

氏 名	そ 曾 ね 根 まさ 正 かつ 勝
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2714 号
学位授与の日付	平 成 16 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells に関する研究 (霊長類とマウス由来胚性幹細胞における血管前駆細胞の分化動態の相違に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 北 徹 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

申請者の研究室においては、マウス ES 細胞から誘導された血管内皮増殖因子 VEGF の受容体である VEGF-R2 陽性細胞は、血管内皮細胞および壁細胞（ペリサイトおよび血管平滑筋細胞）の双方に分化する能力を持ち、in vivo および in vitro にて血管構造を構築し、「血管前駆細胞（vascular progenitor cell:VPC）」として働くことが明らかにされている。本研究では、ES 細胞由来 VTC の再生医療への応用を目指し、サル ES 細胞を用いて霊長類における VTC の性状及び分化動態の解析を行った。

マウス ES 細胞では、未分化な ES 細胞は VEGF-R2 を発現していないが、コラーゲン IV コートディッシュ上で 4 日間分化誘導を行うと 30～40% が VEGF-R2 陽性となるが、サル ES 細胞はマウス ES 細胞と異なり、未分化な状態ですでに大半の細胞が VEGF-R2 を発現していた。これらの VEGF-R2 陽性細胞は未分化 ES 細胞の頭頂であるアルカリフォスファターゼ活性や胚様体形成能を持っていた。サル ES 細胞をマウス ES 細胞と同様にコラーゲン IV コートディッシュ上で分化誘導を試みたが、マウス ES 細胞と同等の細胞密度・条件ではコラーゲン IV 上に生着しなかった。そこで、マウス線維芽細胞系ストローマ細胞株である OP9 細胞との共培養系にてサル ES 細胞の分化誘導を行い、VEGF-R2 と内皮細胞マーカーである VE カドヘリンの発現をフローサイトメトリーにて経時的に解析したところ、未分化状態で認められた VEGF-R2 の発現が、分化誘導 4～6 日目に一度ほぼ消失したのち、分化誘導 8 日目に再び約 8% の細胞群が VEGF-R2 陽性でかつ内皮マーカー VE カドヘリン陰性となった。これらの 8 日間の細胞は未分化 ES 細胞が有するアルカリフォスファターゼ活性を持たず、VEGF-R2 を陽性の未分化 ES 細胞とは異なるものであった。この分化誘導 8 日目の VEGF-R2 を陽性 VE カドヘリン陰性細胞を FACS にて分離し、OP9 上でさらに 5 日間再培養したところ、VE カドヘリン陽性・PECAM 1 陽性・内皮細胞一酸化窒素合成酵素陽性の血管内皮細胞が出現した。一方、この分化誘導 8 日目の VEGF-R2 陽性 VE カドヘリン陰性細胞をコラーゲン IV コートディッシュ上にて血清刺激下で 5 日間再培養を行うと、これらの細胞群は VEGF-R2 陽性の未分化サル ES 細胞と異なりコラーゲン IV 上に良好に生着し、 α 平滑筋アクチン陽性カルボニン陽性の壁細胞が出現した。また、そのコラーゲン IV コートディッシュ上での培養において VEGF 刺激を加えると、 α 平滑筋アクチン陽性の壁細胞に囲まれて PECAM 1 陽性の血管内皮細胞も出現した。更にこれらの細胞はコラーゲンゲルによる 3 次元培養にて管腔構造を形成し立体的な血管様構造を構築した。

これらの結果により、分化誘導後出現した VEGF-R2 陽性 VE カドヘリン陰性細胞は霊長類における VPC であることが証明された。また、その分化動態はマウスと異なることが示された。従って ES 細胞を用いた分化機構の解明および ES 細胞の再生治療への臨床応用には霊長類における検討が不可欠であることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ES 細胞の血管再生への臨床応用を目指し、申請者は霊長類であるカニクイザル ES 細胞を用いて、血管構成細胞である血

管内皮細胞と壁細胞（ペリサイト及び血管平滑筋細胞）両方に分化する能力を持つ血管前駆細胞の存在を検討した。カニクイザルES細胞はマウスES細胞と異なり未分化な状態でVEGF-R2を発現していたが、ES細胞をOP9細胞との共培養系にて分化誘導を行うと、8日後には、未分化なES細胞とは異なる、アルカリフォスターゼ活性陰性のVEGF-R2陽性細胞が約8%出現した。これらの8日目のVEGF-R2陽性かつ血管内皮マーカーVEカドヘリン陰性細胞をFACSにて分離し、再培養したところ、VEカドヘリン陽性PECAM 1陽性eNOS陽性の血管内皮細胞および α 平滑筋アクチン陽性カルボニン陽性の壁細胞が出現した。またこの細胞をコラーゲン1Aゲル内にて3次元培養したところ管くう構造を形成した。これらの結果により、VEGF-R2の発現の経時的変化はマウスES細胞と霊長類ES細胞では異なるが、分化誘導後に出現したVEGF-R2陽性VEカドヘリン陰性細胞は霊長類においても血管前駆細胞として働くことが示された。以上の研究は、霊長類ES細胞由来血管前駆細胞の同定とその分化におけるマウスとの相違点の解明に貢献し、ES細胞を用いた血管再生医療の開発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16年1月27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。