

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 山崎 智子

本研究は、胎生期における静脈からのリンパ管形成機構を明らかにするため、主に血管内皮細胞に Prox1 を発現させる実験系とリンパ管内皮細胞を用いて、リンパ管の分化と維持における COUP-TFII の機能およびその作用機序の解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. 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 抗体を用いてマウス胚組織の免疫染色を行い、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わかった。
2. HUVEC において Prox1 を発現させると細胞増殖が亢進されるが、COUP-TFII と Prox1 を共発現させると 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。
3. COUP-TFII によって Prox1 による VEGFR3 の発現上昇が顕著に抑制されることが示された。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ることが示された。
4. 内因性 Prox1 が発現している HDLEC における COUP-TFII の機能を検討するために COUP-TFII の発現を上昇させると、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 への走化性が低下することが示された。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 の発現は低下したことから、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、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。

5. COUP-TFII の Prox1 への結合を HUVEC における過剰発現系で免疫沈降法により検討し、両者が結合することが示された。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。

6. 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、クロマチン免疫沈降を行ったところ、両者が cyclin E1 プロモーター領域に結合することが示された。このことから 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、本論文は、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を明らかにした。本研究はこれまで未知であった COUP-TFII のリンパ管形成における機能の解明に重要な貢献を成すと考えられ、よって、学位の授与に値するものであると考えられる。