

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成14年度博士課程 進学
氏名 地神 貴史
指導教官 秋山 徹

論文題目

Wnt シグナル制御因子 B9L の機能解析

Wnt シグナルは個体の発生、発癌に重要な役割を果たしていることが知られている。

なかでもシグナル経路の構成因子である APC (adenomatous polyposis coli)、 β -catenin はヒトの大腸癌において遺伝子変異を起こしていることが発見され特に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。両変異とも核内の β -catenin の蓄積を引き起こし、その結果転写標的因子の発現が亢進する。近年の精力的な研究から Wnt シグナル経路の制御因子が数多く同定されているが、複雑に制御されている転写調節機構の全てが解明されたわけではない。本研究室では Wnt シグナルを制御する様々な因子を同定し機能を解析しているがこのたび正に制御する因子を同定し B9L と名付けた。(Adachi S, Jigami T, et al. 2004)

B9L は 1493 アミノ酸からなり、B 細胞リンパ腫で活性化している癌遺伝子 BCL9 と全長にわたり 37% の相同性を持っていた。Blast サーチによりゼブラフィッシュをはじめ、マウス、ラット、ヒトなどの脊椎動物にも相同性のある遺伝子が存在することが明らかになった。我々の培養細胞を用いた実験結果から、B9L は β -catenin/Tcf と相互作用し転写標的遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。またヒトの大腸癌組織を用いた RT-PCR、免疫染色の結果、大腸癌において高度に発現の上昇が認められた。Wnt シグナルの構成因子は発生過程やヒトの病気とも密接に関係しており、B9L の生体内での機能を明らかにすることは非常に興味深く重

要な知見を与えてくれることが期待された。

本研究では B9L の生理的な機能を解析するため、また β -catenin/tcf を介した転写機構が担う生体での役割を明らかにするため B9L 遺伝子欠損マウスの作製および解析を行った。

1, B9L 遺伝子ノックアウトマウスの作製

マウス B9L の塩基配列を元に作製したプローブを用いて C57BL/6 マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、マウス B9L ゲノム断片を得た。B9L の完全欠失を目的としプライミングバリエーションの影響を無視できるように exon2 より変異を導入することとした。ゲノム断片の部分的な塩基配列を決定し、制限酵素地図を作成した後、B9L の発現を X-gal 染色にてモニターできるように 2nd ATG の下流に LacZ 遺伝子をインフレームで挿入したターゲットベクターを構築した。TT2 ES 細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入し相同組み換え体を単離、同定し、得られたポジティブクローンを用いてアグリゲーション法によりキメラマウスを作出した。

2, マウス胎仔における B9L 遺伝子の発現様式

ヘテロマウスを X-gal 染色した結果、B9L は E10.5 マウス個体においてほぼユビキタスに発現していた。そこで切片を作製し詳細に観察ところ、特に背側大動脈および脊索に強いシグナルが出ていた。また、卵黄嚢においては動脈系に強く、胎盤においては脱落膜領域、ラビリンスレイヤーにシグナルが認められた。

3, B9L ノックアウトマウスの解析

B9L ヘテロマウス同士を掛け合わせ、新生児の尻尾でタイピングを行ったところ、B9L のホモ個体は正常に生まれてくる群では確認されなかった。そこで、胎生 9 日目で胎仔を取り出し卵黄嚢にてタイピングを行ったところホモ個体が確認された。これ以降 10 日目、11 日目でホモ個体が確認できたが、11 日目ではすでに退縮がかなり進んでおり、B9L ノックアウトマウスは胎生 10 日以降に胎生致死となることが明らかとなった。

3-1 胚体外組織における表現型の解析

マウスの発生では胎生 7 日目の卵黄嚢において初期の血管形成、造血が始まる（一次造血）。この造血はその後胎仔での造血（二次造血）が営まれる胎生 9 日前後まで続くということが知られている。卵黄嚢では血島と呼ばれる細胞集団ができ、内側の細胞は血球へと分化し、外側の細胞が血管内皮細胞に分化し大小不同のない原始血管叢を形成する（vasculogenesis）。この均一な血管叢から発芽、分岐、融合、

