

論文の内容の要旨

論文題目 **Mechanisms of the Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and *flt-1* Tyrosine Kinase (VEGF Receptor 1) Gene Expression**

血管内皮特異的増殖因子 (VEGF) および *flt-1* チロシンキナーゼ (VEGF 受容体 1) 遺伝子の発現調節機構の解析

氏 名 脇 谷 健 司

ヒトなどの脊椎動物においては、血管新生、すなわち新たな血管の形成は、胎生期の循環系の発生のみならず、成熟固体での組織や器官の形成や再生においても必要不可欠の現象である。また、血管新生は、これら正常なもの以外にも、固形腫瘍の増殖や転移、リウマチ様関節炎、糖尿病性網膜症など、さまざまな疾患においてその病態形成に深く関与することが知られている。

血管新生は、正常状態においては厳密なコントロールを受けており、血管内皮細胞の増殖と分化がその中心的な過程である。血管内皮特異的増殖因子 (VEGF) は、ウシ下垂体細胞培養上清中に見いだされた分泌型の糖タンパクで、内皮細胞特異的な増殖刺激作用とともに、生体内においては、血管新生を誘導し、血管透過性を亢進させることが知られている。VEGF は、上皮系や間葉系など、さまざまな種類の細胞において発現されており、これら細胞によって産生された VEGF は、内皮細胞上に発現される受容体を介して、主としてパラクリン的に作用するものと考えられている。

高親和性 VEGF 受容体としては、現在までに、Flt-1 (VEGFR1) と KDR/Flk-1 (VEGFR2) の 2 つの受容体型チロシンキナーゼが知られているが、これら VEGF 受容体は、細胞外ドメインの 7 個の免疫グロブリン様構造や、キナーゼ

ドメイン内の約 70 アミノ酸のキナーゼ挿入領域など、互いに構造上の類似性を示し、生体内においては、ほぼ血管内皮細胞に限局して発現されることが特徴である。

VEGF とその受容体は、さまざまな血管新生において、中心的な役割を果たすことが知られている。すなわち、正常胎仔における発現パターンや、ノックアウトマウスの解析結果は、VEGF と 2 つの受容体 (Flt-1, KDR/Flk-1) が、いずれも、個体発生における正常な血管系の形成に必須の遺伝子産物であることを示している。また、VEGF は、種々のヒト腫瘍組織中において高発現が報告されており、腫瘍血管の形成など、病的な血管新生においても主要な血管新生因子と考えられている。

VEGF 遺伝子の発現誘導因子としては、現在までに、低酸素、低グルコースなどの代謝性因子や、成長因子、サイトカイン、性ホルモンによる刺激、さらには、腫瘍細胞にみられる遺伝子変化 (癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の不活化) などが報告されているが、実際の生体内における発現調節機構については不明の点も少なくない。また、VEGF 受容体の、内皮細胞特異的な発現に関わる分子機構については、ほとんど、知られていない。

VEGF とその受容体遺伝子の発現調節機構を解明することは、血管新生の分子機構を理解し、血管新生の人為的コントロールによって、固形腫瘍の抗血管新生療法や血管病変に対する遺伝子治療に応用するにあたって重要であると考えられる。VEGF およびその受容体の 1 つである *flt-1* (*VEGFR1*) 遺伝子の発現調節について、分子生物学的手法を用いて解析を行い、以下の知見を得た。

1. オカダ酸による VEGF 遺伝子の発現誘導 : VEGF 遺伝子発現調節におけるプロテインフォスファターゼ (PP) の関与

VEGF の発現に関して、新たに、非 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-型腫瘍プロモーターであるオカダ酸 (okadaic acid) が、その発現誘導因子であることを見出した。

オカダ酸は、海洋生物、クロイソ海綿より抽出されたポリエーテル化合物で、マウス皮膚の 2 段階発癌実験では強力な腫瘍プロモーターとして作用する。オカダ酸は 1 型および 2A 型のプロテインフォスファターゼ (PP1, PP2A) の特異的阻害剤であり、プロテインキナーゼ C (PKC) を直接的に刺激する TPA と

は異なった生化学的作用機序をもつとされる。

多段階発癌実験における腫瘍プロモーションと、腫瘍血管新生との関係は必ずしも明らかではないが、これら化学発癌実験においても、腫瘍がある大きさを超えて成長する以上、なんらかの血管新生因子の活性化が起きていると考えられる。TPA は、培養細胞に対して VEGF の産生を亢進させることが報告されているが、オカダ酸についても、生理的濃度の範囲で各種培養細胞培養液中に添加したところ、数時間後に VEGF mRNA 量の 5-10 倍の上昇を認めた。さらに、オカダ酸刺激後、培養上清中の VEGF タンパク量も著明に増加しており、VEGF は、オカダ酸による 2 段階発癌モデルにおいて、生体内における血管新生因子候補の 1 つと考えられる。

