

論文の内容の要旨

論文題目

胚性幹(ES)細胞から血管系細胞への分化の分子機構の解析

指導教官 新家 眞 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 三嶋 弘一

胚性幹(ES)細胞は多分化能を持つ全能性の幹細胞であり、ES 細胞から様々な細胞・組織への分化誘導、およびその分子機構が精力的に研究されている。近年、マウス ES 細胞由来の Flk-1 (血管内皮細胞増殖因子 2 型受容体 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2; VEGFR2)) 陽性細胞が血管内皮細胞、血管壁細胞の両者に分化し、血管系の前駆細胞 (vascular progenitor cell; VPC) として機能することが報告された。この ES 細胞の *in vitro* 血管分化系では、血管系細胞の分化のみを解析できるため、主にこの系を用いて下記の研究を行った。

第一部：ES 細胞由来血管前駆細胞に対する Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルの効果

血管発生、および血管新生は胎生期における循環器系の形成や、成熟個体

における創傷治癒や性周期に応じた黄体形成などの生理的現象に関与しているだけでなく、固形腫瘍の増殖、転移や糖尿病網膜症などの病態形成においても重要な役割を果たしている。TGF- β シグナルは、そのシグナル伝達因子の欠損により血管発生の異常を引き起こすことから、血管形成において重要な役割を果たすことが知られているが、その分子メカニズムには未解明な部分が多い。そこで私は血管前駆細胞からの血管内皮・壁細胞の分化・増殖に対する TGF- β シグナルの役割を解析するため、ES 細胞由来 Flk-1 陽性細胞からの *in vitro* 血管分化系を用いて検討した。

ES 細胞由来の血管内皮細胞および壁細胞における TGF- β シグナル伝達因子の発現を RT-PCR 法にて検討したところ、TGF- β のシグナル伝達に必要な分子をすべて発現していることを確認した。Flk-1 陽性細胞を VEGF-A 存在下にて培養するとシート状の血管内皮細胞と壁細胞へと分化する。そこに TGF- β を添加すると血管内皮細胞のシート形成が阻害され、血管内皮細胞と壁細胞の増殖が抑制された。また、内因性 TGF- β シグナルを抑制するため、Activin receptor-like kinase (ALK)-4,5,7 受容体の特異的阻害剤である SB-431542 を添加することで内皮細胞の増殖およびシート形成が促進された。

内皮細胞シート構造形成に対する TGF- β シグナルの効果における分子メカニズムを解析するため、細胞間接着分子の発現を解析したところ、血管内皮細胞特異的なタイトジャンクション構成因子である claudin-5 の発現が TGF- β シグナルにより負に制御されることを RNA レベルおよび蛋白レベルで確認した。また、蛍光染色により TGF- β により内皮細胞間における claudin-5 の局在が認められなくなり、SB-431542 により内皮細胞間での claudin-5 の局在が増強した。他のタイトジャンクション関連分子の発現は TGF- β シグナルにより変化を認めなかったため、TGF- β は claudin-5 の発現調節を介して内皮シート形成を制

御することが示唆された。

マウス個体における血管発生過程における TGF- β シグナルの影響を検討するため、胎生 8.5 日マウス胎仔由来 Flk-1 陽性細胞における TGF- β および SB-431542 の効果を検討した。その結果、TGF- β により内皮細胞の増殖およびシート形成が阻害され、SB-431542 の添加により内皮シート形成が促進された。このことからマウス胎仔由来 VPC においても TGF- β シグナルは内皮細胞の増殖とシート形成を阻害することが示された。

次に TGF- β による claudin-5 発現調節機構を解析するために、マウス claudin-5 プロモーターの解析を行った。マウス claudin-5 プロモーターの deletion construct を作製し、ES 細胞由来血管内皮細胞を用いた luciferase assay にて検討した結果、転写開始点より上流 933bp の遺伝子領域を含む -933cld5/Luc では内皮細胞での高い活性が認められ、かつ TGF- β による抑制効果も認められたのに対し、転写開始点より上流 848bp の遺伝子領域を含む -848cld5/Luc では活性が認められなかった。-933 から-759 までの領域（以下、-933/-759 領域と表す）を SV40 プロモーターに結合したレポーター遺伝子を作製し、解析を行った結果、-933/-759 領域は内皮細胞において高いプロモーター活性を示し、かつ TGF- β による抑制効果も認められた。また、-933/-759 領域はヒトとマウスの間で 93.8%と高い相同性を持つことが示された。

