

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 VEGF-C をコンディショナルに発現するトランスジェニック
マウスの作成及び解析

指導教員 吉田進昭教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 塩澤誠司

血管内皮成長因子受容体-3 (VEGFR-3) は成体においてはリンパ管内皮特異的に発現しており、そのリガンドである VEGF-C の刺激によって伝達されるシグナルは、リンパ管形成において極めて重要な役割を果たすことが知られている。しかし、胎生期では初期血管においても発現がみられ、*Vegfr3* 遺伝子欠損マウスでは血管の形成異常によって胎生 9.5 日に致死となる。このマウスでは原始血管叢の階層性獲得が阻害され、大血管が形成されずに、一様に分岐した脈管が形成されることが明らかになった。また、*Vegfr3* 遺伝子欠損マウスの更なる解析から、初期血管形成過程においては VEGF-C による VEGFR-2 の刺激が重要で、VEGFR-3 は VEGF-C に対するデコイとして働くことが示唆された。しかし一方で、デコイとしてではなく VEGFR-3 のシグナル自体が機能性を有すると考えられる報告もなされており、正常な血管発生過程における VEGFR-3 のシグナル自体の役割については未だ明らかでない。

本研究では、血管形成過程において VEGF-C を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、過剰な VEGFR-3 の刺激が血管形成に及ぼす影響の解析

を試みた。この過程において VEGF-C を過剰発現させた場合、胎生致死となりトランスジェニックマウス系統の樹立が困難である可能性が考えられたため、Cre/loxP を用いたコンディショナル系を選択した。

まず、Cre による組み換え前には β -geo を発現し、組み換え後には VEGF-C を発現するトランスジーン (CAG: β -geo:VEGF-C) を構築した。同時に β -geo の代わりに GFP-neo 融合遺伝子 (GeM) を、VEGF-C の代わりに VEGF-C152S を発現するトランスジーン (CAG:GeM:C152S) を構築した。これらのトランスジーンを ES 細胞に導入し、ネオマイシンの類似物質である G418 に対する耐性を指標にクローンを選別した。更に、分化させた際に広範囲に強くリポーター遺伝子を発現するクローンを選別した。これらのクローンでは *in vitro* において Cre 発現ベクターを導入した際に組み換えが起これ、VEGF-C が発現することが確認された。

このようにして得た CAG: β -geo:VEGF-C トランスジェニック ES 細胞を用いてキメラマウスを作出し、雄のキメラマウスを C57Bl/6 系統雌マウスと交配させることで CAG: β -geo:VEGF-C トランスジェニックマウスを得た。性成熟に達したこのトランスジェニックマウスを CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配させ、胎生初期に VEGF-C を発現するマウス (CAG::VEGF-C トランスジェニックマウス) の作出を試みた。その結果、離乳して遺伝子型を PCR により確認した産仔の中に CAG::VEGF-C トランスジェニックマウスは存在しなかった。胎生 17.5 日胚の解析から、2 匹の CAG::VEGF-C トランスジェニックマウスの存在が確認されたが、いずれも壊死していたことから、胎生致死となることが示唆された。

血管形成過程における表現型を解析するため、胎生初期における CAG::VEGF-C トランスジェニックマウス胚の解析を行った。胎生 8.5 日では、CAG::VEGF-C トランスジェニックマウス胚は外観上の著変は確認されなかった。VEGFR-2 の免疫染色ではほぼ全ての内皮細胞が染色されるが、VEGFR-3 免疫染色では背側大動脈はほとんど染色されず、この時期においては卵黄囊上の一部の内皮細胞が染色されるのみであった。

一方、胎生 9.5 日では、CAG::VEGF-C トランスジェニックマウス胚は野生型と比較してやや小さく、卵黄囊上の脈管構造が確認されなかった。しかし、抗 PECAM-1 抗体によるホールマウント免疫染色の結果から、卵黄囊上において高度に拡張した血管が形成されていることが明らかになった。8.5 日胚にお

ける表現型は顕著でないことから、原始血管叢からのリモデリングの過程において、血管同士の融合が促進した可能性や、血管の嵌入や刈り込みといった形態形成過程に異常が起こった可能性が考えられる。これらの表現型は *Vegfr3* 遺伝子欠損マウスで観察された大血管の形成不全とは対照的な表現型であり、この遺伝子が初期血管形成過程において大血管の形成を促進する役割を担うことを強く示唆する結果である。

