

要旨

論文題目：流れずり応力による ES 細胞由来動脈内皮細胞の分化誘導機構

指導教員：阿部 裕輔 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻 医用生体工学講座 生体機能制御学分野

榊村智美

1、緒言

近年、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化させた血管内皮増殖因子受容体陽性 (VEGFR2⁺) 細胞が血管前駆細胞として働き、血管内皮増殖因子を加えると血管内皮細胞へ、血小板由来成長因子 (PDGF-BB) を加えると壁細胞 (平滑筋細胞、血管周囲細胞) へ分化が誘導され、生体で血管を構築することが示された。また最近、VEGFR2⁺細胞が血管細胞へ分化する過程において、血流に起因する血行力学因子である流れずり応力や伸展張力が重要な役割をはたすことが明らかになった。具体的には、VEGFR2⁺が流れずり応力により VEGF 受容体のリン酸化を介して血管内皮細胞に、伸展張力により PDGF 受容体のリン酸化を介して血管平滑筋細胞に分化することが報告されている。しかし、流れずり応力により分化誘導された血管内皮細胞が動脈と静脈のどちらの性質を持つかは明らかではない。そこで本研究では、ES 細胞の動静脈内皮細胞への分化に及ぼす流れずり応力の効果を確認することを目的として、動脈と静脈各々の内皮細胞マーカーである ephrinB2 と EphB4 の遺伝子及び蛋白発現レベルを解析した。さらに、内皮細胞への分化の分子機構を明らかにする為、発生過程における細胞運命の決定とパターン形成に関与することで知られ、動静脈分化の制御にも重要な役割を果たす Notch シグナル伝達経路を解析すると共に、Notch 受容体にリガンドが結合すると、 γ -secretase が働くことで切断される Notch 細胞内ドメイン (NICD) の核内移行を評価することにより、流れずり応力による Notch シグナリングの活性化を検討した。また、 γ -secretase 阻害剤、VEGFR リン酸化阻害剤、PKC、ERK、MAPKK、PI3K、Akt kinase の各種阻害剤を使用し、ES 細胞が流れずり応力により血管内皮細胞へ分化する過程において、VEGFR と Notch シグナル伝達が果たす役割を検討した。

2、実験方法

2-1. 細胞培養

マウス ES 細胞 (MGZ-5) を、培養液から leukemia inhibitory factor (LIF) を除き、 α 型コラーゲンでコートしたディッシュに播種し、37℃、5%CO₂ 下にて分化を開始した。3 日目に VEGFR2 抗体を結合させた磁気ビーズ (MACS) を用いて VEGFR2⁺細胞 (血管前駆細胞) を分離した。

2-2. 流れずり応力負荷実験

VEGFR2⁺細胞を分離して3日目に、平行平板型流れ負荷装置とペリスタポンプを用いて定量的な流れずり応力を負荷した。流れずり応力： t (dyne/cm²)は $t=6\mu Q / a^2b$ で表される(灌流液の粘性： μ 、灌流液の流量： Q (mL/sec)、流路の厚み： a (cm)、流路の幅： b (cm))。 a と b が一定であるため、流量または、灌流液の粘性を制御することにより目的の定量的な流れずり応力を負荷することができる。本実験では、静脈から動脈に相当する1.5~20 dyne/cm²の流れずり応力を所定時間負荷した。

2-3. 細胞の分化評価

<Western-blot 解析>

SDS-PAGE を行い、泳動した蛋白をゲルに転写しブロッキングしたあと、一次抗体として抗 ephrinB2、CD31、Notch 1、Notch 4、DLL 4、Jagged 1、Jagged 2、cleaved Notch 1 抗体を作用させた。二次抗体は、Horseradish peroxidase(HRP)-linked 抗マウス IgG 抗体を使用し、それぞれのタンパク発現を解析した。

<Real-time PCR 解析>

細胞中の total RNA を逆転写し、得られた cDNA を鋳型とし、それぞれ ephrinB2、EphB4、Notch 1、Notch 4、DLL 4、Jagged 1、Jagged 2 の primer を用いて real-time PCR を行った。各遺伝子の発現レベルは β -actin の発現レベルを内部標準とすることにより定量した。

<免疫蛍光抗体染色>

Notch 受容体の活性化を検討するために、核内へ移行した Notch 1 受容体の細胞内ドメイン (NICD) の染色を行った。一次抗体として抗ラット cleaved Notch1 抗体にて NICD を染色した。二次抗体には Alexa Fluor 488 抗ラット IgG 抗体を使用した。さらに、4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を作用させ、細胞核を染色し、NICD の局在を共焦点レーザー顕微鏡 (Leica SP2) にて撮影した。

