

## 論文の内容の要旨

論文題目 Expression and functional analyses of XRASGRP2 in vascular development of *Xenopus laevis*

和訳 アフリカツメガエルの血管発生におけるグアニンヌクレオチド交換因子 RasGRP2 の発現と機能解析

指導教員 岩中 督 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  
生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 鈴木 完

ポストヒトゲノム時代において、35000 以上にも及ぶ遺伝子によってコードされるタンパクそれぞれの機能的役割を割り付ける作業において優先的に重要な遺伝子をピックアップすることは困難である。その意味で発生の速いアフリカツメガエルなどの下等脊椎動物モデルによって多くの候補遺伝子をスクリーニングし、更なる解析をマウスなどの哺乳動物に委ねるという方法は戦略として有用である。ツメガエル胚は、1) 血管発生に関して信頼性の高い運命地図があること、2) ゼブラフィッシュより高等動物に近い血管系を有していること、3) 初期胚は透過性があるので血管発生の段階を観察・解析するのに適していること、4) 発生が速く、受精後 4 日でほぼ完全に血管系は発生し機能するようになること、5) モルフォリノオリゴヌクレオチド (以下 MO) を初期胚に導入することによって特定の遺伝子の発現をノックダウンすることができること、などから血管形成や血管新生に関与する過程や因子の研究にとって有用なツールである。

浅島研究室では、アニマルキャップアッセイ法を用いて様々な組織・器官を誘導することに成功しているが、その 1 つとしてアニマルキャップに低濃度アクチビン (0.4ng/ml) とアンジオポエチン 2 (100ng/ml) を誘導因子として作用させることで高率に血管内皮細胞を誘導する方法を確立していた。アクチビン処理のみとアクチビン・アンジオポエチン 2 共処理のアニマルキャップ細胞

塊をマイクロアレイにかけて比較し遺伝子プロファイルを作成し、アクチビン・アンジオポエチン2共処理で発現上昇の認められた遺伝子断片の1つに XI.9840 (XRASGRP2 遺伝子) が存在した。この遺伝子は、スクリーニングの Whole-mount *in situ* hybridization (以下 WISH) によって血管系に特異的な発現が予想されたため、私は本遺伝子を詳細に解析することとした。

RasGRP2 は RasGRP ファミリーに属するグアニンヌクレオチド交換因子の1つである。このファミリーは、カルシウムとジアシルグリセロールに応答し Ras や Rap などの Small GTPase を活性化する。XRASGRP2 はヒト RasGRP2 の short form のホモログであり、593 のアミノ酸から構成される。ヒトにおいて RasGRP2 は T リンパ球、好中球、血小板におけるインテグリンの細胞外活性の細胞内からの調節に関して重要な機能をもつことが示されているが、血管内皮細胞や血管形成における機能に関する知見は今までにない。

ツメガエル胚における XRASGRP2 の発現はステージ 24 以降であることが報告されている。まず、ステージ 24 以降の胚を用いて WISH にて詳細な XRASGRP2 の発現パターンを解析した結果、ステージ 28 では一次造血に関与する VBI(Ventral Blood Island)を取り囲むような発現と、二次造血に関与する DLP(Dorsal Lateral Plate)領域の発現が認められた。この発現パターンはヘマンジオブラストマーカーである Xflk-1、Xfli と同様であった。また、ツメガエルの主要血管系が形成されるステージ 30 以降の XRASGRP2 の発現を WISH にて解析すると、ステージ 30 では ACV (anterior cardinal vein)、AA (aortic arch)、PCV (posterior cardinal vein)、ISV (intersomitic vein)、VVN (vascular vitelline network) などの血管特異的な発現パターンを示す。しかし、その発現は一時的でステージ 35 以降にはその発現レベルは低下する。この発現パターンは Ami でみられるステージ 40 以降の血管内皮マーカーとなりうる発現パターンとは異なり、Xtie2 や Xmsr などのアンジオブラストから血管内皮形成段階のマーカーの発現パターンに類似している。つまり、XRASGRP2 は形成血管においてヘマンジオブラストから早期血管内皮細胞に発現していると考えられる。

