

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

大澤 祥 印

(学位論文のタイトル)

Fibronectin on extracellular vesicles from microvascular endothelial cells is involved in the vesicle uptake into oligodendrocyte precursor cells.

(微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞上に存在するフィブロネクチンはオリゴデンドロサイト前駆細胞への取り込みに関与する)

(学位論文の要旨)

大脳皮質下白質の虚血による脱髄は運動機能および認知機能の低下をきたすことが知られているが、虚血性脱髄に対する確立された治療法は存在しない。筆者らはこれまでラットの内包の虚血性脱髄モデルを作成し、脱髄巣に脳微小血管内皮細胞(MVECs; microvascular endothelial cells)を移植することで脳梗塞巣が縮小し運動機能が改善することを報告した。またMVECsの移植によって髄鞘形成に関わるオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs; oligodendrocyte precursor cells)が増加することも明らかにした。OPCsが増加する機序としてMVECsより分泌される細胞外小胞(EVs; extracellular vesicles)がOPCsの生存・増殖を促進させている可能性を報告した。EVsはタンパク質、脂質、核酸を含む小胞であり、細胞間コミュニケーションに関与していることが知られている。したがってMVECs由来のEVs (MVEC-EVs)中のOPCs生存・増殖促進分子を明らかにすることで白質梗塞に対する治療法の開発につながるのではないかと考えた。本研究ではMVEC-EVsがOPCsの生存・増殖を促進するメカニズムについて特にタンパク質に着目して解析した。

MVEC-EVsがOPCsに作用する機序として、まずEVsの膜表面タンパク質がOPCsの受容体に結合することで作用していると考えた。MVEC-EVsを抽出し、その膜表面タンパク質のペプチドライブラリーを作成して質量分析を行った。その結果、MVEC-EVsの表面にはfibronectinが存在することが明らかになった。Fibronectinはintegrinに結合し、OPCsの生存・増殖を促進することが知ら

れている。MVEC-EVs表面のfibronectinをEnzyme-Linked Immunosorbent Assayで定量するとラットの線維芽細胞様細胞株であるRat-1のEVsと比較してfibronectinが多く存在していることが明らかになった。したがってMVEC-EVsはその表面のfibronectinによりOPCsのintegrinに結合することで生存・増殖を促進しているのではないかと考えた。

そこでintegrinへの結合配列を持つRGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid) ペプチドミミックをOPCsとプレインキュベートし、fibronectinとOPCs上のintegrinの結合をブロックした上でMVEC-EVsを投与したところ、RGD ペプチドミミックはMVEC-EVsのOPCsに対する生存・増殖促進効果を減弱しなかった。したがってMVEC-EVsは fibronectinによるintegrinを介したシグナルではなく、OPCsへ取り込まれた後にその内容物により作用しているのではないかと考えた。

EVsの取り込みについては複数の経路が知られているが今回筆者はヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG; Heparan Sulfate Proteoglycan)に着目した。細胞表面にはHSPGが発現しており、EVs表面のfibronectinが細胞表面のHSPGに結合することでEVsの取り込みが引き起こされることが報告されている。したがって種々の条件下でfibronectin-HSPGの結合阻害を行い、PKH67で蛍光標識したEVsをOPCsに投与してflow cytometryおよび蛍光度の定量解析を行うことで取り込みを評価した。その結果、fibronectin-HSPGの結合を阻害することでEVsの取り込み低下が認められた。

次に同様の条件下でOPCsにEVsの投与を行い、生存・増殖を評価した。その結果、EVsとHSPGの結合を阻害することでEVsによるOPCの生存・増殖促進効果が減弱した。

以上より、fibronectinはintegrinを介した信号伝達ではなく、OPCs上のHSPGを介した取り込み促進により、EVsのOPCs生存・増殖促進に寄与していることが明らかとなった。