

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 三平 元

本研究は、心臓発生、臓器線維症において重要な役割を演じていると考えられている内皮間葉移行 (endothelial to mesenchymal transition: EndMT) の分子機序を明らかにするため、マウス臍臓由来血管内皮細胞 (MS-1) の TGF- $\beta$ 2 による EndMT のシグナル経路の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. MS-1 細胞に TGF- $\beta$ 2 を投与して、24 時間後にはアクチンストレスファイバーの形成が認められ、72 時間後には細胞間接着が消失し、内皮細胞マーカーである細胞膜上の VE-カドヘリンタンパク質が検出されなくなり、間葉系細胞マーカーである $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$ 、ファイブロネクチン 1、MMP2 の発現が上昇した。以上の結果より、MS-1 細胞は TGF- $\beta$ 2 により EndMT が誘導されることが示唆された。
2. EMT においては、Snail ファミリー (Snail, Slug)、 $\delta$ EF-1 ファミリー ( $\delta$ EF-1, SIP-1) の関与が多く報告されているが、MS-1 細胞に TGF- $\beta$ 2 を投与して EndMT を誘導しても、Slug、 $\delta$ EF-1、SIP-1 の発現誘導は認められなかった。一方、TGF- $\beta$ 2 刺激により Snail の発現上昇は認められたが、Snail の発現をノックダウンしても TGF- $\beta$ 2 刺激による $\alpha$ -SMA の発現上昇は影響をうけなかった。以上の結果より、TGF- $\beta$ 2 による MS-1 細胞における $\alpha$ -SMA の誘導に、Snail 転写因子は必要ではないことが示唆された。
3. Rho ファミリータンパク質は細胞運動、細胞周期、細胞質分裂、アポトーシス、転写など広範に細胞機能の制御に関わっており、EMT においても Rho シグナルの活性化の関与がいくつか報告されている。そこで、TGF- $\beta$ 2 による MS-1 細胞における $\alpha$ -SMA の発現における Rho シグナルの関与を検討した。TGF- $\beta$ 2 は MS-1 細胞において RhoA を活性化した。TGF- $\beta$ 2 によるアクチンストレスファイバー形成ならびに $\alpha$ -SMA の発現誘導は、Y27632 や C3 菌体外酵素といった Rho シグナル阻害剤により抑制された。以上の結果より、TGF- $\beta$ 2 による MS-1 細胞における $\alpha$ -SMA の誘導には、Rho シグナルの活性化が必要であることが示唆された。
4. 乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞における TGF- $\beta$ による EMT における Rho シグナルの活性化は non-Smad 経路に依存している。そこで MS-1 細胞における TGF- $\beta$ 2 による間葉系細胞マーカーの発現上昇に Smad 経路が関与するか検討した。TGF- $\beta$ 2 による $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$ 、ファイブロネクチン 1、MMP2 の発現上昇は、Smad4 発現のノックダウンにより抑制された。以上のことより TGF- $\beta$ 2 による MS-1 細胞における間葉系細胞マーカーの発現上昇には Smad 経路が関与することが示唆された。
5. RhoA を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange

factor: GEF) は約 60 種類以上知られており、TGF- $\beta$ による EMT において Net1、GEF-H1 などの GEF の関与が報告されている。TGF- $\beta$ 2 処理した MS-1 細胞で発現が上昇する GEF を同定するために、cDNA マイクロアレイ解析による mRNA の発現プロファイリングを行った。Arhgef5 が TGF- $\beta$ 2 により発現が上昇しており、TGF- $\beta$ 2 による $\alpha$ -SMA の発現上昇は Arhgef5 発現のノックダウンにより抑制された。また、TGF- $\beta$ 2 による Arhgef5 の発現上昇は Smad4 発現のノックダウンにより抑制された。以上の結果より、Smad4 依存的に TGF- $\beta$ 2 により発現が上昇する Arhgef5 は、TGF- $\beta$ 2 による $\alpha$ -SMA の発現上昇に寄与していることが見出され、Arhgef5 が Smad 経路の下流で Rho 活性化を制御する分子の候補であることが示唆された。

6. MRTF-A は myocardin ファミリーに属し、細胞の筋分化関連遺伝子の転写を促進する血清応答因子のコファクターとして働く。G-アクチンに結合して細胞質に局在する MRTF-A は Rho シグナルが活性化されストレスファイババーが形成される際に、G-アクチンから遊離し核内へ移行することが知られている。そこで TGF- $\beta$ 2 による MS-1 細胞の EndMT における MRTF-A の局在を検討した。TGF- $\beta$ 2 により核内 MRTF-A タンパク質量は増加したが、Y27632 による Rho シグナル経路の抑制によって阻害された。TGF- $\beta$ 2 により細胞全体の MRTF-A の発現上昇が認められたが、この発現変化は Rho シグナル阻害の影響を受けなかった。一方、TGF- $\beta$ 2 による細胞全体の MRTF-A の発現上昇は Smad4 発現のノックダウンにより抑制された。以上の結果より MS-1 細胞においては、TGF- $\beta$ 2 は MRTF-A の核内移行および発現上昇を促進し、MRTF-A を活性化していることが見いだされた。さらに、その核内移行には Rho シグナル活性化が重要であるが、一方で、その発現上昇には Rho シグナル活性化を促す Smad 経路が、Rho シグナルとは独立して、重要であることが示唆された。

7. MS-1 細胞において TGF- $\beta$ 2 による $\alpha$ -SMA の発現上昇に MRTF-A が必要か検討するため、MRTF-A 発現のノックダウンを行ったところ、TGF- $\beta$ 2 による $\alpha$ -SMA の発現上昇は顕著に抑制された。次に、MRTF-A が $\alpha$ -SMA の発現上昇に対して十分条件であるか検討した。恒常活性型 MRTF-A をレンチウイルスを用いて MS-1 細胞に発現させると $\alpha$ -SMA の発現上昇が認められた。以上の結果より、TGF- $\beta$ 2 による $\alpha$ -SMA の発現上昇には MRTF-A が必要であり、MRTF-A は TGF- $\beta$ 2 と同様に $\alpha$ -SMA の発現上昇をもたらすことが示唆された。

以上、本研究は MS-1 の EndMT における間葉系細胞マーカー発現調節メカニズムを探索し、Rho シグナルの活性化、MRTF-A の発現量調節がいずれも Smad 経路により調節されているという新たな知見を見出した。本研究における EndMT 機構の解明は、EndMT の関与が示唆される病態の解明、疾病予防および治療法の開発に、大いに貢献する可能性があると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。