

論文内容の要旨

論文題目 Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the PI3-kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature.

和訳 エフリン-B2 は PI3-キナーゼを介して血管内皮の移動を誘導し、成体においても血管新生を惹起する

指導教官 永井良三教授

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

循環器内科学専攻

氏名 前川寛充

背景: Eph レセプターチロシンキナーゼは 14 種類のファミリーからなり、そのリガンドであるエフリンは 8 種類からなる。エフリンは、他の多くのレセプターチロシンキナーゼに対する可溶型のリガンドと異なり、膜結合型のリガンドである。エフリン、Eph とともに神経系に多く発現が認められたため、当初は神経系における解析が進められ、神経細胞の移動やアクソンガイダンスに重要な働きをすることが明らかにされてきた。近年になって、エフリン、Eph とともに胎生期の血管発生において重要な役割を果たすことが示されている。エフリン-B2 のノックアウトマウスでは、血管の形成は原始血管叢の段階で停止しており、血管のリモデリングが観察されず、10.5 日目に死亡する。エフリン-B2 のレセプターである EphB4 のノックアウトマウスの表現形はエフリン-B2 と同様であり、これら二つの分子が互いに関与しあいながら血管の発生に重要な働きをしていると考えられている。このような発生時期のエフリン、Eph の解析に比べ、成体におけるこれらの分子の働きは十分に解析されていない。成体においては、腫瘍や生殖器官での血管新生部分でエフリン-B2 の発現が強いことは報告されているが、その作用は明らかでない。さらには、血管において Eph レセプターの下流で、どのような分子機構がその作用を媒介しているか明らかでない。そ

ここで、この研究においてエフリン-B2 の *in vivo*, *invitro* における血管新生作用と、そのシグナル伝達機構を解析した。

方法、結果：ephrin-B2 は膜結合型の蛋白であり、単量体はアンタゴニストとして働くため、ephrin-B2 の細胞外ドメインを IgG の Fc 部分に結合させた可溶性キメラ蛋白 ephrin-B2/Fc を用いた。ephrin-B2/Fc は二量体を形成する。

血管新生を構成する重要な要素として血管内皮のマイグレーションがあり、ephrin-B2/Fc が走化性因子として働くかどうかを、トランスウェルメンブレンを用いたマイグレーションアッセイで評価した。ephrin-B2/Fc は濃度依存的にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)のマイグレーションを促進し、走化性因子であると考えられる。

血管内皮の移動を媒介する分子としては PI3-キナーゼが報告されている。ephrin-B2/Fc による刺激後に HUVECs の蛋白を溶出し、チロシンリン酸化抗体で免疫沈降を行い、その免疫沈降物の PI3-キナーゼ活性がどうなるかを調べた。ephrin-B2/Fc による刺激により、HUVEC における PI3-キナーゼ活性は 4 倍に増加した。さらに PI3-キナーゼの特異的な阻害薬 LY294002 を加えると、ephrin-B2/Fc による血管内皮のマイグレーション促進作用は抑制されることから、PI3-キナーゼがその作用を媒介していると考えられる。PI3-キナーゼ以外に、Src の阻害薬 PP2、Ras の阻害薬 FT-III も加えて検討したが、これらの阻害薬はマイグレーションに影響が無く、Src、Ras は ephrin-B2/Fc による血管内皮マイグレーション促進作用のシグナル伝達系に関与していないことが示唆された。

PI3-キナーゼは Akt を活性化することが知られており、ephrin-B2/Fc が Akt を活性化するかどうかを調べた。Akt はセリン 473 がリン酸化を受けて活性化することが知られており、セリン 473 がリン酸化を受けた Akt を特異的に認識する抗体を用いて活性化の状態を評価した。HUVEC を 18 時間血清や増殖因子を除いた培地で培養した後に ephrin-B2/Fc を作用させ、細胞を溶解し、ウエスタンブロット法で評価すると、15 分後をピークに Akt のリン酸化を認めた。さらに、HUVEC に ephrin-B2/Fc を作用させる前に、PI3-キナーゼの特異的な阻害薬 LY294002 を加えて処理をすると、Akt のリン酸化は認めなくなり、ephrin-B2/Fc は PI3-キナーゼを介して Akt をリン酸化していると考えられる。さらに Akt の下流で ephrin-B2 の血管新生作用のシグナル伝達をしている物質として、NO を調べた。NO は、VEGF や Angiopoietin1 といったレセプタータイロシンキナーゼのリガンドの血管新生作用のシグナル伝達に関与していることがこれまでに示されている。血管内皮 NO 合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) はそのセリン 1177 が Akt によって直接リン酸化を受けることにより活性化することが知られており、同様にセリン 1177 がリン酸化した eNOS を特異的に認識する抗体を用いて eNOS の活性化を評価した。HUVEC

