

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 炎症性疾患における血管内皮増殖因子受容体 1
(VEGFR-1/Flt-1)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 村上 雅人

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、そして血管の透過性をあげる因子として同定された。その後のノックアウトマウスの解析から、VEGF およびその受容体である VEGFR 受容体 1 (VEGFR-1, Flt-1) と VEGFR 受容体 2 (VEGFR-2, KDR/Flk-1) はいずれも胎生期の個体発生において必須であり、血管新生において中心的な役割を果たすことが示唆されている。一方 VEGF-VEGFR システムは正常な血管新生以外にも、リウマチ性関節炎などの炎症、糖尿病性網膜症、固形腫瘍などにみられる病的血管新生に深く関わっていることが報告されている。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、しかも血球成分が低下し胎生 8.5~9.5 日で死亡する。これに対して VEGFR-1 ノックアウトマウスでは、分化した内皮細胞あるいは血球成分が存在するにもかかわらず、内皮細胞は過増殖し、無秩序な血管形成を示し胎生約 8.5 日で死亡する。これら両者は VEGF の受容体として働いているにもかかわらず、異なった表現型を示すことは、その役割が異なっていることを示しており非常に興味深い。一方 VEGFR-1 のチロシンキナーゼドメインを欠失したマウス (VEGFR-1 TK ノックアウトマウス)では、VEGF で刺激した時の単球の遊走能が減弱しているものの、みかけ上正常に発育し、血管系も正常である。このこ

とは、個体発生においては VEGFR-1 のチロシンキナーゼドメインは必須でないことを示しているが、成熟期における病的状態での役割についてはまだほとんど解明されていない。

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は、関節病変を主徴とする多発性、進行性の自己免疫性疾患で、その病因についてはいまだ不明である。慢性の経過を示し寛解と増悪を繰り返すが、進行すると関節の破壊・変形をきたし機能障害をもたらす。RA 関節病変は増殖性滑膜炎の像を示す。病変の進行に伴い多数の慢性炎症細胞浸潤とともに滑膜組織が増生、関節腔内に絨毛状に増殖する。炎症細胞や増殖した滑膜組織の産生する種々の炎症性サイトカインにより関節の破壊がもたらされる。増殖した滑膜組織は血管成分に富み、その病変の進行には血管新生が重要な役割を担うと考えられている。

本研究では、病理的血管新生、とくに炎症性疾患である慢性関節リウマチにおける VEGFR-1 の役割を、関節炎モデルマウス、および VEGFR-1 TK ノックアウトマウスをそれぞれ交配し解析した。

関節炎モデルマウス

関節炎モデルマウスは、HTLV-1(Human T-cell Leukemia Virus-1)遺伝子の env-pX 領域を導入したトランスジェニックマウス(pX マウス)を東京大学・医科学研究所 岩倉教授 (Iwakura et al, Science Vol.233 p1026, 1991) より供与を受けた。本マウスはヒトの慢性関節リウマチ(RA)に類似した慢性関節炎を発症し、骨・軟骨の破壊、滑膜の増殖、炎症細胞の浸潤が認められる。関節炎は2ヶ月齢頃より発症し、その発生率はマウス系統によって異なる [3ヶ月齢での発症率: Balb/c(63%) > C3H/He (25%) > C57BL/6 (0%)]。また関節炎で種々の炎症性サイトカインの発現亢進があり、IL-1、IL-6 を欠損させると発症が抑制されることが確認されている。

VEGFR-1 TK ノックアウトマウス

当研究室で作製されたVEGFR-1 TKノックアウトマウス (VEGFR-1 TK (-/-) マウス) は、みかけ上正常に発育し、血管系も正常であるが、VEGFで刺激した時の単球・マクロファージの遊走能が減弱していることが知られている。また本マウスを用いた研究で、VEGFR-1チロシンキナーゼのシグナルが欠損している場合、腫瘍増殖、および肺転移が低下すること、即ち野生型VEGFR-1キナーゼはこれらを促進することが確認されている。