2-4. 統計解析

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で示した。統計的意義は、SPSS プログラムで行った t 検定の結果に ANOVA と Bonferonni 補正を行い評価した。 $P < 0.01$ を統計学的に有意と判定した。

3. 結果および考察

3-1. 流れずり応力は ephrinB2 の発現を増大させるが EphB4 の発現を減少させる

マウス ES 細胞由来 VEGFR2⁺細胞に 10 dynes/cm² の流れずり応力を 72 h 負荷したところ、動脈内皮のマーカーである ephrinB2 の mRNA レベルは静的条件下の細胞と比較し、約 3 倍に増大したが、静脈内皮のマーカーである EphB4 mRNA レベルは 1/2 以下に減少した。また 5~20 dynes/cm² の流れずり応力を負荷したときの ephrinB2 のタンパク発現は流れずり応力の大きさに依存して増大し、20 dynes/cm² の流れずり応力により約 3.5 倍に上昇した。このことは流れずり応力が動脈内皮細胞へ分化を誘導することを示唆する。

3-2. Notch シグナルは流れずり応力による ephrinB2 発現の増大に関わる

VEGFR2⁺細胞に、Notch 受容体を切断する γ -secretase の阻害剤である DAPT または、L685,458 を加えて、流れずり応力 (10 dynes/cm², 24 h) を負荷すると、流れずり応力依存的な ephrinB2 の発現の上昇が有意に抑制された一方、流れずり応力による EphB4 の発現の減少にはほとんど影響がなかった。以上の結果により、流れずり応力が Notch シグナリングを活性化することで、動脈内皮マーカーである ephrinB2 の発現を上昇させることが明らかになった。

3-3. 流れずり応力は Notch 受容体とリガンドの発現を増大させる

VEGFR2⁺細胞に流れずり応力 (0~10 dynes/cm², 0~24 h) を負荷したところ、動脈内皮細胞に発現する Notch 1、Notch 4、DLL 4、Jagged 1、Jagged 2 の mRNA と蛋白の発現レベルは流れずり応力の強度と負荷時間に依存して有意に増大した。この結果から、流れずり応力により VEGFR2⁺細胞における Notch の受容体とリガンドの蛋白および、mRNA 発現が上昇することが示された。

3-4. VEGFR2⁺ES 細胞において流れずり応力により Notch が切断される

Notch シグナリングの活性化を評価する為に、NICD の免疫蛍光染色と Western blot 解析を行った。VEGF を作用させると、NICD の核内移行が著明に示された。さらに、流れずり応力 (10 dynes/cm², 1h) を負荷した細胞においても、Notch 受容体が切断され、NICD が核内へ移行することが確認された。核内における NICD は、流れずり応力を負荷してから 30 分後頃より増大し始め、経時的に増大した。以上の結果から、流れずり応力が VEGFR2⁺細胞における Notch の切断を誘導することが示された。流れずり応力による Notch 切断は、 γ -secretase 阻害剤 L685,458 と DAPT、マウス DLL4 の組替え細胞外領域 (rmDLL4) によりほぼ完全に抑制される。これは、流れずり応力に誘導された Notch の活性化に γ -secretase と DLL4 が関与することを示唆する。

3-5. VEGF シグナルは Notch 活性化とその後の ephrinB2 発現の増大に関わる

流れずり応力依存性 ephrinB2 の発現上昇における VEGFR シグナリングの役割を検討する為、VEGFR のリン酸化阻害剤である SU1498 の作用を検討した。流れずり応力による Notch の切断と ephrinB2 の発現上昇が SU1498 により有意に抑制された。また、VEGFR シグナリングの下流にある情報伝達経路である PKC、ERK、MAPKK、PI3K、Akt kinase の阻害剤により Notch の切断と ephrinB2 の発現上昇が抑制された。このことは、VEGFR シグナルの下流で 2 つのシグナリング経路、PKC-MAPKK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路の活性化が、流れずり応力による誘導される Notch 活性化とそれに引き続き起こる ephrinB2 の発現上昇に関与することを示す。

4. 結論

本研究により、血行力学因子である流れずり応力が ES 細胞を動脈内皮細胞へ選択的に分化を誘導することが示された。この分子機構に VEGF 受容体と Notch シグナリングの活性化が主な働きを担っていることが明らかになった。以上の結果から、初期の胚の発生過程における循環器系の構築に、機械的な刺激である流れずり応力が重要な役割を果たすことが示唆される。さらに、細胞組織工学や再生医療分野において、ES 細胞から血管細胞を分化させる操作技術として、流れずり応力を含む機械的な刺激を応用することが有効であると考えられる。