

氏 名	ひさ 久 恒 洋
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2916 号
学位授与の日付	平 成 17 年 11 月 24 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	A high level of endothelial cell - specific gene expression by a combination of 5' flanking region and 5' half of the first intron of VE-cadherin gene. (VE-cadherin 遺伝子の5' flanking region および 5' half of the first intron による血管内皮細胞特異的発現増強に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 横 出 正 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

血管内皮細胞に発現する様々なプロモーターが報告されているが、必ずしも血管内皮細胞特異的に発現しているわけではない。例えば、血管内皮細胞に発現するプロモーターとしてよく用いられている Tie-1 および Tie-2 は血球においても発現し、VEGFR2 も未分化な ES 細胞で発現している。これらに比して VE-cadherin は血管内皮細胞に特異的かつ連続的に発現していることが知られている。Gory らによりマウス VE-cadherin のプロモーター領域が同定されたが、それによると頭部での発現が見られない上に、発現が弱いという問題があった。そこで血管内皮細胞への特異性を保ちつつ、より強い発現を示すユニットを得るために、VE-cadherin の第 1 イントロンのエンハンサー活性について 3 つの実験系を用いて評価した。まず、ルシフェラーゼ活性を NIH3T3 と血管内皮細胞株 (F2 細胞) の間で比較したところ、F2 細胞において VE-cadherin のプロモーター領域に第 1 イントロンの 5' 側の 4 kbp (5' 1<sup>st</sup> Intron) を付加したフラグメントを導入した際に、ルシフェラーゼ活性の著明な上昇を認めた。次に GFP の発現を ES 細胞の血管分化系で比較するために、VE-cadherin のプロモーター領域、これに 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加したフラグメント、あるいは 3' 側の 4.5 kbp (3' 1<sup>st</sup> Intron) を付加したフラグメントをそれぞれ未分化 ES 細胞に導入し OP9 共培養下に血管内皮細胞へ分化させて、エンハンサー活性を比較した。その結果、ES 細胞系においても 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加することにより、血管内皮細胞特異性を保ちつつその発現が強化されることが示された。以上より VE-cadherin プロモーター領域への 5' 1<sup>st</sup> Intron の付加によるエンハンサー活性の増強作用が強く示唆されたため、VE-cadherin プロモーターを導入したトランスジェニックマウス (VECDp-EGFP マウス) およびこれに 5' 1<sup>st</sup> Intron が付加されたトランスジェニックマウス (VECDp-EGFP-5' Intl マウス) を作成し in vivo における GFP 発現の比較検討を行った。各臓器における蛍光免疫染色の比較において、VECDp-EGFP-5' Intl マウスは VECDp-EGFP マウスに比して成体期および胎生期ともに強い GFP 発現を来した。また VECDp-EGFP-5' Intl マウスでは血管マーカーである PECAM-1 に一致して網膜および脳においても強い GFP 発現が観察された。さらに網膜の血管において GFP の発現パターンを観察したところ、静脈幹において GFP 発現は減弱していた。また血球を表す円形の細胞に GFP は発現せず、VECDp-EGFP-5' Intl は in vivo においても血管内皮細胞への特異性を十分保っているものと考えられた。さらに ES 細胞を顆粒球、単球、B リンパ球に分化誘導した実験系において、血球細胞は GFP 陽性の VE-cadherin 陽性細胞から誘導され、しかも血球へ分化すると GFP は発現されなくなった。従って本系は血管細胞から血球細胞への分化における内因性 VE-cadherin 発現を追跡する際にも有用であることが示された。以上より、VE-cadherin のプロモーター領域に 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加することにより血管内皮細胞特異性を保ちつつ VE-cadherin 発現が強まること、さらに本実験系の前駆期血球分化研究への有用性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞に発現する様々なプロモーターが報告されているが、必ずしも血管内皮細胞特異的に発現しているわけではない。そこで申請者は VE-cadherin の第 1 イントロンのエンハンサー活性について解析を行った。まず、VE-cadherin のプロモーター領域に第 1 イントロンの 5' 側の 4kbp (5' 1<sup>st</sup> Intron) を付加したフラグメントを血管細胞株に導入した際に、最もルシフェラーゼ活性の上昇を認めることが示された。次に、5' 1<sup>st</sup> Intron を付加したフラグメントを未分化な ES 細胞に導入し血管内皮細胞へ分化させ GFP 発現の検討を行った。その結果、ES 細胞系においても 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加することによる GFP 発現の強化を認めた。トランスジェニックマウスにおける GFP 発現の各臓器における蛍光免疫染色での検討でも、VE-cadherin のプロモーターに比して 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加したマウスで、成体期および胎生期ともに血管内皮細胞に特異的な強い GFP の発現を来した。以上より、VE-cadherin のプロモーター領域に 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加することにより血管内皮細胞特異性を保ちつつ、その発現が強まることが示された。さらにこの 5' 1<sup>st</sup> Intron を付加した ES 細胞を血球系に分化誘導した実験において、血球細胞は 6FP 陽性かつ VE-cadherin 陽性細胞から誘導され、血球へ分化した際に GFP の発現は消失した。したがって本系は血管細胞の分化における内因性 VE-cadherin 発現を追跡する際にも有用であることが明らかとなった。

以上の研究は血管発生の分子メカニズムの解明に貢献し、様々な消化器疾患の病態解明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17年11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。