

氏 名 (本 籍)	渡 邊 格 子 (岐 阜 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 2 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 8 年 9 月 1 3 日
学 位 論 文 題 目	In Vitro Model for Mouse Coronary Vasculogenesis (マウス冠動脈発生の三次元的培養下における検討)
審 査 委 員	主 査 教 授 松 浦 博 副 査 教 授 遠 山 育 夫 副 査 教 授 清 水 猛 史

## 論文内容要旨

*整理番号	534	(ふりがな) 氏名	わたなべ のりこ 渡邊 格子
学位論文題目	In Vitro Model for Mouse Coronary Vasculogenesis (マウス冠動脈発生の三次元的培養下における検討)		
<p>【目的】冠動脈の発生に、心外膜の原基となる心外膜前駆組織 (Proepicardial Organ (PEO)) の細胞が関与することが報告されている。しかし、心外膜と冠動脈発生との関係や冠動脈の発生に作用する因子など、冠動脈発生過程の詳細については明らかにされていない。筆者らは PEO の細胞を培養し、<i>in vitro</i> での細胞の生育と増殖を観察しながら、形成される組織がどういった形態学的・分子生物学性状を有するか、また血管成長因子により管腔形成が促進されるか検討した。</p> <p>【方法】正常 ICR マウス胚における冠動脈発生を組織学的に経時的に観察した。次に、妊娠 9.5 日の ICR 母マウスから胎仔を摘出し、直ちに PEO を切除した。切除した組織から得られた細胞群をウシ血清添加コラーゲン培地上に静置し、37℃の恒温槽内で 72 時間から 288 時間培養した。培地内で形成される組織の形態と細胞の性状を明らかにするため免疫組織染色を行った。また、培養組織から RNA を経時的に抽出し、発現する因子を RT-PCR により分子生物学的に解明した。さらに血管成長因子を含む種々の成長因子や細胞接着因子を無血清培地中に添加し、血管形成を促進する因子の同定を試みた。</p> <p>【結果】胎生 9.5 日の正常マウスにおいて、血管内皮細胞のマーカである Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) 陰性の PEO が認められた。胎生 12 日頃に心臓表面に PECAM 陽性の管腔様構造物が出現し、これが冠動脈の原基と考えられた。胎生 9.5 日のマウス胚から PEO を採取し、ウシ血清添加コラーゲン培地にて細胞培養を開始したところ、PECAM 陽性の管腔構造が形成され、これは血管内皮細胞を有する脈管であることが明らかとなった。蛍光免疫染色により 培養 12 日目には PECAM 陽性細胞の周囲に血管平滑筋細胞のマーカである <math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin (<math>\alpha</math>-SMA) 陽性細胞が認められた。また、培養組織から経時的に RNA を抽出して分子生物学的解析を行ったところ、種々の血管成長因子 (Flt-1, Flk-1, b-FGF, VEGF, HGF) が発現していることが明らかとなった。血管形成の早期に作用するといわれる Flt-1 及び Flk-1 が PEO 培養の早い段階で発現していたが、管腔が伸張してくるにつれ、bFGF の発現が認められ、Flt-1 及び Flk-1 の発現は消失した。無血清培地に個々あるいは複数の血管成長因子を添加して PEO 細胞の培養を行ったところ、各培地における培養組織の形態に差は認めるものの、いずれにおいても脈管形成は認められなかった。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【考察】正常マウスにおける PEO には PECAM の発現が免疫染色においても RT-PCR においても認められなかったことは、PEO そのものには血管内皮細胞が存在しないことを示唆する。しかし、PEO をウシ血清添加コラーゲン培地で培養することで PECAM 陽性の管腔、つまり血管が形成されることが明らかとなった。また、免疫染色において血管平滑筋細胞のマーカである  $\alpha$ -SMA 陽性の細胞を認め、RT-PCR でも血管平滑筋細胞のマーカである SM22 $\alpha$  の発現を認めたことから、PEO の細胞群から血管が形成されることが示された。このことから、ウシ血清含有コラーゲン培地において、生体内と同じ機序で PEO から血管の形成が行われていることが明らかとなり、冠動脈発生の *in vitro* でのモデルとなると考えられた。無血清培地における PEO の培養実験で、血管成長因子の無添加培地では PEO の培養組織に形態的变化は認めなかった。また HGF, VEGF, bFGF を個々、あるいは組み合わせて添加した培地でも細胞の広がりや認めるものの、脈管形成は認められなかった。以上より、個々の血管成長因子のみでは PEO は血管形成を行うことができず、他の因子を含め、これらが複雑に関与していることが示唆された。

【結論】PEO は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に分化しうる細胞を含んだ組織であり、ウシ血清含有コラーゲン培地での培養により、*in vitro* で脈管（冠血管）形成することが可能であった。しかし、PEO から血管形成を誘導するにはこれらの因子を含む多くの増殖因子が複雑に関与していることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	534	氏名	渡邊 格子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は冠血管の発生で重要な役割を担っている proepicardial organ (PEO) の細胞を培養し、生育と増殖を <i>in vitro</i> で観察しながら、脈管系に分化するのか、またその分化が血管増殖因子により促進されるのかについて、形態学的・分子生物学的に検討を行ったものである。</p> <p>血清含有コラーゲン培地で培養された PEO から生体内の冠血管と同じ構造を有する脈管の形成が認められ、PEO は血管内皮・血管平滑筋細胞に分化し得る細胞を含んだ組織であることが明らかとなった。これまで哺乳動物の PEO を培養し、脈管系への分化を示した報告はなく、ヒトの冠血管発生に関する研究のモデルとして利用が可能と考えられた。</p> <p>一方、無血清コラーゲン培地においては、血管増殖因子無添加で培養もしくは代表的な血管増殖因子である bFGF、HGF、VEGF を単独あるいは複数の組み合わせ添加した培養でも血管形成は認められなかった。この結果は、これらの血管増殖因子のみでは PEO から血管の分化を誘導することができず、他の因子を含め様々な因子が複雑に関与していることを示唆している。</p> <p>本研究は冠血管発生の <i>in vitro</i> でのモデルを作成し、PEO から冠血管の分化に関与する因子について検討した論文であり、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認められる。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 18 年 8 月 30 日実施の論文内容とそれに関する試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
(平成 18 年 9 月 5 日)			