



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | FHL-2 Suppresses VEGF-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activation via Interaction With Sphingosine Kinase-1                            |
| Author(s)    | 林, 宏樹                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 2010, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/54167">https://hdl.handle.net/11094/54167</a>                                                             |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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           | はやし ひろ 樹<br>林 宏 樹                                                                                                                                                                      |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 3 6 9 3 号                                                                                                                                                                          |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 22 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                       |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学系研究科病態制御医学専攻                                                                                                                                                     |
| 学 位 論 文 名     | FHL-2 Suppresses VEGF-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activation via Interaction With Sphingosine Kinase-1.<br>(FHL-2はSphingosine Kinase-1との相互作用を介してVEGF誘導性PI3K/Akt活性化を抑制する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 金田 安史<br>(副査)<br>教 授 高倉 伸幸 教 授 楽木 宏実                                                                                                                                       |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

血管新生は、発生から成体に至るまで非常に重要なイベントであり、この恒常性は複雑に制御された促進因子と抑制因子のバランスの上に成り立っているが、その全容は明らかになっていない。われわれはヒト由来のcDNAライブラリーより新たな血管新生抑制候補遺伝子としてFHL-2(four and a half LIM protein-2)を同定した。FHL-2は血管内皮細胞に発現していることから、本研究では血管内皮細胞におけるFHL-2の血管新生抑制作用のメカニズムについて検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

FHL-2を血管内皮細胞に過剰発現させると、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)により誘導される遊走能(改良型ポイデンチャンバー法)は有意に抑制された。このメカニズムにおけるFHL-2の会合分子として、Sphingosine Kinase-1(SK1)に着目した。SK1は強力な血管新生促進作用のあるsphingosine-1-phosphate(S1P)をSphingosineから作り出す脂質代謝酵素である。内皮細胞において、免疫沈降法によってFHL-2はSK1と結合することがわかり、さらにVEGFの刺激下において結合能は減少することを見出した。FHL-2を過剰発現させると、このSK1の活性化は抑制され、産生されるS1Pも減少し(薄層クロマトグラフィー法)、その下流に存在するphosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt経路を抑制することがわかった(PI3K

アッセイ法、ウエスタンブロット法)、しかしながら、S1P誘導性Akt活性化には影響しなかった。逆に、FHL-2をsiRNA法にてノックダウンさせるとSK1の活性化とともにAktのリン酸化、内皮細胞の遊走能の上昇がみられた。個体での血管発生における評価として、アフリカツメガエルの胚にFHL-2 mRNAをインジェクションし、血管内皮マーカー(Xmsr、Xfli-1)を用いた*in situ*ハイブリダイゼーション法を施行した結果、血管内皮マーカーの発現が有意に抑制されていることがわかった。

### 〔 総 括 〕

FHL-2は血管内皮細胞においてSK1-S1Pの直接的な抑制を介してVEGF誘導性PI3K/Akt経路を抑制することから、血管新生作用に対する内因性の調節因子となりうることを示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、遺伝子機能スクリーニングで単離した遺伝子の一つFHL-2(four and a half LIM protein-2)は血管内皮細胞で血管新生抑制機能を有することを見出し、そのメカニズムを解析した。

FHL-2は血管新生の強力な誘導因子であるsphingosine-1-phosphate(S1P)を産生する脂質代謝酵素sphingosine kinase-1(SK1)と結合することでその酵素活性を抑制しており、FHL-2を過剰発現させると、VEGFによるSK1、PI3kinaseの活性化を抑制し、Aktのリン酸化を抑えて遊走能を阻害することがわかった。FHL-2のsiRNAを導入した血管内皮細胞では、SK1は活性化され、PI3kinase/Aktの活性化の結果、遊走能が惹起された。FHL-2のmRNAをアフリカツメガエルの胚に導入すると血管新生、血管系ネットワークが抑制された。

この研究は、FHL-2が内皮細胞においてSK1を直接的に抑制するという新しいメカニズムでVEGF誘導性PI3K/Aktを抑制し、FHL-2の新規血管新生抑制因子としての可能性を示唆しており、学位に値するものであると考える。