

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 14 年度博士課程 入学

氏 名 松井 利康

指導教員名 九郎丸 正道

論文題名 マウス生後血管形成における *Sox17* および *Sox18* の相補的な役割

近年、血管内皮細胞の発生、増殖、分化および形態形成に關与する遺伝子の同定と機能解析が飛躍的に進み、血管形成における分子機構の多くが解明されてきた。しかしながら、血管形成における複雑な分子機構を、標的遺伝子の発現制御により調節する転写因子の役割は、未だ断片的にしか解明されておらず不明な点が多い。最近、ヒト *SOX18* 遺伝子の点変異が、劣性および優性のリンパ水腫/毛細血管拡張/先天性貧毛疾患の原因であることが報告され、転写因子 *Sox* のヒト先天性疾患への関与が明らかにされた。*Sox* (*Sry*-related HMG box gene) ファミリーは、哺乳類の精巢決定遺伝子 *Sry* の DNA 結合ドメインである HMG ボックスに高い相同性を示す一連の転写因子群であり、様々な細胞の分化決定に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。*Sox* ファミリーは、その一次構造から幾つかのサブグループ (A-H) に分類することができる。このうち *Sox18* は、*Sox7* および *Sox17* と共にサブグループ F に属している。マウス *Sox18* 遺伝子の変異は、ヒト *SOX18* 変異と同様に、4 つのアレル変異体 *Ra*、*Ra(Ja)*、*Ragl* および *RaOp* を含めて、*ragged* 変異マウスにおける出血、チアノーゼ、水腫および乳糜性腹水を伴う血管系異常、ならびに貧毛および被毛異常を伴う毛包発生異常の原因となる。その一方で、

Sox18 遺伝子欠損マウスは生存率、繁殖能力とも正常であり、軽度の被毛異常のみで、血管系の異常は示さない。*Sox*ファミリーでは、同じサブグループに属すメンバーが、同一の細胞種で共発現し、相補的に機能することが報告されている。したがって、*Sox18* 遺伝子欠損マウスの血管系における表現型の消失は、*Sox17* およびあるいは*Sox7* が、*Sox18* の機能損失を相補する可能性を強く示唆する。しかしながら、胎仔期および生後期のマウス血管新生における*Sox17* の発現様式および機能は未だ明らかにされていない。以上の経緯を背景として、本研究では、マウス血管新生における*Sox17* の役割および*Sox18* に対する相補的機能の解明を目的として、*Sox17^{+/-}/Sox18^{-/-}*二重遺伝子改変マウスを作出し、*Sox18^{-/-}*マウスとの表現型の比較解析を行った。

第 1 章では、*Sox17* 遺伝子の胎仔期の新生血管における発現を検討し、*Sox* サブグループ F メンバー (*Sox7*、*Sox17* および *Sox18*) の発現様式について比較検討するために、マウス胎仔での whole mount *in situ* hybridization 法による発現解析を行った。その結果、マウス *Sox17* は、胎齢 8.5 日 (E8.5) の後腸胚性内胚葉、E9.5-10.5 の胆嚢原基で一過性の発現に加えて、E9.5 以降の背側大動脈、体節間の血管および体部の一部の新生血管の内皮細胞において発現することが明らかにされた。マウス胎仔期の後腸胚性内胚葉、胆嚢原基および血管内皮細胞における *Sox17* の発現は、カエル (*Xenopus tropicalis*) での *Sox17 α* の発現様式に類似しており、両種の間での *Sox17* 発現細胞種の高い保存性が推察された。*Sox17* 遺伝子は、脊椎動物の内胚葉形成に共通して重要な機能を担っており、機能の高い保存性が報告されている。したがって、血管内皮細胞での *Sox17* の発現は、血管新生における機能を反映していると思われる。一方、*Sox7* および *Sox18* の新生血管の内皮細胞における発現は、マウスを含めた様々な脊椎動物種において以前に報告されている。本研究においても、マウス *Sox7* および *Sox18* は、E8.5 の背側大動脈、体節間の血管および体部の新生血管における内皮細胞で発現することが確認された。本研究で行われた、マウス胎仔期における *Sox* サブグループ F メンバーの発現解析により、*Sox7*、*Sox17* および *Sox18* の血管内皮細胞での共発現が初めて明らかとなった。このことは、血管新生での *Sox* サブグループ F メンバーの相補的な役割を強く示唆する。

そこで第 2 章では、血管新生における*Sox17* および*Sox18* 遺伝子の相補的機能を明らかにするために、*Sox17^{+/-}/Sox18^{-/-}*二重遺伝子改変マウスを作出し、それらの表現型

を *Sox18*^{-/-} マウスと比較検討した。その結果、一部の *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスが生後発生期に致死することを見出した。また、成体まで生存した *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスにおいて、雄個体は繁殖能力を有するのに対し、全ての雌個体が不妊を呈した。 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスは、生後 7 日齢 (P7) では、メンデルの遺伝法則に従って *Sox18*^{-/-} マウスとほぼ同比率で認められるが、P21 までに約 57% が致死となる。そこで、表現型の肉眼解剖および組織学的所見に基づいて、2 つの群 (強い表現型群: 生後に致死する個体、弱い表現型群: 成体まで生存する個体) へ分類した。

