HGF／NK4のVEGF誘導性ERKのリン酸化に対する抑制効果を検討した。HGF／NK4はERKのリン酸化に対し、抑制効果を示すことが明らかとなった（$p<0.01$）。

【総括】

HGFアンタゴニストであるHGF／NK4は、in vitroで、VEGFによる血管内皮増殖および内皮細胞遊走に対して抑制効果を示した。これらの作用は、転写因子ets－1タンパク合成の抑制およびERKのリン酸化の抑制を介していると推察された。

論文審査の結果の要旨

病的血管新生を認めるガンや糖尿病網膜症などの疾患において、それらの原因となる血管新生因子は、長年研究されてきたが、それらの中でも、血管内皮増殖因子（VEGF）が極めて重要なタンパクとして関与していることが知られている。したがって、VEGFの作用を抑制することが、血管新生の抑制、さらには血管新生病の治療につながると考えられている。最近の知見から、HGFアンタゴニストでHGFの分子内断片であるNK4は、HGFばかりでなく、bFGFやVEGFによる細胞増殖に対する抑制作用や、制癌作用を示すなど、血管新生抑制因子として作用することが明らかになった。しかし、その作用機序は未だ明らかにされていない。当該論文において、VEGFの生物活性である血管内皮細胞の増殖および遊走作用に対するNK4の効果およびその作用機序について、KDR／Flk－1（VEGFR2）を介するシグナル伝達に注目し、レセプターのチロシンリン酸化、MAPK（ERK）のリン酸化およびets－1タンパク発現に対する効果を検討している。その結果、NK4はKDR／Flk－1のチロシンリン酸化は抑制しないが、ERKのリン酸化や、ets－1タンパクの発現に対して、抑制効果があり、VEGFのシグナル伝達経路において、KDR／Flk－1より下流、ERKより上流で作用していると考えられた。NK4は、細胞増殖において重要な役割を果たすMAPキナーゼカスケードの活性化を阻害し、さらに、MMP－1、3、9やuPAなどの多くの酵素遺伝子の転写制御をしている転写因子ets－1の発現を抑制することによりVEGFの作用を抑制していると考えられた。本研究は、HGFアンタゴニストであるNK4の、血管新生抑制因子としての作用機序を検討したもので、臨床におけるガンや糖尿病網膜症など病的血管新生をきたす疾患の治療の糸口となるものであり、学位の授与に値すると考えられる。