

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of the physiological function of WAVE2

和訳 WAVE2 の生理的機能の解析

指導教官 竹縄忠臣 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 山崎大輔

細胞が運動する際には糸状仮足や葉状仮足が細胞先端に生じ、細胞が推進する力を与える。これらの膜構造の変化にはアクチン細胞骨格の再構成が必要である。WASP ファミリータンパク質は Rac や Cdc42 の下流でアクチンの重合を制御しており、外からの刺激にตอบสนองしたアクチン細胞骨格の再構成において必須の分子である。なかでも WAVE ファミリータンパク質は、Rac によって誘導される波打ち膜形成において不可欠である。細胞運動は形態形成に必須の過程であるが、それがどのような機構により制御されているのかは未だよく分かっていない。

我々は形態形成における細胞運動の役割を調べるために、WAVE ファミリータンパク質のひとつである WAVE2 の遺伝子欠損マウスを作製した。WAVE2 欠損マウスは、胎生 8.5 日目より発生に顕著な遅れが認められ、胎生 10 日前後で頭部での浮腫の形成や心臓に出血が認められ致死であった。このことから WAVE2 はマウスの発生に必須の役割を果たしていることが示された。

抗 WAVE2 抗体をもちいた免疫組織化学的な検討から、胎生 10 日前後において WAVE2 は血管内皮細胞および心臓の内皮細胞に強く発現していた。一方この時期において他の WAVE ファミリータンパク質である WAVE1 は多くの組織で発現しており、なかでも神経管でとくに強い発現が認められた。しかしながら WAVE3 はこの時期ではほとんど発現は認められなかった。このように WAVE2 は胎生初期において血管内皮細胞において主に発現している WAVE ファミリータンパク質であること、また WAVE2 欠損マウスでは出血が認められることから、WAVE2 は血管の発生に関与している可能性が考えられた。

そこで発生初期の血管を血管内皮細胞のマーカーで免疫組織染色したところ、20 体節期までに起こる血管発生の過程において、WAVE2 欠損マウスにおいて血管形成はほぼ正常に起こっていた。しかしながらつづいて起こる血管新生の過程において、WAVE2 欠損マウスでは卵黄嚢や頭部の毛細血管などにおいて新たな血管の発芽や既に形成されていた血管のリモデリングが著しく抑制されていた。このことから WAVE2 は胚発生期の血管新生において重要な役割を担っていると考えられる。

WAVE2 欠損マウスで心臓の発生が異常であったが、上に述べた血管発生の欠陥が心臓の機能の欠陥による二次的な影響ではないことを確かめるために、胎生 9.5 日胚を用いた器官培養を行った。14 日間培養したのち血管内皮細胞のマーカーで染色したところ、WAVE2 の欠損はこのような試験管内の系においても、血管内皮細胞による血管発生にはほとんど影響を与えず血管新生の段階を著しく阻害した。これまでの結果と併せて考えると、WAVE2 欠損マウスで認められる血管新生の抑制は、心臓の欠陥による二次的な現象ではなく、血管内皮細胞になんらかの欠陥がある可能性を示している。

一方、胎生期の血管新生が抑制されるいくつかの遺伝子破壊マウスでは、血管内皮細胞とその管腔を覆う周皮細胞との接着に異常が認められるものもあるが、WAVE2 欠損マウスでは周皮細胞の発生に欠陥は認められなかった。

WAVE2 欠損マウスの血管の異常をさらに詳細に検討するため、電

子顕微鏡による形態の観察を行った。WAVE2 欠損マウスでは管腔を形成する血管内皮細胞自体の細胞数が少なく、その形態は野生型のそれと比較してより平板であり、また野生型の場合に認められる細胞外への細胞膜の突起様の構造が認められないなど異常な形態を示した。加えて WAVE2 欠損マウスの血管内皮細胞は、内皮細胞同士の細胞間接着は正常に形成されるものの、細胞の途中に穴が開いておりその間隙から血球細胞が漏出してくる様子が観察された。これらの観察から WAVE2 欠損マウスでは血管内皮細胞に異常が認められることが示された。

WAVE2 の血管内皮細胞における機能を調べるため、WAVE2 の優性抑制変異体を血管内皮細胞に異所発現させたときの影響を検討した。WAVE2 は細胞運動時に細胞先端に形成される葉状仮足に局在することから、WAVE2 の機能を阻害することにより細胞の運動能が低下することが予想される。そこで血管形成時に血管内皮細胞の運動を制御している血管内皮増殖因子に対する血管内皮細胞の走化性を検討したところ、WAVE2 の優性抑制変異体の発現によりそれは抑制された。このことから WAVE2 は血管内皮細胞の運動を制御することが示唆された。

WAVE2 の細胞運動における機能をさらに詳しく解析するために、WAVE2 欠損マウスより胚性繊維芽細胞を単離した。WAVE2 を欠損した繊維芽細胞では、運動する細胞先端での葉状仮足形成が著しく抑制され、また実際に運動能の低下が認められた。

以上の結果から、WAVE2 が葉状仮足形成を介して細胞運動を制御することが示され、また WAVE2 に制御される血管内皮細胞の運動が血管新生に重要な役割を担っていると考えられる。