

|             |                                                                                                                                           |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 河 野 朋 哉                                                                                                                                   |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                 |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 3243 号                                                                                                                              |
| 学位授与の日付     | 平 成 20 年 3 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 病 理 系 専 攻                                                                                                                       |
| 学 位 論 文 題 目 | Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells<br>on OP9 stromal cells.<br>(胚生幹細胞から OP9 を用いたリンパ管上皮細胞への分化誘導について) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 篠 原 隆 司 教 授 開 祐 司 教 授 長 澤 丘 司                                                                                                |

### 論 文 内 容 の 要 旨

目的：リンパ管内皮細胞に特異的に発現するチロシンキナーゼ受容体 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR3) とそのリガンド VEGF-C は、リンパ管形成の中心的な分子機構である。またホメオボックス遺伝子 *prox-1* はリンパ管内皮分化の決定因子であることが報告された。リンパ管内皮細胞は静脈から分岐することがわかっているが、その詳細な分化様式はわかっていない。本研究では、マウスの胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いてリンパ管内皮細胞の分化過程を調べた。

方法と結果：ES 細胞分化系は、生体の発生・分化を *in vitro* で再現する系として知られている。実際、未分化 ES 細胞を collagenIV コートしたディッシュ上で LIF を除いて 96~108 時間培養すると、VEGFR2 陽性 E-cadherin 陰性の血管内皮前駆細胞が分化する。セルソーターを用いてこの細胞を分離し、さらにストローマ細胞 OP9 上で培養すると、リンパ管内皮細胞に分化することを発見した。リンパ管内皮細胞の同定には *prox1*、VEGFR3、podoplanin の免疫染色を用いた。この細胞における *prox1* 発現誘導を経時的に調べると、第 1.5 日目では VEGFR2 陽性 E-cadherin 陰性はすべて *prox-1* 陰性であったが、第 3 日目にはほとんどが *prox-1* 陽性と変化することがわかった。第 1.5 日目の VEGFR2 陽性 E-cadherin 陰性は、VEGFR3 陽性 LYVE-1 陽性 podoplanin 陰性であり、マウス胎児期 9 日静脈にみられる内皮細胞と同じ形質をもっていた。これは成体における静脈内皮とリンパ管内皮の中間的な形質であり、この細胞を「静脈・リンパ管前駆細胞」と位置づけることを提唱した。

次に、リンパ管内皮細胞の分化を決める因子の探索のために、まず OP9 より分泌される VEGF-C や angiopoietin1 の働きが必須かどうかを調べた。それぞれのリガンドをトラップする VEGFR3-Fc や Tie2-Fc キメラタンパクを培養液に混ぜると、OP9 上のリンパ管内皮細胞のコロニー数は抑制され、そのコロニー内のリンパ管内皮細胞数に変化はなかった。一方、collagen でコートしたディッシュに VEGFR2 陽性血管前駆細胞を VEGF、VEGF-C、Ang1 と共に培養してもリンパ管内皮細胞は誘導できなかった。以上から、VEGF-C と angiopoietin1 はリンパ管内皮細胞分化に必須であるが、他に必要な因子があることが示唆された。

次に、OP9 上のタンパクあるいは分泌タンパクいずれにリンパ管内皮細胞分化因子があるのかを調べた。パラホルムアルデヒドで固定された OP9 上で VEGFR2 陽性細胞を培養すると、コロニーは形成されなかった。一方、OP9 のコンディショニングメEDIUMのみを用いて VEGFR2 陽性細胞を培養すると、*prox-1* 陽性細胞が観察された。OP9 から分泌されるタンパク中にリンパ管内皮細胞分化因子が含まれることがわかった。

結論：ES 細胞からリンパ管内皮細胞分化誘導に成功した。この過程で、「静脈・リンパ管前駆細胞」の存在を提唱した。この系は、血管系の分化、すなわち動脈・静脈・リンパ管内皮細胞の分化の詳細を解明するために有用であると考えられる。また、OP9 から分泌されている因子が誘導に関与することが考えられ、VEGF-C、Ang1、その他まだ知られていない因子が必要であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

発生学的にリンパ管は静脈から分岐してくることが観察されているが、リンパ管内皮細胞の起源については十分に理解されていない。申請者は血管前駆細胞から動静脈およびリンパ管内皮細胞へ分化する過程を研究するために、ES 細胞からリンパ管内皮細胞に分化する系を確立することを目的とした。

未分化 ES 細胞を collagenIV 上で分化誘導し 4 日間培養すると、Vascular Endothelial Growth Factor Receptor(VEGFR)-2 陽性の側板中胚葉細胞が出現する。この細胞をフローサイトメトリーにて純化し、collagenIV 上で VEGF を加えるか、ストローマ細胞 OP9 上で培養すると、共に 3 日後に内皮細胞マーカーである VE-cadherin 陽性細胞のクラスターが形成された。CollagenIV 上のクラスターは蛍光免疫染色にてリンパ管分化因子 (prox-1) 陰性であったが、OP9 上のクラスターは prox-1 をはじめとした各種リンパ管内皮細胞マーカー陽性であった。またフローサイトメトリーによる解析でも、同様のリンパ管内皮細胞マーカー陽性の細胞群を認めた。以上より、OP9 を用いて ES 細胞からリンパ管内皮細胞を分化誘導することが可能となった。

以上の研究はリンパ管内皮細胞分化過程の解明に貢献し、静脈とリンパ管内皮細胞分化の関連研究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みとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 25 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。