

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 完

本研究は、モデル動物としてアフリカツメガエルを用い、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て血管内皮細胞を誘導する系から同定された Xl.9840 (XRASGRP2 遺伝子) について、Whole-mount *in situ* hybridization (以下 WISH) による詳細な発現パターン解析と機能解析を行い、下記の結果を得ている。

1. 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した。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した。この発現パターンは、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おり、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た。
2. 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た。
3. 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。

4. 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、のちの VBI 領域に VEGF-A 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を観察した。一方で、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。これらの結果から、VEGF-A 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た。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 細胞期胚の植物極側に 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-A mRNA のみの顕微注入によって低下する globinT3 の後方 VBI 領域での発現の回復を観察した。この結果から、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た。
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可能性を示した。

以上、本論文ではアフリカツメガエルの胚発生において、XRASGRP2 がその血管形成に必要であり、VEGF-A/VEGFR2 シグナル系の一端を担って vasculogenesis から angiogenesis の過程において主要な血管の形成に関わることを主に *in vivo* の実験にて示している。これらの結果は、胎生期血管発生機構の一端を解明したという点で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。