

論文の内容の要旨

論文題目 Involvement of VEGF system in intrauterine growth retardation (IUGR) associated with pre-eclampsia
(妊娠中毒症に関連する子宮内胎児発育遅延における VEGF システムの関与の解析)

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 本田 貴宏

背景

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は、血管内皮細胞を特異的に増殖させる因子として見出された。VEGF には、VEGF 受容体 1 (VEGFR-1, Flt-1)、VEGF 受容体 2 (VEGFR-2, Flk-1/KDR)、VEGF 受容体 3 (VEGFR-3, Flt-4) と 3 つのチロシンキナーゼ型受容体がある。VEGF は VEGFR-1 と VEGFR-2 を介して作用を発揮するが、両者は大きく異なっている。VEGFR-1 は VEGF と高親和性 (解離定数 $K_d=1\sim 10\text{pM}$) に結合するが、自己リン酸化のレベルは非常に弱く、VEGF 刺激下での細胞増殖を殆ど示さない。対して、VEGFR-2 は VEGF に対する親和性は、VEGFR-1 と比して 10 分の 1 以下 (解離定数 $K_d=75\sim 125\text{pM}$) であるが、自己リン酸化レベルは高く VEGF 刺激下の細胞増殖も認められている。これらの結果より、VEGF の生物学的活性は主に VEGFR-2 を介していると考えられる。

VEGF-VEGFR システムは、胎生初期から発現し胎児における正常な血管と血球形成を調節する重要な因子であることが、ノックアウトマウスの解析により明らかにされた。VEGF は、ヘテロ接合体であっても、血管形成が強く障害され胎生約 11 日で致死となる。また VEGF 受容体ホモ接合体は、いずれも胎生期に致死となる。VEGFR-1 ノックアウトマウスは、分化した内皮細胞、血球成分が存在するにもかかわらず、内皮細胞が過増殖し無秩序な血管形成を示し胎生 8.5~

9.5日で致死となる。VEGFR-2 ノックアウトマウスは、卵黄嚢内の血島が形成されず、血管内皮細胞が欠如し、しかも血球成分の著明な低下を示し胎生約 8.5日で致死となる。これらの事実より、個体の初期発生において VEGF 量の低下が血球、血管形成に重大な影響を与え、VEGF は厳密な量的制御を受けていることが示唆される。

近年、固形腫瘍の進展抑制において VEGF-VEGFR システムの生物活性を阻止するいくつかの試みがなされている。VEGF を標的としたものとして中和抗体、VEGF 受容体を標的としたものとして dominant negative 受容体、可溶性受容体がある。ほかに VEGFR-1 及び VEGFR-2 キナーゼのリン酸化を、特異的に阻害する低分子化合物として SU5416 がある。SU5416 は、VEGF 刺激下におけるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖を強力かつ即効的に抑制し、単回投与後 72 時間以上にも及ぶ長い持続作用性を持つとされている。

妊娠中毒症は全妊娠の約 5~15% で発生し、母体の血圧上昇、蛋白尿、浮腫を主徴とした原因不明の疾患で、高頻度に子宮内胎児発育遅延 (IUGR) を伴い、組織学的には、胎盤の浮腫様変化とフィブリン沈着を認める。また最近、妊娠中毒症患者における血中可溶性 VEGFR-1 は、正常妊婦に比べ有意な上昇を認めることや、妊娠ラットに可溶性 VEGFR-1 を投与すると、胎盤における組織学的変化は認めないものの、血圧上昇、蛋白尿、腎臓血管内皮細胞障害など妊娠中毒様症状を生ずるという報告がなされ、VEGF-VEGFR システムと妊娠中毒症は密接に関与していることが示された。ほかにも妊娠中期~後期マウスに VEGF を反復投与する実験で、胎児血管に富むラビリンス層 (胎盤の胎児側) に、浮腫様変化とフィブリン沈着を主とする妊娠中毒症類似様組織学的変化を引き起こし、胎児体重の有意な減少を認めるという知見が示されたが、経時的、量的変化に関しては依然として十分な解析が行なわれていない。

これらの背景を基に本研究では、妊娠中期~後期において VEGF-VEGFR システムが胎盤と胎児側にどのように作用するかを探る目的で、VEGF 投与により妊娠マウスに発生する変化の詳細を検討した。さらに具体的な治療法の検討も併せて行なった。

方法と結果

1. 妊娠中期~後期の VEGF 連続投与による生物学的作用の検討

方法: Jcl:ICR 妊娠マウスに rhVEGF 1.5ug を E10 から E17 まで連日腹腔内投与し、E18 に全採血後、胎盤検体を得て胎児体重の計測を行った。VEGF 阻害剤投与群は VEGF 連日投与に加え E12、E15 に VEGFR 阻害剤である 100n mol の SU5416

も同時に腹腔内投与を行った。コントロール群として PBS の腹腔内投与を行った。

結果：①コントロール群（母体数:N=5）、②VEGF 投与群 (N=5)、③VEGF+SU5416 投与群 (N=6) より得られた胎児体重を計測し、統計学的解析を行なった結果、①群 $1.679 \pm 0.013\text{g}$ 、②群 $1.488 \pm 0.013\text{g}$ で有意に減少 ($p < 0.0001$) した。そして③群 $1.671 \pm 0.021\text{g}$ と②群に比べ有意な増加 ($p < 0.0001$) が確認された。①群と③群の間では有意差を認めなかった ($p = 0.766$)。VEGFR-2 の発現をウエスタンブロット法で確認したが各群の発現に変化は認めなかった。胎盤における VEGFR-1、可溶性 VEGFR-1、VEGFR-2 の mRNA 発現は、半定量的 RT-PCR において②群で可溶性 VEGFR-1 の若干の発現低下を認めた。血中可溶性 VEGFR-1 の発現 (ELISA 法) は有意差を認めなかった。