しかし、オカダ酸による VEGF 遺伝子発現誘導は、TPA によるそれとは異なって、比較的緩やかな時間経過で起こることが特徴的であり、その作用は、PKC 活性に非依存적であった。また、オカダ酸の腫瘍プロモーション作用の内因性メディエーターとして注目される腫瘍壊死因子 (TNF- α) の関与についても、培養液中への抗 TNF- α 中和抗体の添加によってもオカダ酸刺激後の VEGF mRNA の誘導は阻止されず、オカダ酸による VEGF 遺伝子活性化の機構として、TNF- α によるオートクリン的な作用機序は否定的であった。

一方、オカダ酸と同様に PP1 および PP2A の特異的阻害剤であるトウトマイシン (tautomycin) にも、高濃度での VEGF mRNA の誘導作用が認められた。トウトマイシンには、オカダ酸のような強力な腫瘍プロモーション作用や TNF- α の誘導作用は認められないことから、オカダ酸による VEGF 遺伝子発現誘導は、その腫瘍プロモーター活性や TNF- α の誘導能よりも、むしろ、プロテインフォスファターゼ (PP) 活性の抑制に関連しているものと思われた。さらに、VEGF mRNA の誘導に必要なトウトマイシンの用量よりみて、PP のうちでは、PP1 よりも PP2A が VEGF 遺伝子発現の制御に関わっていることが示唆されており、これら PP によって調節を受けるシグナル伝達系を明らかにすることによって、VEGF 遺伝子の発現調節機構に関して新たな知見が得られるものと期待される。

2. cAMP response element (CRE) と Ets モチーフによる VEGF 受容体 *flt-1* 遺伝子の転写活性化：プロトオンコジーン *c-ets-1* による内皮細胞特異的発現調節

VEGF 受容体遺伝子の発現は、i) 内皮細胞に特異的であること、ii) 胎生期の血管新生が活発な時期においては特に高いレベルで発現されること、iii) 成熟個体においても腫瘍血管などでは高発現されること、が特徴的である。従って、ゲノム DNA 上には、VEGF 受容体遺伝子の内皮細胞特異的な発現を調節するエンハンサー領域が存在し、胎生期や腫瘍組織において、その活性を発揮するものと想定される。

VEGF 受容体の 1 つ *flt-1* (*VEGFR1*) 遺伝子の 5'-隣接領域を単離し、*flt-1* mRNA を発現する 293E1 細胞や内皮由来の細胞株を用いて chloramphenicol acetyl transferase (CAT) アッセイを行ったところ、転写開始点より上流約 200 bp の間に細胞特異的な転写調節領域が存在することが判明した。この領域には、1 つの CRE と 5 つの Ets モチーフが存在するが、さらに、これらモチーフに点変異を導入した結果、転写開始点の上流約 50 bp 附近に存在する CRE とこれに近接する 1 つの Ets モチーフの synergistic な作用によって *flt-1* 遺伝子の細胞特異的な転写活性が発揮されることを見出した。これら 2 つのモチーフを含む約 90 bp の *flt-1* 遺伝子上流領域のプロモーター活性は、Ets タンパク発現ベクターの co-transfection によって著明に上昇し、また、ゲルシフト法によって、293E1 細胞や内皮細胞の核抽出液中に、これら CRE と Ets モチーフのそれぞれに特異的に結合するタンパク性因子の存在が確認された。

鳥類の発生初期の内皮細胞や、ヒトの腫瘍血管において、Ets ファミリーに属するタンパクの 1 つ、c-Ets-1 の高発現が報告されている。本研究に用いた 293E1 細胞や培養内皮細胞にも c-Ets-1 の存在が認められ、*flt-1* 遺伝子の内皮細胞特異的な発現調節機構として、転写調節因子 c-Ets-1 による活性化が考えられる。

個体発生や腫瘍組織での血管新生においては、VEGF-Flt システムは、リガンド、レセプターの両者とも、高いレベルでの発現が誘導されることが報告されている。c-Ets-1 は、内皮細胞において、VEGF を含むさまざまな成長因子による刺激に反応して、その発現が誘導されることが知られており、転写調節因子 c-Ets-1 を介するポジティブフィードバック機構は、血管新生における、VEGF とその受容体 Flt-1、両者の協調的な高発現を説明するモデルの 1 つであると考えられる。