

総 説

血管新生に関わる血管内皮細胞増殖シグナル伝達系

高橋 知子

Signaling Pathway via VEGF Receptors

Tomoko TAKAHASHI

(Received November 20, 2016)

1. はじめに

血管新生は器官形成期において活発に行われるが、いったん血管系が完成すると成熟期の卵巣における黄体形成や子宮内膜の一過性の増殖、胎盤の形成などに限局して認められる。このように血管内皮細胞は増殖刺激に速やかに反応し、その後必要に応じ増殖は停止し、正と負の厳密な制御を受けている。1990年代、血管内皮細胞特異的増殖因子とその受容体 VEGF-Flt 系が見いだされ、生体内のさまざまな血管新生において中心的な役割を果たすことが示されてきた。¹⁻⁴⁾ 病態的には、リウマチ性関節炎などの炎症、糖尿病性網膜症、特に固形腫瘍などの病的な血管新生において、この系の関与が数多く報告され、臨床的な立場からの重要性も増してきている。本稿では、筆者らの研究成果を含め、VEGF-Flt 系についての知見を概説する。

2. VEGF/VPF

VEGF は血管内皮細胞を特異的に増殖させる活性、あるいは血管の透過性を上げる活性を指標にして単離された因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF,⁵⁻⁷⁾ vascular permeability factor; VPF^{8,9)}) である (以下 VEGF と略)。VEGF は二量体からなる分泌性の糖蛋白質で、ほとんどの臓器で発現しており、基本的にはパラクリンで血管内皮細胞に作用する。体内にもっとも豊富に存在する VEGF165 をはじめ、splicing の違いからヒトでは5つのサブタイプが存在することが報告されている (Fig. 1)。それぞれの生物活性の詳細は不明であるが、exon 6, 7 を欠失したマウス、つまり *vegfl20* (ヒトでは 121 に相当) のみを持つマウスが作製され、出血と心筋における血管新生が障害され、生後早期に死亡することが報告された。¹⁰⁾ この結果から、VEGF にはある程度サブタイプ特

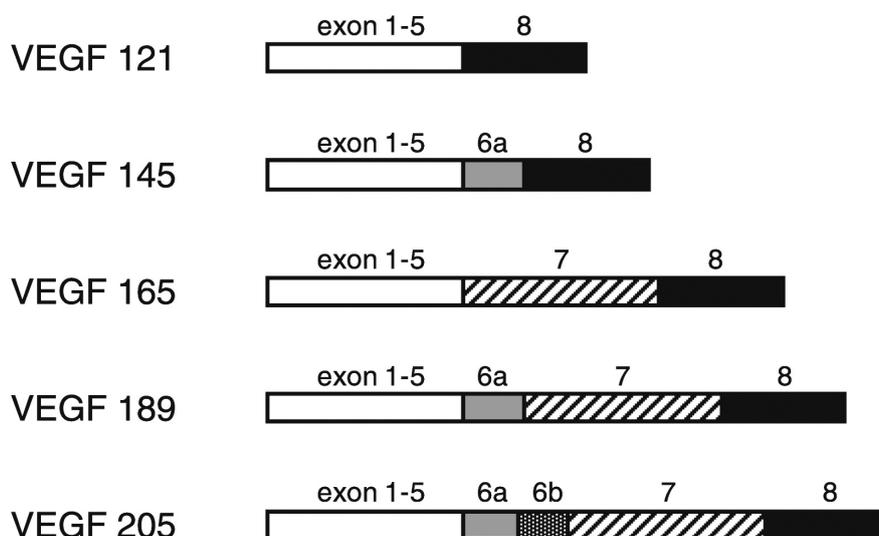


Fig. 1. Structures of VEGF family.

VEGF transcripts are generated by mRNA alternative splicing. VEGF121 and VEGF165 are the two representative forms in human.