2. 妊娠後期の短期間 VEGF 投与による生物学的作用の検討

方法：E15 の Jcl:ICR 妊娠マウスに rhVEGF1.5ug を 4 時間の間隔で 2 回腹腔内投与し 2 回目の投与から 1 時間後の胎盤検体を採取した。VEGF 阻害剤投与群は VEGF 初回投与の 3 時間前に 100n mol の SU5416 を腹腔内投与し、他は同時期に PBS を投与した。胎盤組織の HE 染色を行ない弱拡大下 ($\times 40$) で浮腫様変化を示す部位の直線最大径を計測、数値化し統計学的解析を行なった。

結果：①コントロール群（胎盤数:N=9）、②VEGF 投与群 (N=9)、③VEGF+SU5416 投与群 (N=10) を比較検討したところ、①群 11.33 ± 2.50 、②群 23.77 ± 4.52 と有意な増加 ($p = 0.033$) を認めた。③群 14.3 ± 2.19 となり②群と比べ減少 ($p = 0.084$) した。①群と③群の比較では $p = 0.386$ となり有意差は認めなかった。

3. 妊娠後期の単回 VEGF 投与による生物学的作用の経時的変化の検討

方法：E13 の Jcl:ICR 妊娠マウス尾静脈より rhVEGF1ug の血管内投与を行ない 20 分後、1 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後の胎盤検体を採取し観察した。

結果：VEGF 血管内投与 20 分後、1 時間後のマウス胎盤の HE 染色でフィブリン沈着を伴った著明な鬱血像が認められた。6 時間後の胎盤の HE 染色においても高度な鬱血像が認められた。以降の胎盤では軽度な像のみ散発的に認められた。

4. 妊娠中期～後期における VEGF 阻害剤投与による肺成熟への影響

背景と方法：妊娠中毒症で問題となるのは高頻度にて体重発育遅延を合併する早産である。早産児では胎児体重と胎児肺成熟が生命予後や将来的な後遺症を決定する重要な因子となる。最近 HIF-2 α ノックアウトマウスにおける VEGF 発現低下によって、胎児の肺サーファクタント産生低下が生じ呼吸不全を生じる事が報告された。1. で胎盤を採取した際に同時に胎児の肺も採取し、免疫組

織化学染色を行ない、サーファクタント陽性肺胞細胞の数をランダムに強拡大下で観察し統計学的解析を行なった。

結果：強拡大下での観察の結果、すべての群でサーファクタント陽性細胞数の統計学的な有意差は認められなかった。

考察

本研究において VEGF 投与による胎児体重の減少には、VEGF-VEGF 受容体システムが強く関与していることが確認された。胎盤内においてラビリンス層の血管内皮には、VEGFR-2 (in situ hybridization 法、および免疫組織学的方法) が発現し、Spongiotrophoblast (胎盤の母胎側) では VEGFR-1 とその変異体である可溶性 VEGFR-1 の発現することが報告されている。また胎児側血管内皮細胞である HUVEC を VEGF 刺激すると HUVEC へ粘着する血小板が 2.5 倍増加するという in vitro での報告が近年されたが、本研究でも VEGF の腹腔内投与で胎盤のラビリンス層にコントロールと比べ有意な程度の浮腫様変化をきたし、さらに VEGF を血管内投与すると短時間で発症し数時間続く著明なラビリンス層の鬱血とフィブリン沈着を生じることが確認された。これらにより母体への VEGF 投与は胎盤の胎児側に血流循環不全と浮腫による拡散障害を引き起こすことが推測される。これらに引き続き生じる母体胎児間のガス交換と栄養分などの物質移動の低下を主徴とする胎盤機能低下が胎児体重の減少の原因と考えられる。VEGF 投与による胎児体重の減少は、低分子化合物の母体投与による VEGF 受容体の自己リン酸化を抑制することにより改善されることが確認された。母体血圧上昇、蛋白尿、胎盤へのフィブリン沈着などの妊娠中毒症所見を示す P57^{kip2} ノックアウトマウスで胎盤 VEGF の発現上昇が報告されている。本研究により妊娠中毒症における胎児側異常は、胎児側での内因性 VEGF 過剰によって生じ、妊娠中毒症に特徴的な組織学的所見である胎盤の浮腫様変化とフィブリン沈着も改善する可能性が示された。妊娠中毒症の母体より出生した胎児予後の重大な決定因子は生下時体重であることは明らかであり、高頻度に合併する子宮内胎児発育遅延の治療に有効な手段は依然として存在しない。VEGF 受容体阻害剤の適切な量の投与により胎児体重減少の改善が期待されることを本研究は初めて示した。最近報告された母体側における妊娠中毒症の所見発生のメカニズムと、本研究で得られた知見の複合的な更なる探求は、子宮内胎児治療 (Intrauterine fetal treatment : IUFT) の樹立という臨床応用にも発展が期待される。