

論文内容要旨

Nestin and Notch3 collaboratively regulate angiogenesis, collagen production, and endothelial–mesenchymal transition in lung endothelial cells

(血管新生、線維化、EndoMT における肺 Nestin 陽性細胞の役割)

Cell Communication and Signaling, 2023, in press.

主指導教員：服部 登教授

(医系科学研究科 分子内科学)

副指導教員：藤高 一慶講師

(医系科学研究科 分子内科学)

副指導教員：中島 歩教授

(医系科学研究科 幹細胞応用医科学)

大道 和佳子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：Nestin は、中間径フィラメントタンパクの一種であり、様々な組織において血管新生、内皮間葉転換 (EndoMT)、線維化との関与が報告されている。肺における Nestin 陽性細胞の役割には相反する報告があり、心筋梗塞ラットモデルの肺で血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞がコラーゲンとともに Nestin を発現し EndoMT に関与していたとする報告がある一方、肺 Nestin 陽性細胞は CD31 陰性であるとする報告もある。つまり、肺において Nestin 陽性細胞は EndoMT などを介して線維化に関与している可能性があるが、一定の見解が得られていない。

目的と方法：マウス血管内皮細胞株 MS1 と Nestin-GFP マウスを用い、肺 Nestin 陽性細胞の役割を明らかにする。

結果：Nestin-GFP マウス肺細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、Nestin 陽性細胞は全肺細胞のうち 1%未満と稀少であり、ほぼ全てに CD31 発現が認められた。くわえて上皮細胞マーカーEpCAM や間葉系細胞マーカーPDGFR β も高発現していた。全肺細胞を CD31 陽性、陰性細胞にわけて Nestin の発現を比較すると、前者で明らかに高かった。つまり肺 Nestin 陽性細胞は血管内皮に属するが、上皮系、間葉系マーカーも共発現する特殊な分画であった。

血管新生に対する Nestin の働きについての検証では、Nestin 陽性の血管内皮細胞では、陰性の血管内皮細胞と比較し、血管新生に重要な役割を担う VEGFR や PDGFR β の発現が有意に高かった。血管新生の様子を肉眼的に観察できる三次元的な培養実験では、Nestin 陽性の血管内皮細胞は陰性の血管内皮細胞と比較して盛んな血管新生が観察された。

血管内皮細胞株 MS1 に Nestin-siRNA を作用させたノックダウン実験では、Col1a1 の発現上昇を認めた。Nestin をノックダウンしたうえで TGF β による EndoMT 誘導を行ったところ、コントロール群と比較し Nestin ノックダウン群で間葉系マーカーの上昇を認めた。つまり、Nestin は EndoMT やコラーゲン産生を遮る役割を担っており、ノックダウンによってコラーゲン産生や EndoMT が促進されたと考えた。

肺 Nestin 陽性細胞を用いた RNA シークエンス解析結果より、Nestin 陽性細胞では Notch3 というペリサイトの働きに関わる因子が高発現していることが判明した。さらに、先述の MS1 における Nestin のノックダウンにより Notch3 発現が低下すること、一方で Notch3 のノックダウンでは Nestin の発現低下は来さないことを示した。つまり、Nestin が Notch3 を制御しておりこれらが共同して EndoMT に関与していることを見出した。

動物実験では、siRNA 製剤の経気道投与による肺 Nestin ノックダウンモデルマウスを作製した。同モデルマウスの肺において、Notch3 発現低下および間葉系マーカー発現上昇を認めた。さらに、マウスブレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおいて、Nestin の mRNA および蛋白の低下、Notch3 やペリサイトマーカーの発現低下を認めた。つまり、細胞実験と同様の動態を生体内において追視した。また、ブレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスでは、線維化の指標であるヒドロキシプロリン値と肺 Nestin 陽性細胞数に負の相関があることを示した。

結語：Nestin は Notch3 を制御し、これらが共同して血管新生、線維化、EndoMT を制御

することを明らかにした。