

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Fuctional analysis of novel angiogenic factor VEGF-E_{NZ7} protein in the transgenic mouse model and in the receptor interaction

和訳 血管新生因子 VEGF-E_{NZ7} のトランスジェニックマウス及びキメラ変異蛋白を用いた機能解析

指導教官 澁谷正史教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 木場篤司

背景

血管新生は個体の多様な生理現象において、重要な役割を演じている。血管新生は、Vasculogenesis (脈管形成) と Angiogenesis (狭義の血管新生) の二つに分けられる。脈管形成とは胎生前期における血管形成で、狭義の血管新生とは既存の血管から新たに誘導される血管形成である。成熟した個体では性周期に応じた黄体形成・子宮内膜の一過性の増殖・創傷治癒といった状態に血管新生が強く関係している。また、様々な病的な状態においても血管新生が与える影響が大きく、例えば、糖尿病性網膜症、リュウマチ様関節炎、乾癬などで血管新生が過剰に誘導され、また癌の進展と血管新生の密接な関係も明らかになってきた。

血管内皮細胞を特異的に増殖させる因子として同定された血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管新生において主要な役割を果たすことが示されている。VEGF 蛋白は約 20kD のサブユニットが二量体を形成する分泌型の因子である。その一次構造は血小板由来因子(PDGF)と相同性を示し、8個のシステインが同間隔で保存されている。これらシステイン間のジスフィルド結合に制御され、VEGF と PDGF の3次構造は高い類似性を示すことが結晶構造解析により明らかにされた。

VEGF 受容体として Flt-1/VEGFR-1 と KDR/VEGFR-2 (以降それぞれ VEGFR-1 と VEGFR-2) が報告されている。どちらも、チロシンキナーゼタイプを受容体であるが、その作用は大きく異なる。VEGFR-2 に比べて、VEGFR-1 が約 10 倍の VEGF 結合活性を有するが、シグナル伝達活性は逆に VEGFR-2 で非常に強く、VEGF の生物学的作用は、主に VEGFR-2 を

介していると考えられている。VEGF とその受容体 VEGFR-1 と VEGFR-2 が、発生過程の血管新生において欠かせないことが、ノックアウトマウスの解析で示された。VEGF のノックアウトマウスでは、(-/-) マウスでも血管形成が未熟で胎生 11 日頃で死亡する。受容体については、VEGFR-1(-/-)マウスで、内皮細胞の過剰な増殖が見られ、血管構築の異常により、胎生 8.5-9.5 日で死亡した。VEGFR-2(-/-)マウスでは、内皮細胞の形成が誘導されず、VEGFR-1 の場合と同時期の胎生 8.5-9.5 日で死亡した。

これまで VEGF 関連因子として、Placenta growth factor(PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E 等が報告されている。PlGF と VEGF-B は VEGFR-1 に特異的に結合し、弱い血管内皮細胞増殖活性を示す。VEGF-C と VEGF-D の特異的レセプターとして、Flt-4/VEGFR-3 が報告されている。VEGFR-3 はリンパ管内皮細胞に特異的に発現しており、このことから VEGF-C と VEGF-D の生理的作用が血管内皮に対してよりも、主にリンパ管内皮に対して働くことが示唆された。

VEGF-E は Parapox ウイルス属の Orf ウイルスのゲノム上に見出された open reading frame にコードされる蛋白である。これまで、3つの関連因子が報告されており、それぞれウイルス株にちなんで VEGF-E_{NZ7}, VEGF-ORFVNZ2/VEGF-E_{NZ2}, VEGF-E₁₇₀₁ と呼ばれている。小川らの最近の報告によると、VEGF-E_{NZ7} 蛋白は VEGFR-2 特異的に VEGF-A と同等の強さで結合し、その下流のシグナル伝達を活性化した。また、VEGF-E_{NZ7} 蛋白は in vitro で血管内皮細胞の増殖活性を示し、更に血管透過性亢進も誘導した。VEGF-E_{NZ2} と VEGF-E₁₇₀₁ については、VEGF-E_{NZ7} と同等の活性を持つことが他のグループにより示された。

