

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 三嶋 弘一

本研究は再生医療における様々な組織・細胞の供給源として注目されている胚性幹(ES)細胞を用いた *in vitro* 血管分化系において TGF- β シグナルの役割、および転写因子 Prox1 の効果について解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. TGF- β により、ES 細胞由来の血管内皮細胞の増殖が抑制され、シート形成が阻害された。また、TGF- β I 型受容体特異的なキナーゼ阻害剤である SB-431542 により内因性の TGF- β シグナルを阻害することにより、ES 細胞由来の血管内皮細胞の増殖とシート形成が促進された。
2. ES 血管分化系における細胞間接着分子の発現解析から、TGF- β シグナルによりタイトジャンクション接着分子である claudin-5 の発現が抑制されることが確認され、TGF- β による内皮シート形成阻害の分子メカニズムの一つであることが示唆された。
3. マウス claudin-5 のプロモーター解析を行った結果、マウス claudin-5 プロモーター内の転写開始点より上流 933 塩基から 759 塩基までの領域 (-933/-759 領域) が ES 細胞由来血管内皮細胞におけるプロモーター活性に必要かつ十分であることが示された。また、上記領域において TGF- β 応答性が認められた。
4. 複数の異なる細胞種を用いた検討より、マウス claudin-5 プロモーター内の -933/-759 領域は内皮細胞特異的なプロモーター活性を持つことが示唆された。
5. ホメオボックス転写因子 Prox1 を ES 細胞由来血管前駆細胞に発現

させ、in vitroにおいて分化させたところ、Prox1により、ES細胞由来血管内皮細胞においてリンパ管内皮マーカーである VEGFR3、Podoplanin の発現が亢進することが確認された。

6.ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に Prox1 を発現させることで、血管内皮マーカーである VEGFR2、VE-cadherin の発現が減弱し、リンパ管内皮マーカーである VEGFR3、Podoplanin の発現が亢進した。

7.HUVEC においてリガンドに対する走化性を検討した結果、Prox1 発現により VEGF-A に対する走化性が減少し、VEGF-C に対する走化性が亢進することが示された。

8.HUVEC において Prox1 により PDGFR β の発現が亢進し、PDGF-BB に対する走化性が亢進したが、ES 由来血管細胞において Prox1 は PDGFR β の発現を誘導しないことが示された。

9.ES 由来血管細胞および HUVEC において Prox1 を発現させることにより内皮シート形成が阻害され、運動性が亢進した。中和抗体を用いた検討より、その分子メカニズムの一つとして Prox1 により発現増強が認められた integrin α 9 の関与が考えられた。

10.ヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞における Prox1 ノックダウンによる検討から、内在性の Prox1 により、VEGFR3、PDGFR β 、integrin α 9 の発現が維持されていることが確認された。

以上、本論文は①ES細胞からの血管分化において SB-431542 により内因性 TGF- β シグナルを阻害することにより claudin-5 の発現増強を介して内皮細胞シート形成が促進されること、②転写因子 Prox1 により ES細胞由来血管内皮細胞のリンパ管内皮への分化が誘導されること、③Prox1 は VEGFR や integrin の発現を制御することで細胞の運動性や走化性を調節すること、の三点を明らかにした。本研究は TGF- β シグナルの血管再生医療への応用や、リンパ管再生医療、抗リンパ管新生療法確立に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。