

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ管形成における血小板由来増殖因子の役割

宮崎 秀幹

リンパ管は血管と共に体液の恒常性維持や免疫系の機能に重要な役割を果たしており、その機能不全はリンパ浮腫を引き起こす。また腫瘍において形成されるリンパ管はがん細胞のリンパ節転移における転移経路ともなるため、その形成機構の解明は重要な研究課題である。リンパ管の発生は胎生期に静脈から起こり、その分化はリンパ管内皮細胞への分化能を獲得した静脈血管内皮細胞にリンパ管形成のマスター因子である **Prox1** 転写因子が発現することによって誘導される。**Prox1** が発現した細胞では血管内皮増殖因子受容体(VEGFR) 2 や **VE-cadherin** 等の血管内皮細胞マーカーの発現が低下し、**VEGFR3** や **podoplanin** 等のリンパ管内皮細胞マーカーの発現が上昇する。こうした細胞が静脈から出芽して近傍のリンパ管内皮細胞の増殖などを亢進する作用を持つ **VEGF-C** を発現している部位に向けて遊走し、集まって初期リンパ嚢を形成し、これらが次第に吻合・伸長して全身のリンパ管を形成するのである。**Prox1** のノックアウトマウスではリンパ管形成が完全に欠失し、致死となることが知られているが、これはリンパ管内皮前駆細胞が **VEGF-C** への走化性を獲得できず、静脈からの出芽が起こらないためとされている。また **Prox1** は成体のリンパ管内皮細胞においても、**VEGFR3** などの複数のチロシンキナーゼ受容体群の発現を調節することでリンパ管の形質維持やリンパ管新生を制御していることが報告されている。本研究では、チロシンキナーゼ型受容体の一つ血小板由来増殖因子受容体 (**PDGFR β**) と、これを介した血小板由来増殖因子 (**PDGF**) シグナルについて、リンパ管形成における機能と発現機構の解明を行った。

PDGF は巨核球や血小板、内皮細胞などにより産生されるシグナル分子で、その受容体 **PDGFR** は主に間葉系細胞に発現し、これを介したシグナルにより細胞の増殖や運動性が制御されている。血管内皮細胞には **PDGFR** の発現は通常は見られないが、血管形成においては血管内皮細胞周囲への壁細胞の遊走を調節することで、成熟血管の形成に関与しているとされている。一方でリンパ管内皮細胞には血管内皮細胞と異なり **PDGFR** の発現が通常は見られ、これを介したシグナルがリンパ管形成を亢進させるという報告が既に複数なされている。

本研究ではヒト皮膚由来リンパ管内皮細胞 (**HDLEC**) を用い、この細胞に

PDGFR の二つのサブクラスのうちの一つである PDGFR β が発現しており、リガンドである PDGF-BB 刺激によって細胞内シグナルの活性化が認められることを示した。さらにこの発現が Prox1 のノックダウンによって低下すること、すなわち PDGFR β の発現は Prox1 によって維持されていることを示した。また、chamber migration assay による解析から、Prox1 の発現を低下させることでリンパ管内皮細胞の PDGF-BB への走化性が抑制されること、すなわち Prox1 が PDGFR β の発現を介してリンパ管内皮細胞の運動性を制御している可能性が示唆された。

in vivo マウスモデルを用いた PDGF シグナルの機能解析については既に複数の報告がなされているが、これらの論文では PDGF シグナルの阻害剤として特異性の低い imatinib (Gleevec) が用いられていること、いずれも腫瘍性のリンパ管新生における解析であり、炎症性のリンパ管新生について評価したものがないことなど未検討な点がいくつか残されていた。そこで本研究では、まずマウスにチオグリコレートの腹腔内投与を繰り返すことで人工的に慢性無菌性腹膜炎を引き起こし、腹腔側の横隔膜に炎症性リンパ管新生を誘導するマウスモデルを作成し、これに imatinib の腹腔内投与を行うことで横隔膜における炎症性リンパ管新生が有意に抑制されることを示した。次に腫瘍性リンパ管新生について、より特異的な PDGF シグナルの阻害剤として PDGFR β /Fc キメラタンパク質を用いて PDGF シグナルの関与を検討した。PDGFR β /Fc キメラタンパク質を産生するヒト膀胱癌細胞 (BxPC-3) をレンチウイルスを用いて作製し、これをヌードマウスの皮下に移植して、腫瘍内のリンパ管新生について検討した。Fc タンパク質を発現する陰性対照群の腫瘍と比較して、PDGFR β /Fc 産生群の腫瘍では腫瘍内のリンパ管新生が有意に抑制されていることが示された。これらの結果から、PDGFR β は既に報告されている複数のチロシンキナーゼ型受容体と同様に、Prox1 の下流でリンパ管の形成を制御している因子の一つであることが示唆された。

