

審査の結果の要旨

氏名 木場篤司

血管内皮増殖因子 (VEGF) ファミリーの新規のメンバーの VEGF-E<sub>NZ7</sub> は Parapox ウイルス属の Orf ウイルス NZ7 株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。VEGF-E<sub>NZ7</sub> 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する。また、VEGF-E<sub>NZ7</sub> 蛋白は in vitro で血管内皮細胞の増殖活性を示し、更に Miles assay により血管透過性亢進を誘導することも示されている。

本研究では、更に VEGF-E<sub>NZ</sub> 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い、以下の結果を得ている。

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

1. VEGF-E<sub>NZ</sub> 及び PlGF-II のトランスジェニックマウスの作製

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、VEGF-E<sub>NZ7</sub> と PlGF-II 遺伝子の発現を皮膚特異的に誘導したマウスを作成した。これらの遺伝子産物はそれぞれ KDR/VEGFR-2 と Flt-1/VEGFR-1 に特異的なリガンドであるため、個体レベルでのそれぞれの受容体の機能も解析できることが期待された。トランスジェニック初代マウスを用いて繁殖実験を行ったところ、どちらのトランスジェニックマウスも、誕生し繁殖可能であった。また RT-PCR により、導入遺伝子の発現が皮膚特異的であることも示された。

2. VEGF-E<sub>NZ7</sub> 及び PlGF-II のトランスジェニックマウスに誘導された血管新生

VEGF-E<sub>NZ7</sub> 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。これらは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) に対する抗体により免疫染色され、これらが血管内皮細胞であることが示された。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<sub>NZ7</sub> 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<sub>NZ7</sub> 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。PlGF-II のトランスジェニックマウスは、VEGF-E<sub>NZ7</sub> よりも弱い表現形であるが、血管の誘導が若干観察された。

3. トランスジェニックマウスにおける血管新生因子の発現の RT-PCR 法による解析

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、耳の組織における 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<sub>NZ7</sub> 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、血管新生誘導を反映して、VEGFR-2 の発現が強く上昇していた。PIGF-II トランスジェニックマウスでも VEGF-A の発現に変化はなかったが、basic FGF, Ang 1, Ang 2 については、発現の上昇が見られた。VEGF-E<sub>NZ7</sub> と PIGF-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<sub>NZ7</sub> と PIGF-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<sub>NZ7</sub> 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。

#### PART 2. VEGF-E<sub>NZ7</sub> キメラ変異蛋白を用いた受容体結合に関する機能解析

これまでの報告によると、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、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。興味深いことに、VEGF-E<sub>NZ7</sub> 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<sub>NZ7</sub> において保存されていない。更に、VEGF-E<sub>NZ7</sub> 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<sub>NZ7</sub> 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ていた。本研究では、VEGF-E<sub>NZ7</sub> の VEGFR-2 への結合に重要な領域を同定する目的で、VEGF-E<sub>NZ7</sub> と VEGFR-1 の特異的リガンドであり VEGFR-2 には結合しない PIGF 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。

1. PIGF 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。精製した変異蛋白について還元、非還元状態においてウエスタンブロッティングで解析したところ、全ての蛋白で少なくとも二量体形成に異常は見られなかった。また、全般的に、キメラ変異蛋白の KDR/VEGFR-2 への結合能はその他の生物学的活性と相関関係にあった。
2. VEGF-E<sub>NZ7</sub> の全領域のうち PIGF の配列を置換しても活性に影響が見られなかった領域は、第一システインよりアミノ末端の領域、その下流の  $\alpha$ -ヘリックス領域、ループ 2 領域、第八システインよりカルボキシル末端の領域であった。これらの領域は VEGF-E<sub>NZ7</sub> の活性に直接関与しない可能性が示された。
3. ループ 1 やループ 3 の領域を PIGF に置換すると活性が失われた。また、興味深いことに、同じ領域を KDR/VEGFR-2 に結合する VEGF-A と置換しても、活性が失われていた。以上のことから、アミノ酸配列の相同性は低い VEGF-E<sub>NZ7</sub> 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うことが活性に必要であることが示された。

4. VEGF-Aのループ1とループ3の領域の一部を別々にVEGF-E<sub>NZ7</sub>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関腔形成活性で回復が若干見られた。次に、VEGF-E<sub>NZ7</sub>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<sub>NZ7</sub>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<sub>NZ7</sub>はアミノ酸配列での相同性は低い、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、という共通したメカニズムを持つことが示された。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<sub>NZ7</sub>の潜在的な抗原性の減少が期待される。VEGF-E<sub>NZ7</sub>の臨床応用へ向けて有用な情報が得られた。

以上、本研究ではPART1で、トランスジェニックマウスを用いて解析した結果、VEGF-E<sub>NZ7</sub>はKDR/VEGFR-2を介して強い血管新生を、PlGF-IIはFlt-1/VEGFR-1を介して弱い血管新生を誘導することが明らかとなった。次にPART2で、VEGF-E<sub>NZ7</sub>のキメラ変異体を用いてKDR/VEGFR-2への結合能や生物学的活性の解析を行った結果、VEGF-E<sub>NZ7</sub>のループ1とループ3の両方が同時に存在することが不可欠であることが示された。従って、本研究はVEGF-E<sub>NZ7</sub>やPlGF-II蛋白、その受容体KDR/VEGFR-2やFlt-1/VEGFR-1の個体レベルでの血管新生誘導機構の解明に、またKDR/VEGFR-2リガンドに共通する受容体結合機構の解明に大きく貢献したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。