CAG::VEGF-C トランスジェニックマウス胚の卵黄嚢において観察された内皮細胞での異常を詳細に解析するため、*in vivo* における血管及び造血発生を模倣することが知られている胚様体を用いて、*in vitro* での解析を試みた。コントロール (CAG: β -geo:VEGF-C) ES 細胞及び CAG::VEGF-C ES 細胞で胚様体を作成し、内皮マーカーである PECAM-1 に対する免疫染色を行った。CAG::VEGF-C トランスジェニック胚様体では、その中心部に広く内皮細胞のシートが形成され、辺縁部には脈管構造が形成されることが明らかになった。抗 VEGFR-2 及び VEGFR-3 抗体による免疫染色によっても同様の構造が染色されたことから、これらの内皮細胞は VEGFR-2 陽性、VEGFR-3 陽性であると考えられた。リンパ管内皮マーカーである *Prox-1* 及び *Lyve-1* の発現は、胚様体 (Day 9) では RT-PCR レベルで検出されないことから、これらの内皮はリンパ管内皮ではないと考えられる。

さらに、VEGFR-3 のみを刺激する変異型 VEGF-C(C152S) を発現する CAG::C152S トランスジェニック ES 細胞でも同様の検討を行ったところ、辺縁部に脈管構造を有する内皮シートの形成が確認された。このことから、このような内皮シートの形成は VEGFR-3 のシグナルによるものであると考えられた。次に、内皮細胞の増殖について、BrdU 取り込み能の測定及び FACS による解析でその影響を調べた。その結果、コントロールの胚様体では内皮・非内皮細胞に関わらず一様に BrdU が取り込まれる像が観察されるのに対し、CAG::VEGF-C トランスジェニック胚様体では PECAM-1 陽性の内皮細胞において優位に BrdU が取り込まれている像が顕著であった。更に、FACS により培養系全体に対する内皮細胞の割合を算出したところ、CAG::VEGF-C トランスジェニック胚様体ではコントロールに比べて内皮細胞の割合が上昇していた。これらのことから、内皮細胞の増殖が促進されていることが明らかになった。これらの表現型は CAG::C152S トランスジェニック胚様体においても同様であったことから、この内皮細胞に対する増殖促進は、VEGFR-3 によるものであ

ると考えられた。

しかし、CAG::C152S トランスジェニック胚様体では CAG::VEGF-C トランスジェニック胚様体に比べて辺縁部に形成される脈管構造が少なく、分岐の少ない、太い脈管構造が観察された。そこで、これらの内皮シートの相違を明らかにするため、画像解析により面積及び分岐点の定量化を試みた。その結果、CAG::VEGF-C 及び CAG::C152S トランスジェニック胚様体では PECAM-1 陽性面積がコントロールと比べて有意に増大していることが確認された。胚様体 1 個あたりの分岐点の数を計測した結果、CAG::VEGF-C トランスジェニック胚様体では有意に増加していた。一方、CAG::C152S トランスジェニック胚様体ではコントロールよりもやや減少していた。さらにこの分岐数を、固定した PECAM-1 陽性面積で補正すると、CAG::VEGF-C トランスジェニック胚様体においても分岐数がコントロールよりも有意に減少しており、CAG::C152S トランスジェニック胚様体では更に顕著に減少していることが明らかとなった。このことから、VEGFR-3 のシグナルが ES 細胞由来内皮細胞の分岐形成を抑制する働きを持つことが示唆された。

これらの結果から、VEGFR-3 のシグナルが内皮細胞の増殖を促進し、分岐形成を抑制する役割を持つことが示唆された。胚様体において観察された内皮シートは、この結果形成されると考えられる。過剰な分岐形成による大血管の形成不全が起こることが報告されている *Vegfr3* 遺伝子欠損マウスの報告と考え合わせると、VEGFR-3 シグナルの持つ増殖促進及び分岐形成の抑制が、CAG::VEGF-C トランスジェニックマウス胚で観察された脈管拡大の、一因と予想された。

以上、本研究においてコンディショナルに VEGF-C を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、過剰な VEGF-C が初期血管形成過程において大血管の形成を促進することが明らかになった。リセプターである *Vegfr3* 遺伝子の欠損マウスで観察された表現型を考え合わせると、VEGFR-3 がこの過程において大血管の形成を促進する役割を担うと考えられる。更に、胚様体での解析から VEGFR-3 が分岐形成を抑制し、内皮細胞の増殖を促進することが明らかになった。この VEGFR-3 による分岐形成を伴わない内皮細胞の増殖促進が、脈管の拡大を促進する 1 つの要因となる可能性が考えられた。本研究結

果は、VEGFR-3 の初期血管形成過程における発生学的意義を明らかにすると同時に、腫瘍性血管新生やリンパ管新生における VEGFR-3 の役割を理解するために新たな知見を与えるものであると考えられる。