

審査の結果の要旨

氏名 高橋 宏行

本論文は、ハブ毒より新規に同定した vascular endothelial growth factor (VEGF) 類似タンパク質、*Trimeresurus flavoviridis* snake venom VEGF (*T. f.* svVEGF) の分子生物学的特徴の詳細な解析を通して、血管透過性亢進における VEGF receptor (VEGFR) を介するシグナル伝達機構について検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。さらに、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) 遺伝子の単離にも成功した。*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 の発現は毒腺に限局していた。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。
2. *T. f.* VEGF-A の特異抗体を用いたウェスタン・ブロッティング結果、*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。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ことが示された。
3. *T. f.* svVEGF とヒト VEGF₁₆₅ との生物活性の違いについて、内皮細胞の増殖アッセイや血管透過性のアッセイを用いて解析した結果、*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。
4. *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明らかとなった。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と同程度強く結合する一方で、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はVEGF₁₆₅と比較し、VEGFR-2を弱くしか活性化できず、VEGFR-1をより優位に活性化することが示された。

5. VEGFR-1 特異的なリガンドである placenta growth factor (PlGF) 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、PlGF 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、PlGF と VEGF-E との割合が 5:3 のときに最も強く誘導された。VEGFR-1 優位な活性化が強い血管透過性の亢進と弱い内皮細胞の増殖に直接関連していることが示唆された。
6. 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検討した結果、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。すなわち、*T. f.* svVEGF により誘導される血管透過性亢進において、VEGFR-1 シグナルが非常に重要であることが示された。

以上、本論文は、ハブ毒中より VEGF-A とは異なる毒腺特異的な新規タンパク質、*T. f.* svVEGF を精製・同定し、この因子が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するという特性を有し、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を示すとともに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。本研究は、未だにあまり明らかにされていない血管透過性亢進のシグナル伝達機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。