異的な生物活性があることが予想される。一方、VEGFの大きな特徴のひとつは、低酸素状態に反応して転写が誘導されることである。^{11,12)} VEGFの転写開始点より上流に hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) が結合する配列が存在し、この配列はやはり低酸素で転写が誘導されるエリスロポエチンでも認められる。このことは糖尿病性網膜症での新生血管や腫瘍血管が誘導される機序を考える上で非常に興味深い。そのほか、VEGFの転写を誘導する要因として種々の成長因子、サイトカイン、性ホルモン刺激、低グルコース、癌遺伝子 (Ha-Ras など) の活性化、癌抑制遺伝子 (p53, VHL など) の不活化などがあげられる。VEGFには前述した活性以外に、単球の遊走能の亢進¹³⁾などの生物活性が報告されている。

3. Flt family

VEGFの生理的な受容体のひとつである Flt (fms-like tyrosine kinase)-1 は、著者が属していた研究部によって単離されたチロシンキナーゼである。^{14,15)} Flt-1は細胞外には7つの免疫グロブリン様ループを持ち、膜貫通部を挟んで、細胞内にはキナーゼドメインとこれを二分する約70アミノ酸の

キナーゼインサートを持つことが特徴である (Fig. 2)。また、Flt-1には細胞外ドメインのみで膜貫通部を持たない soluble Flt-1 (sFlt-1) が存在し、^{16,17)} リガンドと結合することによって VEGFの量的制御に関わっていることが推測される。実際に sFlt-1の一部を動物に作用させると、投与時期により卵巣における黄体形成¹⁸⁾ や長骨の成長にかかわる軟骨内骨化が抑制された。¹⁹⁾ ヒトでは妊娠高血圧腎症²⁰⁻²²⁾ や加齢黄斑変性症²³⁾ への関与が報告されている。また、VEGFによる腫瘍血管形成を抑制することから抗腫瘍効果が臨床応用されている。

現在、Flt familyには構造上の類似点から Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2),^{24,25)} Flt-4 (VEGFR-3)^{26,27)} の3つの受容体が属している (Fig. 2)。Flt-1の主な発現臓器は胎盤で、血管内皮細胞と一部の単球系に発現が認められるのに対して、Flk-1の発現は血管内皮細胞とその始原細胞 (卵黄嚢内の血島) に限られていた。一方、Flt-4は胎生初期には静脈系とリンパ管の内皮細胞に、胎生後期あるいは adult ではリンパ管内皮細胞に限局して発現している。このように Flt familyの遺伝子は発現部位が異なっており、対応するリガンドによる作用の違いが予想される。

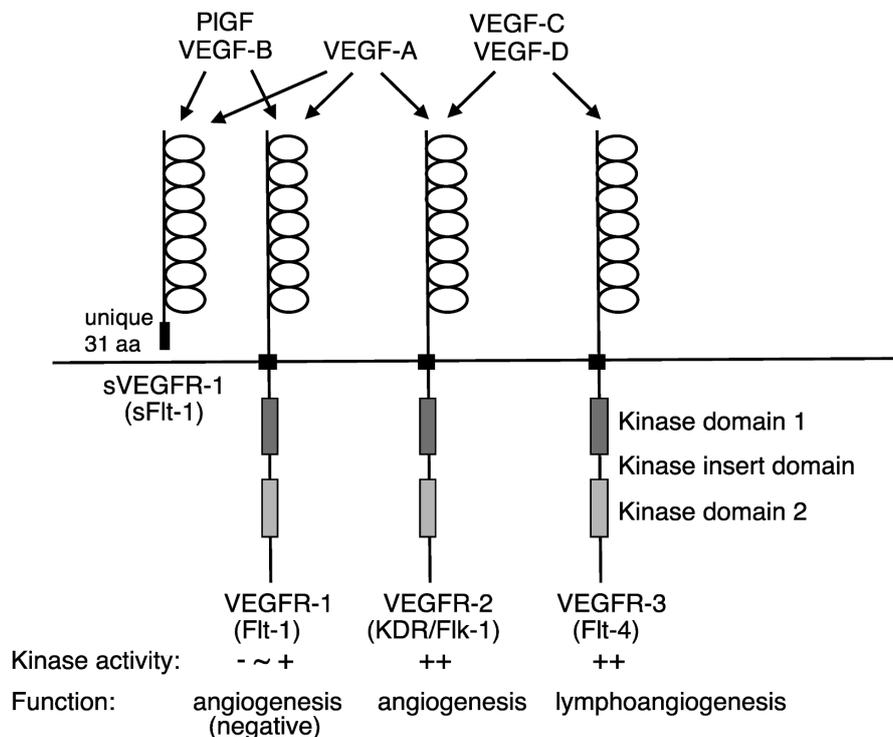


Fig. 2. VEGF-VEGFR system

VEGF-A binds Flt-1 at higher affinity than KDR-1/Flk-1. PIGF and VEGF-B bind only Flt-1. VEGF-C and VEGF-D lead to lymphoangiogenesis through Flt-4.