嵌入、退縮を繰り返すリモデリングと呼ばれる過程を経て新たな管腔が形成され全身に分布する成熟した血管システムが形成される (angiogenesis)。

B9L ノックアウトマウスの卵黄囊の外観は明瞭な血管が認められず蒼白であった。切片を作製し HE 染色にて構造を観察したところ血管内の血球の顕著な減少が認められた。また、血管内皮細胞のマーカである PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) 抗体にて染色したところ血管構造の異常が認められた。

胎盤は、胎仔が酸素やその他の栄養分を親から受け渡される重要な組織である。なかでもラビリンスレイヤーと呼ばれる母体由来の血管と胎仔の血管が共存する領域が重要な働きをし、ホモ個体で注目したところ母親由来の血管、血液は認められたものの胎仔由来の血管、血液が認められなかった。

上記のことから B9L は胚体外組織の血管形成において重要な機能を果たしていることが明らかになった。

3-2 胎仔における表現型の解析

胎生 9 日のホモ個体は、野生型に比べると外見上特に異常は認められなかった。しかし胎生 10 日になると外観上では、成長の遅滞や頭部の形成不全、心臓を含む様々な部位での内出血が認められた。ホモ個体のなかには心臓において心膜が肥大化し、loop 形成に異常をきたしているものも観察された。そこで、E10.5 の胎仔についても PECAM 染色したところ、頭部において野生型では緻密な血管構造が認められたが、ホモ個体では経の太い粗雑な血管構造が観察され、卵黄囊同様 angiogenesis の不全が示唆された。さらに血管構造を詳細に解析するため E10.5 の胎仔の毛細血管の電子顕微鏡観察を行ったところ、ホモ個体では野生型に比べ外径が太く、血管内皮細胞同士の接着面が短く接着性が脆弱であることが示唆された。これらの結果から B9L は血管形成において重要な機能を担っていると考えられた。

OP9 ストローマ細胞の上に E9.5 のマウスの P-sp 領域 (para-aortic splanchnopleural mesoderm) を血清、IL-6、IL-7、SCF、Epo 存在下で共培養すると vascular bed と呼ばれる内皮細胞のシートができ、そこから延びる血管の構造が二次元的に再現されることが知られており P-sp アッセイと呼ばれている。そこで、B9L の欠失により P-sp アッセイによる血管構造形成に差が見られるかどうか検討したが、ホモ個体と野生型で顕著な差は見いだされなかった。生体では、血管は内皮細胞の管腔構造の外側を平滑筋細胞が取り巻くことにより構成されているので、in vitro での二次元的な系では差が見られなかった可能性があると考えられる。

マウスの心臓形成は初期の円筒形のチューブ構造が looping と呼ばれる屈曲を経て構築される。これまでに Wnt1 は予定心臓領域の neural crest cell で発現しており、心臓形成過程において Wnt シグナルが重要な機能を担っていることが示唆されている。この現象は胎生 9 日前後で起こりその屈曲は 10 日目でも続く。そこで B9L ノ

ックアウトマウスで心臓に着目して観察したところ、ホモ個体の中にはこの looping に異常をきたしたものが観察された。さらに連続切片を作成し HE 染色にて構造的な差異を検討したところ、心臓の肉柱 (torabeculae) の形成不全を起こしている個体も確認された。また、心室の心筋層の厚さが野生型に比べ薄いことも認められた。

4, 総括

B9L ノックアウトマウスの解析から、B9L がマウスの発生過程で卵黄嚢、胎盤、胎仔いずれにおいても重要な働きをしていること、特に血管、心臓の形成に必須のはたらきをしていることが明らかとなった。これまでに、Wnt のレセプターである Fzd5 ノックアウトマウスや血管内皮細胞特異的に β -catenin を欠損させたマウスが同様の表現型を示すことが報告されている。今後、B9L ノックアウトマウスをさらに詳細に解析することにより、血管形成における Wnt シグナルの役割を転写の分子機構のレベルで解明することが可能になると期待される。