

学位論文題名

Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5
and CD31 interactions with filamentous actin.

(内皮細胞管腔形成はカドヘリン5およびCD31
と線維性アクチンとの相互作用に依存する)

学位論文内容の要旨

毛細血管形成は、血管内皮細胞に特異的な機能であり、この機能の発現のためには血管内皮細胞間接着が重要であると考えられている。内皮細胞間の接着分子としてカドヘリン、インテグリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するCD31(PECAM-1)があるが、毛細血管形成においてどの分子が重要な働きをしているかはまだ分かっていない。そこで我々は、SCIDマウスを用いた *in vivo* の血管新生モデルと、培養血管内皮細胞を用いた *in vitro* の血管新生モデルを作成した。

正常ヒト皮膚をSCIDマウスに移植し、2週後生着を確認した後、ヒト皮膚にナイフで創傷を作り、創傷下にカドヘリン5、Nカドヘリン、CD31に対するヒト特異阻抑制抗体を単独または同時に皮下注射した。6日後、創傷部位の皮膚から凍結標本を作り、創傷治癒段階における増生血管を、ヒト血管をUlex Europeus Agglutinin(UEA)-1レクチンを用い、またマウス血管をマウス特異CD31抗体を用いて免疫組織染色した。コントロールおよびカドヘリン5、Nカドヘリン、CD31に対する阻抑制抗体を単独で皮下注射した群では、潰瘍部においてマウス由来血管とヒト由来血管が両者とも増殖している像が確認されたが、カドヘリン5およびCD31を同時に阻抑制したところ、ヒト由来血管のみに増殖抑制効果がみられた。この実験から、カドヘリン5とCD31が血管新生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

カドヘリン5およびCD31の血管新生における働きをさらに調べるために、マトリゲルを用いた *in vitro* 血管新生モデルに画像解析を応用し、血管新生アッセイを行った。ラミニンを主成分とする間質成分であるマトリゲル上で内皮細胞を培養すると、約24時間で毛細血管網に似たネットワークを形成する。このモデルに阻抑制抗体を加え、ネットワークの分断化をコンピューターを用いた画像解析により定量化した。結果は *in vivo* の結果と

同様に、カドヘリン5、CD31に対する阻止抗体を単独で加えた場合コントロールとの間に差は見られなかったが、これらを同時に作用させるとネットワークの有意な分断化の増加が見られた。

CD31はCD31自身にホモティピックに接着する他に、ヘパリンの非存在下に糖蛋白に接着すること、また $\alpha v \beta 3$ インテグリンへのヘテロティピックな接着もあることが知られている。このモデルでは、培地にヘパリンが含まれているため、糖蛋白への接着は関与していないと考えられた。また、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンに対する阻止抗体はカドヘリン5に対する阻止抗体と同時に用いてもネットワークの分断化の有意な増加はなかったことより、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンを介した接着も、内皮細胞のネットワーク形成には関与していないと考えられた。

CD31には6つのドメインがあり、ホモティピックな接着にはドメイン2が、ヘテロティピックな接着にはドメイン2とドメイン5が関与していると考えられている。そこで、ドメイン2を阻止するモノクローナル抗体2種とドメイン5を認識するモノクローナル抗体1種を用いてネットワーク形成を見たところ、ドメイン2を阻止する抗体のみにネットワークの分断化が見られた。このことから、血管新生においてはCD31のドメイン2が重要であることが考えられた。

カドヘリン5はアドヘレンスジャンクションにおいて、細胞内蛋白カテニンを介して細胞骨格に関連していることが知られている。血小板を用いたモデルでは、活性化した血小板でCD31が細胞骨格と関連していることも報告されている。そこで、カドヘリン5とCD31に対する阻止抗体が、細胞骨格に与える影響を調べたところ、カドヘリン5とCD31のいずれかの阻止では影響はなかったが、両方を阻止した場合アクチン線維の繊維状の構造が失われ、塊状となることが分かった。これは、マトリゲル上のネットワークを作った細胞でも、単層培養した細胞でも見られた。そこで、逆にアクチン線維を阻害するとネットワーク形成がどうなるかを調べた。サイトカラシンDを用いてアクチンを阻害したところネットワークの分断化が見られた。