生後致死を示す、強い表現型群の *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスは、P7 において肝臓の重度な変性・萎縮に加えて、腎臓髄質外帯の形成不全を示した。 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウス肝臓では、辺縁部を走行する肝静脈および中心静脈は消失し、血管内皮マーカー PECAM-1 を用いた組織定量的解析において、血管密度は *Sox18*^{-/-} マウスの 55% 程度と著しく減少していた。また、 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスの肝細胞は、一部領域で空胞変性を伴う虚血性壊死像を示し、変性領域は生後日齢の経過に伴い、肝葉全体へと波及していた。一方、 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウス腎臓では、P7 から P14 において、様々な程度の水腎症を伴った著しい髄質外帯の形成不全が見られた。 *Sox18*^{-/-} マウスの腎臓髄質外帯では、尿細管と並走する直血管および直血管から構成される血管束が存在するが、 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスでは血管束が全く形成されず、尿細管および毛細血管の異常な走行が認められた。さらに、 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウス腎臓髄質外帯の血管密度は、 *Sox18*^{-/-} マウスに比べて有意に減少し、尿細管上皮細胞は、肝細胞と同様に虚血性壊死像を呈した。しかしながら、腎臓髄質外帯の形成異常とは対照的に、 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスの皮質領域 (糸球体を含む) および髄質内帯は正常に形成されており、血管密度の変化も見られなかった。成体まで生存する弱い表現型群の *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスは、肝臓、腎臓に加えて、雌雄生殖器における血管異常を示した。性成熟期以降の *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} 雄マウスの陰嚢は突出、腫大しており、蔓状静脈叢の走行異常および拡張が認められた。さらに、 *Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-} マウスの卵巣は、 *Sox18*^{-/-} マウスに比べて萎縮し、発育卵胞および黄体の形成不全が認められた。発育卵胞周囲では、毛細血管の著しい減少が観察された。以上の結果より、 *Sox18* 遺伝子欠損下での 1 アレルの *Sox17* 遺伝子欠損が、生後期の肝臓、腎臓髄質外帯および雌雄生殖器における器官/領域特異的な血管形成異常の原因となることが明らかとなった。生後発生期 (P3-P7) の肝臓、腎臓における *Sox* サブグループ F メンバーの発現解析により、 *Sox17* および *Sox18* は肝臓の洞様毛細血管、腎臓髄質外帯の直血管で共発現を示し

た。これらの知見は、血管内皮細胞における*Sox17* および*Sox18* の協調的な機能が、生後期の血管新生に必須であること、さらに*Sox17* が*Sox18* の機能損失を相補できることを示している。

第3章では、マウス*Sox17* および*Sox18* の生後血管形成における役割を解明することを目的として、着目した血管形成関連因子 (*Tie-1*、*Tie-2* および*Vcam-1*) の発現について、*Sox18*^{-/-}マウスと*Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-}マウスの間で比較検討を行った。血管内皮細胞は、主としてVEGFシグナル系に依存した増殖をするが、*Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-}マウスの血管内皮細胞は増殖 (BrdU標識法) および維持 (TUNEL法) において明らかな異常を示さず、*Sox17*、*Sox18* を介した血管形成機構はVEGFシグナル系から独立して機能する、もしくは下流に位置すると推察された。これは、SOX18 がVEGF/ FLK-1 シグナルの下流で機能する可能性を指摘した、以前の仮説とも一致している。一方、肝臓における*Ang-1* 過剰発現マウスと*Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-}マウスとの表現型の類似性 (血管の減少および拡張)、生後発生期の腎臓髄質外帯の血管束形成における、ANG/TIE-2 シグナル因子と*Sox17*、*Sox18* の発現様式の類似性から、*Sox17*、*Sox18* により制御される血管新生とANG/TIE-2 シグナル系との関係が示唆された。しかしながら、*Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-}マウス肝臓および腎臓において、*Tie-2* の発現に変化は見られなかった。*Tie-2* とは対照的に、血管形成関連因子*Vcam-1* の発現は*Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-}マウスで有意に減少したが、*Vcam-1* 遺伝子欠損マウスは生後期における血管形成異常を示さないことから、血管異常の直接的な原因ではないと考えられる。生後期の器官/領域特異的な血管形成における*Sox*サブグループFメンバーの役割、*Sox17* および*Sox18* により制御される血管形成機構と既知のシグナル系との関係の解明には、*Sox*サブグループFメンバーの新規標的遺伝子の単離、同定も含めて、さらなる解析が必要であろう。

総括すると、本研究により、マウス*Sox17* 遺伝子は*Sox18* と協調して生後期の血管形成に重要な役割を果たすことが初めて明らかとされた。*Sox17*^{+/-}/*Sox18*^{-/-}マウスにおける器官/領域特異的な血管形成異常は、哺乳類の血管形成における*Sox*サブグループFメンバーの相補性を示す直接的な証拠であり、*Sox*サブグループFメンバーの発現様式の多様性が、器官/領域特異的な血管形成に関与する可能性を強く示唆する。