4. VEGF 関連遺伝子群と受容体との関係

最初に発見された VEGF (以後 VEGF-A と表記) と類似する遺伝子として PlGF, VEGF-B, -C, -D が次々と発見され, 結合する受容体の違いが明らかになっている. VEGF-A は Flt-1 と KDR/Flk-1 の両者と高親和性に結合するが, 親和性は Flt-1 のほうが高い^{28,29)} (Fig. 2), 一方, PlGF あるいは VEGF-B は選択的に Flt-1 に結合するのに対して,^{30,31)} VEGF-C あるいは -D は Flt-4 と高親和性に結合するが, プロセッシングの状態によっては Flk-1 と結合することができる.^{32,33)} これらに加えて今まで報告されていた VEGF-A の, exon 8 のスプライシングの違いにより生じた VEGF(XXX)b は, 血管新生を負に制御する因子として^{34,35)} 報告された. 今後, 生理的血管新生への関与や病的血管新生への応用が期待される.

また, VEGF165 isoform に特異的に結合する分子として neuropilin-1 (NRP-1) が同定された.³⁶⁾ NRP-1 は神経細胞の軸索を抑制的に誘導する semaphorin family の受容体として報告されていた分子であるが, 内皮細胞においては VEGF165 と KDR/Flk-1 との結合を修飾し, シグナルを増強する分子として働いている可能性が示唆されている. その後, NRP-1 は PlGF-2 や VEGF-B と結合することが報告されている.

5. VEGF からのシグナル伝達

Flt-1 を強発現させた NIH3T3 細胞あるいは血管内皮由来の細胞株では, VEGF-A による増殖活性はほとんど認められない.³⁷⁾ また, VEGF-A との親和性が高いにもかかわらず, 内皮細胞を VEGF-A で刺激した際の Flt-1 の自己リン酸化は非常に弱い. 強発現細胞では PLC- γ , GAP などいくつかのチロシンリン酸化分子が認められるが,³⁸⁾ 本来の内皮細胞での働きは不明である. 増殖以外の VEGF-A の生物活性として血管内皮細胞, 単球の遊走能の促進が知られているが, このシグナルには Flt-1 が関与していることが報告されている.³⁹⁾

一方, KDR/Flk-1 を強発現させた内皮細胞株では, VEGF-A による増殖活性が認められることから, 内皮細胞における増殖シグナルは主に KDR/Flk-1 を介していることが推測される. 著者らは, VEGF-A を用いてラット肝類洞壁内皮細胞におけるシグナル伝達を解析した結果, リガンド依存性に KDR/Flk-1 が自己リン酸化し, PLC- γ を

チロシンリン酸化すること,⁴⁰⁾ また, プロテインキナーゼ C 依存性に Raf-MEK-MAP kinase を活性化し, DNA 合成を刺激することを見いだした.⁴¹⁾ また, 従来報告されている PDGFR/Fms/Kit family⁴²⁾ とは異なり, VEGF 受容体のキナーゼインサートドメインには PI3 kinase p85 の結合モチーフ Y-x-x-M が存在せず, この経路に Ras, PI3-Akt の関与は少ないことが細胞系においても報告されている.⁴³⁾

一方, 筆者らは KDR/Flk-1 の主なリン酸化部位 Y1175 と Y1214 を同定した.⁴⁴⁾ このうちリン酸化された Y1175 は PLC- γ の主な結合部位であること, このチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体では VEGF 刺激による細胞増殖が認められないことを示した. また, リン酸化 Y1175 特異的抗体を作製し, この抗体を細胞内にマイクロインジェクションしたところ, VEGF 依存性の DNA 合成は抑制された. 以上のことより, KDR/Flk-1 を介した VEGF の細胞増殖活性に Y1175 のリン酸化が重要な働きを果たしていることが示された. また, この抗体を用いることによって, 多形性膠芽腫などの腫瘍組織において, KDR/Flk-1 の Y1175 のリン酸化すなわち増殖シグナルの入った血管芽細胞が組織内に散在していることも見いだしている (未発表データ).

