

## 審査の結果の要旨

榊村 智美

本研究は、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検討するために、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の解析、発生過程における細胞運命の決定とパターン形成に關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 シグナリングの解析、Notch 受容体にリガンドが結合すると  $\gamma$ -secretase が働くことで切断される Notch 細胞内ドメイン (NICD) の核内移行の評価、VEGFR シグナリングと Notch シグナリングが果たす役割の検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

- 1、マウス ES 細胞由来 VEGFR2<sup>+</sup> 細胞に 10 dynes/cm<sup>2</sup> の流れずり応力を 72 時間負荷したところ、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/cm<sup>2</sup> の流れずり応力を負荷したときの ephrinB2 の蛋白発現は流れずり応力の大きさに依存して増大し、20 dynes/cm<sup>2</sup> の流れずり応力により約 3.5 倍に増大した。このことから流れずり応力により動脈内皮細胞へ分化が誘導されることが示唆された。
- 2、マウス ES 細胞由来 VEGFR2<sup>+</sup> 細胞に、Notch 受容体を切断する  $\gamma$ -secretase 阻害剤である DAPT および L685,458 を加え、10 dynes/cm<sup>2</sup> の流れずり応力を 24 時間負荷すると、流れずり応力依存的な ephrinB2 の発現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、マウス ES 細胞由来 VEGFR2<sup>+</sup> 細胞に 0 ~ 10 dynes/cm<sup>2</sup> の流れずり応力を 0 ~ 24 時間負荷したところ、動脈内皮細胞に発現する Notch 1、Notch 4、DLL 4、Jagged 1、Jagged 2 の mRNA と蛋白質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<sup>+</sup> 細胞における Notch の受容体とリガンドの蛋白質および mRNA 発現が上昇することが示された。
- 4、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、10 dynes/cm<sup>2</sup> の流れずり応力を 1 時間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<sup>+</sup> 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、 $\gamma$ -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たが、これは、流れずり応力に誘導された Notch の活性化に  $\gamma$ -secretase と DLL4 が關与することを示唆する。

5、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。

以上、本論文は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し、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を明らかにした。本研究は、初期胚の発生過程において流れずり応力が循環器系の構築に及ぼす影響の解明、さらに、細胞組織工学や再生医療分野において、ES 細胞から血管細胞へ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させる試み、に重要な貢献をなし、学位の授与に値すると考えられる。