

## 論文の内容の要旨

論文題目 胚性幹細胞の血管細胞分化におけるメカニカルストレスの効果

指導教員 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月 入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

清水 信隆

### <本研究の背景と目的>

胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell:ES 細胞)は3つの胚葉に分化する能力を有し、実質上すべての種類の体細胞に分化することが出来る。近年、培養した細胞や組織、バイオデバイスにより、機能不全に陥った臓器や組織を再生・回復させる医療である「再生医療」が注目されている。すべての細胞に分化しうる能力をもつ ES 細胞は組織再生工学における細胞ソースとして非常に期待される細胞であり、ES 細胞を様々な特定の細胞へ分化させる方法を開発するため多くの努力がなされてきた。血管細胞への分化については、マウス ES 細胞で血管内皮増殖因子(VEGF)の受容体である Flk-1 を発現した細胞(Flk-1+ES 細胞)がいわば「血管前駆細胞」の役割を担っており、増殖因子の選択により VEGF を加えると血管内皮細胞へ、血小板由来増殖因子(PDGF-BB)を加えると血管平滑筋細胞やペリサイトを含む壁細胞に特異的に分化

することが明らかとされた。

一方、血管壁は心拍動に伴い、血流や血圧に起因する流れずり応力 (Shear stress) や周期的な伸展張力 (Cyclic strain) といったメカニカルストレスに常時さらされている。こうしたメカニカルストレスに対する血管内皮細胞や平滑筋細胞の反応は、血管の循環系の恒常性を維持することや、血管形成、リモデリング、動脈硬化といった血流に依存する現象に重要な役割をしていると考えられている。ES 細胞は胚の成長の過程において心拍動が始まると、血液や組織液の流れにより生じる Shear stress や Cyclic strain といったメカニカルストレスにさらされる。最近、このようなメカニカルストレスが細胞の分化にも影響を及ぼすことが分かってきた。Yamamoto らは、Shear stress がマウス Flk-1+ES 細胞を血管内皮細胞へ分化誘導することを明らかにしている。

そこで本研究では、Cyclic strain がマウス Flk-1+ES 細胞の分化に影響を及ぼすかどうか、及ぼすとしたらどのような細胞へ分化を誘導するかについて検討した。伸縮性のシリコン製膜に培養したマウス Flk-1+ES 細胞に Cyclic strain (2~12%、1Hz) を負荷し、種々の細胞マーカーの発現変化を測定した。また Cyclic strain による Flk-1+ES 細胞の分化誘導作用の分子メカニズムを理解するため、PDGF 受容体のリン酸化の面からも検討を加えた。

## <結果>

### 1. Cyclic strain は Flk-1+ES 細胞の増殖を促進する

マウス Flk-1+ES 細胞に Cyclic strain (4~12%、1Hz) を 24 時間負荷すると、静的条件で培養した細胞より細胞数の増大が見られた。4%、8%と伸展強度に応じて増加

する傾向が見られたが、8%でピークに達し、12%では8%と変わらなかった。8%、12%での細胞数の増加は、増殖因子である PDGF-BB を最も有効な濃度で負荷した場合とほぼ同等であった。

以上より、Cyclic strain は Flk-1+ES 細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

## 2. Cyclic strain は Flk-1+ES 細胞を血管平滑筋細胞へ分化誘導する

Cyclic strain による細胞分化への影響を検討するため、Cyclic strain を負荷した Flk-1+ES 細胞における各細胞マーカーの蛋白・遺伝子発現を定量し、静的条件で培養した細胞と比較した。

ウエスタンブロットにより蛋白発現を定量すると、Cyclic strain (1Hz,24h) により血管平滑筋細胞のマーカーである SM  $\alpha$ -actin および SM-MHC の発現はその強度に依存して著明に増加し、8%で PDGF-BB を添加した場合とほぼ同等の発現レベルとなった。一方、血管平滑筋細胞以外の各種細胞マーカーについて、その蛋白発現をフローサイトメトリーで定量すると、Cyclic strain 負荷(8%、1Hz、24h)により血管内皮細胞のマーカーである Flk-1 については発現が有意に低下し、他の内皮細胞マーカーである Flt-1、VE-cadherin、PECAM-1、さらに血球細胞のマーカーである CD3、上皮細胞のマーカーである Keratin は発現に変化を認めなかった。

遺伝子発現についてはリアルタイム PCR で定量した。血管平滑筋細胞マーカーのうち、より分化した血管平滑筋細胞を示す SM  $\alpha$ -actin、SM-MHC、SM22  $\alpha$ 、desmin については、Cyclic strain (1Hz、24h) によりその発現が有意に増大し、特に SM  $\alpha$ -actin、SM-MHC、SM22  $\alpha$  については強度に依存して増大する傾向が見られた。一方、未分化型のマーカーである SM-emb は Cyclic strain による影響は認め

なかった。これに対し、血管内皮細胞のマーカーである Flk-1 の遺伝子発現は Cyclic strain に反応して減少し、他の Flt-1、VE-cadherin、PECAM-1 は変化しなかった。

以上より、Cyclic strain は Flk-1+ES 細胞を血管内皮細胞、血球細胞、上皮細胞ではなく、血管平滑筋細胞に選択的に分化を誘導することが示された。

### 3. Cyclic strain の分化誘導効果に PDGF 受容体の活性化が関わっている

Cyclic strain による細胞増殖の促進や血管平滑筋細胞への選択的な分化誘導は、PDGF 受容体のリン酸化阻害剤である AG1296 を加えると抑制された。このことから PDGF 受容体の活性化が Flk-1+ES 細胞の Cyclic strain による細胞増殖や血管平滑筋細胞への分化誘導に重要な役割をしていることが示唆された。

### 4. Cyclic strain は PDGF 受容体をリガンド非依存的にリン酸化する

Cyclic strain を負荷すると、10 分以内に PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化が生じたが、AG1296 を負荷するとほぼ完全に阻害された。また Cyclic strain による PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化は、Cyclic strain の強度に依存していた。この Cyclic strain による PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化は PDGF-BB の中和抗体では阻害されなかった。また Cyclic strain を 10 分間負荷した細胞の培養液を Conditioned medium として Flk-1+ES 細胞に加えたが、PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化は生じなかった。このことから、Cyclic strain による PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化は、リガンドに依存しない反応であると考えられた。さらに細胞外 ATP スカベンジャーである apyrase、G 蛋白結合受容体の阻害剤である pertussis toxin を添加、あるいは細胞外液を  $\text{Ca}^{2+}$  free の状態にしても、Cyclic strain による PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化は抑制されなかった。このこと

から、Cyclic strain による PDGF  $\beta$  受容体のリン酸化は、少なくとも ATP 受容体、G 蛋白結合受容体、Ca<sup>2+</sup>流入を介した情報伝達経路からのクロストークによる活性化ではないと考えられた。

### < 結 論 >

Cyclic strain は、PDGF  $\beta$  受容体のリガンド非依存的なリン酸化を介してマウス Flk-1+ES 細胞の増殖を促進し、選択的に血管平滑筋細胞へ分化を誘導することが示された。Shear stress が Flk-1+ES 細胞を血管内皮細胞に分化誘導する事実と考え合わせると、胚における血管形成にメカニカルストレスが重要な調節因子として働いている可能性がある。また、メカニカルストレスは細胞の分化を直接制御する技術として再生医療に応用できると考えられた。