実験結果

(1) Balb/cコンジェニックマウスの作成

本研究で用いた関節炎モデルマウスは、Balb/c遺伝的背景において優位に発症する。VEGFR-1 TK (-/-)マウスは、遺伝的背景がC57BL/6 : C129 = 1 : 1の系であったことから、Balb/cコンジェニックマウスを作成する必要があった。コンジェニックマウスの作成には、作成時間を短縮するためにスピードコンジェニック法を用いた。マウス常染色体に対して20cM毎に遺伝子多型マーカーを計60マーカー作成し、バッククロス毎に遺伝子多型マーカーに対して遺伝的背景をPCR法にて確認後、Balb/c多型により多く置換されたマウスを選択的に次世代のバッククロスに用いた。その結果、4世代目でドナー系統の遺伝子の残存率が3%以下となるコンジェニックマウスを作成することが出来た。Balb/cコンジェニックマウスの作製を確認するために、このマウスとpXマウスと交配し、出生したpXマウスの関節炎発症率を検討し、本来のBalb/c遺伝的背景マウスと同様であることを確認した(図1)。

(2) VEGFR-1 チロシンキナーゼシグナルの関節炎発症に関する役割の解析

最初に作製した VEGFR-1 TK ヘテロマウス (以下、VEGFR-1 TK(+/-)マウス) (Balb/c 遺伝的背景) と pX VEGFR-1 TK (+/-)マウスを交配し、関節炎の発症率を比較した (図 1)。pX マウスに比べて pX VEGFR-1 TK (-/-)マウスの関節炎発症率は、解析した 2 ヶ月齢から 6 ヶ月齢に渡り顕著に減少した。また pX VEGFR-1 TK (+/-)マウスにおいても初期に発症率の低下が観察された。関節炎重症度においては、pX マウス、pX VEGFR-1 TK (+/-)マウス、VEGFR-1 TK (-/-)マウスの順序で症状の減弱がみられた。次に関節炎組織切片をそれぞれ作製し、滑膜過形成、炎症細胞浸潤、pannus (肉芽) 形成、骨破壊を組織学的に検討した。これら全ての項目において、pX VEGFR-1 TK (-/-)マウスは、pX マウスと比較して優位に減少していた。また滑膜組織中にある血管密度も、軽度に減少していることが、統計的有意差は認められなかった。

(3) 単球・マクロファージ細胞からの IL-6 分泌能の解析

次に、IL-6 は関節炎形成に関して重要な役割を担っており、pX マウスで IL-6 を欠損させると発症が抑制されるということ、関節炎炎症細胞のひとつである単球・マクロファージが VEGFR-1 を発現していることが確認されており、これらの単球・マクロファージが IL-6 を分泌するということが、(*fms* エンハンサー/プロモーターの下流に *tax* 遺伝子を結合したものを導入したトランスジェニックマウスの場合、2 ヶ月齢で関節炎の発症率が 100%ときわめて高くなるということ) などから、pX VEGFR-1 TK(-/-)マウスマクロファージの IL-6、なら

びに VEGF 分泌能を検討した。

野生型マウス、VEGFR-1 TK (-/-)マウス、pX マウス、pX VEGFR-1 TK(-/-)マウスそれぞれに 4%チオグリコレートを腹腔内注射 3 日後に腹腔内マクロファージを回収し、Mac-1 抗体ビーズで分離した。その後、VEGF 刺激下で IL-6 分泌能を検討した。VEGFR-1 TK(-/-)マウスは野生型マウスに比べて、VEGF 刺激下で IL-6 分泌量、および VEGF 分泌量が優位に低下していた。同様に pX VEGFR-1 TK(-/-)マウスも pX マウスに比べて同様に低下していた。

考察

本研究において、スピードコンジェニック法を用いてコンジェニックマウス作製に成功した。その結果得られたマウスより、VEGFR-1 チロシンキナーゼシグナルは容量依存的に関節炎の発症に強く関与していると確認された。また VEGFR-1 チロシンキナーゼドメインを欠損したマクロファージは、野生型のそれに比較して IL-6 分泌能、VEGF 分泌能が共に低下しており、これらの分泌に VEGFR-1 が関与していると推測された。またこれら、およびマクロファージの遊走の低下が、関節炎症状軽減の主な原因であったことが考えられる。以上より、疾患モデルマウスのレベルでは VEGFR-1 のシグナルをブロックすることが関節炎の治療に有効であるという知見が本研究によって明らかにされた。今後、これらをブロックする治療実験についての解析を進める予定である。

図 1

