

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of Angiopoietin-Tie system in angiogenesis and vascular permeability

和訳

血管新生、血管透過性におけるアンジオポエチン-Tie システムの作用の解析

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 10 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 齋藤桃実

血管新生 (angiogenesis) は胎生期における血管系形成の中心的過程であるばかりでなく、成熟個体の卵巣における黄体形成、胎盤形成などに関与する。一方、これらの正常な血管新生以外にも病的血管新生や血管透過性亢進が、固形腫瘍の増殖と進展、糖尿病網膜症やリウマチ様関節炎などの様々な疾患の病態に関与していることが知られている。これらに深く関わっている血管内皮細胞特異的増殖因子、血管透過性因子として VEGF (vascular endothelial growth factor) が見出され、VEGF とその受容体による血管新生の機構が *in vitro* および *in vivo* 両面において解析されつつある。近年、VEGF とその受容体系とは異なる新たな血管制御系として、Tie 受容体ファミリーとそのリガンドであるアンジオポエチン(Ang)ファミリーが単離された。Tie 受容体ファミリーはチロシンキナーゼ型受容体であり、現在 Tie1、Tie2 が知られている。また、アンジオポエチンファミリーはアンジオポエチン 1 (Ang1) からアンジオポエチン 4 (Ang4) までが単離されており、これらはすべて Tie2 のリガンドである。Tie2 チロシンキナーゼに対して Ang1 およ

び Ang4 は自己リン酸化を誘導するのに対し、Ang2、Ang3 は結合はするものの自己リン酸化を誘導しないことから、前者は Tie2 のアゴニスト、後者は Tie2 のアンタゴニストとして機能すると考えられている。ノックアウトマウスの解析により、VEGF とその受容体が vasculogenesis（血管発生）と呼ばれる血管の初期発生からその後の血管新生に至るまで非常に広い範囲の血管系形成に関与するのに対して、アンジオポエチン-Tie 受容体系は胎生中期・後期の内皮細胞と平滑筋細胞（および周皮細胞）の相互作用に重要であることが明らかにされた。しかしながら、Ang-Tie2 系の *in vitro*、*in vivo* における血管系への作用に関しては不明な点が多い。

本研究では、血管新生および血管透過性における Ang-Tie2 系の作用を解析することを目的にふたつの実験を行った。(1) Ang-Tie2 系の分子細胞生物学的な解析を目的に、そのシグナル伝達および管腔形成への影響を、その他の血管新生因子 VEGF、HGF (hepatic growth factor) および bFGF (basic fibroblast growth factor) と比較検討した。(2) *in vivo* における血管新生、血管透過性への Ang-Tie2 系の関与を検討する目的で、マウス腹水癌における Ang の発現変化およびアデノ Tie2-Fc による Ang-Tie 系阻害の影響を調べた。

(1) Ang-Tie2 系のシグナル伝達および管腔形成への影響

結果

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の一次元培養系において Ang1 は MAP kinase を弱く活性化したが、HUVEC の増殖に影響は見られなかった。しかしながら、Ang1 は無血清下において誘導される HUVEC のアポトーシスを VEGF、HGF および bFGF と比較すると弱いながら阻害することが分かった。アポトーシス阻害に関わるシグナルとして PI3-kinase-Akt 系に注目し、Ang1 がこの系に関与するか検討した。Ang1 は Akt を弱くリン酸化し、この活性化は PI3-kinase の阻害剤である Wortmannin で阻害された。また、Ang1 の誘導する無血清下での抗アポトーシス効果も Wortmannin で完全に抑制されることから、Ang1 によるアポトーシス阻害は PI3-kinase 系が関与していることが示唆された。Ang1 による管腔形成への影響を調べるために、HUVEC とヒト繊維芽細胞の共培養による管腔形成のモデル系を用いた。この系において Ang1 は、VEGF、HGF および bFGF 同

