

## 受賞者

平島 正則

神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 血管生物学分野

## 研究テーマ

p53結合因子Aspp1のリンパ管形成における役割の解明

### 1. 目的・背景

我々は過去にES細胞分化培養系を用いて内皮細胞特異的分子を探索し、Aspp1 (Ankyrin-repeats-, SH3-domain- and proline-rich-region-containing protein; Apoptosis stimulating protein of p53) を同定した (文献1)。生体内における役割について解析するためにAspp1ノックアウト (Aspp1<sup>-/-</sup>) マウスを作製・解析したところ、Aspp1<sup>-/-</sup>マウス胎仔においてリンパ管形成および機能の異常と皮下浮腫を見出した。成体Aspp1<sup>-/-</sup>マウスにおいては浮腫を認めずリンパ管機能がある程度発達していたが、興味深いことに集合リンパ管の蛇行や融合など、走行パターンの異常が認められた。Aspp1が癌抑制因子p53に結合してp53依存性のアポトーシスを促進することがLuらによって報告されていたが (文献2)、我々の解析においてAspp1<sup>-/-</sup>マウスの異常にはリンパ管内皮細胞の数的変化を伴っていなかった。またp53<sup>-/-</sup>マウスを同様の手法で解析したが、リンパ管走行パターンの異常や胎生期浮腫を認めなかった。以上のことから、Aspp1はp53非依存的にリンパ管形成において重要な役割を果たしていると考えられた。Aspp1<sup>-/-</sup>マウスでリンパ管内皮細胞の数的変化は認めなかったものの、細胞形態が異常で多数の突起を形成していることを見出した。Aspp1はリンパ管内皮細胞に発現しており、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスに由来するリンパ管内皮細胞は培養中においても多数の突起を形成していたことから、リンパ管内皮細胞において、Aspp1は細胞自律的に細胞間接着や細胞運動などの制御に関わっている可能性が示唆された。本研究では、内皮細胞におけるAspp1の真の役割を分子・細胞レベルで解明することを目的とした。

### 2. 方法

#### 1) Aspp1<sup>-/-</sup>マウス由来内皮細胞における遺伝子発現解析

Aspp1欠損によるリンパ管内皮細胞の形態学的異常を分子レベルで解明するために、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。野生型およびAspp1<sup>-/-</sup>マウスから胎生14.5日胎仔の皮膚を剥がした後にコラーゲナーゼとディスパーゼで組織をバラバラにして、PECAM-1陽性LYVE-1陽性のリンパ管内皮細胞をFACSソーティングした。これらの細胞群から抽出したRNAサンプルにおける遺伝子発現レベルをMouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いて網羅的に解析した。Aspp1<sup>-/-</sup>リンパ管内皮細胞内で発現レベルが変化している分子のうち細胞間接着や細胞運動などの制御に関わっていると考えられるものについては、リアルタイムPCRによって遺伝子発現レベルを再確認し、免疫組織化学的解析によりAspp1<sup>-/-</sup>マウスにおける細胞内局在の変化を解析した。

#### 2) Aspp1に関する細胞生物学的解析

Aspp1が細胞形態に与える作用を調べるために、蛍光タンパクEGFPと融合させたAspp1を培養細胞に発現させ、タンパクの細胞内局在と細胞の形態変化について解析した。コントロールにはEGFPタンパ

クを用い、EGFP融合タンパクとしてはAspp1全長のみならずSH3ドメインを欠損したもの（EGFP-Aspp1  $\Delta$ SH3）やSH3ドメインとAnkyrin repeatsの両方を欠損したもの（EGFP-Aspp1  $\Delta$ ANK-SH3）を用いて、Aspp1タンパクの局在にどのドメインが必要であるか解析した。

### 3. 結果

DNAマイクロアレイおよびリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析から、Aspp1<sup>-/-</sup>マウス由来リンパ管内皮細胞においてPodoplaninおよびVE-cadherinの発現が上昇していることが分かった。Podoplaninは細胞膜表面にある糖タンパク質でリンパ管内皮細胞特異的に発現し、アクチン結合タンパクであるEzrin/Radixin/Moesinファミリーに結合することが知られている。VE-cadherinは血管とリンパ管両方の内皮細胞に特異的に発現し、内皮細胞間接着に重要であることが知られている。これらのタンパクのAspp1<sup>-/-</sup>マウスでの局在を調べるために胎仔皮膚を採取して、PodoplaninとVE-cadherinに対するそれぞれの抗体で二重染色を行った後に皮膚フラットマウント標本を作成し、コンフォーカルレーザー顕微鏡で解析した。Podoplaninはリンパ管内皮細胞の突起部分に局在していたが、VE-cadherinは細胞間結合部位に集積が認められたが突起部分への局在は認められなかった。現在までの解析では、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスにおいてこれらのタンパクの局在異常は同定できていないが、ここまでの解析結果を論文としてまとめ報告した（文献3）。

Aspp1はリンパ管内皮細胞に発現しており、Aspp1<sup>-/-</sup>マウスにおいては細胞自律的な異常がリンパ管形成の異常に繋がっていると考えられる。HEK293細胞に蛍光タンパクEGFPのみを発現させると細胞全体にほぼ均一に分布したが、EGFPと融合させたAspp1タンパクは主として細胞質に分布した。その内、細胞辺縁部に集積するものが認められ、Phalloidinとの共染色によってEGFP-Aspp1はアクチン上に局在することが分かった。EGFP-Aspp1  $\Delta$ SH3やEGFP-Aspp1  $\Delta$ ANK-SH3も主として細胞質に分布したが、細胞辺縁部への集積は認められなかった。

### 4. 考察

Aspp1は血管およびリンパ管内皮細胞特異的に発現しており、Aspp1は核よりも細胞質特に細胞辺縁部に局在していた。Aspp1およびp53のノックアウトマウスの表現型解析とあわせると、Aspp1は核内でp53と協調してアポトーシスを制御しているより、むしろ細胞質でアクチンリモデリングの制御に関わりながらリンパ管内皮細胞の細胞間接着や細胞運動などを調節していることが予想される。VE-cadherinは細胞突起に局在しないため、リンパ管内皮細胞同士の認識・結合の初期過程には機能していないと考えられるが、安定した細胞間結合にAspp1が重要である可能性が高い。現在までの実験では、Aspp1の強制発現による細胞形態の変化は観察されていないが、Aspp1を発現していない細胞を用いて再検討する必要がある。最近、ショウジョウバエの相同遺伝子であるASPPはCsk (C-terminal Src kinase)の活性を制御していることが報告された(文献4)。今後は、Src kinaseの制御を介したVE-cadherinのリン酸化による細胞間接着の調節、アクチンリモデリングやFocal adhesion complexの制御へのAspp1の関与とリンパ管内皮細胞の運動について分子・細胞レベルで解析することが重要であると考えられる。

### 5. 参考文献

1. Hirashima et al, Blood 104(3):711-718, 2004
2. Samuels-Lev et al, Mol Cell 8(4):781-794, 2001
3. Hirashima et al, Dev Biol 316(1):149-159, 2008
4. Langton et al, Dev Cell 13(6):773-782, 2007