

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 山 根 章

血管内皮細胞増殖因子 A (VEGF-A 以下 VEGF) とその受容体 (Flt-1 並びに KDR/Flk-1) は、血管系の新生・維持・再構成において重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。本研究は VEGF の受容体が実際に成熟体においてどの細胞に発現しているかを明らかにするため、ラットの肝臓における VEGF-受容体系の細胞特異的発現調節・生理活性に関し検討し、下記の結果を得ている。

1. ラット *flt-1* の蛋白コード部分の全長を含む cDNA をクローニングし、その全塩基配列を決定した。ラット Flt-1 はヒト Flt-1 と高い相同性を示した。成熟ラットでは、*flt-1* mRNA は肺・胎盤・肝臓・腎臓・心臓・脳などの組織で発現がみられ、その中でも肺において最も高い発現を示した。
2. ラット肝臓を肝細胞画分と類洞内皮細胞を多く含む非実質細胞画分に分け、VEGF-受容体系と HGF-Met 受容体系の遺伝子発現とを調べたところ、VEGF 受容体の mRNA は類洞内皮細胞に強く発現していたが、肝細胞ではほとんど検出できなかった。一方 VEGF 遺伝子の発現は肝細胞に弱く認められたが、非実質細胞画分には認められなかった。また、HGF 遺伝子の発現は非実質細胞画分にはほぼ特異的に発現しており、肝細胞では検出できず、HGF 受容体は肝細胞のみで発現が認められた。これらの結果はラット肝臓において細胞特異的に各増殖因子・受容体が発現調節されていることを示した。
3. VEGF 存在下・非存在下で類洞内皮細胞の培養を行ったところ VEGF 存在下では類洞内皮細胞は増殖したが、VEGF 非存在下ではこれらの細胞は 2 - 3 日で死滅した。他の血管新生促進作用のある増殖因子 (高濃度 FBS, acidic FGF, basic FGF) ではこの細胞の増殖や生存を支持することはできず、類洞内皮細胞は VEGF に対し特異的に反応し増殖した。この結果により培養が難しいとされている肝類洞内皮細胞の培養法が確立できた。
4. 類洞内皮細胞の表面には $Kd=3 \times 10^{-12}M$, 10^4 per cell および $Kd=100 \times 10^{-12}M$, 10^5 per cell の 2 種類の結合部位が存在しており、それぞれ Flt-1, KDR/Flk-1 に相当すると考えられた。
5. クロスリンク並びに免疫沈降実験により Flt-1 と VEGF の複合体は約 220kDa のサ

イズであることが示された。

6. 類洞内皮細胞に VEGF を添加すると細胞内の数種類の蛋白がチロシンリン酸化されたが、Flt-1 の自己リン酸化は検出できなかった。Flt-1 の自己リン酸化作用は、もし存在したとしても非常に弱いことが示唆された。

以上、本論文はラット肝臓において VEGF-受容体系が細胞特異的に発現調節を受けていること、ラット肝類洞内皮細胞に VEGF の高親和性結合部位が存在し、同細胞は VEGF 依存性に増殖することを明らかにした。本研究はそれまでほとんど未知であった成熟体における VEGF-受容体系の細胞特異的発現調節の解析の端緒となったとともに、肝類洞内皮細胞培養系という内皮細胞におけるシグナル伝達解析の有用な実験系を開発したと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。