

論文内容の要旨

β -catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels.

訳 β -catenin 依存的転写が、BMP による静脈形成の中心である

日本医科大学大学院医学研究科 内科学呼吸器感染腫瘍内科学分野

大学院生 柏田 建

Development 掲載予定

β カテニン は生物の胚発生、成長や再生に重要な転写調節因子である。これまで、内皮細胞特異的に β カテニンをノックアウト、もしくは内皮細胞に恒常活性型 β カテニンを過剰発現したマウスにおける報告では、血管形成障害により致死となることが示されている。すなわち、血管形成において β カテニンは必須であり、厳密にコントロールされていると考えられる。しかし、 β カテニンは転写調節の他に細胞間接着にも機能を持つ分子であるため、これらのマウスのフェノタイプが、細胞間接着の障害によるのか、転写調節の障害によるのかは明らかではない。また、 β カテニンの転写調節因子としての機能が、血管形成過程のいつ、どこで働いているかも不明である。

これらの疑問に答えるため、二つの遺伝子を持つ遺伝子改変ゼブラフィッシュラインを樹立した。①血管内皮細胞特異的に、「転写因子 TCF の β カテニン結合領域」と「Gal4 の DNA 結合領域」の融合蛋白質を発現する遺伝子 ②「Gal4 転写因子の認識配列」による制御下に「緑色蛍光蛋白 GFP」を発現する遺伝子 である。このゼブラフィッシュでは内皮細胞特異的に、 β カテニン依存的な転写が起こると GFP が発現する。それによって、GFP 蛍光により β カテニン依存的な転写を可視化できる。

この魚個体を観察し、 β カテニンの転写は頭部血管、心臓内膜、総主静脈、尾側静脈の血管形成過程で活性が起こっていることを見出した。これまで頭部、心臓内膜では Wnt- β カテニン経路の重要性が知られているため、今回我々は尾側静脈形成に着目した。まず静脈形成過程を生体イメージング技術を用いて経時的に観察したところ、静脈形成は①静脈原基と呼ばれる細胞群が動脈から分化し、②その一部が腹側に Migration を起こし、③最終的に生存して一本の管を形成する という過程を経ていた。この過程における β カテニンの転写活性を GFP 蛍光により観察したところ、それら最終的な静脈を形成する内皮細胞でのみ、 β カテニン転写活性は認められていた。このことから、 β カテニンの転写活性が静脈の形成に寄与していることを示唆された。

それを確かめるため、内皮細胞特異的に β カテニン転写活性を抑制するゼブラフィッシュラインを作成した。すると、 β カテニンを抑制した内皮細胞は、静脈血管形成過程においてアポトーシスを起こし致死となり、尾側静脈形成は阻害された。この現象は動脈細胞では観察されず、 β カテニン依存的な転写は静脈特異的に生存に寄与していることが分かった。

次に、静脈において β カテニンの発現を制御している分子を探索した。これまで静脈形成において Bmp (bone morphogenetic protein) の役割が知られているため、Bmp を過剰発現、また Bmp のアンタゴニストである Noggin を魚個体に全身過剰発現して解析した。すると、Bmp 過剰発現では尾側静脈血管内皮細胞の β カテニン転写活性が増加し静脈が過剰に形成されること、また Noggin の過剰発現では β カテニン依存的な転写が抑制され、尾側静脈の形成が阻害されることが分かった。このことから、Bmp は β カテニン依存的な転写を介して尾側静脈の形成を制御していることが示唆された。

さらに、Bmp による β カテニンの制御をおこすシグナル経路を解析するため、 β カテニン活性のある細胞のみをフローサイトメトリー (FACS) を用いて回収し、RNA シークエンスに

より RNA 発現プロフィールを検討した。その結果、 β カテニン転写活性のある細胞で多く発現している分子として、Aggfl (Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1)を見出した。Aggfl はヒトで骨・軟部組織過形成と静脈瘤を来す Klippel-Trenaunay 症候群の原因遺伝子とされている。Aggfl と β カテニンの相互作用について解析するため 293 細胞でルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Aggfl と β カテニンは synergistic に働き β カテニン依存的転写を制御していた。また、魚個体で Aggfl を過剰発現すると β カテニン転写活性が亢進し、抑制すると β カテニン転写活性が抑制され静脈形成が障害された。さらに、Bmp 過剰発現で Aggfl の発現が増加した。これらから、Bmp が Aggfl を介して、 β カテニン転写活性を亢進していると考えられた。また、Bmp 抑制、Aggfl 抑制とも、静脈特異的にアポトーシスの亢進を認め、このシグナルは静脈の生存に関与していると考えられた。

最後に静脈形成時に β カテニン依存的に転写される標的を探索した。RNA シークエンスの結果、静脈分化を制御する役割が知られる分子 Nr2f2 の発現量が β カテニン転写活性の細胞で著明に増加していたため、それを候補とした。魚個体で β カテニンを過剰発現すると尾側静脈で Nr2f2 発現量が増加し、 β カテニン抑制では減少した。また、Nr2f2 の抑制では、尾側静脈の生存には影響がなく、静脈の形態はわずかに阻害された。このことから、 β カテニン依存的な転写は、静脈内皮の生存を制御すること、またそれとは別に Nr2f2 を介した静脈分化制御している可能性が示唆された。

以上、Bmp により惹起され、Aggfl を介したシグナルが β カテニン依存的な転写を制御し、Nr2f2 による静脈分化および、静脈内皮細胞の生存を司ることを解明した。