

氏 名	こぶけ かず ひろ 小 夫 家 和 宏
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2418 号
学位授与の日付	平 成 14 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	ESDN, A Novel Neuropilin-like Membrane Protein Cloned from Vascular Cells with the Longest Secretory Signal Sequence among Eukaryotes, Is Up-regulated after Vascular Injury (真核生物で最長の分泌シグナル配列を有するニューロピリン類似の新規膜蛋白 ESDN の単離と, 傷害血管における発現に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 米 田 正 始 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

血管系は哺乳類などの多細胞生物に必須のシステムで, その病的破綻は動脈硬化に由来する成人病, 経皮的冠動脈形成術後の再狭窄など数多くのヒト疾患の病態に関与している。この分野においてこれまで多数の細胞外情報伝達分子の研究がなされてきたが, 全ての現象を十分に説明できる段階には到っていない。血管系においてなお未知の細胞外情報伝達分子が存在するものと仮定して今回その検索を試みた。

方法と結果

ヒト冠動脈内皮及び平滑筋の初代培養細胞から得られた cDNA ライブラリーに対しシグナルシーケンス・トラップ法による新規遺伝子の検索を行い, CUB ドメイン, 凝固第 V / 第 VIII 因子相同ドメインおよび LCCL ドメインを有する新規 I 型膜蛋白の全長 cDNA のクローニングを行い, “内皮・平滑筋由来ニューロピリン類似分子 (ESDN)” と命名した。またマウスとラットの相同遺伝子の全長 cDNA の塩基配列も同定した。タグ付き全長 cDNA を強制発現させた 293T 細胞の細胞可溶化物のウェスタン・ブロットからは糖鎖付加によると思われる 3 種の産物が確認された。また, 同一産物を検出できる抗ペプチドポリクローナル抗体の作成にも成功した。タグ付き全長 cDNA を強制発現させた COS7 細胞の共焦点レーザー顕微鏡による観察から ESDN は細胞膜表面に局在することが確認された。また, ESDN の細胞外領域, あるいはその分泌シグナル配列だけを CD5 のそれと入れ替えたキメラ蛋白の cDNA を強制発現させた 293T 細胞の培養上清のウェスタン・ブロットにて同一分子量の産物が確認された。この 2 つの実験より ESDN の分泌シグナル配列が実際に機能していることが示された。ESDN の遺伝子座は STS データ等により家族性非特異的痴呆症と重なるヒト第 3 染色体中心体近傍に位置することが示された。ヒト・ラットでのノザン・ブロットからは, ESDN は比較的広範な分布を示すものの血管平滑筋細胞での発現が強い共通点を示した。また, 定量的 RT-PCR 法からヒト冠動脈平滑筋初代培養細胞においては PDGF-BB 刺激により mRNA の発現が亢進することが見出された。更にラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける発現を定量的 RT-PCR 法と免疫組織染色にて調べたところ, 傷害後 14 日目に mRNA が有意に上昇しており, 蛋白の局在は傷害前後とも血管中膜の平滑筋細胞に認めるものの傷害 14 日目には新生内膜でより強い発現を示すことが判明した。ESDN の全長または一部を欠損させた cDNA を強制発現させた 293T 細胞の増殖能を BrdU の取り込みで調べたところ, 前者では有意な増殖抑制効果が見られるのに対し, 後者ではその効果は消失していた。また ESDN はラット頸動脈に伴走する迷走神経, 頸神経わなにおいても発現を認めた。

考察

本研究は血管細胞での細胞外情報伝達に関わる可能性を持つ新規膜蛋白 ESDN の全長 cDNA 配列をヒト・マウス・ラットにおいて決定し, 真核生物におけるこれまでで最長の分泌シグナル配列を実験的に確認した。更に mRNA と蛋白の発現解析から血管平滑筋, 中でも血管傷害後の新生内膜との関わりを指摘, cDNA の強制発現の実験結果と併せ ESDN が増殖

抑制シグナルを担う可能性を示唆した。また、ESDNは神経系にも発現しており、ニューロピリンと同様血管系のみならず神経系においても何らかの機能を有する可能性が示された。ESDNのリガンドの同定や細胞内情報伝達経路の解明、神経系における役割など多彩な問題提起の端緒となる仕事であり、今後この分子に関する研究の更なる進展が期待される。

論文審査の結果の要旨

近年様々な細胞間情報伝達分子の解析を通じ血管系についての理解が深まりつつある。その更なる展開を目的として、申請者らは血管系における新規膜蛋白・分泌蛋白の単離・解析を試みた。ヒト冠動脈血管内皮及び平滑筋細胞より作成したcDNAライブラリに対しシグナルシーケンスストラップ法によるスクリーニングを行い、ESDN（血管内皮・平滑筋細胞由来ニューロピリン類似分子）と命名される新規膜蛋白をクローニングし、更にマウス・ラットの相同遺伝子も同定した。ESDNの分泌シグナル配列は真核生物の中で最長で、実際に分泌シグナルとして機能することを示した。ESDNの発現は培養血管平滑筋細胞で強く、PDGF刺激により更に亢進することを見出した。次にラット頸動脈バルーン傷害モデルを用い、傷害後14日目の新生内膜においてESDNの発現が亢進していることを示し、ESDNを強制発現させた293T株化細胞でBrdUの取り込み能が抑制される結果と併せ、ESDNが新生内膜形成に対し抑制性のシグナルを担う可能性を指摘した。また、迷走神経・頸神経ワナにおいて発現していることから、ニューロピリンと同様にESDNが神経系においても何らかの役割を果たしている可能性を示した。

以上の研究は血管系で働く新たな膜蛋白の同定とその生理的・病理的な役割の解明に貢献し、血管生物学及び循環器内科学に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位申請者は、平成13年11月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。