

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
金村昌徳	主査 教授 植 木 實 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 芝 山 雄 老
主論文題名 MS-818 accelerates mobilization of endothelial progenitor cells and differentiation to endothelial cells (MS-818 は血管内皮前駆細胞の動員と血管内皮細胞への分化を促進する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>生体内での虚血性変化に対しておこる血管新生は、その臓器の機能保護に対して重要であり、また、悪性腫瘍の生体内での増殖、進展に対しても同様に深く関与していることが知られている。血管新生のメカニズムの解明はこれら悪性腫瘍等の疾患に対する治療を考える上で有用とされ、多数の報告がなされている。近年、成人体の循環血液中に血管内皮前駆細胞の存在が証明され、その細胞の血管内皮細胞への分化が血管新生の場で重要な役割を演じていることが明らかとなってきている。一方本邦で合成された神経成長因子様ピリミジン化合物MS-818は、bFGF(basic fibroblast growth factor)の血管新生能、種々の神経栄養因子のニューロン数の増加および神経突起の伸長作用、末梢神経障害、筋肉障害、骨折の修復への促進作用を有することが知られており、再生医療の観点から非常に興味深い物質であると考えられている。そこで今回、MS-818単独での血管新生へ及ぼす影響を検索するとともに、血管新生および脈管発生のメカニズムを解明することを目的とした。</p> <p>《方 法》</p> <p>(1) 血管内皮細胞の遊走能へ与える影響</p> <p>ウシ細動脈内皮細胞(BCECs)を35mm dish上でconfluentになるまで培養し、かみそり刃で一部細胞を除去した状態で24時間培養を続け、その部位に遊走した細胞をカウントしMS-818添加群と対象群との比較検討を行った。</p> <p>(2) 血管内皮細胞の管腔形成能へ与える影響</p> <p>BCECsをtypeI collagen gel上でconfluentになるまで培養し、無血清培地でさらに3日間培養を継続し形成した管腔の全長をNIH image programを用いて計測しMS-818添加群と対象群との比較検討を行った。</p> <p>(3) マウス末梢血中単核細胞層の分離とフローサイトメーターによる解析</p> <p>4週齢のマウス(C57BL/6N)に対しMS-818(1or10mg/kg/day)もしくは生食単独を2日間腹腔内投与し3日目に心臓より全血を採血し、濃度勾配遠心法で単核細胞層を分離した。これら細胞の総数をカウントし、CD34、Flk-1/KDR(VEGFR-2)、VE-cadherinの蛍光標識をしたモノクローナル抗体を反応させ、フローサイトメーターによる解析を行った。</p>	

(4) マウス骨髄由来Lin⁻細胞のin vitroでの分化に与える影響

4週齢のマウス(C57BL/6N)の大腿骨より骨髄を採取し、マグネットビーズ法(MiltenyiBiotec)によるnegative sortingによりLin⁻細胞を分離し、分化誘導培地を用いてフィブロネクチン上で4日間培養しMS-818添加群と非添加群に分け、さらに10日間培養を継続した後にvon Willebrand factor(vWF)の免疫染色より血管内皮細胞へ分化した細胞を蛍光顕微鏡下で計測した。

(5) マウス胚性幹細胞のin vitroでの分化に与える影響

マウス胚性幹細胞のcell lineであるMG1.19をフィーダー細胞であるOP9上で5日間共培養することによりMG1.19を分化誘導し、MS-818添加群と非添加群において血管内皮細胞への分化効率を血管内皮細胞のマーカーとされるVE-cadherinの蛍光標識されたモノクローナル抗体を用いてフローサイトメーターで解析した。

(6) シグナル解析

confluentとなったBCECsを0.1%血清下で24時間培養し、各濃度のMS-818(0,10,100μM)を添加し15分間培養した細胞から蛋白を抽出し、Erk1/2(extracellular signal-regulated kinase)、Aktのリン酸化をウエスタンブロッティング法により解析した。

