

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	山水 康平
論文題目	Novel roles of cAMP signaling in endothelial cell differentiation and diversification from vascular progenitors (血管前駆細胞からの内皮細胞分化及び多様化における cAMP シグナルの新しい役割)		
(論文内容の要旨) 生物発生過程において最も早く形成される臓器の一つが血管であり、生命体の形成、維持に深く関与している。血管発生は、中胚葉細胞から血管芽細胞 (血管前駆細胞) への分化から始まり、原始血管叢形成から血管新生・動静脈分化を経て成熟血管が形成される。当研究室では、胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞を用いて中胚葉マーカーである VEGF (vascular endothelial growth factor) 2 型受容体 (Flk1) 陽性血管前駆細胞に VEGF を添加することにより内皮細胞を分化誘導するシステムを構築した。さらに VEGF 及び cAMP (cyclic adenosine monophosphate) の活性化により (1) 内皮細胞分化の促進と、(2) 動脈内皮細胞の誘導が見出された。本研究では、血管分化多様化機構、特に新たに見出した cAMP の作用機構を解明することを目的とし、上記 (1), (2) の分子機構を解析した。 (1) 血管内皮細胞分化における cAMP シグナルの役割 Flk1 陽性細胞へ VEGF に加えて cAMP を添加することにより内皮細胞分化は約 2 倍亢進したが、同作用は PKA (protein kinase A) 阻害剤である H89、PKI 添加により抑制された。マウス胚 ex vivo 培養 においても H89 の添加により血管形成が有意に抑制された。さらに、活性化型 PKA (CA-PKA) 発現をテトラサイクリンにより制御できる ES 細胞を樹立し、Flk1 陽性細胞において発現させたところ、内皮細胞分化やコラーゲンゲル 3 次元培養下における血管構造形成が著しく促進された。遺伝子発現解析を行ったところ VEGF 受容体である Flk1 及び Neuropilin1 (NRP1) の発現が約 5 倍上昇していた。さらに、無血清培養にて Flk1 陽性細胞の VEGF に対する感受性を検討した結果、CA-PKA 発現により、従来の 10 倍以上低濃度の VEGF165 添加でも内皮細胞分化が誘導され、Flk1-VEGF165-NRP1 タンパク複合体形成も認められた。これらの結果より、cAMP/PKA シグナルは Flk1 及び NRP1 の発現を亢進し、血管前駆細胞の VEGF に対する感受性を向上させることで、内皮細胞分化を促進することを明らかにした。分化を誘導する外的因子ではなく、受け手側である前駆細胞の分化能を制御するという cAMP/PKA シグナルの新しい分子機構を明らかにした。 (2) 動脈内皮細胞の運命決定機構における cAMP シグナルの役割 Flk1 陽性細胞への VEGF 及び cAMP の添加により認められた動脈内皮細胞誘導は、PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) 阻害剤である LY294002 を添加することで抑制された。この LY294002 の抑制作用は、GSK3β の阻害剤 Bio によって部分的に改善された。GSK3β の主たる下流因子の β-catenin を VEGF の投与と同時に発現させても動脈内皮細胞は誘導されなかったが、β-catenin と Notch 細胞内ドメイン (NICD) -エストロゲン受容体融合タンパクを用いて、β-catenin, Notch を同時に活性化することにより cAMP 非存在下においても動脈内皮細胞が分化誘導された。FACS を用いて ES 細胞由来動脈・静脈内皮細胞をそれぞれ純化し、Notch と β-catenin の相互作用を免疫沈降法及びクロマチン免疫沈降法にて検討した。その結果、種々の動脈マーカー遺伝子の RBP-J 結合部位において、RBP-J-Notch-β-catenin が動脈内皮細胞特異的にタンパク複合体を形成していることを見出した。このタンパク複合体は、マ			

ウス胎仔由来動脈内皮細胞や成体の胸部大動脈においても特異的に形成されていた。本研究から、cAMP シグナル下流で活性化する Notch 及び β-catenin は、新規動脈特異的タンパク複合体を形成し、動脈内皮細胞を誘導することを見出した。動静脈運命決定機構における新たな分子メカニズムを明らかにした。

(1)、(2)の研究で行った詳細な解析により、内皮細胞分化・多様化における cAMP シグナルの新しい意義を明らかにした。これらの研究成果は血管発生機構の新たな理解をもたらすと共に新規血管再生医療の開発につながると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)
 多能性幹細胞株は将来の細胞治療への応用の可能性に加えて、各種組織の形成、分化機構の解明に役立つ実験系である。本研究は、マウス胚性幹細胞を用いた血管分化システムを中心的実験系として、血管内皮細胞の分化多様化機構における cAMP (cyclic adenosine monophosphate) の 2 つの異なる役割、(1) 血管内皮細胞の分化促進効果、及び(2) 動脈内皮細胞の誘導効果の分子機構を解明した。(1) cAMP シグナルの下流因子である PKA (protein kinase A) は、血管前駆細胞において VEGF (vascular endothelial growth factor) 受容体である Flk1 及び Neuropilin1 の発現を亢進し、血管前駆細胞の VEGF に対する感受性を高め、内皮細胞分化を促進することを明らかにした。(2) 血管前駆細胞において、cAMP シグナルの下流で phosphatidylinositol-3 キナーゼを介して Notch 及び β-catenin シグナルが活性化され、これらが動脈内皮特異的タンパク複合体 (RBP-J-Notch-β-catenin) を形成し協調的に作用することにより、内皮細胞の動脈内皮への運命決定が引き起こされることを明らかにした。

以上の研究は血管発生・形成機構の解明に貢献し、血管を標的とした治療法の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 3 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降