

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ管形成における COUP-TFII の機能解析

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 19 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

山崎智子

リンパ管は成体の全身において末梢血管から漏れ出した組織液を汲み出して静脈へと戻すことによって閉鎖循環系を維持している。リンパ管の異常は組織液の貯留によるリンパ浮腫を引き起こすだけでなく、癌のリンパ節転移においては癌細胞の転移経路として機能するため、その形成機構の解明は急務でありながら、リンパ管研究の歴史はまだ浅く、未解明な部分が多く残されている。

胎生期において、中胚葉由来の血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞へと分化する。血管は動脈と静脈に分類されるが、静脈血管内皮細胞の形成・維持においてはオーファン核内受容体である **Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II (COUP-TFII)** が重要な役割を担っている。さらに静脈の一部において **Prox1** ホメオボックス転写因子が発現すると、様々な血管内皮細胞マーカーの発現が低下し、血管内皮増殖因子受容体 (**Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3: VEGFR3**) などのリンパ管内皮細胞マーカーの発現が上昇し、血管内皮細胞からリンパ管内皮細胞への分化が始まる。それとともにリンパ管内皮細胞は一部の静脈から出芽し、**VEGFR3** のリガンドである **VEGF-C** を発現している近傍の部位へと遊走し、初期リンパ嚢が形成される。さらに **Prox1** 遺伝子を欠損したマウスではリンパ管が形成されずに胎生致死の表現型を呈することから、**Prox1** は血管内皮細胞からリンパ管内皮細胞への分化を誘導するマスター因子として働くと考えられている。しかし、リンパ管分化における **Prox1** の転写制御機構については明らかになっていないこ

とが多く、組織特異的な転写共役因子が存在するのではないかと考えられている。実際に Prox1 は肝臓において Liver Receptor Homologue 1 (LRH-1)などの核内受容体と結合することにより転写調節を行なっていることが報告されている。そこで本研究では、リンパ管内皮細胞へと分化する静脈内皮細胞において発現する核内受容体である COUP-TFII に着目し、そのリンパ管内皮細胞における発現を検討し、血管・リンパ管内皮細胞における機能およびその作用機序を検討した。

まず、COUP-TFII の血管内皮細胞ならびにリンパ管内皮細胞における発現を検討するために、臍帯静脈血管内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)とヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞(human dermal lymphatic endothelial cell: HDLEC)を用いたところ、COUP-TF-II が両者において同程度に発現することが定量的 RT-PCR およびウェスタンブロットにより明らかになった。さらに COUP-TFII 抗体を用いて胎生 11.5 日のマウス胚組織の免疫染色を行ったところ、頸部静脈から出芽するリンパ管内皮細胞において COUP-TFII が発現していることが明らかとなった。また胎生 16.5 日のマウス頭部皮膚の組織染色によってもリンパ管内皮細胞で COUP-TFII が発現していたことから、静脈内皮細胞からのリンパ管内皮細胞が分化する過程において COUP-TFII と Prox1 が同じ細胞において発現し、相互作用する可能性が示唆された。

次に血管内皮細胞における Prox1 の機能に対する COUP-TFII の効果を検討するために Prox1 および COUP-TFII 遺伝子を発現するアデノウィルスを作製した。HUVEC において Prox1 を発現させると細胞増殖が亢進されることが当研究室の先行研究により示されているが、COUP-TFII と Prox1 を HUVEC に共発現させると Prox1 による細胞増殖促進が COUP-TFII により抑制されることが明らかになった。この分子機構を探るために細胞周期調節因子の cyclin E1, E2 の発現を検討したところ、COUP-TFII を単独で発現させても cyclin E1, E2 の発現に影響を与えないにも関わらず、両者を共発現すると Prox1 による cyclin E1, E2 の発現誘導が顕著に抑制された。また COUP-TFII の発現を siRNA により低下させると、Prox1 による cyclin E1, E2 の発現誘導が亢進したことから、血管内皮細胞における Prox1 による cyclin E1, E2 の発現誘導を介した細胞増殖亢進が COUP-TFII によって抑制されることが示唆された。

