

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Mechanisms of PlGF/VEGFR-1 Expression and their Function in the Vasculature

和訳 PlGF/VEGFR-1 の血管における発現調節および作用解析

指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月進学

医学博士課程

内科学専攻

齊藤 哲也

12

13

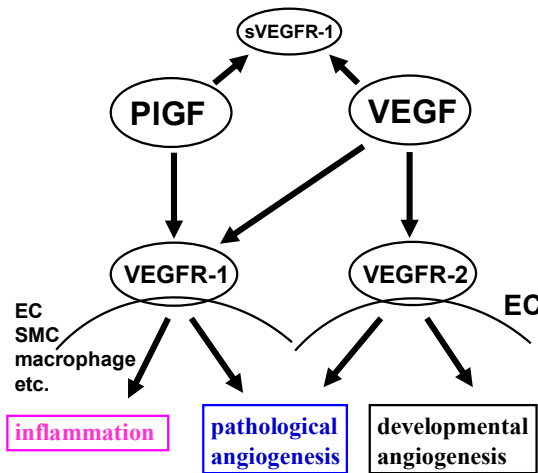


Figure 1. Schematic representation of the role of PlGF, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, and sVEGFR-1

VEGF binds to mainly 2 tyrosine kinase receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2. PlGF specifically binds to VEGFR-1, but not VEGFR-2. Recent studies showed that PlGF- and VEGFR-1-mediated signaling have a significant role in pathological angiogenesis and inflammation. sVEGFR-1 can function as an angiogenic inhibitor by capturing PlGF and VEGF.

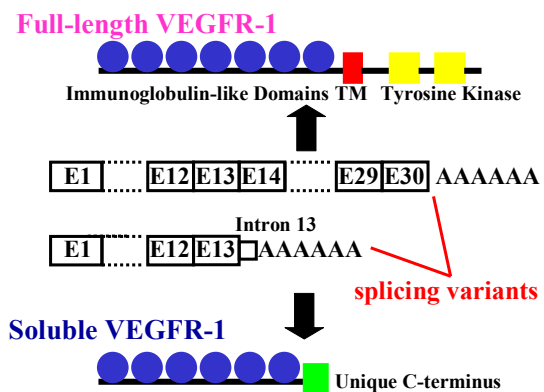


Figure 2. VEGFR-1 protein, mRNA, and genomic structures

Alternative pre-mRNA processing gives rise to a full-length and soluble form of VEGFR-1. sVEGFR-1 protein retains the first 6 immunoglobulin-like domains of VEGFR-1, including domains that contain the major VEGF-binding determinants. The transmembrane (TM) and intracellular regions, encoded by exons 16-30, are excluded from sVEGFR-1, which instead contains a unique 31-amino acid C-terminal peptide encoded by the 5'-end of intron 13.

血管新生は胎生期の発達や創傷治癒過程において重要である一方、動脈硬化や糖尿病性網膜症、悪性腫瘍といった疾患形成にも深く関わっている。Vascular endothelial growth factor (VEGF)は主要な血管新生因子の一つであり、その代表的な isoform である VEGFA は VEGFR-1 および VEGFR-2 の 2 つのチロシンキナーゼ型レセプターに結合する。Placental growth factor (PlGF)は、Persico らによって 1991 年に人の

胎盤から発見された糖蛋白であり、VEGFA と 47%の homology を持つ VEGF ファミリーの一つである。PlGF はその後胎盤だけでなく、心臓、肺、甲状腺、骨格筋など全身の組織に発現していることが分かり、また細胞レベルでは内皮細胞、平滑筋細胞、炎症細胞、骨髄細胞、神経細胞、腫瘍細胞といったあらゆる細胞に発現することが分かってきた。また PlGF は VEGF と同様、ジスルフィド結合により homodimer を形成し、VEGFR-1 と特異的に結合し、VEGFR-2 とは結合しない (Figure 1)。これまで VEGF による血管新生は、VEGFR-2 がその主要シグナルと考えられており、VEGFR-1 に関しては、そのチロシンキナーゼ活性が弱いことや、下流のシグナルが不明であることなどから、その役割は不明瞭であった。また、VEGFR-1 のホモノックアウトマウスがむしろ血管の overgrowth により胎生死となる一方、VEGFR-1 のチロシンキナーゼのみを欠失させたマウスは正常に出生することから、VEGFR-1 は胎生期においては VEGF の reservoir として働き、VEGFR-2 によるシグナルを阻害するものと考えられた。実際 PlGF のホモノックアウトマウスでは、胎生期の血管形成や血管新生に著明な機能異常は認められなかった。しかしこのマウスにおいて、虚血下肢や腫瘍、網膜内の血管新生が著明に減少していることが分かり、また PlGF の投与により虚血下肢の血流が著明に改善することが認められたことから、PlGF-VEGFR-1 系がそれ自体もしくは VEGF-VEGFR-2 系との cross talk により、悪性腫瘍や創傷治癒といった成熟期における pathological な血管新生 (angiogenic switch) に強く関わっていることが分かってきた。さらに VEGFR-1 は、VEGFR-2 と異なり、内皮細胞だけでなく平滑筋細胞、炎症細胞、腫瘍細胞、造血幹細胞など様々な細胞に発現していることから、PlGF-VEGFR-1 系はこれらの細胞の遊走、活性化を促すことにより、より mature な血管新生に関与し、一方動脈硬化やリウマチ性関節炎といった炎症性疾患にも強く関与することが示された。さらに近年、血漿中の PlGF 値が急性冠症候群における強力な予後増悪因子であることも報告された。しかし PlGF および VEGFR-1 の血管での発現調節や血管における機能の詳細は未だ解明されていない。