《結果および考察》

MS-818がbFGFの血管新生を促進するという報告がYasuharaらによりなされたが、単独での作用は明らかではない。今回の結果では、MS-818はin vitroでの実験系で血管内皮細胞に直接作用し、遊走能および管腔形成能を促進することが明らかになった。また、近年、成人の末梢血中に血管内皮前駆細胞が存在していることがAsaharaらにより報告され、成人体内での血管新生に重要な役割を果たしていることが明らかにされたが、今回、MS-818のマウスへの腹腔内投与により、末梢血中の血管内皮前駆細胞が豊富に含まれていると考えられている単核細胞の総数が増加し、血管内皮前駆細胞に発現しているといわれているCD34、Flk-1/KDR(VEGFR-2)、VE-cadherin陽性細胞数も有意に増加を示した。さらにin vitroでマウス骨髄由来のLin⁻細胞を用いた分化誘導実験においてはMS-818添加により有意にvWF陽性細胞の増加が認められた。また、マウス胚性幹細胞を用いた分化誘導実験では、MS-818の添加により血管内皮細胞のマーカーとされるVE-cadherinの陽性細胞増加が認められた。これらの結果は、MS-818が血管内皮細胞に対して直接的に作用し、さらに血管内皮前駆細胞を動員し血管内皮細胞への分化を促進することにより血管新生を惹起するというメカニズムの存在を示唆している。最後に、シグナルに及ぼす影響をみたところ、MS-818は濃度依存性にErkのリン酸化を促進したが、Aktのリン酸化には影響を及ぼさなかった。これはMS-818が促進する遊走や管腔形成がMAPK pathwayを介して起こることを示唆していると考えられた。

《結 論》

本研究から、MS-818が血管内皮細胞に対するMAPK pathwayを介した直接的な作用と、血管内皮前駆細胞の動員および分化により血管新生および脈管発生を促進することが判明した。MS-818は神経栄養因子としての作用に加え血管新生促進作用を有している化合物であり、脳虚血等の疾患に対する臨床応用が期待される薬剤であると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	金 村 昌 徳
論文審査担当者		主 査 教 授 植 木 實 副 査 教 授 大 槻 勝 紀 副 査 教 授 谷 川 允 彦 副 査 教 授 北 浦 泰 老 副 査 教 授 芝 山 雄 老	
主論文題名 MS-818 accelerates mobilization of endothelial progenitor cells and differentiation to endothelial cells (MS-818 は血管内皮前駆細胞の動員と血管内皮細胞への分化を促進する)			
論文審査結果の要旨			
<p>血管新生のメカニズムの解明は生体内での虚血性疾患や悪性腫瘍に対する治療を考える上で有用とされている。また、近年、成人の循環血液中に血管内皮前駆細胞の存在が証明され、その細胞の血管内皮細胞への分化が血管新生の場で重要な役割を演じていることが明らかになってきており、下肢虚血性疾患に対する細胞治療に応用されつつある。一方、本邦で合成された神経成長因子様ピリミジン化合物MS-818は、bFGFの血管新生能の促進や種々の神経栄養因子のニューロン数の増加および神経突起の伸長作用などを有することが知られており、再生医療の観点から非常に興味深い物質であると考えられている。申請者は、MS-818単独での血管新生へ及ぼす影響を検索し、以下の結果を得た。</p> <p>(1) MS-818はin vitroでの実験系で血管内皮細胞に直接作用し、遊走能および管腔形成能を促進する。</p> <p>(2) MS-818のマウスへの腹腔内投与により、末梢血中の単核細胞の総数が増加し、血管内皮前駆細胞に発現しているといわれているCD34、Flk-1、VE-cadherin陽性細胞数も有意に増加を示した。in vitroでマウス骨髄由来のLin⁻細胞を用いた分化誘導実験においてはMS-818添加により有意にvWF陽性細胞の増加が認められた。</p> <p>(3) マウス胚性幹細胞を用いた分化誘導実験では、MS-818の添加により血管内皮細胞のマーカーとされるVE-cadherinの陽性細胞の増加が認められた。</p> <p>(4) シグナルに及ぼす影響では、MS-818は濃度依存性にErkのリン酸化を促進したが、Aktのリン酸化には影響を及ぼさなかった。</p> <p>申請者は、MS-818が血管内皮細胞に対するMAPK pathwayを介した直接的な作用と、血管内皮前駆細胞の動員および分化により血管新生および脈管発生を促進することを明らかにしている。MS-818は神経栄養因子としての作用に加え血管新生促進作用を有している化合物であり、再生医療への応用を考える上で重要な知見を与えるものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Endothelium 11: 221-230, 2004</p>			