HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腸管リンパ管内皮細胞はR-Spondin3を産生する［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	小笠原, 励起
Description	配架番号：2368
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12989号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70365
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Reiki_Ogasawara_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　小笠原　励起

審査担当者
主査　有賀　正
副査　橋野　聡
副査　佐藤　典宏
副査　清野　研一郎

学 位 論 文 題 名

腸管リンパ管内皮細胞はR-Spondin3を産生する
(Intestinal Lymphatic Endothelial Cells Produce R-Spondin3)

申請者から小腸においてR-Spondin (R-Spo)のうちR-Spo3がもっとも多く産生されていること、R-Spo3を産生しているのはリンパ内皮細胞であること、リンパ内皮細胞は移植片対宿主病（GVHD）において減少することが発表された。

審査にあたり、まず副査の橋野聡教授からリンパ内皮細胞は腸において幹細胞を刺激する以外の働きがあるのかという質問があり、申請者は、リンパ内皮細胞はリンパ管を形成し、腸管から吸収した栄養成分を流していたり、免疫細胞の流路を形成したりすることを説明した。また興味深いことにconditional knockoutで腸リンパ内皮をknockoutすると、腸管からの細菌の流入により敗血症をきたすという報告があり、腸管において支持組織として働き、物理的なバリアを形成している可能性があると回答した。R-Spo3以外のR-Spo1,2などは腸幹細胞を刺激するのかとの質問があり、申請者は、R-Sposは相同性が高く、同様にLgr5に結合することでR-Spo1はin vivo, in vitroでともに腸幹細胞を刺激することが示されていると回答した。R-Spo3の産生に影響を及ぼす因子などについて検討したかとの質問があり、申請者は、内因性のR-Spo3を刺激してGVHDを改善させるかということを検討するべく実験を行なったと回答し、さらにリンパ内皮細胞の増殖因子であるVEGF-CのレセプターであるVEGFR3のチロシンキナーゼ阻害薬の投与を行なったが、positiveな結果がでず、阻害薬自体が効いているのかも含めて今後検討するべきであると回答した。ヒトでのR-Spoについてどこまでわかっているのかとの質問があり、申請者は、いままでに報告されているリコンビナントヒトR-Spo1の投与でマウス腸幹細胞は刺激されているとの報告があり、ヒトのR-Sposでも同様にヒトの腸幹細胞を刺激しうると回答した。また、ヒト腸でR-Spo3が小腸リンパ内皮細胞からでているのかはさらに検討すべき点であると回答した。造血幹細胞移植モデルにおいてリンパ内皮細胞はホストの細胞であるのかと質問があり、申請者は、検討はできていないが内皮細胞でありおそらく造血細胞からできるとは考えづらく、ホストの細胞であると考えていると回答した。

副査の佐藤典宏教授から腸リンパ内皮細胞は他の臓器のリンパ管と性質が異なるのかという質問があり、申請者は、皮膚のリンパ内皮細胞のcell lineでR-Spo3を発現していないことを確認しており、臓器によりリンパ内皮細胞の性質は異なる可能性があると回答した。

腸上皮を刺激する細胞としてリンパ内皮細胞に着目したのは粘膜固有層にあるという局在なのかという質問があり、申請者は、当初間葉系細胞が分泌し、CD31 陰性 CD90 陽性の細胞群で発現が高いことを想定していたが、意外にも CD31 陽性 CD90 陽性細胞であるリンパ内皮細胞であることが発見されたと回答した。R-Spo3 を治療に使う上で、R-Spo3 の多臓器への影響はないのかと質問があり、R-Spo1 の投与の系では表現系は腸上皮の増多だけであり、成人マウスへの他の作用や毒性は確認できていないが、今後検討すべき事項であると回答した。

副査の清野研一郎教授からリンパ内皮細胞が他のマウスの系統やヒトでも R-Spo3 を同様に産生しているのかと質問があり、申請者は C57BL/6 では確認しているが、ヒトについては確認できておらず、今後検討すべきであると回答した。ヒトの腸では他の R-Spos を発現しているのかと質問あり、そこは検討できていないと回答した。R-Spo1 が腸 GVHD を改善させる効果があるとのことだが他の皮膚や肝臓についても効果があるのかと質問があり、申請者は、腸 GVHD を改善させると全身のリンパ球活性化を抑えることになり、全身の GVHD を改善させることになるので直接的な効果は確認することが難しいと回答した。腸の粘膜固有層と漿膜層の分離はどのように行なったのかとの質問があり、申請者は、顕微鏡下で用手的に行なったと回答した。GVHD で上皮のほかリンパ内皮細胞がなぜ減るのかとの質問あり、腸上皮においては IFN-γの関与が影響しているとされているがリンパ内皮細胞がどのように減るかというメカニズムは不明であると回答した。腸において myofibroblast は R-Spo3 を発現していないのかと質問があり、申請者は腸の myofibroblast を含む CD90 陽性 CD31 陰性細胞では発現していなかったと回答した。

主査の有賀正教授からリンパ内皮細胞が R-Spo3 を制御する機構している機構が autocrine でいいのかとの質問があり、申請者は Lgr5 の発現から autocrine である可能性があり、今後 R-Spo の投与で LEC の R-Spo の変化が起きるかなどを検討していきたいと回答した。R-Spo3 により腸幹細胞がふえることを示しているのかと質問があり、いままでの文献でそのような報告があるが、今回の実験では示せておらず、今後 R-Spo3 抗体などを用いることで示していきたいと説明した。大腸についても同様なことが示せているのかと質問があり、大腸細胞の回収の問題から示せていないと回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。