

論文の内容の要旨

リンパ管形成を司る転写調節因子の同定

指導教員 宮園浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

吉松 康裕

リンパ管は血管とともに全身にはりめぐらされた脈管系を構成し、血管と同様に組織液の恒常性の維持において必要不可欠であり、リンパ管およびリンパ節の先天的発育不全や悪性腫瘍の浸潤、外科手術後のリンパ浮腫など病態とも強く関連していることから、リンパ管の形成機構の解明は以前から重要な課題であった。しかし、リンパ管を同定する適切なマーカーの発見が遅れたことからリンパ管形成を司る分子機構は血管のそれと比較すると未解明の部分が非常に多い。リンパ管の発生は静脈の一部にリンパ管マーカーである LYVE-1 を発現する細胞が出現することから始まる。そのリンパ管内皮細胞への分化能を持った細胞の一部にホメオボックス転写因子 Prox1 が発現するようになると、下流遺伝子の血管内皮増殖因子受容体(vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR) 3 の発現が亢進し VEGF-C (VEGFR3 のリガンド) への走化性を獲得して初期リンパ嚢が形成される。Prox1 遺伝子を欠損したマウスにおいては VEGF-C 発現細胞への遊走が起こらずに

リンパ管が形成されないことから、**Prox1** はリンパ管発生のマスター因子と考えられており、**VEGFR3** 以外にも線維芽細胞増殖因子受容体(fibroblast growth factor receptor) 3 などのリンパ管新生に関与する下流遺伝子群の発現を介してリンパ管の形成に重要な役割を果たすことが報告されている。しかしリンパ管新生シグナルには他に血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF)-BB およびその受容体 PDGFR β を介するものなどがあり、それらのシグナルと **Prox1** との関係については未解明である。

さらに **Prox1** はリンパ管内皮細胞以外にレンズや肝臓などにも発現しているにも関わらず、**Prox1** による **VEGFR3** の発現誘導はリンパ管内皮細胞以外には見出されない。私は **Prox1** のリンパ管内皮特異的な転写調節機構を解明することを通じてリンパ管の形成メカニズムに迫ることを試みた。そのためにまず、私は **Prox1** をリンパ管内皮特異的に機能させている転写調節因子が存在することを想定し、そのような因子を同定することを目指した。そこで、血管とリンパ管の両方で発現していること、哺乳細胞内で **Prox1** と結合できること、**Prox1** の下流遺伝子発現を調節できること、以上の 3 つの条件をクリアできる **Prox1** 結合因子を yeast two-hybrid スクリーニングを用いて探索することにした。

複数の **Prox1** 結合候補因子が取得されたが、核に局在するもの、特に転写因子に注目して選択し解析を行い、**Ets** ファミリー転写因子である **Ets-2** に注目した。**Ets** ファミリー転写因子のプロトタイプである **Ets-2** は血管新生に関わることが知られているが、これまでリンパ管新生における **Ets-2** の役割は明らかにされていなかったため、本研究においては **Ets-2** のリンパ管内皮細胞における機能を検討した。

まず **Ets-2** の血管およびリンパ管内皮細胞における発現を検討するために HUVEC (ヒ

ト臍帯静脈血管内皮細胞) および HDLEC (ヒト皮膚リンパ管内皮細胞) を用いたところ両方の細胞において発現していることが見出された。また、マウス胎生期 14.5 日目の血管・リンパ管内皮細胞においてもその発現が観察された。Yeast two-hybrid スクリーニングの結果を反映して、HDLEC において内因性と Ets-2 と Prox1 が結合していることが免疫沈降法と *in situ* proximity ligation assay によって明らかとなった。

そこで私は無菌性の慢性腹膜炎モデルを用いてリンパ管新生における Ets-2 の効果を検討した。このモデルでは炎症を惹起するチオグリコレートを腹腔内注射すると、横隔膜にリンパ管新生が誘導される。これに対して Ets-2 を発現するアデノウィルス腹腔内注射するとリンパ管新生が亢進した。一方、Ets ファミリーの転写活性を阻害するドミナントネガティブ変異体 TM-Ets-1 ではリンパ管新生が著しく抑制された。

