

氏名	まつ 松 村 和 宣
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2629 号
学位授与の日付	平成 15 年 5 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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3に関する研究 (VEGFR-3シグナルによるVEGFR-2を介した血管内皮細胞の制御に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中 辻 憲 夫 教授 北 徹 教授 千葉 勉

### 論 文 内 容 の 要 旨

血管内皮増殖因子受容体 3 (VEGFR-3) は VEGFR-1, VEGFR-2 と共に血管内皮細胞における受容体チロシンキナーゼファミリーを構成し, 胎生期および病的状態における血管新生を制御している。VEGFR-3 とそのリガンドである VEGF-C はリンパ新生に関与していることが知られている。その一方 VEGFR-3 遺伝子欠損マウス及び腫瘍細胞移植マウスの研究において VEGFR-3 シグナルは胎生初期の血管新生の再構築に重要な役割を示すことが示されているが, VEGFR-3 シグナルの血管新生における役割については十分に解明されていない。本研究では細胞レベルにおいて血管内皮細胞における VEGFR-3 シグナルの役割を検討するために, マウス胎生幹 (ES) 細胞由来の VEGFR-3 陽性血管内皮細胞の培養系を確立し VEGFR-3 シグナルが血管内皮の Integrity を維持するために働いていることを実験的に示した。

フィーダー細胞として OP9 細胞株を用いることにより, ES 細胞から VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 を発現する血管内皮細胞を分化誘導し, その発現を維持する培養系を確立した。本培養系において VEGF-A と VEGF-C は共に血管内皮細胞の増殖を促進する因子であることを確認したが, 内皮細胞の細胞形態は両者においては明らかな違いを見せた。VEGFR-A はシート状の内皮細胞塊を拡散させ細胞は紡錘状に伸長するが, VEGF-C は細胞を伸長させるシート状の細胞塊を維持したまま増殖を促進した。VEGF-A は VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1 と結合することが報告されているがその生物学的な活性は主に VEGFR-2 を介しているとされている。VEGF-C は VEGFR-1, VEGFR-2 と結合し血管内皮細胞の増殖, 遊走, 血管の再構築に働くことが知られている。これらの結果を考えあわせると VEGF-A, VEGF-C の内皮細胞塊における効果の違いは VEGFR-3 シグナルが関与している可能性が示された。この可能性を検証するために, VEGFR-3 の中和抗体を培養系に加えることにより VEGFR-3 シグナルを阻害すると内皮細胞塊は VEGF-A と同様に内皮細胞塊を拡散させた。また, 細胞形態の観察において VEGF-A 刺激時と VEGFR-3 中和抗体添加時は酷似した伸長した細胞形態を示した。予期せぬことに内在性 VEGF-A を阻害時には VEGFR-3 中和抗体の効果は認められなかった。以上の結果より, VEGF-C/VEGFR-3 シグナルは VEGF-A シグナルを修飾することにより, 血管内皮細胞の Integrity を保ち血管新生を厳密に制御していると考えられた。

また, VE カドヘリンが VEGFR-2, VEGFR-3 シグナルの標的分子として働くことが報告されており, VEGFR-3 シグナルが VE カドヘリンを介して内皮細胞塊の維持に関与している可能性について検討した。VE カドヘリン中和抗体を用いた実験において VEGFR-3 中和抗体添加時と細胞形態, VE カドヘリン分子の局在において明らかな違いが見られた。以上の結果より, VEGF-C/VEGFR-3 シグナルは血管内皮細胞間構造を維持するために単に VE カドヘリンを介する細胞接着を修飾するのではなく, VEGFR-2 シグナルを修飾し, より複雑な機序により血管新生を制御している可能性が示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

VEGFR-3 シグナルはリンパ管新生と共に胎生初期の血管新生に重要な役割を示すことが知られているが, VEGFR-3 に

よる血管新生制御の機序については十分に解明されていない。そこで申請者は細胞レベルにおいて血管新生における VEGFR-3 の役割を検討するために、マウス胚性幹細胞由来の内皮細胞の培養系を確立し、VEGFR-3 の内皮細胞の培養系を確立し、VEGFR-3 の内皮に対する影響について検討した。本培養系において VEGF-C は VEGF-A と異なり内皮細胞塊の拡散作用を認めなかった。VEGF-A は VEGFR-2 を介して作用するのに対して、VEGF-C は VEGFR-2、VEGFR-3 と結合することにより働くことが知られている。以上より、今回の検討における VEGF-A と VEGF-C の効果の違いは VEGFR-3 シグナルが関与している可能性が示された。この可能性を検証するために VEGFR-3 の中和抗体である AFL4 を用いて VEGFR-3 シグナルを阻害したところ、VEGF-A と同様の細胞形態の変化が内皮細胞に認められた。また VEGF-A 阻害時には AFL4 の効果が認められず、AFL4 の働きは VEGFR-2 シグナル亢進によるものではなく VEGFR-3 シグナル阻害によるものと考えられた。

以上の結果より、VEGFR-3 シグナルは VEGF-A / VEGFR-2 シグナルによる内皮細胞の活性を修飾することにより血管新生を制御している可能性が示唆された。

以上の研究は血管新生の機序を明らかにし、消化器癌の腫瘍血管新生の制御の解明に貢献し消化器病学に寄与するところが多い、従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位申請者は、平成15年3月10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。