

論文の内容の要旨

血管の形成における骨形成因子 BMP の機能

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 18 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

鈴木 夕佳

血管は成体の恒常性の維持に必須であるのみならず、腫瘍や糖尿病網膜症などの病態の進行においても重要な役割をはたすことから、その形成機構の解明は急務でありながら、未解明な部分が多く残されている。血管系の発生は、中胚葉由来の血管前駆細胞が卵黄嚢上で血島を形成し、血島が互いに連結しあい原始的な血管網を形成することにより始まる。また成熟個体における血管新生 (neovascularization) は、既存の血管からの内皮細胞の増殖・遊走による angiogenesis に加えて、末梢血中骨髓由来の血管前駆細胞が血管内皮細胞へと分化する vasculogenesis も関与すると考えられている。血管形成に重要な役割を果たすことが明らかになっている代表的な因子群としては、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) や Angiopoietin (Ang) が挙げられる。VEGF は血管内皮細胞の分化・増殖と遊走を促進することで血管発生・新生を誘導することが、細胞ならびに個

体レベルの解析により示されている。Ang-1 は血管内皮細胞の増殖の促進とアポトーシスを抑制するとともに、壁細胞との相互作用により血管構造を安定化させることが明らかとなってきた。

血管の形成に重要な役割を果たす因子として bone morphogenetic protein (BMP) ファミリーに注目が集まっている。BMP ファミリーは BMP-2/4 グループ (BMP-2, 4), osteogenic protein-1 (OP-1) グループ (BMP-5, 6, 7, 8), BMP-9/10 グループ (BMP-9, 10), GDF-5 グループ (GDF-5, 6, 7) から構成される。BMP の受容体は I 型と II 型に分類され、リガンドが結合すると I 型・II 型受容体がヘテロ四量体を形成し、II 型受容体は I 型受容体をリン酸化して活性化する。活性化された I 型受容体は Smad タンパク質をリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達し、標的遺伝子の発現を調節する。BMP-2, 4, 6, 7 の I 型受容体は activin receptor-like kinase (ALK)-2, 3, 6 であり、Smad1, 5, 8 を活性化すると考えられてきたが、近年 BMP-9, 10 が ALK-1 と結合し Smad1, 5, 8 経路を活性化すると報告された。

血管の形成と維持における BMP ファミリーの重要性は、遺伝性血管疾患がそのシグナル伝達因子の遺伝子異常により引き起こされることから明らかになっている。遺伝性出血性末梢血管拡張症 (HHT) の原因遺伝子は ACVRL1 (ALK-1) と endoglin (co-receptor) であり、原発性肺高血圧症 (PAH) の原因遺伝子が BMPR2 (BMP の II 型受容体) であることが示されてきた。また細胞レベルでは BMP-4 が血管前駆細胞の分化を促進することや、BMP-2 が HAEC (ヒト動脈内皮細胞) の、BMP-6 が MEEC (マウス胚性内皮細胞) の、BMP-7 が HPAEC (ヒト肺動脈内皮細胞) の増殖を促進することが報告されている。その一方で、

BMP-4 は HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の増殖を抑制すると報告されており、血管内皮細胞の分化・増殖に対する BMP ファミリーの作用については未解明な部分が残されていた。そこで本研究では血管前駆細胞から血管内皮細胞が分化する過程における BMP-4 ならびに BMP-9 の役割を解析するために胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞からの in vitro 血管分化系を用いた。

ES 細胞を分化させた細胞集団から VEGF 受容体 2 (VEGFR2) を発現する血管前駆細胞 (VEGFR2 陽性細胞) を単離して、無血清条件で VEGF を加えて 48 時間培養すると、90% 以上が血管内皮細胞へと分化する。その際に BMP-4 を添加し効果を検討したところ、細胞数の増加を認めた。また、血管前駆細胞から血管内皮細胞を分化させる過程 48 時間のうち BMP-4 を作用させる時間帯を変えて細胞数に与える効果を検討したところ、血管内皮細胞が未分化な、初期 15 時間においてのみ増殖促進効果を認めた。

コロニーフォーメーションアッセイにおいて、BMP-4 によりコロニー数が増加したことから、BMP-4 が血管内皮細胞の分化・生存のどちらか、または両方を促進することが明らかになった。また BMP-4 により、単一細胞から形成されるコロニーあたりの細胞数が増加したことから、BMP-4 が増殖を促進することを示した。さらに、BMP-4 により BrdU を取り込む血管内皮細胞の割合が上昇し、TUNEL 陽性の細胞の割合が低下したことから、BMP-4 による ES 細胞由来血管内皮細胞の細胞数増加が細胞周期の活性化とアポトーシスの抑制を介することが示唆された。

