

論文内容の要旨

論文題目: 血管内皮細胞の分化における血管内皮増殖因子受容体シグナルの解析

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 19 年度 4 月入学

医学博士課程 病因・病理学専攻

氏名: 佐瀬仁志

血管は全身に分布し、組織の恒常性維持に重要な役割を果たすのみならず、さまざまな病態に関与することから、その形成過程の解明は基礎生物学ならびに医学的に急務である。胎生期において、血管は最も初期に形成される臓器であり、マウスでは受精後 7.5 日にその発生が開始する。初めに、卵黄嚢にて血管内皮細胞と血球系細胞への分化能を持つヘマンジオブラストと呼ばれる細胞が血島と呼ばれる細胞塊を形成し、血島のうち、外側の細胞は血管内皮細胞へと分化することで原始血管網を形成する。一連の血管発生過程において、主要な役割を果たす受容体が血管内皮増殖因子受容体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2; VEGFR2) である。VEGFR2 は、チロシンキナーゼ型の受容体であり、主に VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) によって活性化される。VEGFR2 は、細胞外ドメイン、膜貫通領域、細胞内ドメインを持ち、細胞内ドメインに主要リン酸化部位であるチロシン 951, 1175, 1214 (Y951, Y1175, Y1214) が存在する。成熟した血管内皮培養細胞を用いた解析により Y951, Y1175, Y1214 のリン酸化により、細胞内シグナル因子が活性化され、血管内皮細胞の増殖・生存・運動が亢進することが報告されてきた。また VEGFR2 ノックアウトマウスや、Y1173 (ヒトでは Y1175 に相当する) をフェニルアラニン (F) に置換した VEGFR2-Y1173F ノックインマウスは、血島の形成不全による血管の形成不全という表現型を示すことが報告された。しかし、以上の報告では血島形成以降の血管発生過程における VEGFR2 シグナルの役割を生化学的に解析しておらず、「血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞への分化」における VEGFR2 シグナルの詳細については未解明な点が残されている。そこで本研究では、胎生期の血管内皮前駆細胞と共通の性質を持つ胚性幹 (Embryonic Stem; ES) 細胞由来の VEGFR2 を発現する (VEGFR2⁺) 細胞を血管内皮前駆細胞のモデル細胞として用いて、血管内皮細胞分化における VEGFR2 シグナルを詳細に解析することを試みた。

まず血管内皮細胞分化に必須の VEGFR2 のチロシンの同定を試みるために、VEGFR ファミリーの他のメンバーである VEGFR3 の細胞外ドメイン及び細胞膜貫通ドメインと、VEGFR2 の細胞内ドメインからなるキメラ受容体 (R32) をテトラサイクリン依存的に発現させる ES 細胞を樹立し、*in vitro* 分化の過程で VEGFR2⁺細胞においてキメラ受容体を発現させる実験系を構築した。VEGFR2⁺細胞は VEGF-A 存在下で再分化させると血管内皮細胞が出現するが、VEGFR3 特異的なリガンドである VEGF-C(C152S)存在下では血管内皮細胞は出現しない。これは、VEGF-C(C152S)は内在性の VEGFR3 を活性化するが、VEGFR3 シグナルは VEGFR2⁺細胞から血管内皮細胞への分化誘導しないためである。しかし R32 を発現させた VEGFR2⁺細胞を VEGF-C(C152S)存在下で再分化すると、血管内皮細胞が分化されたことから、この系においては、R32 シグナル特異的に血管内皮細胞分化が誘導されることが示された。そこで、主要リン酸化部位 (Y951, Y1175, Y1214) を F に置換した R32 変異体を VEGFR2⁺細胞に発現・活性化させたところ、血管内皮細胞が出現してこなかったのは R32-Y1175F を発現させたもののみであった。これらの結果から Y951 と Y1214 は血管内皮細胞分化に必須ではなく、Y1175 が血管内皮細胞分化に必須であることが示唆された。

