

審査の結果の要旨

氏名佐々木 裕司

本研究では血管内皮細胞における VEGF 刺激下によってエピジェネティックな修飾変化に着目し、KDM2B の血管新生に与える影響について調べた。また、*in vitro* において KDM2B の血管新生における機能を検討し、下記の結果を得ている。

1. 初めに HUVEC に対して VEGF 刺激した際に活性化される遺伝子を RNA-seq を用いて網羅的に解析し、早期に誘導される 57 個の遺伝子を同定した。これらは腫瘍血管新生に重要な転写因子群を含んでおり、既報と一致していた。
2. 次に VEGF 刺激下のヒストン修飾変化を網羅的に検索するために、H3K4me3、H3K27ac、H3K36me3、H3K9me3、H3K27me3、H2A119Ub の ChIP-seq を行った。その結果、血管新生関連の遺伝子座において、VEGF 刺激 1 時間後の H3K4me3、H3K36me3 のシグナル強度の上昇、および H2A119Ub では VEGF 刺激 15 分後の抑制の解除および VEGF 刺激 1 時間後のシグナル強度の回復を認めた。この結果から、KDM2B が VEGF 刺激下における血管内皮の遺伝子変化に介在する因子として示唆された。
3. siRNA を用いた KDM2B のノックダウンにより、血管新生関連遺伝子の変化を検討したところ、VEGF 刺激 1 時間後の発現量の上昇は KDM2B のノックダウンによって有意に増加していた。RNA-seq を用いて VEGF 刺激によって早期誘導される 57 の遺伝子を解析したところ、41 遺伝子において 2 種類の siRNA に共通して KDM2B のノックダウンによって FC が増加しており、また腫瘍血管新生に重要な遺伝子群はこれらに含有されていた。このことから KDM2B が腫瘍血管新生遺伝子に抑制的に作用していることが示唆された。
4. *in vitro* において VEGF 刺激下における KDM2B の血管新生に与える影響を検討するためにチューブフォーメーション、スクラッチアッセイ、増殖アッセイを行った。いずれのアッセイにおいても KDM2B のノックダウンによって血管新生は有意に亢進しており、KDM2B のノックダウンが内皮細胞における血管新生を亢進させることが判明した。
5. 次に KDM2B の過剰発現系を構築するためにクローニングを行った。KDM2B の過剰発現を行って qPCR を行ったところ、血管新生関連遺伝子の VEGF 刺激 1 時間後の mRNA の発現量は KDM2B の過剰発現によって減少を認めた。RNA-seq では KDM2B の過剰発現によって FC が減少した遺伝子と KDM2B のノックダウンによって FC が上昇した遺伝子を比較し、KDM2B が転写制御に強く関与している 31 遺伝子

を同定した。この中には **EGR1-3** や **NR4A2**、**NR4A3** などが含まれていた。

6. **KDM2B** を過剰発現させた際の血管新生に与える影響を検討するために同様にチューブフォーメーション、スクラッチアッセイ、増殖アッセイを行ったところ、チューブフォーメーション、増殖アッセイにおいては血管新生は有意に低下していた。スクラッチアッセイにおいても血管新生の低下は認められたが有意差は認めなかった。

以上、本論文では **VEGF** 刺激下における **KDM2B** の血管新生への関与を初めて証明した。血管新生を促進するヒストン修飾についてはいくつか報告があるが、今回、血管新生に抑制的に機能する初めてのエピジェネティクス因子として **KDM2B** の関与を示しており、今後腫瘍に対する血管新生をターゲットとした治療法に対して新たな知見を提供する。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。