この実験結果は、カドヘリン5とCD31が相補的に働きうることを示している。そこで、両者は共通の細胞内蛋白を介してアクチン線維と関連しているのではないかと考えた。カドヘリン5は細胞内蛋白 β カテニンと結合していることが知られているので、CD31も β カテニンと関連しながらアクチン線維と連絡しているのではないかと考え、免疫沈降法を用いてCD31とカテニンの関連を調べた。細胞溶解液を抗 β カテニン抗体で免疫沈降し、沈降物を免疫ブロットしたところ、沈降物の中にカドヘリン5のみならず少量のCD31も検出された。逆に抗CD31抗体で免疫沈降すると、少量の β カテニンが検出された。このことから、CD31のうちの一部は β カテニンと関連していると考えられた。

今回の一連の実験により、カドヘリン5とCD31が細胞骨格と関連しつつ機能的な一つの単位を作っていることが分かったが、血管内皮細胞のホモティピックな細胞間接着は、血管新生のみならず炎症細胞浸潤の際にも重要な役割を演じていると考えられ、これら接着分子を調べることにより、炎症性細胞浸潤の解明にも役立つと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 大 河 原 章

学 位 論 文 題 名

Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin.

(内皮細胞管腔形成はカドヘリン5およびCD31
と線維性アクチンとの相互作用に依存する)

本論文は血管内皮細胞の特異的機能である毛細血管形成に、血管内皮細胞間接着因子が、どのように関わっているのかをin vivo血管新生モデルと、培養内皮細胞を用いたin vitroモデルで検討したものである。創傷治癒過程の血管新生において、細胞接着分子であるカドヘリン5並びにCD31に対する特異的抗体を用いたin vivoの阻止実験では、両者を同時に作用させた時にのみ血管新生の抑制が認められた。マトリゲルを用いたin vitro血管新生モデル実験では、培養24時間後に、毛細血管網に類似したネットワークを形成するが、カドヘリン5並びにCD31に対する阻止抗体を同時に作用させると、ネットワークの分断化が認められた。又、カドヘリン5並びにCD31に対する阻止抗体が細胞骨格成分であるアクチン線維にあたえる影響を検討し、接着因子の機能を阻害すると、アクチン線維の細胞内分布が変化し、凝集化が起ることを示した。更に、ウエスタンブロット法にて、ベータカテニンに対する抗体による内皮細胞の免疫沈降物中にカドヘリン5とCD31が存在することより、血管内皮においても細胞膜貫通分子であるカドヘリン5とCD31が細胞内に存在するベータカテニンと物理的にも関連していることを証明した。これらの研究結果はカドヘリン5とCD31が細胞骨格と関連しながら、皮膚における血管内皮細胞による血管新生を制御していることを証明した貴重な研究である。

審査に当たっては副査の菅野教授から1)血管内皮をマトリゲル上で培養した時の、ネットワーク形成と管腔形成の関係、2)細胞膜貫通分子の細胞外ドメインを認識する抗体で処理して、細胞骨格の断片化がおこるメカニズム、3)ネットワーク形成した血管の機能等についての質問があった。次いで副査の長嶋教授より1)カドヘリン5やCD31を欠損した血管内皮をマトリゲル上で培養したら、管腔形成を認めるか、2)管腔形成における

FGF やVEGF等の増殖因子の関与等についての質問があった。さらに副査の大河原教授より、炎症細胞の血管外遊走におけるカドヘリン5やCD31の役割についての質問があった。最後に主査の上出教授より管腔形成において、他の細胞間接着装置、コネクシンやオククルージンの関与についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は明確な回答をなしえた。今後、in vivoおよびin vitroの血管新生モデルを用いた研究により、皮膚における炎症細胞浸潤の機序を解明するすることができるかと期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。