The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Hypoxia up-regulates HIF-1α expression through RhoA activation in trophoblast cells
Author(s)	林, 正美
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45544
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　林（はやし）　正（まさ）　美（み）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学　位　記　番　号　第　19331　号

学位授与年月日　平成17年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学　位　論　文　名　Hypoxia up-regulates HIF-1α expression through RhoA activation in trophoblast cells
（絨毛細胞の低酸素下における低分子量GTP結合蛋白Rhoを介したHIF-1α誘導機構の解析）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　村田　雄二

（副査）
教　授　高井　義美　　教　授　奥山　明彦

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

胎盤を形成する絨毛細胞は子宮胎盤循環が開始されるまで低酸素状態にある。一般に細胞は、低酸素負荷に対して様々な生理的な代償機構を有しており、その一つが、低酸素下で誘導される転写因子 hypoxia inducible factor (HIF)-1αを介したグルコーストランスポーター（GLUT1）や血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などの発現である。妊娠初期の生理的な胎盤機能の解明には、絨毛細胞におけるこれらの機構の解明が不可欠であるが、低酸素下における分子レベルでの解析はまだ十分になされていない。

一方、最近低分子量GTP結合蛋白Rhoは低酸素負荷によりその発現・活性が制御されうることが明らかとなってきた。しかし、低酸素状態の絨毛細胞で、Rhoの発現レベルおよび活性の調節が起こっているか否か、またその生理的意義に関しては未だ明らかになっていない。

そこで、本研究では、絨毛細胞における低酸素下でのRhoの発現調節、およびHIF-1αの発現制御におけるRhoの関与について検討した。さらに、絨毛細胞において、低酸素下でのGLUT1やVEGFの発現におけるRho、HIF-1αの関与について解析を行った。

【方法ならびに成績】

患者の同意を得て採取した正常妊娠初期絨毛組織から分離培養した細胞およびヒト絨毛癌BeWo細胞を用いた。これらの細胞において低酸素下で、転写因子HIF-1αが誘導されたが、RhoAがその発現調節に関与しているかどうかを検討するため、まずRhoA mRNAおよび蛋白発現量を検討し、低酸素下でその増加を認めた。また、RhoA activation assayにより、低酸素下では活性型RhoAが増加していることを確認した。次にdominant negative RhoA cDNAを遺伝子導入し、HIF-1α発現量をRT-PCR法、Western blot法で検討したところ、dominant negative RhoA導入群では低酸素下でのHIF-1α発現増加が抑制された。逆にconstitutively active RhoA cDNAの導入では、20%酸素下においてもHIF-1α発現量は増加した。さらに絨毛細胞内で活性化されたRhoAが、HIF-1αの標的遺伝子GLUT1およびVEGFの発現調節に関与しているかどうかを検討するため、constitutively active RhoA遺伝子を導入し

GLUT1 および VEGF の蛋白発現量を測定したところ、それらの発現量の増加を認めた。よって、絨毛細胞においても低酸素下で RhoA の発現増加および活性化が引き起こされ、それによって HIF-1α とその標的遺伝子産物が誘導されることが示唆された。

次に、転写因子 HIF-1α による低酸素下での GLUT1 の発現調節についてさらに検討した。GLUT1 プロモーターの下流に luciferase 遺伝子を有するレポーターベクターを遺伝子導入し luciferase assay を行ったところ、低酸素下で GLUT1 転写活性の上昇を認めた。さらに、その deletion mutant を用いた luciferase assay を行った。転写開始部位から－3.2/－3.0 kb の範囲の 398-402 番目のアミノ酸配列を CGTG から ATAT に置き換えると低酸素に対する転写活性の上昇を認めなくなった。また、HIF-1α 発現ベクターを遺伝子導入し、20%酸素下での GLUT1 プロモーター活性を luciferase assay で検討したところ、wild type では活性上昇を認めたが、前述の mutant type では認めなかった。この結果より、絨毛細胞では低酸素下で HIF-1α が誘導され、GLUT1 プロモーターの特定部位に結合し、GLUT1 の発現が増加することが示唆された。さらに、GLUT1 発現増加とグルコース輸送機能の関連を調べるため、[^{3}H]2-deoxyglucose を用いて低酸素下でのグルコース取り込み量の変動を観察し、低酸素状態でその有意な増加を認めた。

【総括】

絨毛細胞において、低酸素下では RhoA の発現増加および活性化が起こり、転写因子 HIF-1α とその標的遺伝子（GLUT1、VEGF）の発現増加をもたらすこと、そしてこれらが低酸素負荷に対する代償機構に寄与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

胎盤を形成する絨毛細胞は子宮胎盤循環が開始されるまで低酸素状態にある。低酸素負荷に対する応答機構として、転写因子 hypoxia inducible factor（HIF）-1α を介した、グルコーストランスポーター（GLUT1）や血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などの発現が知られている。本研究では、これまで主としてアクチン細胞骨格の再編成や細胞の遊走をつかさどる因子として知られてきた低分子量 GTP 結合蛋白 RhoA が、絨毛細胞において低酸素下で活性化され HIF-1α を誘導することを初めて報告した。さらにまた、この活性化された RhoA が GLUT1 や VEGF の発現増加も、もたらすことを報告した。これらは、低酸素負荷に対する絨毛細胞の生理的な代償機構の、新たな分子レベルでの遺伝子誘導機構を解析したものである。本研究は、妊娠初期の生理的な胎盤機能の解明の一助となるものであり、学位の授与に値するものと認める。