

## 審査の結果の要旨

氏名 山内麻衣

血管新生は、促進因子と抑制因子のバランスによって制御されている。血管新生が多くの疾患の病態や進行の決定因子である事からも、その制御機構の詳細な理解は非常に重要である。そこで本研究では、血管新生を促進因子及び抑制因子両方の視点から理解する事を試みた。血管新生抑制因子の視点からは、皮膚における血管新生抑制因子の探索とその機能解析を、血管新生促進因子の視点からは、VEGFR-1 安定発現細胞株の樹立とその有用性の検討を行い下記の結果を得ている。

### 1. 皮膚における血管新生抑制因子の探索とその機能解析

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体ファミリーは血管新生に対して重要な役割を担っている。VEGF 受容体の 1 つ VEGFR-2 は、内皮細胞の増殖において最も強いシグナルを発信する。これまでに所属研究部では VEGFR-2 に特異的なリガンドである VEGF-E を Keratin14 プロモーター下で過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、皮膚における血管が著しく増加する事を報告している。しかしながら興味深い事には、これらのトランスジェニックマウスでは VEGF-E を分泌している表皮基底層近傍には血管はほとんど観察されなかった。そこで表皮基底層から何らかの血管新生抑制因子が分泌されているのではないかという仮説を立てそれを検討した。まず、表皮基底層はその殆どが角化細胞によって構成されていることから、表皮角化細胞初代培養の Conditioned medium (CM) に血管新生阻害活性があるのかどうかを、血

管内皮細胞と線維芽細胞の共培養による *in vitro* 血管新生アッセイによって検討した。CM には予想通り、血管新生阻害活性が濃度依存性に認められた。そこで次に、CM のゲル濾過クロマトグラフィーフラクションを用いて *in vitro* 血管新生アッセイ及び HUVEC の増殖アッセイを行って、どちらのアッセイにおいても強い血管新生抑制活性の確認された因子を質量分析によって同定した。質量分析の結果、CM 特異的に存在して *in vitro* 血管新生アッセイと HUVEC の増殖アッセイのどちらにも血管新生抑制活性が認められた因子はトロンボスポンジン-1 (TSP-1) である事が明らかとなった。TSP-1 は既に、血管内皮細胞に対して CD36 受容体を介したアポトーシスを誘導する血管新生抑制因子として報告されている。しかしながら、本研究におけるアッセイで使用している HUVEC には CD36 受容体が発現していない事も既に報告されている。実際に用いた HUVEC でもフローサイトメトリーでの確認を行ったが CD36 分子は殆ど検出されなかった。また、CD36 分子に対する TSP-1 の結合部位を含む合成ペプチドを使った *in vitro* 血管新生アッセイと HUVEC の増殖アッセイでも血管新生抑制活性は認められず、CD36 受容体を介さない TSP-1 の血管新生抑制能の存在が示唆された。そこで次に、TSP-1 の CD36 受容体を介さない血管新生抑制機構の詳細を検討した。CD36 受容体を介した血管内皮細胞への TSP-1 の効果はアポトーシスを誘導する事で発揮される事から、CD36 受容体を持たない HUVEC に対しても TSP-1 によってアポトーシスが誘導されるのかどうかを、TUNEL アッセイ及びアポトーシス実行因子の1つであるカスパーゼの阻害剤を用いた増殖アッセイにより検討した。その結果、TSP-1 の HUVEC への血管新生抑制ではアポトーシスは誘導されておらず、またカスパー

