

論文の内容の要旨

論文題目 ハブ毒由来新規 VEGF 類似因子 (*T. f.* svVEGF)
を用いた血管透過性の分子機構の解析

指導教官 滝澤 始 助教授

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

内科学専攻

氏名 高橋 宏行

論文要旨

背景

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF, VEGF-A)-VEGF receptor (VEGFR) 系は、*in vivo* における様々な血管新生および血管透過性の調節において中心的な役割を果たすことが次々と明らかになり、臨床的な立場からも重要度を増している。VEGF-A は血管内皮細胞の増殖を促進する活性と強力な血管透過性亢進活性との主要な 2 つの生物活性を有し、VEGFR-1 と VEGFR-2 の 2 つのチロシンキナーゼ型受容体と特異的に結合する。VEGF-A により誘導される血管内皮細胞の増殖や血管透過性の亢進において、VEGFR-2 の活性化が中心的な役割を果たすことが明らかとなる一方で、VEGFR-1 の役割については、未だ明らかになっていないことも多い。すでに、胎生初期の血管新生において、VEGFR-2 がポジティブなシグナルを伝達する一方で、VEGFR-1 は VEGF-A をトラップしてネガティブな調節をしていることや、病的血管新生において VEGFR-1 を介するシグナルが重要な役割を果たしていることが示されたが、血管透過性亢進における VEGFR-1 シグナルの重要性はいままでほとんど明らかにされていない。

VEGF ファミリータンパク質には、VEGF-A のほか胎盤成長因子 (PlGF)、VEGF-B、

VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E がある。最近へび毒からも VEGF-A に類似したタンパク質が単離され、VEGF₁₆₅ (ヒト VEGF-A の主要なサブタイプ) とほぼ同様な生物活性を有することが報告されたが、いくつかの重要な疑問点が未だ明らかにされていない。へび毒由来の VEGF 類似因子はへび VEGF-A のサブタイプの一つであるのか否か、さらにもしへびがへび毒由来 VEGF 類似因子と VEGF-A という二つの一見非常に類似した VEGF 関連因子を持っているとすれば、生物活性や分子機構にどういった相違点があるのか、これらを使い分けることで何かへびにとって有利な点があるのか、という点である。

本研究で私は、新規 VEGF 類似因子である *Trimeresurus flavoviridis* snake venom VEGF (*T. f.* svVEGF) の精製、全長配列の決定とその分子生物学的特徴の解析を行った。その詳細な解析を通して、生理的な血管透過性における VEGFR-1 シグナルの重要性を明らかにした。

結果

ハブ毒の血管破壊の側面に注目し、奄美ハブ毒に含まれる血管新生因子として精製した *T. f.* svVEGF は、分子量約 14 kDa のタンパク質で、ヒト VEGF-A と 52% の相同性を有し、2 つのサブユニットが 2 量体を形成していた。*T. f.* svVEGF がハブの VEGF-A であるかについて検討するため、ハブの *VEGF-A* 遺伝子のクローニングを試み、ヒト VEGF-A とアミノ酸レベルで 71% の相同性を有するハブ *VEGF-A* (*T. f.* *VEGF-A*) 遺伝子の単離に成功した。*T. f.* *VEGF-A* はヒト VEGF-A と類似して主要な 3 種類のサブタイプを有し、ほとんどの臓器に発現が認められたが、*T. f.* svVEGF の発現は毒腺に局限していた。*VEGF* ファミリーの分子系統樹からも *T. f.* svVEGF と *T. f.* *VEGF-A* は異なった系統の分子であることが判明した。ハブが生理的な血管新生に使用する VEGF-A とは別に、毒特異的な攻撃タンパク質として *T. f.* svVEGF を利用していることが明らかとなった。毒腺において *T. f.* *VEGF-A* の比較的高い発現が認められたため、*T. f.* *VEGF-A* のハブ毒中への分泌の有無についても検討した。その結果、*T. f.* *VEGF-A* の 3 種類のサブタイプもハブ毒中に存在することが明らかとなったが、その含有量は *T. f.* svVEGF に比較して非常に少なく、*T. f.* svVEGF の約 60 分の 1 であった。*T. f.* *VEGF-A* は、ヒト VEGFR-1 および VEGFR-2 双方に結合する性質を有し、哺乳類の血管内皮細胞に対し何らかの生物活性を持つと考えられるが、相対量を考慮すると、ハブ毒における *T. f.* *VEGF-A* の役割はマイナーであり、*T. f.* svVEGF の生物活性にほとんど影響を与えないと考えられる。

ハブが二つの異なる VEGF 関連分子を持っていることが明らかとなったが、ハブは

何故 *T. f.* VEGF-A とは異なる *T. f.* svVEGF を毒腺特異的な攻撃毒として利用しているのであろうか。ハブ毒のヒトを含めた哺乳類に対する影響を念頭に置き、*T. f.* svVEGF とヒト VEGF₁₆₅ との生物活性の違いについて更なる解析をすすめた。その結果、*T. f.* svVEGF は、VEGF₁₆₅ とほぼ同様の血管透過性亢進活性を有していたが、血管内皮細胞増殖活性に関しては、VEGF₁₆₅ の約 10 分の 1 であった。この特徴は、ハブ毒の毒作用を考える上で非常に合目的であり、興味深い。すなわち、血管透過性亢進作用は、ハブ毒中の他の攻撃タンパク質の血管内側への移行を助け、血管破壊・出血を助長する利点を有するが、血管内皮増殖作用は、傷害組織の再生に必要な血管新生を促進し、創部の治癒を促進してしまうからである。私は、*T. f.* svVEGF の分子メカニズムについても解析を行った。その結果、*T. f.* svVEGF はヘパリンとの結合能を有し、さらに VEGF-A と同じく VEGFR-1 及び VEGFR-2 双方に結合するが、VEGFR-3 や neuropilin-1 には結合しないことが判明した。