XRASGRP2 の血管発生における機能を調べる目的で、XRASGRP2 の mRNA を人工的に合成し将来の VBI 形成に関与する細胞が多数存在する 8 細胞期胚の植物極側に顕微注入したところ本来原始血球系細胞のみが存在する領域に異所性に血管系細胞が存在するようになることが Xmsr を血管系マーカーとして用いた WISH による解析にて確認された。また、顕微注入胚をステージ 40 以降まで飼育すると高確率で浮腫になるフェノタイプを認めた。この結果は、XRASGRP2 の VBI 領域への異所性の過剰発現によって異所性に血管形成が行われ、血球形成が抑制されることによって循環系に異常をきたし浮腫の原因になっていることを示唆している。

また、XRASGRP2 の機能阻害を行うため、XRASGRP2 の 2 種類のゲノム断片を特定し、これらの第 1 エクソンとイントロンの境界領域のスプライシングを阻害するモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) をそれぞれ作成し、その阻害効果を RT-PCR にて確認した。この MOs を用いて 2 細胞期胚に顕微注入を行い Xflk-1、Xtie2、Ami の各血管系マーカーを用いた WISH によって XRASGRP2 機能阻害により血管系に異常が起こることを確認した。さらに、先行研究での知見と XRASGRP2 阻害による血管マーカー Xmsr の発現パターンの結果を総合し、XRASGRP2 が、VEGF と apelin シグナル系の協調作用に影響することによってツメガエルにおける最初の angiogenesis の過程である ISV の形成にも影響を及ぼしていると考えられる結果を得た。また一方で、血球系マーカー globinT3 に関してはその発現自体には異常は起こらないが、血管系の形成異常に伴った血球循環開始が遅れることを WISH による解析で観察した。

次に、血管形成において中心的な役割を果たす VEGF-A が XRASGRP2 の発現に関与するか検討した。まず、先行研究において VEGF-A のうち VEGF122 と VEGF170 においてその過剰発現において浮腫となる胚が得られることが示されていたのでこれらの 2 つについて検討したところ、のちの VBI 領域に VEGF170 mRNA を顕微注入した胚において XRASGRP2 陽性細胞が VBI に異所性に発現することが観察された。反対に VEGF-A MO を顕微注入した胚では顕微注入領域の XRASGRP2 陽性細胞が減少した。これらの結果は、VEGF-A (VEGF170) が XRASGRP2 を誘導すること、そして XRASGRP2 の発現に VEGF-A が必要であることを示している。さらに、のちに VBI 後方領域を形成する細胞が多く存在する 8 細胞期 VV 領域に VEGF-A mRNA と同時に XRASGRP2 -MO を共顕微注入することによって、VEGF-A mRNA のみの顕微注入によってみられる Xmsr の異所性発現の増加が減弱し、逆に VEGF-AmRNA のみの顕微注入によって低下する globinT3 の後方 VBI 領域での発現が回復した。この結果は、VEGF-A シグナルが XRASGRP2 の関与したシグナルパスウェイにおいて血管系細胞分化を促す役割を果たしていることを示している。

最後にヘマンジオブラストマーカー Xfli、アンギオブラストおよび血管内皮マーカー Xmsr および Xtie2、原始血球マーカー globinT3 を用いて VBI 前方および後方における細胞群の性質について検討し、XRASGRP2 はヘマンジオブラストマーカー Xfli の発現には関与しないことと XRASGRP2 が VEGF の強発現により血球系から血管系へと分化する後方 VBI 領域のシグナル系の一端を担っていることを示した。

まとめると本研究によってツメガエルの胚発生における XRASGRP2 の働きに関して以下の知見を得た。(1) ツメガエルの発生において XRASGRP2 は神

経胚後期から尾芽胚にかけて血管系に特異的な発現を示し、その発現パターンは *Xmsr* や *Xtie2* などの他の血管内皮マーカーに類似している。(2)

**Gain-of-function** および **Loss-of-function** の実験の結果より、発生において **XRASGRP2** が適当な時期に適当な発現量を示すことは、個体において適切な血管形成をするのに必要である。(3) 血管誘導因子 **VEGF-A** は **XRASGRP2** を誘導し、**XRASGRP2** は **VEGF-A** のシグナル系の一端を担っている。(4) **VBI** 後方において **XRASGRP2** はヘマンジオブラストから血管系細胞への分化において重要な役割をはたし、**vasculogenesis** の過程に関与している。(5) 先行研究での知見と総合して、**XRASGRP2** が **VEGF** と **apelin** シグナル系の協調作用に影響することによってツメガエルにおける最初の **angiogenesis** の過程である **ISV** の形成にも影響を及ぼしている。