

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	大道 和佳子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	東 幸仁	印
審査委員	教授	岡田 守人	
審査委員	准教授	宮田 義浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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 などを通じ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。そこで著者らは、マウス血管内皮細胞株 MS1 と nestin-GFP マウスを用い、肺 nestin 陽性細胞の役割を解明すべく研究を行った。</p> <p>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PDGFRβ 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。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。</p> <p>血管新生に対する nestin の働きについての検証では、nestin-GFP マウスから採取した nestin 陽性の血管内皮細胞は、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 VEGFR2 や PDGFRβ 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。</p> <p>血管内皮細胞 MS1 に TGFβ を添加した EndoMT 誘導モデルでの検証では、時系列に沿った遺伝子発現の変化を観察した。Colla1 や EndoMT 関連の mRNA の発現上昇に先んじて、nestin の発現が有意に上昇していた。よって、nestin は、EndoMT の発生早期段階に関与していると考えられた。</p> <p>MS1 に nestin-siRNA を作用させたノックダウン実験では、Colla1 の発現上昇を認めた。Nestin をノックダウンしたうえで TGFβ 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早期段階で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。</p> <p>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 という血管新生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を示した。一方で、MS1 における Notch3 のノックダウンでは、nestin の発現低下を認めず、上昇することを示した。従って、nestin はその下流にある Notch3 を制御していること、そして、コラーゲン産生や EndoMT に対しては、nestin と Notch3 が共同的に関与していることを見出した。</p> <p>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、CD31 陽性細胞における Notch3 発現低下および間葉系</p>			

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 の発現低下を認めた。細胞実験と同様の動態を生体内において確認した。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。

以上の結果から、本論文は、nestin が Notch3 を制御し、これらは共同して、血管新生、線維化、EndoMT を制御することを明らかにした。肺 nestin 陽性細胞の働きについて新しい知見を示した報告である。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。