

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ラット *flt-1* (血管内皮細胞増殖因子受容体-1 遺伝子) のクローニング
 と組織特異的発現、およびラット肝臓における血管内皮細胞増殖因子-
 受容体系を通じた肝細胞-類洞内皮細胞間の情報伝達に関する研究

氏 名 山 根 章

血管新生は個体発生・性周期・種々の炎症・創傷治癒・糖尿病性細小血管症・腫瘍血管増生など様々な生理的あるいは病的な過程に深く関与している。血管内皮細胞増殖因子A (VEGF-A 以下 VEGF と略す) は強い内皮細胞増殖刺激活性を有し上記のような種々の過程において血管新生のためのシグナル伝達物質として作用していることが明らかになって来ている。

また Flt-1(Fms-like tyrosine kinase-1) は c-Fms (コロニー刺激因子-1 受容体) ファミリーに属するチロシンキナーゼ型受容体として渋谷らによって発見された。当初、そのリガンドは不明であったが、VEGF に高い親和性を持つ受容体(VEGFR-1) であることが判明した。また KDR/Flk-1 は Flt-1 と類似した構造を持っており、これも VEGF の受容体である(VEGFR-2)と考えられた。これらの受容体を発現する細胞に関して、1993 年に *flt-1* と *KDR/flk-1* の mRNA がほ乳類・鳥類の胎生のごく早期に血管内皮細胞に発現されていることが報告され、また成熟体でも 1992 年には RI でラベルした VEGF の結合部位が血管内皮細胞に限局していることが示された。従ってこれらの受容体の発現は血管内皮に限局していることが予想されたが、実際に成熟体において *flt-1* などの VEGF 受容体がどの細胞に発現しているかを検討する必要があった。そこで2つの

主要な構成細胞（肝細胞と肝類洞内皮細胞）をコラゲナーゼの灌流とそれに引き続く遠心分離によって分けることができるラットの肝臓を実験系に選び、*flt-1* とその関連遺伝子が成体の組織でどの様に発現調節されているかを検討した。

ラットの *flt-1* の蛋白コード部分の全長を含む cDNA をラット肺由来の cDNA ライブラリーからクローニングし、その全塩基配列を決定した。ラット Flt-1 はヒト Flt-1 と高い相同性があり、アミノ酸残基の一致率は細胞外ドメインでは 78%、チロシンキナーゼドメインでは 96%、C-末端部では 79% だった。ラット *flt-1* をプローブとして成熟ラットの諸組織での *flt-1* mRNA 発現を調べたところ、肺・胎盤・肝臓・腎臓・心臓・脳などの組織で発現がみられた。その中でも最も高い発現を示した組織は肺だった。

次に 6 週齢の正常ラットの肝臓由来の細胞を田中らの方法に従って肝細胞画分と類洞内皮細胞を多く含む非実質細胞画分(NP cell fraction)に分け、それぞれの画分から抽出した RNA と、胎児から 6 週齢までの正常ラットの肝臓全体から抽出した RNA を用いて VEGF-Flt-1 受容体ファミリー系と、HGF-Met 受容体系の遺伝子発現を調べた。その結果 *flt-1* の mRNA は類洞内皮細胞に強く発現していたが、肝細胞ではほとんど検出できなかった。肝臓全体の *flt-1* mRNA レベルは胎生期以降には大きな変化が見られなかった。もう一つの VEGF 受容体である KDR/Flk-1 も同様の発現パターンであった。一方 VEGF 遺伝子の発現は肝細胞に弱く認められたが、NP cell fraction には認められなかった。

また、HGF 遺伝子の発現は NP 細胞にほぼ特異的に発現しており、肝細胞では検出できず、HGF 受容体は肝細胞のみで発現が認められた。これらの結果はラット肝臓において細胞特異的に各増殖因子・受容体の発現調節が起こっていることを示した。

次に VEGF 受容体が高いレベルで発現されている類洞内皮細胞に対する VEGF の生理活性を調べるために、VEGF 存在下・非存在下で NP 細胞の培養を行った。VEGF の添加により類洞内皮細胞は増殖し 4-5 日で confluent になった。一方 VEGF 非存在下ではこれらの細胞は 2-3 日で死滅した。類洞内皮細胞の VEGF に対する反応は特異的で、高濃度 FBS や acidic FGF, basic FGF のような血管新生促進作用のある増殖因子でさえもこれらの細胞の増殖や生存を支持することはできなかった。類洞内皮細胞は *in vitro* で培養することが難しいことが知られているが、この類洞内皮細胞の VEGF に対する厳密な依存性は非常に興味深く、また内皮細胞のシグナル伝達の解析に有用である。

類洞内皮細胞の増殖における Flt 受容体ファミリーの関与をさらに検討するために、¹²⁵I 標識 VEGF の内皮細胞への結合を Scatchard 解析で調べた。これらの細胞は $K_d=3 \times 10^{-12}M$, 10^4 per cell の高親和性の VEGF に対する受容体を発現していた。 $K_d=100 \times 10^{-12}M$, 10^5 per cell の結合部位もみられ、前者は Flt-1 後者は KDR/Flk-1 に相当すると考えられた。また VEGF の受容体のサイズを確定するため、細胞表面に結合した [¹²⁵I]VEGF を DSS でクロスリンクし SDS-PAGE で解析したところ、Flt-1, KDR/Flk-1

受容体との VEGF の複合体に相当すると思われるブロードなバンドが検出された。さらに、このバンドは抗 Flt-1 抗血清で免疫沈降された。この沈降は免疫に使用した Flt-1 ペプチドでブロックされた。このことから、少なくともこの複合体と思われるバンドの一部には Flt-1 が含まれていることが示された。KDR/Flk-1 に対する特異抗血清は入手できなかったが、この複合体には KDR/Flk-1 と VEGF の複合体も含まれていると推測している。

VEGF による刺激後の細胞蛋白のチロシンリン酸化を調べるために類洞内皮細胞の培養に VEGF 添加後、経時的に cell lysate を作り、抗リン酸化チロシン抗体をプローブとしてウェスタンブロッティングを行った。250 から 40kDa の大きさの数種類の蛋白が速やかにそして一過性にチロシンリン酸化を受けた。しかし、Flt-1 に相当する 175-185kDa の位置のチロシンリン酸化は非常に微弱だった。Flt-1 受容体を免疫沈降して、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロッティングを行ったがこの受容体の自己リン酸化は検出されなかった。Flt-1 の自己リン酸化作用は、もし存在したとしても非常に弱いことが示された。

結論 以上の結果から、VEGF-受容体系を通じて肝類洞内皮細胞の増殖・生存を肝細胞がパラクリン形式で制御していると推定される。これは HGF-受容体系を通じて内皮を含む間葉系細胞が肝細胞の増殖を制御するのと逆方向の制御系であり、肝臓では間葉系と実質細胞の間の両方向の制御系が働いていることが想定できる。