本研究において、我々は初めにヒトの培養内皮細胞における PlGF 遺伝子の発現調節について検討した。VEGF は間葉系細胞で多く発現し、内皮細胞での発現は極めて低いのに対し、PlGF は主に血管内皮細胞において発現が多く認められた。さらに PlGF は thrombin、interleukin-1 β (IL-1 β) といった炎症性サイトカインや、低酸素、VEGF、basic fibroblast growth factor (bFGF) といった血管新生因子により mRNA レベルで発現が誘導された。また低酸素により特異的に誘導される転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) の過剰発現は、VEGF 遺伝子の発現を促進させる一方、PlGF 遺伝子の発現にはほとんど影響を与えなかった。すなわち低酸素刺激は PlGF に対して、VEGF とは異なる経路で発現を促進させることが示唆された。以上の誘導は、蛋白合成阻害剤である cycloheximide の投与によっても阻害されないことより、de

novo の蛋白合成を介さないものであった。また RNA 合成阻害剤である actinomycin D を用いた実験において、これらの誘導は PIGF mRNA の stability に影響しなかった。さらにヒト PIGF promoter (-3448~+150)を用いた luciferase レポーターアッセイにおいて、thrombin、低酸素はその活性を増加させたことから、これらの刺激は転写レベルで PIGF の発現を調整していることが示された。

次に我々は、in vivo における PIGF 遺伝子の血管床に対する直接作用の検討を行った。皮膚での創傷モデルにおいて、アデノウイルスを用いて PIGF 遺伝子を導入したところ、PIGF は壁細胞血管平滑筋のマーカーである smooth muscle myosin heavy chain-1 (SM-1)陽性細胞の増加を伴う、成熟した血管新生を惹起し、その治癒過程の促進をもたらした。以上の結果より、PIGF は血管局所で様々な炎症および血管新生因子により発現が誘導され、血管新生の形成に関与していることが示唆された。

最後に我々は、PIGF の特異的レセプターである VEGFR-1 遺伝子の発現調節についても検討した。全長 VEGFR-1 は、細胞外の 7 つの Ig 様ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内のチロシンキナーゼドメインから形成される。一方 VEGFR-1 遺伝子からは Intron 13 における alternative splicing により、細胞外ドメインのみで膜貫通ドメインおよび細胞内の tyrosine kinase を持たない soluble VEGFR-1 (sVEGFR-1)も生成される (Figure 2)。sVEGFR-1 はそのリガンドである VEGF および PIGF を吸着することから、血管新生因子の endogenous な antagonist と考えられている。従って同じ VEGFR-1 遺伝子より VEGF シグナルに促進的に働く full-length VEGFR-1 mRNA と、抑制的に働く短い sVEGFR-1 mRNA が発現しているが、その詳細な発現調節機序は解明されていない。我々は VEGFR-1 遺伝子の Intron 13 周辺の数箇所 probe を作成し、ヒト内皮細胞を用いて、full-length VEGFR-1 と sVEGFR-1 を区別できる詳細な Northern blotting を行った。その結果、3'側に Intron 13 のほぼ全長が結合された、長い sVEGFR-1 (long form sVEGFR-1) mRNA の存在を新たに見出し、それは full-length VEGFR-1 mRNA とほぼ同長であったこと、ヒト内皮細胞で大量に発現していることが分かった。また様々な因子でヒト培養内皮細胞を刺激した結果、sVEGFR-1 は full-length VEGFR-1 とは独立した因子でその発現が誘導され、リガンドである VEGF は、sVEGFR-1 の発現のみを mRNA、蛋白両レベルにおいて増加させた。この VEGF による sVEGFR-1 の発現誘導は PKC シグナルを介していた。sVEGFR-1 の発現には VEGFR-1 遺伝子の Intron 13 における alternative polyadenylation が関わっており、luciferase gene に VEGFR-1 Intron 13 を連結させたレポーターアッセイによる検討から、Intron 13 には複数の polyadenylation site が存在することが示唆された。さらに PKC のアクチベーターである 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)および VEGF は、polyadenylation machinery の主要因子である CstF-64 の発現を増強させ、この因子の sVEGFR-1 発現への関与が強く示唆された。

以上の結果から、血管新生下においては、その促進因子である PIGF が誘導される一方、抑制因子である sVEGFR-1 も同時に誘導され、これは病的血管新生時におけるホメオスタシス維持のための **negative feed back** 調節機構であると考えられた。これら両者のバランスを修飾することが適切な血管新生において重要であり、新たな血管新生療法のターゲットになり得るものと思われた。