次にリン酸化 Y1175 残基からのシグナルが血管内皮細胞の分化のどの過程において働くか、より詳細に検討した。血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞へと分化するためには、「血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞への形質を獲得すること (specification)」と「分化した血管内皮細胞が生存・増殖すること (survival / proliferation)」が必要であると考えられる。そこで、Y1175 から伝達されるシグナルが specification と survival / proliferation のいずれの過程に関わっているのか検討することとした。まず Y1175 の血管内皮細胞の survival / proliferation に対する必要性を検討するために、R32 と R32-Y1175F を血管内皮細胞において活性化させ、血管内皮細胞の生存因子を含まない培地で培養した。その結果、R32 シグナルは細胞数の減少に対して抑制的に働いたのに対して、R32-Y1175F シグナルは細胞数の減少を抑制しなかった。以上から、Y1175 から血管内皮細胞の survival / proliferation に必要なシグナルが伝達されていることが示唆された。また、分化した成熟血管内皮細胞においては VEGFR3 シグナルが survival / proliferation を亢進していることも示された。この survival / proliferation に対する作用は PI3K の阻害剤 LY294002 により阻害されたことから、血管内皮細胞の survival / proliferation に必要なシグナルの下流因子として PI3K が重要な役割を果たしていることが示唆された。次に、Y1175 が血管内皮細胞への specification に対する必要性を検討するために、分化した成熟血管内皮細胞の生存因子である FGF-2 (fibroblast growth factor-2) を含む培地で、R32 または R32-Y1175F を発現させた VEGFR2⁺細胞を VEGF-C(C152S)存在下で培養した。その結果、R32 を発現させた VEGFR2⁺細胞からは血管内皮細胞が出現したが、R32-Y1175F を発現させた VEGFR2⁺細胞からは血管内皮細胞分化は認められなかった。以上

の結果から、Y1175 から、survival / proliferation に必要なシグナルに加えて、specification を誘導するシグナルも伝達されていることが示唆された。

さらに血管内皮細胞の分化において VEGFR2 Y1175 からのシグナルにおいて機能している候補因子として Phospholipase-C γ 1 (PLC γ 1)に注目した。PLC γ 1 は血管内皮前駆細胞と血管内皮細胞において発現し、VEGFR2 のリン酸化 Y1175 残基に結合すると報告されている。さらに PLC γ 1 ノックアウトマウスにおいては血管形成が進行しないことから、血管発生において重要な役割を果たすことが示唆されていたが、血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞への分化における役割について明らかになっていなかった。そこで PLC γ 1 の恒常活性型である PalmPLC γ 1 を ES 細胞由来の VEGFR2⁺細胞に発現させたところ、単独では血管内皮細胞分化を誘導しなかったが、FGF-2 と協調的に作用させることで血管内皮細胞分化が誘導された。この現象は、PLC γ 1 によるシグナルが血管内皮細胞への specification を誘導し、FGF-2 シグナルによる血管内皮細胞の survival / proliferation への亢進作用と協調して、血管内皮細胞分化に必要な一連のシグナルが再構築できたためだと考えられる。一方、生存因子を含まない培地で培養した分化した血管内皮細胞に PalmPLC γ 1 を発現させても、細胞数の減少は抑制できなかったことから、PLC γ 1 は血管内皮細胞の survival / proliferation には十分でないことが示された。さらに、PLC γ 1 が VEGFR2 によって活性化されるが、VEGFR3 によっては活性化されないことが生化学的に示されたことから、血管内皮細胞の survival / proliferation を誘導できる VEGFR3 が血管内皮細胞への分化を誘導できない要因が PLC γ 1 を活性化できないためであると推察された。

血管内皮細胞の分化における VEGFR2/ PLC γ 1 シグナル伝達機構をさらに詳細に解析するために、Ras のファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤である FTI-277 を用いたところ、Ras シグナルの阻害により、PLC γ 1 と FGF-2 によって誘導される血管内皮細胞分化が抑制された。血管内皮細胞の survival / proliferation は FTI-277 による影響を受けなかったことから、FTI-277 は VEGFR2⁺細胞から血管内皮細胞への specification を阻害し、Ras が specification シグナルを伝達する因子として、PLC γ 1 シグナルの下流に存在することが示唆された。さらに、MEK 阻害剤である U0126 が血管内皮細胞分化を抑制するにも関わらず、Ras の活性化状態には影響を与えないことから、VEGFR2-PLC γ 1-Ras シグナルの下流で MEK-ERK が機能することが示唆された。

以上の結果から、血管内皮前駆細胞において発現する VEGFR2 が VEGF-A によって活性化し、リン酸化された Y1175 から PLC γ 1-Ras-ERK と伝達されるシグナルが血管内皮細胞への specification を誘導し、さらに Y1175 から PI3K へと伝達されるシグナルが分化した血管内皮細胞の survival / proliferation を誘導し、両シグナルが協調的に伝達されることで血管内皮細胞分化が進むことが明らかになった。成体における血管新生においてもこれらの知見

が血管の再生医療や腫瘍血管新生を標的とした癌治療への新たな方法の開発につながる
ことが期待される。