

審査の結果の要旨

氏名 吉松 康裕

本研究はリンパ管形成を司る転写因子と考えられているProx1の転写調節機構を解明するため、リンパ管内皮におけるProx1の機能調節因子としてProx1結合因子を探索し、その候補因子が与えるProx1の転写調節機能に対する効果について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Yeast two-hybrid screeningを行い、Prox1結合候補因子として10種の核内局在因子を同定し、哺乳細胞内での結合を確認した。また、これらの因子が血管内皮細胞 (BEC) およびリンパ管内皮細胞 (LEC) で発現していることをRT-PCRにより確認した。これらのうち血管新生における関与が報告されているEtsファミリー転写因子Ets-2に着目してBECおよびLECにおける詳細な解析を試みた。
2. Ets-2はヒトのBECおよびLECにおいてウェスタンブロットにより発現が確認され、また初期リンパ管が形成されている時期のマウス胎児由来のBECおよびLECにおいても発現していることがRT-PCRにより明らかになった。
3. Yeast two-hybrid screening の結果を反映して、Ets-2がLECにおいてProx1と結合していることが免疫沈降法および*in situ* PLA法によって明らかになった。また、BECにおける過剰発現によりEts-2と相同性の高いEts-1もProx1と結合することが示され、Prox1とEts-1の結合ドメイン解析を行って、それぞれが結合する領域を同定した。
4. Ets-2の生体内のリンパ管における機能を個体レベルで解析するため、横隔膜リンパ管新生モデルを用いたところ、Ets-2がリンパ管新生を亢進させ、一方でEts-2のドミナントネガティブ変異体として機能するTM-Ets-1がリンパ管新生を抑制することが明らかになった。
5. Ets-2がリンパ管新生を亢進させているメカニズムを探るため、培養可能なBECおよびLECを用いて*in vitro* の解析を行った。BECにおいてProx1を発現させると下流遺伝子の血管内皮増殖因子受容体3 (VEGFR3)の発現を亢進させるが、これと同様にEts-2単独でも発現が亢進していること、Prox1との共発現によりさらに発現が亢進していることがRT-PCRおよびウェスタンブロット、VEGFR3のリガンドであるVEGF-Cに対する走化性実験により示され、Ets-2がProx1と協調してVEGFR3の発現誘導を行っていることが示唆された。Ets-2によるVEGFR3の発現誘導はLECにおいても見られることが、同様の方法で示された。これらのVEGFR3の発現誘導はEts-1

6. VEGFR3の発現がEts-1およびEts-2以外のEtsファミリー転写因子の代償作用により維持されている可能性を検討するため、幾つかのEtsファミリー因子についてProx1と結合するものを探索し、Netを同定した。しかし、Net単独もしくはEts-2およびEts-1との同時ノックダウンを行いRT-PCRにより解析したところ、VEGFR3の発現は低下しなかった。そこで、他のEtsファミリー転写因子の機能を阻害する可能性のあるTM-Ets-1を用いて解析を行ったところ、BECにおいてProx1およびEts-2によって亢進するVEGFR3の発現が抑制された。これによりEts-2、Ets-1、Net以外のEtsファミリー因子の転写活性がVEGFR3の発現に必要であることが示唆された。
7. Prox1の下流遺伝子angiopoietin-2およびintegrin  $\alpha$ 9の発現はBECにおいてEts-2によっても誘導され、Prox1との共発現によりさらに亢進することがRT-PCRにより示された。この効果はLECにおけるEts-2のノックダウンでは確認されなかったが、BECにおけるこれらの遺伝子の発現亢進はTM-Ets-1により抑制され、VEGFR3の発現誘導と同様にangiopoietin-2およびintegrin  $\alpha$ 9の発現にEtsファミリー因子の転写活性が必要であることが示唆された。
8. 血小板由来成長因子(PDGF-BB)はリンパ管新生因子として知られるが、当研究室の先行研究によってProx1がその受容体であるPDGFR $\beta$ の発現を誘導することが示されている。LECにおいてEts-2がPDGFR $\beta$ の発現を亢進させていることがRT-PCRおよびPDGF-BBに対する走化性実験により明らかになった。また、同様にEts-1もPDGFR $\beta$ の発現を亢進していることが示された。さらにLECにおいてEts-2の発現をノックダウンするとPDGFR $\beta$ の発現が低下し、PDGFR $\beta$ の発現にEts-2が必要であることが示された。
9. Prox1とEts-2が同じプロモーター上でDNAに結合しているかを検討するため、BECにProx1およびEts-2を発現させ、それぞれの抗体で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、本論文は転写因子 Ets-2 が LEC 内で Prox1 と結合すること、炎症性リンパ管新生を亢進することを明らかにし、そのメカニズムに迫り Prox1 と協調して Prox1 下流遺伝子を発現誘導すること、また Ets-2 以外の Ets ファミリー転写因子が複数の Prox1 下流遺伝子の発現誘導に必要であること、さらに Prox1 と Ets-2 が同じプロモーター近傍で機能することを明らかにした。リンパ管形成に重要な役割を果たしている Prox1 の機能を正に調節する転写因子はこれまでに同定されておらず、本研究はリンパ管形成における転写因子のネットワークの解明に貢献したと考えられ、学位の授与に値するものである。