

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 佐瀬 仁志

本研究は、血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞への分化メカニズムを明らかにするために、ES 細胞由来 VEGFR2⁺細胞を発生期における血管内皮前駆細胞のモデル細胞として用いて、血管内皮細胞分化が誘導される際に伝達される VEGFR2 シグナルの詳細な解析を行ったものである。そして、以下の結果を得た。

1. 細胞外ドメインと膜貫通ドメインが VEGFR3 で細胞内ドメインが VEGFR2 であるキメラ受容体 (R32) および R32 の変異体を VEGFR2⁺細胞において活性化させ、VEGFR2⁺細胞が血管内皮細胞へ分化するか検討することで、血管内皮細胞分化に重要な役割を果たす VEGFR2 のチロシン残基の同定を試みた。その結果、VEGFR2 の 3 つの主要リン酸化チロシンのうち、Y1175 が血管内皮細胞分化に必須のチロシンであること、一方、Y951, Y1214 は血管内皮細胞分化に必須のチロシンではないことが明らかとなった。

2. 血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞への分化は、「VEGFR2⁺細胞が血管内皮細胞へと分化運命を決定される specification」プロセスと、「分化運命が決定された血管内皮細胞が生存し、増殖する survival / proliferation」プロセスを必要とするとの前提を置いた。

(i) R32, R32-Y1175F を活性化した血管内皮細胞を、血管内皮細胞の生存因子非存在下で培養し、細胞死抵抗性を観察すること (生存アッセイ) により、Y1175 から血管内皮細胞の survival / proliferation シグナルが伝達されていることが明らかとなった。

(ii) 血管内皮細胞の生存因子である FGF-2 存在下で、VEGFR2⁺細胞において R32-Y1175F を活性化させても血管内皮細胞分化が誘導されなかったことにより、

Y1175 から specification シグナルが伝達されていることが示唆された。Y1175 には PLC γ 1 が結合することから、PalmPLC γ 1 (PalmPLC γ 1) を VEGFR2⁺細胞に発現させたところ、PalmPLC γ 1 を発現させただけでは血管内皮細胞分化は誘導されなかったが、FGF-2 と協調的に働くことで血管内皮細胞分化が誘導されることが明らかとなった。このことは、PLC γ 1 が specification シグナルを伝達することを意味している。PLC γ 1 の血管内皮細胞分化における重要性は、miRNA を用いたノックダウンの実験においても示されている。また、生存アッセイにより、PLC γ 1 は survival / proliferation シグナルは伝達しないことが確かめられた。

(3) 生存アッセイにより、VEGFR3 は survival / proliferation シグナルを伝達することが明らかとなった。しかし、VEGFR3 は PLC γ 1 を活性化しなかったため、specification シグナルは伝達しないことが示唆された。VEGFR3 は VEGFR2⁺細胞の血管内皮細胞分化を誘導しなかったが、その理由としては、PLC γ 1 を活性化しないため、specification シグナルを伝達しないことが考えられる。

(4) PalmPLC γ 1 と FGF2 によって誘導される血管内皮細胞分化は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤である FTI-277 によって阻害された。また、FTI-277 は血管内皮細胞の生存は阻害しなかった。よって、FTI-277 の主要なターゲットである Ras が、PLC γ 1 の下流で specification シグナルを伝達することが示唆された。さらに、FTI-277 は ERK のリン酸化を阻害したこと、VEGF-A によって誘導される VEGFR2⁺細胞の血管内皮細胞分化を MEK 阻害剤である U0126 が抑制したことから、Ras-MEK-ERK 経路が specification に重要であることが明らかとなった。一方、survival / proliferation シグナルを伝達していると報告されている Akt の活性化には、Ras は関与していないことが示された。

以上、本論文は、ES 細胞由来 VEGFR2⁺細胞を用いて、血管内皮細胞分化を誘導する VEGFR2 シグナル伝達経路を明らかにした。血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞へと分化する際に伝達されるシグナル伝達経路に関しては現在まで未知の点が多く、本研究は血管内皮細胞分化を誘導するメカニズムの解明に重要な貢献を成す。よって、学位の授与に値するものであると考えられる。