6. *flt* family および *vegfr* のノックアウト/ノックインマウスによる解析

flt family それぞれのノックアウトあるいはノックインマウスが作製され, 個体発生に果たす役割を考える上で, 非常に興味ある結果が得られている. *flt-1* を欠損させたマウス⁴⁵⁾ および *flt-1* *Y1173F/F* (ヒト Y1175 に相当) マウス⁴⁶⁾ では, いずれも血管内皮細胞が欠如し, しかも血球成分が著しく低下し, 胎生約 8.5-9.0 日で子宮内で死亡した. この結果は, *flt-1*, 特に *flt-1* *Y1173* は血管内皮細胞のみならず血球系の始原細胞, おそらくは共通の前駆細胞 (haemangioblast) の増殖, 分化に必須であることを示唆している. それに対して *flt-1* を欠損させたマウスでは, 分化した内皮細胞あるいは血球成分が存在するにもかかわらず内皮細胞は過増殖し, 秩序だった血管形成が障害され, やはり胎生約 8.5 日で子宮内で死亡した.⁴⁷⁾ 一方, *flt-1* のキナーゼドメインを欠失したマウスでは, VEGF で刺激したときの単球の遊走能が減弱して

いるもののみかけ上正常に発育し、血管系もほぼ正常であった。⁴⁸⁾ この結果から、少なくとも個体発生において Flt-1 は血管新生を負に制御し、Flt-1 のキナーゼ活性は必須でないことが示された。一方、*flt-4* を欠損させたマウスでは内皮細胞の分化と一次血管網の形成は正常であったが、血管のリモデリングが障害され、胎生 12.5 日で死亡した。⁴⁹⁾ このように *flt family* それぞれのノックアウトマウスが異なった血管系の表現型を示すことは、その下流へのシグナルが異なっていることを反映しているものと思われる。

一方、リガンドである *vegf-a* のノックアウトマウスではヘテロの段階で、胎生約 10–12 日で子宮内で死亡した。^{50,51)} このマウスでは血管内皮細胞数が減少し、正常な血管形成が障害されていた。個体発生において VEGF-A 量の低下が血管形成に重大な影響を与え、VEGF-A は厳密な量的制御を受けていることが示唆される。*vegf-b* のノックアウトマウスではみかけ上正常であったが、心臓が野生型に比較して小さく、虚血に対する抵抗力が減弱していた。^{52,53)} また、*vegf-c* のノックアウトマウスでは、リンパ管形成が乏しく、組織の浮腫のため新生時期に致死した。⁵⁴⁾

7. 疾患との関わり

多くの固形腫瘍や腹水癌、また、眼内新生血管などの症例で VEGF の過剰産生が認められている。特に POEMS syndrome (Crow-Fukase syndrome) においては、血清中の VEGF 濃度が健常人に比較して数 10 倍に上昇していた。それに対してヒトの疾患と直接結びつくような Flt family 遺伝子の構造異常、機能異常は現時点では報告されていない。

8. おわりに

今までの研究から、VEGF とその受容体である Flt family は血管新生において中心的な役割を果たしていることが明らかにされてきた。特に遺伝子改変マウスの解析からそれぞれが個体発生で果たす役割について非常に有用な情報がもたらされた。一方、VEGF からのシグナル、内皮細胞の増殖シグナルについては明らかにされつつあるが、VEGF のもうひとつの生物活性である血管透過性におけるシグナル伝達は未解決なままで、今後の研究の課題であろう。また、この系に注目し血管新生を正あるいは負に制御することによって病態を改善