また本研究室の先行研究により、HUVEC および胚性幹(Embryonic Stem: ES)細胞由来の血管内皮細胞において Prox1 がリンパ管内皮細胞マーカーである VEGFR3 の発現を誘導し、リガンドである VEGF-C への走化性を亢進することが示されている。そこで COUP-TFII の VEGFR3 の発現への関与を検討したところ、COUP-TFII

によって Prox1 による VEGFR3 の発現上昇が顕著に抑制された。また、chamber migration assay によって Prox1 による HUVEC の VEGF-C への走化性の亢進作用も抑制された。以上の結果から、血管内皮細胞においては COUP-TFII が Prox1 の細胞増殖と VEGF-C への走化性の亢進という作用を抑制し、その機序として COUP-TFII が Prox1 による標的遺伝子の発現調節を抑制することが明らかになった。

次に内因性 Prox1 が発現している HDLEC における COUP-TFII の機能を検討した。アデノウイルスにより COUP-TFII を発現させたところ、cyclin E1 および VEGFR3 の発現が低下するとともに、細胞増殖と VEGF-C への走化性が低下した。しかし COUP-TFII の発現を低下させても VEGFR3 の発現と VEGF-C への走化性が低下することから、COUP-TFII は HUVEC と HDLEC で異なる作用を示すことが示唆された。そこでリンパ管内皮細胞における Prox1 の発現に対する COUP-TFII の効果を検討したところ、COUP-TFII の発現を上昇させると内因性 Prox1 の発現は低下した。以上の結果から、リンパ管内皮細胞において COUP-TFII の発現を増加させると、Prox1 の転写活性が抑制されるとともに内在性の Prox1 の発現が低下することによって、Prox1 の機能が阻害されることが示唆された。

さらに、リンパ管内皮細胞における COUP-TFII のリンパ管内皮細胞マーカーなどの発現調節への機能を検討したところ、COUP-TFII の発現を増加させても減少させてもリンパ管内皮細胞マーカーの integrin $\alpha 9$ や podoplanin の発現が低下することから、COUP-TFII はリンパ管内皮細胞の性質の維持に関与していることが明らかになった。また、動脈血管内皮細胞マーカーである ephrin B2 の発現は COUP-TFII により阻害され、この結果は COUP-TFII が静脈化に作用するという知見と一致した。また、血管内皮細胞における COUP-TFII の標的遺伝子として知られる Neuropilin 1 の発現がリンパ管内皮細胞において COUP-TFII により亢進することが明らかとなった。

こうした COUP-TFII と Prox1 の相互作用の機序を検討するために、LRH-1 などの核内受容体が Prox1 と結合するという報告を参考に、COUP-TFII の Prox1 への結合能を検討した。HUVEC にアデノウイルスを用いて COUP-TFII と Prox1 を発現させて免疫沈降法により検討したところ、両者が結合することを確認した。さらに in situ Proximity Ligation Assay を用いた検討により、HDLEC において内因性の COUP-TFII と Prox1 が結合することが明らかになった。

COUP-TFII が Prox1 による cyclin E1 の発現亢進を抑制することと内因性 COUP-TFII と Prox1 が結合することから、COUP-TFII と Prox1 が cyclin E1 プロモ

ーターへ結合するかどうかを検討するため、HUVECに Prox1 と COUP-TFII を発現させ、両者の抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行ったところ、Prox1 および COUP-TFII が cyclin E1 プロモーター領域に結合することを確認した。これらの結果から、COUP-TFII の Prox1 による cyclin E1 の発現上昇の抑制は、COUP-TFII と Prox1 の cyclin E1 プロモーター上での結合を介したものであることが示唆された。

以上の結果から、COUP-TFII が、Prox1 との結合を介してリンパ管の分化・維持において重要な役割を担っていることが明らかとなった。Prox1 はリンパ管の形成に中心的な役割を果たすことから、COUP-TFII などの転写共役因子によるリンパ管形成制御機構の詳細な解明により、リンパ管の形成不全や病的新生が関与した病態の治療法の開発が進むことが期待される。