

氏名	平島正則
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2083号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. (試験管内脈管形成モデルにおけるマウス胚性幹細胞から内皮細胞への成熟) (主査)
論文調査委員	教授 桂 義元 教授 中辻 憲夫 教授 西川 伸一

### 論文内容の要旨

脈管形成とは中胚葉細胞から分化した血管芽細胞が小さな細胞集塊内で管腔形成した後、お互いに融合し原始血管叢を形成する過程である。特に卵黄囊の脈管形成においては、血球血管芽細胞と呼ばれる前駆細胞が血島を形成した後、辺縁部の細胞は内皮細胞へ分化し中心部の細胞は血球細胞へ分化すると推定されている。近年のジーンターゲット法を用いた解析により、様々な分子が血管発生に関わっていることが示されてきた。脈管形成に必須の分子として、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、Flk-1(VEGF受容体-2)、Flt-1(VEGF受容体-1)、VE-カドヘリンなどが報告されている。しかし、これらの分子が血管構成細胞を細胞レベルでどのように制御しているのかについて、あまり良く分かっていない。脈管形成における細胞レベルの解析系として、マウス胚性幹細胞(ES細胞)の浮遊培養や中胚葉細胞の培養などが用いられてきた。しかしながら、いずれの系においても様々な系列の細胞が共存するため、内皮細胞だけに注目することは困難だった。

一方、発生過程にある内皮細胞を特異的に解析するため、ES細胞由来Flk-1陽性細胞をソーティングし、原始血管叢が形成される際に見られる細胞現象を分化・増殖・遊走・細胞間接着などに分けて解析したのが本論文である。

ES細胞は多能性であり細胞分化の研究に有用である。この細胞をIV型コラーゲン・ディッシュ上で培養(分化誘導)後4日目に、Flk-1陽性細胞が30~40%程度存在した。Flk-1は中胚葉細胞に発現した後に内皮細胞に局限することや、内皮細胞と血球細胞の発生に必須であることなどが知られている。そこで、このES細胞由来Flk-1陽性細胞をソーティングして、試験管内での内皮細胞への分化を解析した。実際には、未分化なES細胞の混入を防ぐため、Flk-1陽性E-カドヘリン陰性細胞をソーティングした。その時点では、VE-カドヘリン、PECAM-1、CD34といった他の内皮細胞マーカーは全て陰性であった。この細胞を同じ条件下で再培養すると、ほとんどの細胞は急速にFlk-1の発現を失った。しかしFlk-1の発現を維持した細胞集団の中で、VE-カドヘリンとPECAM-1は約1日後ほぼ同時に発現し、CD34はそれらよりやや遅れて発現することが分かった。さらに、今までに生体内の発生過程で報告されていたのと同様に、他の内皮細胞マーカーの発現後Flk-1の発現は下がっていった。このことから、ES細胞由来Flk-1陽性細胞は発生過程にある内皮細胞について研究するのに理想的な細胞であると考えられた。

そこでES細胞由来Flk-1陽性細胞を用いて、脈管形成の際に見られる内皮細胞の増殖・遊走・細胞間接着などを細胞レベルで解析しようと試みた。これらの細胞の低細胞密度での培養が最適であると考えたが、IV型コラーゲン・ディッシュ上ではVEGF添加によっても実現できなかった。そのためフィーダー細胞を用いて低細胞密度で共培養することとした。4種類のフィーダー細胞を試したが、3日後におけるFlk-1陽性細胞の増殖及びコロニー形態は大きく異なった。NIH3T3上では増殖せず、PA6上でもあまり増殖しなかった。一方、Balb/c3T3上とOP9上でFlk-1陽性細胞は増殖したが、前者では索状構造を後者ではシート状構造をとった。OP9上のシート状構造が所期の目的に最適であると考えられたため、以

後の実験にはOP9をフィーダー細胞として用いた。このシート状構造はVE-カドヘリンも陽性で細胞間接着部位に濃縮していた。またアセチル化低比重リポ蛋白の取り込みも観察された。このことからOP9はFlk-1陽性VE-カドヘリン陽性内皮細胞のAdherens junctionを備えたシート状増殖を支持することが示唆された。

OP9は脈管形成に必須のVEGFを発現していたため、マウスFlt-1の細胞外ドメインとヒトIgG1-Fcのキメラ蛋白(mFlt-1-hIgG1)を精製し、この培養に添加してFlt-1リガンド(VEGFとPlGF)を阻害した際の効果を観察した。mFlt-1-hIgG1によりシートの数・サイズともに減少した。mFlt-1-hIgG1の効果はVEGFで濃度依存的に抑制されたが、PlGFでは抑制されなかった。つまり、OP9由来VEGFはFlk-1陽性細胞のシート状増殖に重要であった。しかしながら、mFlt-1-hIgG1の濃度をいくら上げて小さなシートは若干数存在したため、他の増殖因子の効果も示唆された。