本研究では、更に VEGF-E_{NZ} の生物学的機能を解析するために、トランスジェニックマウスを作製した。また、同蛋白質のキメラ変異体を用いて、受容体結合に関する生化学的機能解析を行った。

1. トランスジェニックマウスにおける VEGF-E-NZ7 の生物学的機能解析

背景と方法 VEGF-E_{NZ} のトランスジェニックマウスを作製し、生物学的機能を解析した。プロモーターとしてヒト keratin 14 promoter の発現ベクターを用いて、目的の VEGF-E_{NZ7} 遺伝子の発現を皮膚特異的に誘導した。この発現ベクターはこれまで、様々な因子の発現に使われてきた。VEGF-E と関連性の高いものでは、VEGF-A, VEGF-C, Angiopoietin 1 の解析に用いられ、それぞれ血管やリンパ管に関連した強い表現形が示された。VEGF-E_{NZ7} のトランスジェニックマウスでも、同様な方法で強い表現形が導かれることが予想された。VEGF-E_{NZ7} が VEGFR-2 に特異的に結合することから、その対照として VEGFR-1 のリガンドである PlGF-II のトランスジェニックマウスも本研究で作製、解析した。

結果と考察 導入遺伝子 VEGF-E_{NZ7} の初代マウスのうち発現が最も高いマウスを用いて、繁殖実験を行った。VEGF-E_{NZ7} トランスジェニックマウスは、誕生し繁殖可能であった。しか

し、興味深いことにトランスジェニックマウスでは皮膚の露出した部分、即ち、耳、鼻周辺、尾において、正常の同腹子に比べ、明らかに赤い色を呈していた。皮膚の切片のヘマトキシリン&エオシン染色では、皮膚の真皮のうち表皮に近い部分において管腔を持つ多数の血管様の構造がみられた。同様の皮膚の切片を血管内皮細胞特異的なマーカーである第八因子関連抗原、von Willebrand factor (vWF) に対する抗体で免疫染色すると、予想通り管腔を囲む部分が染色され、これらが血管内皮細胞であることが示された。また RT-PCR により、VEGF- E_{N27} の発現が皮膚特異的であることも解った。次に、誘導された血管の微細構造を透過型電子顕微鏡で解析したところ、内皮細胞間の接着構造に異常は見られず、また内皮細胞の側に周皮細胞の存在も認められた。以上の結果から、VEGF- E_{N27} トランスジェニックマウスでは、皮膚特異的に発現する VEGF- E_{N27} により血管網が誘導され、その血管は機能・構造共に正常であることが示された。VEGFR-1 特異的リガンドである PlGF-II のトランスジェニックマウスでは、血管の誘導が若干観察された。次に、これら血管誘導の表現形における、他の血管新生に関連する因子の関与を調べる目的で、耳の組織について basic FGF, VEGF-A, Ang 1, Ang 2, VEGFR-2 遺伝子の mRNA の発現解析を RT-PCR により行った。VEGF- E_{N27} トランスジェニックマウスでは basic FGF, VEGF-A の発現に変化はなかったが、Ang 1 と Ang 2 の発現が上昇していた。また、血管誘導を反映して、VEGFR-2 の発現が強く上昇していた。PlGF-II トランスジェニックマウスでも VEGF-A の発現に変化は無かったが、basic FGF, Ang 1, Ang 2 については、発現の上昇が見られた。VEGF- E_{N27} と PlGF-II のトランスジェニックマウスで、それぞれの血管新生に関わる機構が異なる可能性が示唆された。

