

学位論文要旨

論文題目

Ras signaling specifies endothelial differentiation of
VEGFR2⁺ vascular progenitor cells

和訳

Ras シグナルによる VEGFR2⁺血管前駆細胞からの血管内皮細胞分化

指導教員

宮園浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程 病因病理学専攻 分子病理学講座

川崎京子

Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)は、マウス胎生初期の後方原始線条において、中胚葉性細胞の一部の血管前駆細胞に発現する初期血管分化マーカーである。VEGFR2 のノックアウトマウスは、血管内皮細胞と血球系細胞の欠損により胎生 8.5-9.5 日で死に至る。このことから、VEGFR2 とその下流シグナル伝達が血管内皮細胞分化において必須であることが示唆されてきた。現在まで、成熟した血管内皮細胞における増殖、生存および運動性にはたらく VEGFR2 を介したシグナル伝達機構は明らかにされているが、前駆細胞から血管内皮細胞への分化を制御するシグナル伝達経路は解明されていない。そこで私は、マウス ES 細胞由来 VEGFR2⁺血管前駆細胞から血管内皮細胞へと分化させることのできる *in vitro* 血管分化系を用いて血管前駆細胞から内皮細胞へのシグナル伝達機構を検討した。

マウス ES 細胞由来 VEGFR2⁺細胞は、血清や PDGF-BB 存在下では α SMA 陽性の壁細胞へと分化するが、VEGF-A に応答し PECAM1 陽性血管内皮細胞へと分化する。まず、チロシンキナーゼレセプター下流の主なシグナル分子に対する低分子量阻害剤を用いて内皮細胞分化を特異的に抑制する分子のスクリーニングを行った。限界希釈法によるコロニーアッセイの結果、ファルネシルトランスフェラーゼの阻害剤である FTI-277 を添加すると、VEGF-A 依存的に出現する PECAM1⁺コロニーが減少し、一方 α SMA⁺コロニーが増加した。このことから、FTI-277 は内皮細胞分化を特異的に抑制することが示唆された。次に、FTI-277 の主要なターゲット分子である H-Ras をノックダウンするため、H-Ras に対する microRNA を発現誘導できる ES 株を樹立した。コロニーアッセイの結果、H-Ras microRNA の発現により PECAM1⁺コロニーが減少し、 α SMA⁺コロニーが増加した。このことから、H-Ras が内皮細胞分化を制御する分子のひとつであることが示唆された。さらに、マウス embryo を用いて発生過程における H-Ras の重要性を検討した。PECAM1 の染色により、H-ras^{-/-} embryo では頭部表面の血管形成に遅延が生じることがわかった。また、*ex vivo* embryo culture の解析では、FTI-277 により yolk sac の血管形成が減損した。以上のことから、H-Ras が血管発生において重要であることが示唆された。

次に、恒常活性型 H-Ras[G12V]を発現誘導できる ES 株を作製した。H-Ras[G12V]の発現により VEGF-A 非依存的に PECAM1⁺細胞が出現した。これらの細胞は、他の血管内皮マーカー (CD34、endoglin、AcLDL の取り込み)も陽性であり、三次元培養では VEGF-A 刺激のときに見られるものと同様の管腔様構造を形成した。このことから、活性型 H-Ras は血管内皮細胞分化を正に制御することが示唆された。

多くのリガンド刺激により活性化される Ras が内皮細胞分化を特異的に制御するメカニズムを探るため、Ras の活性化されるタイミングを検討した。VEGF-A 刺激後 6 時間で Ras の顕著な活性化が見られたが、この活性は内皮細胞分化を誘導することのでき

ない血清刺激のみや PDGF-BB 刺激では見られなかった。また、この Ras の活性は内皮細胞マーカーの発現上昇に先立ち起こることがわかった。

以上の結果より、VEGF-A 依存的な Ras の一時的な活性が内皮細胞分化を制御することが示唆された。