私は Ets-2 によるリンパ管新生亢進のメカニズムを探るため、*in vitro* の実験系を用いて解析を行った。HUVEC において Prox1 を発現させると、Prox1 の下流遺伝子として知られる VEGFR3 および angiopoietin (Ang)-2、integrin- α 9 の発現が誘導されることが報告されている。私はまずリンパ管新生で最も重要と考えられる VEGFR3 の発現への効果を検討した。HUVEC に Ets-2 を発現させると同様に VEGFR3 の発現が誘導され、Prox1 と共発現させた時にはさらに発現が亢進した。この発現誘導は HDLEC においても確認されたので、これが細胞機能に与える効果を chamber migration assay により VEGF-C への走化性を検討した。遺伝子発現を反映するように HUVEC における VEGF-C への走化性は Prox1 および Ets-2 によって誘導され、共発現させるとさらに走化性が亢進した。また、HDLEC においても Ets-2 により走化性が亢進した。さらに Prox1 によって誘導される

Ang-2 や integrin $\alpha 9$ の発現についても Ets-2 の効果を検討したところ、Ets-2 によっても発現が誘導され、Prox1 と共発現させた時にはさらにそれぞれの遺伝子の発現が亢進した。しかし、HDLEC における VEGFR3 の発現は Ets-2 に対する siRNA によるノックダウンでは抑制されなかった。私は Ets ファミリーの他の因子により代償されている可能性を考え、それらの活性を抑制するために TM-Ets-1 を用いた。驚くべきことにこれらの 3 遺伝子のすべてにおいて Prox1 による発現誘導が抑制され、この 3 遺伝子は Ets ファミリーによる発現制御を受けていることが示唆された。

当研究室において三嶋らは Prox1 が内皮細胞において PDGFR β の発現を誘導することを見出している。私はこれに対する Ets-2 の効果を HDLEC において検討したところ、Ets-2 によっても PDGFR β の発現が誘導された。これが細胞機能に与える効果を chamber migration assay により PDGF-BB (PDGFR β のリガンド) への走化性を検討した。遺伝子発現を反映するように Ets-2 により走化性が亢進した。HDLEC における PDGFR β の発現は Ets-2 に対する siRNA によるノックダウンで抑制され、PDGF-BB への走化性も低下した。このことから PDGFR β の発現には Ets-2 が必須であることが示唆された。

次に Prox1 と Ets-2 が転写因子として直接同じプロモーター上で DNA に結合しているかを検討した。両者を発現させた HUVEC を用いて抗 Prox1 抗体および抗 Ets-2 抗体を用いてそれぞれクロマチン免疫沈降を行ったところ、VEGFR3 転写開始点近傍のプロモーター領域が濃縮されており、Prox1、Ets-2 それぞれが VEGFR3 プロモーター上の近傍で機能していることが示唆された。

以上の結果から、Ets-2 は Prox1 の下流遺伝子に対して Prox1 と協調して機能し、

Prox1 によって誘導されるリンパ管新生を亢進させる転写共役因子であることが示唆された。また PDGFR β の発現が Ets-2 に対する siRNA により抑制されたことおよび VEGFR3 や Ang-2、integrin α 9 の発現が TM-Ets-1 によって抑制されたことにより、4 つもの Prox1 下流遺伝子が Ets ファミリー転写因子によって発現調節を受けていることが明らかになった。これらの結果はドミナントネガティブ変異体 TM-Ets-1 で横隔膜リンパ管新生が著しく抑制されたことを裏付けるものであると考えられる。本研究を通じて、血管新生において重要な役割を果たすことが知られている Ets ファミリー転写因子がリンパ管新生においても同様に重要な機能を果たしていることが示唆された。