以上の結果から、VEGF- E_{N27} と PlGF-II はそれぞれの特異的受容体を活性化することで血管新生を誘導することが示された。また、VEGF- E_{N27} による血管新生誘導が極めて強いことから、その受容体 VEGFR-2 は個体レベルの条件でも血管新生を誘導するシグナル伝達に使われる比重が高いことが示されたが、VEGFR-1 による血管新生誘導のメカニズムについても興味深い結果が得られた。

2. VEGF- E_{N27} キメラ変異蛋白を用いた受容体結合に関する機能解析

背景と方法 これまで、VEGF-A の VEGFR-2 への結合に重要な領域およびアミノ酸残基が、アラニン置換法や結晶構造解析により明らかにされてきた。これらの重要なアミノ酸残基は、VEGF-A 分子が形成する3つのループのうち、ループ1とループ3に存在しており、これらのループ構造の重要性が示唆された。また、興味深いことに、VEGF- E_{N27} 蛋白は VEGF-A と同様に VEGFR-2 に結合するが、VEGF-A にとって重要なアミノ酸残基が VEGF- E_{N27} において保存されていない。更に、VEGF- E_{N27} には、他の VEGF ファミリーには無い特異的な8アミノ酸残基の挿入がループ3領域に見られた。これらのことから、VEGF- E_{N27} による VEGFR-2 への結合のメカニズムが、VEGF-A とは異なる可能性が示唆された。本研究では、VEGF- E_{N27} の VEGFR-2 への結合に重要な領域を同定する目的で、VEGF- E_{N27} と PlGF のキメラ変異体のシリ

ーズを作製し、変異が受容体結合能に与える影響を解析した。PlGF は VEGFR-1 の特異的リガンドであり、VEGFR-2 には結合しない。PlGF も同じく VEGF ファミリーに特徴的なシステインモチーフを持つことから、キメラ変異蛋白分子の基本骨格に与える影響は、最小限に抑えられると予想された。解析の方法として、VEGFR-2 と ^{125}I -VEGF-A の結合における競合阻害実験、VEGFR-2 の自己リン酸化実験、内皮細胞増殖実験、管腔形成実験を行った。

結果と考察 全般的に、VEGFR-2 への結合能を失ったキメラ変異蛋白は、同じく生物学的活性にも著しい低下が見られた。VEGF-A では、ループ1とループ3に VEGFR-2 結合に重要なアミノ酸残基が存在したが、VEGF- E_{NZ7} のキメラでもループ1とループ3を変異したものに、結合能や他の VEGFR-2 を介した生物学的活性に著しい低下が見られた。また、この結果は、ループ領域のみを特異的に置換した変異蛋白でも確認された。以上のことから、アミノ酸配列の相同性は低い VEGF- E_{NZ7} においても VEGF-A と同様に、ループ1とループ3の二つのループが揃っていることが重要であることが示された。また、VEGF-A のループ1とループ3の領域の一部を別々に VEGF- E_{NZ7} に導入したキメラ蛋白では、活性の著しい低下が見られたが、両部位を同時に導入すると内皮細胞増殖活性と管腔形成活性で回復が若干見られた。次に、VEGF- E_{NZ7} に導入する VEGF-A の領域を一部から全ループ1と全ループ3にまで延長した。また、同様にして、VEGF- E_{NZ7} のループ領域を PlGF に導入した。どちらのキメラ蛋白でも、予想通り受容体結合活性や他の生物学的活性に回復がみられた。以上のことから、VEGF-A と VEGF- E_{NZ7} はアミノ酸配列での相同性は低いですが、それぞれのループ1と3が VEGFR-2 に結合する条件を満たすために重要な役割を果たす、というメカニズムにおいて非常に近いことが示された。また、アミノ末端、カルボキシル末端ペプチドは活性に関与しないことから、これらを PlGF などのヒト由来ペプチドへ置換することにより、VEGF- E_{NZ7} の潜在的な抗原性の減少が期待される。 VEGF- E_{NZ7} の臨床応用へ向けて有用な情報が得られた。