に ephrin-B2 を作用させて、15 分後に蛋白を回収して eNOS を調べると、リン酸化が促進しており、eNOS が活性化していることが判明した。実際に ephrin-B2/Fc が血管内皮細胞の NO 産生を促進するかどうかを、マウスの脳血管内皮細胞株である b-End3 細胞に ephrin-B2/Fc を作用させて調べた。NO は水溶液中では硝酸と亜硝酸として存在するため、まず硝酸を還元酵素により亜硝酸に変えた後に、亜硝酸の総量を Griess 法によって測定した。b-End3 細胞を 24 時間無血清状態で培養した後、ephrin-B2/Fc を添加した培地で 48 時間培養してその上澄を調べると、NO の産生は添加しないものに比べて有意に増加していた。さらに、その NO 産生促進作用は PI3-キナーゼ阻害薬で抑制されており、ephrin-B2/Fc は PI3-キナーゼ/Akt/eNOS のシグナル伝達系を介して血管内皮細胞の NO 産生を促進していることが示唆された。

ephrin-B2/Fc によって産生された NO が、実際に内皮細胞のマイグレーションに関与しているかどうかを NOS の阻害薬である N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を加えて検討した。L-NAME で HUVEC を処理した後にマイグレーションアッセイを行うと、ephrin-B2/Fc による血管内皮細胞のマイグレーション促進作用は減弱していた。したがって、そのマイグレーション促進作用は PI3-キナーゼ/Akt/eNOS のシグナル伝達系を介していることが示唆される。In vitro の血管新生作用のもう一つの指標として、HUVEC の増殖作用を Brd-U の取り込みを指標として評価した。ポジティブ・コントロールとして用いた VEGF を HUVEC に作用させると、Brd-U の取り込みは促進したが、ephrin-B2/Fc を、濃度を変えて添加しても Brd-U の取り込みに変化は見られなかった。したがって ephrin-B2/Fc には血管内皮の増殖作用は無いことが示唆された。

さらには、Akt が活性化することにより血管内皮のアポトーシスが抑制されることが報告されている。ephrin-B2/Fc 添加が、血清と増殖因子を除くことによって誘導した HUVEC のアポトーシスに影響を与えるかどうかを評価した。血清と増殖因子が除かれた環境下で HUVEC に種々の濃度の ephrin-B2/Fc を加え、24 時間培養した後に細胞をはがし、annexin V-FITC でラベルを行い、フローサイトメトリーで解析を行った。ポジティブ・コントロールとして用いた VEGF が HUVEC のアポトーシスを抑制する一方で、ephrin-B2/Fc はアポトーシスに影響を与えなかった。

In vivo での ephrin-B2/Fc による血管新生作用を見るために、マウスの角膜血管新生の系を用いて評価した。徐放性のペレットに ephrin-B2/Fc 2 μ g を加えて、辺縁から 1mm の部分の角膜に植え込んだ。6 日後に角膜血管新生を評価すると、ephrin-B2/Fc を加えた群ではペレットに向かう新生血管を認めた。ネガティブ・コントロールとして CD4/Fc を加えたペレットを植え込んだが、この群で

はほとんど新生血管を認めなかった。このことから *in vivo* でも ephrin-B2/Fc は血管新生を促進することが示唆された。さらに、*in vivo* の血管新生作用を、マウスの皮下にマトリゲルを打ち込んで評価した。マトリゲルに ephrin-B2/Fc を添加し、マウスの皮下に植え込むと、PBS だけを添加した群に比べて血管内皮細胞の浸入が有意に増加しており、マトリゲルに含まれるヘモグロビンの濃度も増加していた。マトリゲルに、ephrin-B2/Fc に加えて PI3-キナーゼ阻害薬の LY294002 を添加すると、ephrin-B2/Fc による血管内皮細胞の浸入やヘモグロビンの濃度の増加が抑制されていた。このことから、ephrin-B2/Fc は *in vivo* でも血管新生を促進し、その作用は PI3-キナーゼが媒介していることが示唆された。

結論：ephrin-B2/Fc は血管内皮細胞のマイグレーションを促進し、PI3-キナーゼ/Akt/eNOS のシグナル伝達系がその作用を媒介している。一方で ephrin-B2/Fc は血管内皮細胞の増殖作用、抗アポトーシス作用はともに認めなかった。In vivo でも ephrin-B2/Fc は血管新生を促進し、その作用は PI3-キナーゼが媒介している。