ヒト VEGFR の強発現細胞株を用いて ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ と VEGFR-1、VEGFR-2 との結合に対する競合阻害実験を行ったところ、*T. f.* svVEGF は、VEGFR-1 とはヒト VEGF₁₆₅ と同程度強く結合し、¹²⁵I-VEGF₁₆₅ と VEGFR-1 との結合に対する 50%阻害濃度 (IC₅₀) は、*T. f.* svVEGF では 30 ng/ml、VEGF₁₆₅ では 12 ng/ml であった。一方、¹²⁵I-VEGF₁₆₅ と VEGFR-2 との結合に対する IC₅₀ は、*T. f.* svVEGF では 254 ng/ml、VEGF₁₆₅ では 13 ng/ml であり、*T. f.* svVEGF が、VEGFR-2 とは VEGF₁₆₅ の 10 分の 1 程度弱くしか結合しないことが明らかとなった。この受容体との結合の特徴を反映して、*T. f.* svVEGF は、VEGFR-1 の自己リン酸化を VEGF₁₆₅ と同程度強く誘導するのに対して、VEGFR-2 の自己リン酸化誘導能は、VEGF₁₆₅ の 10 分の 1 程度であった。

T. f. svVEGF のこのユニークな受容体との結合特性が、血管内皮細胞の増殖を弱くしか誘導せずに血管透過性を強く亢進する生物活性と直接関連しているのかを検討するため、VEGFR-1 特異的なリガンドである PIGF と VEGFR-2 特異的なリガンドである VEGF-E を用いて、VEGFR-1/VEGFR-2 活性化の比率と血管透過性および血管内皮細胞増殖との関係を解析した。結果、血管内皮細胞の増殖は、VEGFR-2 の活性化にほぼ比例して誘導され、PIGF と VEGF-E との割合が 2:6 のときに最も強く誘導された。これに対し、血管透過性亢進は VEGFR-2 が弱く活性化され、VEGFR-1 が優位に活性化されている条件、PIGF と VEGF-E との割合が 5:3 のときに最も強く誘導された。さらに、*T. f.* svVEGF により誘導される血管透過性亢進における VEGFR-1 シグナルの重要性を確認するため、VEGFR-1 のシグナルの入らない VEGFR-1 のチロシンキナーゼ欠損マウス (VEGFR-1 TK (-/-) マウス) を用いて血管透過性を調べた。野生型マウスでは、*T. f.* svVEGF はヒト VEGF₁₆₅ と同程度に血管透過性を亢進させるのに対し、VEGFR-1 TK

(-/-) マウスでは、VEGF₁₆₅ は血管透過性を亢進させたが、*T. f.* svVEGF はほとんど血管透過性亢進を誘導しなかった。以上より、*T. f.* svVEGF は血管内皮細胞増殖をほとんど誘導せずに血管透過性を強く亢進し、毒作用を効果的に増強するという毒として非常に合目的な特性を有し、これが VEGFR-1 優位な活性化という、2 種類の VEGFR とのユニークなアフィニティーより決定されているということが明らかとなった。

考察

今まで VEGF による血管新生及び血管透過性の誘導は VEGFR-2 の活性化が重要であると考えられ、特に血管透過性における VEGFR-1 の役割はほとんど明らかにされていなかった。本研究は、生理的な血管透過性における VEGFR-1 と VEGFR-2 シグナルとの相乗効果を明確に示しており、VEGF により誘導される血管透過性における VEGFR-1 シグナルの重要性を示した最初の報告であると同時に、VEGFR-1/VEGFR-2 活性化の比率により血管透過性亢進と血管内皮細胞増殖の程度に差異が生ずることを示した最初の報告でもある。最近、VEGFR-1 と VEGFR-2 との分子内あるいは分子間のクロストークが血管新生を増強することが報告されたが、本研究の結果は、こういったクロストークが VEGF により誘導される血管透過性の亢進においても存在していることを示唆している。さらに *T. f.* svVEGF は血管透過性をより選択的かつ強力に亢進させる因子であり、腫瘍血管新生をあまり誘導せずに腫瘍内の血管透過性を亢進し、抗腫瘍薬剤のドラッグ・デリバリーを改善するという臨床応用の可能性を秘めた因子と考えられる。

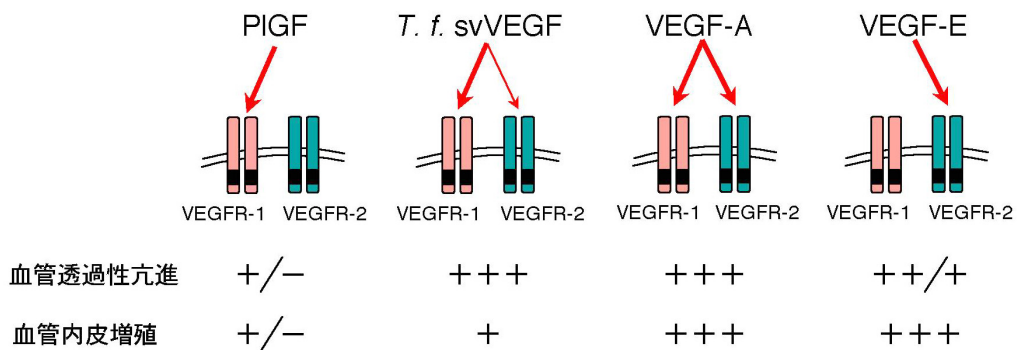


図 VEGFR-1/VEGFR-2 の活性化のバランスと血管透過性亢進、血管内皮細胞増殖の関係