



Title	Pharmacological HIF-1 activation upregulates extracellular vesicle production synergistically with adiponectin through transcriptional induction and protein stabilization of T-cadherin
Author(s)	藤井, 浩平
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96282
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	藤井 浩平
論文題名 Title	Pharmacological HIF-1 activation upregulates extracellular vesicle production synergistically with adiponectin through transcriptional induction and protein stabilization of T-cadherin (薬理的HIF-1活性化はT-cadherinの転写誘導と蛋白の安定化を介してアディポネクチンと相乗的に細胞外小胞(エクソソーム)産生を増加させる)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 当研究室では、脂肪細胞特異的分泌因子であるアディポネクチン(APN)が、GPIアンカー型膜蛋白であるT-cadherin(T-cad)を介してエクソソーム(Exo)の産生を増加させること、抗動脈硬化作用など多様な臓器に対する保護効果を発揮することを報告してきた。APNのExo産生促進作用は細胞のT-cad発現量に依存するため、T-cad発現の増加はAPNによる臓器保護の増強に有用である可能性がある。低酸素応答性転写因子であるHIF-1 α の薬理的活性化は、腎性貧血のみならず心血管疾患や急性腎障害などの様々な疾患モデルにおいて有効性が報告されている。HIF-1はプロリンヒドロキシ酵素(HIF-PH)により酸素濃度依存的に制御され、低酸素応答エレメント(HRE)に結合することで標的遺伝子の発現を誘導する。T-cadのプロモーター領域にもHREが存在することから、HIFシグナルを介したT-cadの発現制御機構の解明とAPNによるExo産生への影響を明らかにすることを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 鉄キレート剤であるdesferoxamineやHIF-PH阻害薬であるRoxadustat(Roxa)のマウス血管内皮・F2細胞への添加により、VEGFなどの代表的なHIF下流遺伝子とともにT-cad mRNA発現の有意な上昇を認め、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)やヒトMSCにおいても同様の結果が得られた。またF2細胞にRoxaとAPNの同時添加を行ったところ、T-cad蛋白量の増加に伴い細胞へのAPN集積の増加、培養上清中へのExo分泌の有意な上昇を認めたが、この効果はsiRNAによるT-cadのノックダウンによりキャンセルされた。一方でレポーターアッセイではRoxaによるT-cadプロモーター活性の上昇はわずかであり、また恒常的T-cad過剰発現・F2細胞(F2T細胞)においてもRoxaによりT-cad mRNAは変化しないにも関わらず、有意にT-cad蛋白発現が増加することを見出した。そこでHIFシグナルがT-cad蛋白の分解に及ぼす影響を、細胞膜上の蛋白をビオチン標識しその経時的な変化を観察することで確認したところ、標識T-cad蛋白の減少がRoxaにより特異的に抑制されることが明らかとなり、HIF活性化によるT-cad蛋白の増加にはT-cad蛋白の分解抑制による安定化も寄与すると考えられた。さらにこのようなT-cad蛋白の制御に関与する因子を、F2T細胞を用いたRNA-seqにより網羅的に探索し、中でもカドヘリンファミリーなどの様々な膜蛋白の膜近傍切断に関わるADAMファミリーの一つであるADAM12の発現が、Roxaにより有意に抑制されていたことに注目した。ADAM12のノックダウンによりT-cad蛋白発現量は有意に増加し、さらにRoxaの添加によりExo産生はさらに増加した。最後に野生型マウスにRoxaを3日間経口投与したところ、血漿中のExo粒子数の有意な増加を認めたが、T-cad欠損マウスではRoxaによる血中Exoの変化は認めなかった。 〔総括(Conclusion)〕 HIF活性化はT-cadの遺伝子転写誘導およびADAM12等による蛋白量調節・安定化を介し、APNによるExo産生を相乗的に増加させることをin vitro・in vivo双方において初めて明らかとした。HIF-PH阻害薬の多様な臓器保護作用にはAPN及びT-cadを介したExo産生増加が関与する可能性がある。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 藤井 浩平													
論文審査担当者	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>(職)</th> <th>氏 名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>主 査</td> <td>大阪大学教授</td> <td>下村 浩一郎</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>大阪大学教授</td> <td>猪阪 善隆</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>大阪大学教授</td> <td>宮川 繁</td> </tr> </tbody> </table>		(職)	氏 名	主 査	大阪大学教授	下村 浩一郎	副 査	大阪大学教授	猪阪 善隆	副 査	大阪大学教授	宮川 繁
		(職)	氏 名										
	主 査	大阪大学教授	下村 浩一郎										
副 査	大阪大学教授	猪阪 善隆											
副 査	大阪大学教授	宮川 繁											
論文審査の結果の要旨 本研究は、HIFシグナルによるT-cadherin(T-cad)の発現、ならびにエクソソーム産生の制御を検討したものである。これまでにT-cad、アディポネクチン(APN)を介したエクソソーム産生の増加が臓器保護的に作用すること、エクソソーム産生量が細胞のT-cad発現量に依存することが報告されていたが、T-cad発現量を増加させる機構に関しては不明であった。 本研究では、マウス血管内皮・UV-F2細胞へのHIF-PH阻害薬添加により、HIF依存的にT-cad遺伝子発現量、蛋白発現量が増加し、それに伴い細胞へのAPN集積が増加、エクソソーム産生量が増加することを明らかにした。また、T-cad蛋白発現量の増加には、ADAM12発現量減少によるT-cad蛋白分解の抑制も関与する可能性を示した。マウスへのHIF-PH阻害薬投与ではT-cad依存的に血漿エクソソーム量が増加した。 本研究は、HIFシグナルがT-cad発現上昇を介して、細胞のエクソソーム産生量を増加させることを示した初めての報告である。APNの作用とも共通する、HIF-PH阻害薬による抗動脈硬化作用などが、T-cadの増加を介したエクソソーム産生の増加で説明できる可能性があり、本研究は生活習慣病治療応用につながる可能性のある重要な知見と考える。従って、学位に値するものと認める。													