Prox1 はリンパ管形成のマスター因子としてリンパ管内皮細胞において多彩な遺伝子の発現調節を担っているが、これは Prox1 単独で行っている訳ではない。リンパ管内皮細胞には他にも COUP-TFII や Sox18、Ets-2 といったさまざまな転写因子が発現しており、これらが共役因子として Prox1 と協調的、あるいは抑制的に働くことで複数のリンパ管新生シグナルを調節しているのである。Prox1 はリンパ管内皮細胞のほか視神経や肝臓実質細胞などにも発現しているが、こうしたさまざまな転写因子が形成するネットワークの存在がリンパ管内皮細胞特異的な遺伝子群の発現調節を可能にしていると考えられている。

PDGFR β の発現を Prox1 と共に調節する共役因子の候補として、本研究では転写因子 Net に注目し、検討を行った。Net は Ets ファミリーと呼ばれる約 30

種よりなる転写因子ファミリーの一つで、Ets-2 などこのファミリーに属するいくつかの遺伝子についてはリンパ管内皮細胞において Prox1 と協調的にリンパ管内皮細胞特異的な遺伝子群の発現調節に関与している可能性が示唆されている。Net は Ets ファミリーの中では唯一、ノックアウトマウスにリンパ管形成異常が報告されている遺伝子であり、また *in vitro* の過剰発現系で Prox1 との結合性が報告されているため、Ets-2 と同様にリンパ管内皮細胞内で Prox1 の共役因子としてリンパ管形成に関与している可能性が示唆される。

本研究でも、HDLECにおいてNetが発現していることが示された。また293T細胞を用いた過剰発現系で既報の通り Net が Prox1 と結合性を示すこと、Ets ドメインを欠いた Net の変異体ではこの結合性が失われることが示された。これらの結果から、私は Net がリンパ管形成において Prox1 と結合することで何らかの役割を果たしている可能性があると考え、まず Net のリンパ管新生に対する効果について、前述のマウス炎症性リンパ管新生モデルを用いて個体レベルで検討した。Net を発現するアデノウィルスで腹腔内投与したマウスでは LacZ を発現するアデノウィルスを投与した対照群と比較して有意に横隔膜のリンパ管新生が亢進していた。そこで、この Net 発現によるリンパ管形成の亢進がリンパ管内皮細胞におけるいずれのシグナル経路を介したのか検討するため、HDLECに Net を発現するアデノウィルスを感染させて Prox1 下流のリンパ管新生因子の受容体の発現について検討した。PDGFR β は Net の強制発現によって発現が上昇することが示されたが、FGFR3、Tie-2 の発現には明らかな上昇は見られなかった。VEGFR3 の発現は Net の強制発現によってむしろ低下した。一方、HDLECにおいてNetの発現をノックダウンすると PDGFR β の発現が低下することも明らかになった。以上の結果から、リンパ管内皮細胞において Net は PDGFR β の発現維持に必要であり、Net のリンパ管形成に対する効果は PDGFR β の発現調節を介していることが示唆された。これらの実験結果から、Net が Prox1 と結合し、PDGFR β の発現を亢進させることでリンパ管形成を促進させている、というモデルが考えられる。

リンパ管の形成機構は特に癌のリンパ行性転移の治療標的として重要と考えられている。本研究の結果からは、PDGFR β ならびにその上流で発現を調節していると考えられる転写因子 Net は、リンパ管形成における新たな分子標的の候補遺伝子の一つになりうると思われる。