一ゼ非依存性の効果である事も確認された。そして更に、HUVEC に対する TSP-1 の作用の詳細についてフローサイトメトリーによる細胞周期の解析を行った結果、それらは細胞周期の停止誘導によるものであることが明らかとなった。加えて、ウエスタン・ブロッティングによる各種細胞周期関連因子の発現変化を検討した結果、TSP-1 によって HUVEC にはサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の 1 つである P21<sup>Cip1/WAF-1</sup> が誘導される事、及び Cyclin-CDK 複合体の標的因子である Rb のリン酸化レベルが著しく低下している事が明らかになった。これらの結果から、TSP-1 によって CD36 及びカスパーゼ非依存性に P21<sup>Cip1/WAF-1</sup> が誘導される事で Cyclin-CDK 複合体による Rb のリン酸化が阻害され、細胞周期の停止が誘導されるのではないかと推測された。また、TSP-1 の内皮細胞への細胞周期停止誘導は CD36 分子とは独立に起こる事、及びその作用ドメインもこれまでに報告のある血管新生抑制の機能ドメインとは違う部分に存在する可能性が合成ペプチドを用いた実験から示唆された。これらの結果から、TSP-1 は CD36 受容体を持たない血管内皮細胞に対して、既知の血管新生抑制ドメイン以外の部分でカスパーゼ非依存的に P21<sup>Cip1/WAF-1</sup> を誘導し、Rb のリン酸化を阻害する事で細胞周期の停止を誘導して血管新生抑制活性を発揮する事が出来ると考えられた。

## 2. VEGFR-1 安定発現細胞株の樹立とその有用性の検討

VEGF とその受容体系は、生理的血管新生のみならず病的血管新生において、その促進因子として最も重要な因子であると考えられている。VEGF は主に VEGFR-1 及び VEGFR-2 と結合する事でその機能を発揮するが、VEGFR-2 に比べて VEGFR-1 の分子機構の解析は遅れている。その理由の 1 つとしては、

頻用される内皮細胞には VEGFR-1 が殆ど発現していない、或いはその発現が欠失している為に、解析に使える有効な細胞が無い事が挙げられる。そこで VEGFR-1 の分子機構解析に有用な細胞として、まず安定的且つ安価に供給することの出来る内皮細胞様細胞株を樹立し、更にそこから VEGFR-1 安定発現細胞株を作製して AG1-G1-Flt-1 細胞とした。AG1-G1-Flt-1 細胞は対照実験用に作製した AG1-G1-Neo 細胞と共に、マトリゲル上での管腔形成能及びアセチル化 LDL の取り込み能を維持している事、またその細胞形態からも血管内皮細胞様の細胞株である事を確認した。一方、VEGFR-2 の発現は蛋白質レベルでは確認出来ず、VEGFR-1 を優位に発現した血管内皮細胞様の細胞株であると考えられた。そこで次に、作製した VEGFR-1 安定発現細胞株 AG1-G1-Flt-1 細胞で VEGFR-1 の機能を検出する事が出来るかどうかを検討した。検討の結果、VEGF 誘導性の細胞遊走の検出に極めて適した細胞である事が明らかとなった。VEGFR-1 及び VEGFR-2 特異的なリガンドやそれぞれの中和抗体を使った実験の結果、その細胞遊走活性が確かに VEGFR-1 依存的な反応である事も確認された。更に、ウエスタン・ブロッティングの結果から VEGFR-1 によって PLC- $\gamma$  や p42/44 MAPK、Akt、JNK といったシグナル伝達分子の活性化が引き起こされる事も確認された。また、阻害剤を用いた細胞遊走の実験からは VEGFR-1 による p42/44 MAPK の活性化は少なくとも細胞遊走のシグナルとは独立したものである事も確認出来た。以上の事は、これまで困難であった VEGFR-1 の細胞運動・遊走に対する作用を容易に検出出来る細胞株が樹立された事を意味し、その機能を促進又は抑制する薬剤の開発にも有用であると期待された。

以上、本論文は皮膚における血管新生抑制因子の探索から、TSP-1 の新たな血管新生抑制機構の存在とその分子機構の一部を明らかにした。また、VEGFR-1 安定発現細胞の樹立にも成功し、VEGFR-1 の機能やその分子機構解析に有用である事が確認された。これらの結果は、血管新生の制御機構の更なる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。