VEGF欠損マウスはヘテロ接合体ですら胎生期に死亡するため、その濃度の重要性が示唆されている。そこで次に、様々な濃度(1~100ng/ml)のVEGFを添加しその効果を観察した。VEGFはFlk-1とFlt-1という2つの受容体に結合するため、Flt-1特異的リガンドであるPlGFの効果も観察した。1から10ng/ml程度までのVEGFにより増殖は促進されたが、それ以上加えても更なる促進は見られなかった。一方、3ng/mlのVEGFによってシート辺縁部の細胞が遊走を始め、50ng/mlのVEGFによってシート形態は円形から棘形へと変化した。対照的に、PlGFでは何の著しい効果も観察されなかった。これらのことから、脈管形成においてVEGFはFlk-1を介して低濃度で増殖を促進し、高濃度では増殖に加えて遊走を促進することが示唆された。

次にシート状構造の細胞間接着におけるVE-カドヘリンの役割を解析するため阻害抗体(VECD1)を培養に添加して観察したところ、シート状構造の形成は抑制された。さらに動的状態で解析するため、OP9上で3日間培養してシート状構造が完成しているところに、50ng/mlのVEGFあるいはVECD1を添加し24時間培養後に観察した。50ng/mlのVEGFは辺縁部の細胞の遊走を促進したが、同時にVECD1も加えるとシート状構造は完全に崩壊した。以上のことから、VE-カドヘリンは脈管形成において内皮細胞の細胞間接着を維持するのに必須の分子であることが示唆された。

脈管形成の解析系として今までに用いられてきたES細胞の浮遊培養や中胚葉細胞の培養などと比べると、この系では血管の管腔ネットワークを作ることにはできない。しかしながら、そのような複雑な管腔構造が個々の内皮細胞の分化・増殖・遊走・細胞間接着などによって形成されるのは明らかである。その意味で以下の点において、非常に有用な培養系であると考えている。1) 発生過程にある内皮細胞をソーティングして用いた最初の系である。2) 脈管形成における細胞現象を分化・増殖・遊走・細胞間接着などに分けて解析できる。3) 複雑な3次元構造を持たない。

## 論文審査の結果の要旨

近年のジーンターゲット法を用いた解析により、血管の初期発生である脈管形成に関わる分子が数多く明らかにされた。しかし、これらの分子が血管構成細胞を細胞レベルでどのように制御しているのかについて不明な点が多い。本論文では発生過程にある内皮細胞を特異的に解析するため、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の受容体の一つであるFlk-1(VEGF受容体-2)陽性細胞に着目し、ES細胞から内皮細胞への試験管内成熟に関する研究を行っている。

ES細胞由来Flk-1陽性細胞をソーティング・再培養して、内皮細胞マーカーの発現様式を解析することにより、この細胞は発生過程にある内皮細胞を解析するのに理想的であると考えられた。次にこのES細胞由来Flk-1陽性細胞を用いて、脈管形成の際に見られる内皮細胞の増殖・遊走・細胞間接着などを細胞レベルで解析しようと試みた。フィーダー細胞を用いて低細胞密度で共培養したところ、フィーダー細胞種によってFlk-1陽性細胞の増殖及びコロニー形態は大きく異なることが明らかとなった。それらの内、Flk-1陽性VE-カドヘリン陽性内皮細胞のシート状増殖を支持するOP9をフィーダー細胞として以後の実験に用いた。この条件下では1個のFlk-1陽性細胞が増殖して形成するシート状構造の形態を観察することにより、脈管形成において内皮細胞がどのような動向を示すのかを想定できる。この系において、VEGFは低濃度で増殖を促進し、高濃度では増殖に加えて遊走を促進した。増殖・遊走という独立した過程に分けて細胞レベルで解析することにより、VEGFの濃度依存性作用がはじめて明らかとなった。また阻害抗体を用いることにより、脈管形成における内皮細胞の細胞間接着に対するVE-カドヘリンの必要性も観察された。

以上の研究は、発生過程にある内皮細胞をソーティングして用いた最初の系であり、脈管形成における細胞現象を分化・

増殖・遊走・細胞間接着などに分けて解析した点において、血管内皮細胞の発生過程の解明に貢献し血管生物学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11年1月21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。