以上よりマウス ES 細胞およびマウス胎仔由来血管前駆細胞において TGF- β は内皮細胞の増殖とシート形成を阻害することが示され、その分子機構のひとつとして claudin-5 の転写レベルでの発現調節が示唆された。また、マウス claudin-5 プロモーターの-933/-759 領域は血管内皮細胞特異的エンハンサーとして働く可能性が考えられ、また TGF- β 応答領域を含むことが示唆された。

第二部：ES 細胞由来血管前駆細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (human

umbilical vein endothelial cell; HUVEC)における転写因子 **Prox1** の機能解析

リンパ管は血管とともに生体内の恒常性の維持、代謝、免疫応答など生理的に重要な役割を担っているだけでなく、悪性腫瘍の転移などの病的状態にも関与していることが示唆されている。しかし、リンパ管の発生・新生を調節する分子機構には未解明な部分が多い。ホメオボックス転写因子 **Prox1** は脈管系においてはリンパ管内皮細胞に特異的に発現し、そのノックアウトマウスにおいて静脈からのリンパ管の発芽が停止することから、リンパ管の発生に必須の転写因子であることが知られているが、その分子機構には不明な点が多い。そこで、**Prox1** がリンパ管内皮分化において果たす細胞生物学的機能およびその分子メカニズムの解明を目的とし、ES 細胞由来血管分化系および HUVEC を用いて検討した。

テトラサイクリン (Tc)発現誘導システムを用いて、Tc 非存在下にてのみ **Prox1** を発現する ES 細胞株 (Tc-**Prox1**)を樹立した。この細胞から抽出した **Flk-1** 陽性細胞を Tc 存在、非存在下にて 4 日間培養し、蛍光免疫染色にて解析した結果、**Prox1** を発現させることにより、ES 細胞由来内皮細胞においてリンパ管マーカーである **VEGFR3** および **Podoplanin** の発現が増強することが確認された。HUVEC においてもアデノウイルスを用いて **Prox1** を発現させることにより、**VEGFR3** および **Podoplanin** の発現が増強することが認められた。**VEGF-A** および **VEGF-C** に対する走化性を HUVEC にて検討した結果、**Prox1** を発現させた細胞では **VEGF-C** に対する走化性が亢進していた。リンパ管発生過程において、静脈から **Prox1** 陽性内皮細胞が **VEGF-C** に対して遊走することで原始リンパ管が形成されることが知られているが、**Prox1** による **VEGFR3** の発現増強がその分子機構であることが示唆された。近年、成熟個体において **Platelet-derived growth factor (PDGF)**シグナルによりリンパ管新生を起こし

得ることが報告された。ES 細胞由来血管細胞および HUVEC において PDGFR の発現を検討したところ、HUVEC において Prox1 により PDGFR β の発現亢進が認められたが、ES 細胞由来血管細胞では発現に変化は見られなかった。

Prox1 を発現させることで ES 細胞由来内皮細胞および HUVEC 両者において内皮シート形成が阻害され、細胞運動性が亢進することが観察された。VEGFR3 特異的阻害剤などによる VEGFR3 シグナル阻害下においてもこれらの現象が認められたことから、VEGFR3 シグナルの関与はないものと考えられた。Angiopoietin (Ang)/ Tie-2 シグナルに着目し、発現を検討したところ、ES 細胞由来内皮細胞および HUVEC 両者において Prox1 により Ang-2 の発現が亢進することが確認された。Prox1 による内皮シート形成阻害効果への関与を検討するため、外因性 Ang-2 リガンドの効果を検討したが、ES 由来内皮細胞において内皮シート形成は阻害されなかったため、Ang-2 の関与は否定的であると考えられた。一方、integrin の発現を検討した結果、Prox1 により integrin α 9 の発現が亢進し、integrin α 5 の発現が抑制されることがわかった。さらに、抗 integrin α 9 中和抗体により Prox1 による HUVEC の運動性亢進が抑制されたため、integrin α 9 の発現亢進が Prox1 による内皮シート形成阻害および運動性亢進のメカニズムのひとつであると考えられた。ヒトリンパ管内皮細胞において Prox1 ノックダウンにより、VEGFR3、PDGFR β 、integrin α 9 の発現が抑制されたことから、内在性 Prox1 によりこれらの分子の発現が維持されていることが確認された。以上より、Prox1 は血管内皮細胞において、VEGFR3、PDGFR β 、integrin α 9 などの発現を調節することで、内皮細胞の運動性や走化性を調節し、リンパ管発生・新生において重要な役割を果たしていることが示唆された。