BMP-4 による増殖促進作用の分子メカニズムを明らかにするために BMP-4 の標的遺

伝子を探索した。その結果、BMP-4 の標的遺伝子として既に報告があり血管新生作用がある Id-1 の発現が上昇した。さらに血管内皮細胞の増殖や生存に重要な因子の発現を検討したところ、VEGFR2 や Tie2 (Ang-1 の受容体) 発現が上昇することが明らかになった。また受容体の活性化状態を示すリン酸化レベルもそれぞれ上昇していたことから、ES 細胞由来血管内皮細胞における BMP-4 の増殖促進効果は、VEGF/VEGFR2 や Ang-1/Tie2 シグナルの増強を介するという可能性が示唆された。

さらに BMP-4 とは異なるサブファミリーに属し、ALK-1 を介してシグナルを伝達するという報告がある BMP-9 の効果を検討した。血管前駆細胞から血管内皮細胞を分化させる際に、BMP-9 を添加したところ、BMP-4 と同様に細胞数が増加した。また BMP-6 も BMP-4 や BMP-9 と同様の効果を示した。ALK-1-Fc (ALK-1 細胞外ドメインからなるキメラ受容体) を用いた実験により BMP-9 が ES 細胞由来の血管内皮細胞においても ALK-1 と特異的に結合することを示した。また、内因性の ALK-1 をノックダウンしたところ、BMP-9 による細胞数の増加が抑制されたことから、BMP-9 による細胞数増加には ALK-1 が必須であることが示された。さらに、血管前駆細胞から血管内皮細胞を分化させる時期特異的に恒常活性型の ALK-1 を発現させると、BMP-9 刺激がない条件であっても BMP-9 刺激と同様に細胞数の増加を認めたことから、BMP-9 が ALK-1 の活性化を介してシグナルを伝達していることが示唆された。

ES 細胞由来血管内皮細胞の増殖を誘導する BMP-9/ALK-1 シグナルの標的遺伝子を探索したところ、BMP-4 と同様に VEGF/VEGFR2 や Ang-1/Tie2 のシグナル増強を介して細胞

数の増加をもたらす可能性が示唆された。また、ALK-1 の発現が BMP-9 により上昇することが新たにわかり、ポジティブフィードバック機構が存在すると示唆された。同様に endoglin の発現も BMP-9 により上昇することが示され、ALK-1 と複合体を形成することにより ALK-1 の効果を促進すると報告されている endoglin が BMP-9 による ES 細胞由来の血管内皮細胞の細胞数増加においても一役担っている可能性が示唆された。

本研究において初めて ES 細胞由来の血管前駆細胞が血管内皮細胞へと分化していく過程における時間依存的な ALK-1, ALK-3 の発現を検討した。その結果、ALK-1 の発現は血管内皮細胞マーカーと並行して分化とともに誘導されたのに対し、ALK-3 の発現は分化とともに減少することが新たにわかった。つまり、ALK-1 を介する BMP-9 のシグナルは、血管内皮細胞への分化が決定したあと遅れて活性化されるのに対し、ALK-3 を介する BMP-4 のシグナルは血管前駆細胞において既に活性化しており血管内皮細胞の分化とともに徐々に低下することが示された。これは血管内皮分化初期の未分化な時期においてのみ BMP-4 の増殖促進効果が認められたという上記の結果を補うものである。このように、BMP-4 と BMP-9 のシグナルはともに内皮細胞の細胞数を増加させる一方で、分化の時期によって活性化される時期が異なり、異なる役割を担っていることが示唆された。

さらに我々は、E8.25 マウス胚において BMP-9/ALK-1 シグナルが機能していること、ex vivo allantois 血管形成において BMP-9 が促進的に働くことを明らかとし、胚での血管発生において BMP-9 が重要な役割を担っていることを示唆した。また、Smad4-null のヒトすい臓がん細胞株 BxPC3 を用いた腫瘍異種移植モデルを導入し、腫瘍血管に対する BMP-9

の効果を検討した。腫瘍血管新生においても **BMP-9** が促進的に機能することを明らかとした。さらに **matrigel plug assay** を行い、成体における血管新生も **BMP-9** により促進することを示した。これら **ex vivo**, **in vivo** 実験から、**BMP-9** が生理的条件下において機能し得ること、また様々な局面での血管形成において **BMP-9** が役割を担っていることを示唆した。

末梢血から採取した骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (**EPC**) は **ES** 細胞由来の **VEGFR2** 陽性細胞と共通の性質を持つ。**EPC** を虚血部位に投与する血管再生療法が試みられており、末梢血からの **EPC** の採取は低浸襲性の面で骨髄からの採取より有利である。末梢血中から採取した **EPC** を利用する場合 **EPC** の細胞数の確保が問題で、**ex vivo** での増殖因子やサイトカインなどによる増殖促進が必要となる。本研究の結果により、血管新生・血管再生医療において **BMP** を用いた方法が開発されることが期待される。