様、管腔形成量を増大させた。Ang1 単独ではコラーゲンゲルやマトリゲル内で HUVEC の管腔形成を誘導できないことが報告されているため、この共培養系において Ang1 が誘導した管腔形成量の増大は、内在性の VEGF に依存しているのではないかと考え、抗 VEGF 中和抗体を各リガンドとともに加えた。その結果、予想通り Ang1 に誘導される管腔形成は著しく阻害された。興味深いことに、HGF や bFGF によって誘導される管腔も強く阻害され、このことから Ang1 のみならず HGF や bFGF による管腔形成の促進も内在性 VEGF に強く依存していることが示唆された。また、管腔を形成する HUVEC のアポトーシスの割合を調べた結果、Ang1 は PI3-kinase 系を介して HUVEC のアポトーシスを抑制し管腔形成を促進することが分かった。管腔形成中にアポトーシスを起こす HUVEC では活性化 Caspase-3 の発現亢進が免疫染色により確認され、Ang1 の抗アポトーシス効果は Caspase-3 活性化の阻害が関与していることが示唆された。

考察

マウスの角膜血管形成モデルを用いた実験で、Ang1 単独では血管新生が認められないものの、VEGF と Ang1 を同時投与すると VEGF 単独と比べより緻密な血管構造を形成するという報告がある。本研究において、Ang1 は一次元培養系および共培養系の HUVEC において抗アポトーシス活性を示した。共培養系において Ang1 の活性は内在性 VEGF に強く依存していることから、*in vivo* では VEGF 存在下で Ang1 は内皮細胞のアポトーシスを阻害し、結果として管腔形成量の増大につながると考えられる。

(2) マウス腹水癌における Ang-Tie2 系の関与

結果

本研究では、マウス腹水癌株細胞、乳癌 MM2 を用いた。MM2 細胞は VEGF を分泌しており、腹水の産生や腹壁における血管新生を誘導する。これらの誘導は抗 VEGF 中和抗体により抑制されることが以前の報告で分かっている。MM2 細胞内の Ang1、Ang2 の発現は RT-PCR 法により確認したところ、ともに発現していなかった。6 週齢、C3H/He マウスに MM2 細胞 (1×10^6 cells) を腹腔内移植し、移植後 7 日目に腹壁を摘出し Ang2 の発現の変化を RT-PCR 法で調べた。その結果、MM2 細胞移植により腹壁中の Ang2 の

mRNA レベルの上昇が認められた。MM2 細胞の分泌する VEGF に誘導される腹壁の新生血管において Ang2 の発現が亢進しているのではないかと考え、抗 VEGF 中和抗体を投与したときの腹壁における Ang2 のレベルの変化を RT-PCR 法および免疫組織染色法により確認した。その結果、腹壁中 Ang2 の発現は VEGF 中和抗体の投与により減少する傾向が見られ、興味深いことに Ang1 は Ang2 と反対に、MM2 移植により発現が下がり、抗 VEGF 中和抗体投与により回復する傾向が見られた。また、免疫組織染色の結果、Ang2 は新生血管の内皮細胞で主に発現していることが確認された。腹水癌における Ang-Tie2 系の阻害による影響を検討するため、アデノウイルス Tie2-Fc を作製した。アデノ Tie2-Fc (5×10^8 pfu) を 6 週齢、BALB/C ノードマウスに腹腔内投与し、12 時間後に MM2 細胞 (1×10^6 cells) を腹腔に移植した。血清中の Tie2-Fc タンパク量はアデノ Tie2-Fc 投与後 4 日目に約 34 μ g/ml に達し、10 日目には約 9 μ g/ml まで減少した。アデノ lacZ 投与と比較し、アデノ Tie2-Fc 投与により MM2 細胞移植後 7 日目における腹水量、腹水中の腫瘍細胞数に有意な減少が見られた。

考察

腫瘍における Ang-Tie 系の関与についてはいくつかの固形癌で報告されている。Ang1 が主に腫瘍細胞で発現しているのに対し、Ang2 は腫瘍血管の内皮細胞で発現が上昇していることが分かっている。本研究では、腹水癌細胞が産生する VEGF に誘導される腹壁の新生血管内皮細胞で Ang2 の発現が亢進していることが示された。このことから、腹壁において Ang2 が VEGF と協調して血管新生を誘導している可能性が示唆される。これらの新生血管は周皮細胞などの裏打ち構造が少なく脆弱なため、血清や血球が漏出しやすいと考えられる。今回、アデノ Tie2-Fc 投与により腹水量の減少が見られたのは、Tie2-Fc が主に Ang2 を阻害することで血管新生を部分的に阻害したためと考えられる。Ang2、VEGF の同時阻害が VEGF の単独阻害に比較し効果が高いことが示されれば、腹水癌治療の可能性の一つになることが期待される。