



Title	Discovery of transcription factors involved in the maintenance of resident vascular endothelial stem cell properties
Author(s)	小西, 博堯
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96323
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	小西 博堯
論文題名 Title	Discovery of transcription factors involved in the maintenance of resident vascular endothelial stem cell properties (血管内皮幹細胞の維持に関わる転写因子の発見)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>血管内皮細胞は我々の全身をめぐる血管の最も内側にある細胞で、酸素や栄養分を送達するパイプを形成する役割だけでなく、組織の恒常性の維持や組織再生にも重要である。組織維持には、各組織の幹細胞が関わっており、それぞれの組織において、造血幹細胞や間葉系幹細胞を始めとして、様々な前駆細胞や幹細胞の存在が示されてきた。しかしながら、各組織に必ず存在する血管において幹細胞性を持った血管内皮細胞はこれまで発見されてこなかった。幹細胞を特定する手法として幹細胞が持つABCトランスポーターを利用したSP解析がある。これは、ABCトランスポーターを発現する幹細胞は核染色試薬Hoechstに染まりにくいことから、フローサイトメトリーによって通常の細胞とは異なる分画に存在することを利用して幹細胞を同定する手法である。このSP解析を用いて幹細胞分画をFACSによって分離した細胞の網羅的遺伝子発現解析から、CD157を発現する血管内皮細胞が高い増殖性を示し、自己複製、分化能を持つ幹細胞であることを示してきた。この血管内皮幹細胞は虚血、腫瘍によって増殖活性を示すことや、放射線障害による組織障害後に新血管を構築し、組織修復に寄与することは分かってきたが、その具体的な制御遺伝子、シグナル伝達経路は明らかではなかった。今回、シグナル伝達経路の末端に存在する転写因子に着目し、CD157を発現する血管内皮幹細胞を制御する転写因子を同定することを本研究の目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>始めに、JASPARデータベースからCD157プロモーター領域に結合する可能性があり、且つCD157陽性血管内皮細胞に発現する転写因子を網羅的遺伝子解析から絞り込んだ結果、20種類の転写因子が候補因子となった。それぞれの転写因子を挿入したレンチウイルスを作製し、不死化されたマウス内皮細胞 (MS-1) に感染させた結果、10種類がRT-PCR法によりCD157を増加させることが判明した。生理的な血管内皮幹細胞はABCトランスポーターを発現し、SP解析によりSP分画に多く存在するように、この10種類の転写因子を過剰発現させた細胞はいくつかのABCトランスポーターの発現とSP分画を増加させた。10種類からさらに絞り込むために、10種類が誘導するSP分画にどの転写因子が含まれているのかをRT-PCR法によって調べた結果、6種類(Atf3、Bhlhe40、Egr1、Egr2、Elf3、Klf4)がSP分画に多く存在した。これら6種を過剰発現させたMS-1は増殖能、tube formation assayにより管腔形成能の促進が見られた。また、フローサイトメトリーによってCD157のタンパク質レベルでの発現増加も見られた。転写因子がCD157プロモーター領域に直接結合するのかをChIP assayによって調べた結果、6種の中で少なくともKlf4はCD157の上流-789~-440に結合した。最後に、6種の中でどの段階からCD157陽性血管内皮幹細胞に貢献するのかをE14からW8における肝臓血管内皮細胞のsingle-seqによって解析した。その結果、CD157が初めて発現したE18のCD157陽性細胞においてAtf3とKlf4の発現が高く、Klf4は約80%陽性だった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>以上の結果をもって、血管内皮幹細胞を制御する転写因子を複数同定し、Klf4はCD157陽性肝臓血管内皮幹細胞の初期から幹細胞発生に寄与することが分かった。これらの転写因子が幹細胞性を持つのかはKOマウスや初代培養細胞など用いて、さらなる解析が求められる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小西 博堯

	(職)	氏名	
論文審査担当者	主査	大阪大学教授	高倉伸幸
	副査	大阪大学教授	坪川正人
	副査	大阪大学教授	石谷 太

論文審査の結果の要旨

血管に少数存在する血管内皮幹細胞の存在は示されているが、どのようなシグナル伝達によって制御されているかは未明であった。本論文では、シグナル伝達経路の末端に位置する転写因子に着目して、血管内皮幹細胞を制御する転写因子の同定及び、発生段階、異なる組織の血管内皮幹細胞の転写因子の発現を比較することで、転写因子ネットワークを理解することを目的とした。マウス内皮細胞に候補転写因子を過剰発現する研究デザインによって、血管内皮幹細胞の特徴であるCD157とABCトランスポーターを誘導する転写因子を同定した。その結果、最終的に6種類の転写因子に絞り込み、それらの因子は血管内皮幹細胞が持つ血管新生、増殖能を示した。また、組織によって血管内皮幹細胞の構成する転写因子が異なることが分かった。さらに、同定した転写因子の内、Klf4は初期の肝臓血管内皮幹細胞発生に強く貢献することが示唆された。以上をもって、本研究は学術上極めて有益であり、学位論文に値するものと認められる。