

京都大学	博士（医学）	氏 名	近 藤 展 行
論文題目	Thrombin induces rapid disassembly of claudin-5 from the tight junction of endothelial cells（トロンビンにより血管内皮細胞のタイトジャンクションからクローディン5の急速な消失が誘導される）		
（論文内容の要旨）			
血管内皮は、あらゆる臓器の維持に欠かせない血液循環に直接関与する多機能な組織である。血管系は血管内皮細胞により内腔を覆われ、循環血液中の分子の移動を調節する役割も果たす。血管透過性に関わる機能の多くは細胞間結合により調節され、種々の物質により細胞間結合に変化が起こる。このときに血管内皮特異的な細胞間の接着分子を観察すると、トロンビンによる透過性亢進時にかぎってタイトジャンクションに特異的な現象を認めた。さらにトロンビン受容体への選択的刺激により同等の結果を得た。 以前の実験成果でマウス胚性幹細胞から血管内皮前駆細胞を分化誘導し、血管内皮細胞を単層形成させた。血管内皮細胞の細胞間結合を観察するには、この血管内皮2次元モデル（endothelial cells derived from embryonic stem cells, EECs）を用いた。EECsは血管内皮への分化・成熟を試験管内で再現し、シート状のコロニーを形成は顕微鏡による細胞構造の観察に適する。血管内皮の細胞間結合には、上皮細胞と同様に、アドヘレンスジャンクション（AJ）とタイトジャンクション（TJ）がある。血管内皮特異的なのは、VEカドヘリン、PECAM（以上AJ）、クローディン5（TJ）である。成体の血管や従来のセルラインと同様に、EECsにおいてもこれらの分子が発現する。 凝固に関わる酵素として知られるトロンビン（セリンプロテアーゼ）は、障害された血管内皮細胞表面で血液凝集を誘導する。一方、炎症性メディエーター、血管作動性物質、成長因子などを血管内皮で合成・分泌させる。血管透過性を増大させる刺激に対するEECsの反応を観察すると、血管内皮増殖因子（VEGF-A）やヒスタミンの投与では、EECsの内皮細胞が高度に収縮して細胞間に明らかな間隙が生じ、細胞間の接着分子は破綻する。しかし、トロンビンの投与では、細胞間の接着分子のうちTJのクローディン5のみに特異的に影響した。トロンビンを投与すると、クローディン5は細胞間から速やかに消失したが、細胞の収縮を認めず、VEカドヘリンの局在にもほとんど変化がなかった。この現象は従来のセルラインを用いた研究において報告がない。 血管内皮細胞にはトロンビン受容体protease-activated receptor（PAR）ファミリーのうちPAR1が発現する。PAR1アゴニストをEECsに用いると、トロンビン投与時と同様、速やかにクローディン5の発現が消失し、VEカドヘリンは影響を受けなかった。 クローディン5の完全消失により脳血管関門で影響はあるものの血管系全体ではほぼ正常に機能すると報告されている。ここで認められる短時間かつ選択的な細胞間接着分子（クローディン5）の消失にどのような生物学的な意味があるかについては明らかではない。しかし、この興味深い現象について解析することは、血管内皮細胞の整合性を制御する機構を解明するために重要な洞察であると考ええる。			

（論文審査の結果の要旨） 血管系は血管内皮細胞に内腔を覆われている。血管内皮細胞は循環血液中の分子の移動を調節する。この機能の多くは細胞間結合により調節される。細胞間結合を観察するために、胚性幹細胞から分化誘導した血管内皮2次元モデル（endothelial cells derived from embryonic stem cells, EECs）を用いた。生体の血管やセルラインと同様に、EECsにおいても血管内皮特異的な分子（VEカドヘリン(VECD)、PECAM、クローディン5 (CLDN5)）が発現する。 血管透過性を増大させる刺激に対する EECs の反応を観察すると、血管内皮増殖因子（VEGF-A）やヒスタミンの投与では、EECs の内皮細胞が収縮して細胞間に間隙が生じ、細胞間の接着分子は破綻する。一方、トロンビンの投与では、血管内皮細胞は収縮せず、VECD の局在にもほとんど変化がなかった。ところが、細胞間の接着分子のうち CLDN5 だけは細胞間から速やかに消失した。 血管内皮細胞にはトロンビン受容体 protease-activated receptor（PAR）ファミリーのうち PAR1 が発現する。PAR1 アゴニストを EECs に用いると、トロンビン投与時と同様、速やかに CLDN5 の発現が消失する一方、VEカドヘリンは影響を受けなかった。ここで認められる短時間かつ選択的な CLDN5 の消失の生物学的学な意味は不明だが、この興味深い現象が血管内皮細胞の整合性を制御する機構を解明する一助となると考える。 以上の研究は、血管内皮特異的な CLDN5 が PAR1 を介して一時的に消失することを示し、血管内皮細胞の細胞間接着の機構の解明に貢献し、細胞生物学的な血管内皮の機能解析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22年 1月 6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			