

本研究は骨形成因子 **BMP** の血管形成における機能を明らかにするために、様々な血管形成モデルを用いて検討したものである。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。得られた結果は以下のとおりである。

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. **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** により細胞周期が活性化しアポトーシスが抑制すると示された。つまりコロニーフォーメーションアッセイの結果とあわせると、ES細胞由来血管内皮細胞での **BMP-4** による細胞数の増加は、**BMP-4** の添加により分化・生存・増殖が促進され、アポトーシスが抑制されたことを介する現象であることが示唆された。
5. **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。
6. **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。
7. **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。
8. 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。

9. 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。
10. ALK-1 の発現が BMP-9 により上昇することが新たにわかった。つまり BMP-9 は ALK-1 の発現誘導を介したポジティブフィードバック機構を有することが示唆された。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役割を担っている可能性が示唆された。
11. 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。
12. 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。
13. matrigel plug assay を行い、成体における血管新生も BMP-9 により促進されることを示した。
14. 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。

以上、本論文は BMP 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役割を担っていることを示唆した。また、BMP/ALK-1, 2, 3, 6/Smad1, 5, 8 の経路が血管形成を促進するという新しいモデルを提唱した。本研究は血管形成の調節機構を明らかにし、癌治療や血管再生医療に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。