

京都大学	博士（医学）	氏名	三浦重徳
論文題目	Impairment of VEGF-A-stimulated lamellipodial extensions and motility of vascular endothelial cells by chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor (軟骨由来血管新生抑制因子コンドロモジュリン-Iによる VEGF-A 刺激された血管内皮細胞の葉状仮足伸長と運動性の抑制)		
(論文内容の要旨) 軟骨は例外的に無血管な間葉組織で、周囲からの血管侵入に対して強い抵抗性を示す。このことから軟骨組織は強力な血管新生抑制活性を含有すると考えられてきた。Chondromodulin-I (ChM-I) は、ウシ胎仔骨端軟骨に同定された無血管軟骨に特異的な血管新生抑制因子で、軟骨の血管新生抑制活性を担う実体分子の一つと考えられている。移植腫瘍モデルでは、ChM-I は固形腫瘍の血管新生を阻害して抗腫瘍活性を示す。ChM-I は培養血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成を阻害することが知られているものの、その作用機序は明らかではない。そこで、本研究では、ChM-I によって血管内皮細胞に誘導される最も初期の血管新生抑制応答である細胞遊走の阻害作用について詳細に検討した。 まず、無血清培養条件下で 293-F 細胞にヒト ChM-I cDNA を発現させ、その培養上清から非変性条件下にあらかじめ付加した Flag タグによりアフィニティー精製して高い生物活性を保持した組換えヒト ChM-I (rhChM-I) を調製した。得られた rhChM-I 標品はマウス角膜血管新生アッセイにより血管新生抑制活性を確認した。次に、modified Boyden chamber 法によりケモタキシスに対する効果を評価したところ、rhChM-I は至適濃度の Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) 刺激によるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) の遊走を濃度依存的に阻害した。その ID ₅₀ は約 5.4 nM で、血管新生抑制活性をもつコラーゲン断片 Endostatin と同等以上の活性を示した。また、VEGF-A に限らず Fibroblast Growth Factor-2 や Insulin-like Growth Factor-I によって刺激された HUVECs のケモタキシスも阻害した。しかし、未刺激の HUVECs に対しては阻害活性を示さなかった。従って、ChM-I はケモアトラクタントに対して遊走する血管内皮細胞に特異的に阻害活性を示すことが判明した。 そこで、細胞遊走に不可欠な細胞-細胞外基質間相互作用に対する効果を検討した。その結果、rhChM-I は I 型コラーゲン、フィブロネクチン及びビトロネクチンのいずれの基質上においても HUVECs の細胞接着を阻害せず、Endostatin 等と異なって細胞遊走阻害活性も細胞表面上のインテグリン $\alpha v \beta 3$ や $\beta 1$ に依存していなかった。その一方、rhChM-I は細胞接着時の HUVECs の細胞伸展を遅延させ、伸展途中の細胞内 Rac1 及び Cdc42 活性を有意に減少させた。HUVECs のアクチン細胞骨格をパキシリン抗体及びファロイジンによって染色したところ、rhChM-I 処理細胞の葉状仮足では VEGF-A 刺激に伴うアクチン細胞骨格の再構成が阻害され、Rac1 の活性化も著明に抑制されていた。HUVECs の細胞運動をタイムラプス観察した結果は、rhChM-I が VEGF-A 刺激に応答した持続的な葉状仮足の伸張を阻害して不安定な仮足形成を高頻度に惹起させることで、細胞の移動速度と定方向性の低下をもたらしていることを示しており、上記の Rac1 や Cdc42 に対する生化学的解析結果を支持していた。 以上の結果から、ChM-I は刺激依存的な Rac1 の活性化を抑制し、アクチン細胞骨格の再構成を阻害することにより葉状仮足の伸長を不安定化して血管内皮細胞の運動性を抑制するユニークな血管新生抑制因子であることが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

コンドロモジュリン-I (ChM-I) は血管新生抑制活性を有する軟骨特異的な糖タンパク質である。本研究では、まず、無血清条件下でヒト ChM-I cDNA を哺乳動物細胞に発現させることにより高い生物活性を保持した組換えヒト ChM-I (rhChM-I) を得た。次いで、rhChM-I が血管新生促進因子刺激による血管内皮細胞の遊走を著明に阻害することを明らかにした。

即ち、rhChM-I はインテグリン $\beta 1$ や $\alpha v \beta 3$ 非依存的に Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) 刺激によるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) のケモタキシスを濃度依存的に阻害し、その ID₅₀ は約 5.4 nM であった。さらに、VEGF-A による HUVEC のケモキネシスをも阻害した。一方、rhChM-I を作用させた HUVEC の葉状仮足では VEGF-A 刺激に伴うアクチン細胞骨格の再構成が阻害され、Rac1 の活性化も著明に抑制されていた。また、rhChM-I は HUVEC に不安定な葉状仮足形成を高頻度に惹起することで細胞移動の速度と定方向性の低下をもたらした。従って、ChM-I は血管内皮細胞の葉状仮足伸長を不安定化することで作用するユニークな血管新生抑制因子であることが明らかとなった。

以上の研究は、内因性血管新生抑制因子による血管新生制御の解明に貢献し、血管新生病態の分子基盤の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 2 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降