しようとする薬剤が開発され、すでに臨床応用されている。研究の成果が直接臨床現場に結びつく分野だけに、この系の解明がさらに期待されている。

REFERENCES

- 1) Folkman J., *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 4–6 (1990).
- 2) Ferrara N., Houck K. A., Jakeman L. B., Winer J., Leung D. W., *J. Cell Biochem.*, **47**, 211–218 (1991).
- 3) Mustonen T., Alitalo K., *J. Cell Biol.*, **129**, 895–898 (1995).
- 4) Shibuya M., *Adv. Cancer Res.*, **67**, 281–316 (1995).
- 5) Leung D. W., Cachianes G., Kuang W.-J., Goeddel D. V., Ferrara N., *Science*, **246**, 1306–1309 (1989).
- 6) Connolly D. T., Heuvelman D. M., Nelson R., Olander J. V., Eppley B. L., Delfino J. J., Siegel N. R., Leimgruber R. M., Feder J., *J. Clin. Invest.*, **84**, 1470–1478 (1989).
- 7) Ferrara N., Henzel W. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 851–858 (1989).
- 8) Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F., *Science*, **219**, 983–985 (1983).
- 9) Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D. T., *Science*, **246**, 1309–1312 (1989).
- 10) Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kleckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A., *Nature*, **380**, 435–439 (1996).
- 11) Levy A. P., Levy N. S., Wegner S., Goldberg M. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 13333–13340 (1995).
- 12) Liu Y., Cox S. R., Morita T., Kourembanas S., *Circ. Res.*, **77**, 638–643 (1995).
- 13) Barleon B., Sozzani S., Zhou D., Weich H. A., and Marm D., *Blood*, **87**, 3336–3343 (1996).
- 14) Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matushime H., Sato M., *Oncogene*, **5**, 519–524 (1990).
- 15) De Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L. T., *Science*, **255**, 989–991 (1992).
- 16) Tanaka K., Yamaguchi S., Sawano A., Shibuya M., *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 867–876 (1997).

- 17) Yamaguchi S., Iwata K., Shibuya M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 554–559 (2002).
- 18) Ferrara N., Chen H., Davis-Smyth T., Gerber H. P., Nguyen T. N., Peers D., Chisholm V., Hillan K. J., Schwall R. H., *Nat. Med.*, **4**, 336–340 (1998).
- 19) Gerber H. P., Vu T. H., Ryan A. M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N., *Nat. Med.*, **5**, 623–628 (1999).
- 20) Maynard S. E., Min J. Y., Merchan J., Lim K. H., Li J., Mondal S., Libermann T. A., Morgan J. P., Sellke F. W., Stillman I. E., Epstein F. H., Sukhatme V. P., Karumanchi S. A., *J. Clin. Invest.*, **111**, 649–658 (2003).
- 21) Koga K., Osuga Y., Yoshino O., Hirota Y., Ruimeng X., Hirata T., Takeda S., Yano T., Tsutsumi O., Taketani Y., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 2348–2351 (2003).
- 22) Levine R. J., Maynard S. E., Qian C., Lim K. H., England L. J., Yu K. F., Schisterman E. F., Thadhani R., Sachs B. P., Epstein F. H., Sibai B. M., Sukhatme V. P., Karumanchi S. A., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 672–683 (2004).
- 23) Luo L., Uehara H., Zhang X., Das S. K., Olsen T., Holt D., Simonis J. M., Jackman K., Singh N., Miya T. R., Huang W., Ahmed F., Bastos-Carvalho A., Le Y. Z., Mamalis C., Chiodo V. A., Hauswirth W. W., Baffi J., Lacal P. M., Orecchia A., Ferrara N., Gao G., Young-Hee K., Fu Y., Owen L., Albuquerque R., Baehr W., Thomas K., Li D. Y., Chalam K. V., Shibuya M., Grisanti S., Wilson D. J., Ambati J., Ambati B. K., *Elife*, **2**, e00324 (2013).
- 24) Terman B. I., Carrion M. E., Kovacs E., Rasmussen B. A., Eddy R. L., Shows T. B., *Oncogene*, **6**, 1677–1683 (1991).
- 25) Matthews W., Jordan C. T., Gavin M., Jenkins N. A., Copeland N. G., Lemischka I. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 9026–9030 (1991).
- 26) Galland F., Karamysheva A., Mattei M. G., Rosnet O., Marchetto S., Birnbaum D., *Genomics*, **13**, 475–478 (1992).
- 27) Pajusola K., Aprelikova O., Korhonen J., Kaipainen A., Pertovaara L., Alitalo R., Alitalo K., *Cancer Res.*, **52**, 5738–5743 (1992).
- 28) Keyt B. A., Nguyen H. V., Berleau L. T., Duarte C. M., Park J., Chen H., Ferrara N., *J. Biol. Chem.*, **271**, 5638–5646 (1996).
- 29) Terman B. I., Dougher-Vermazen M., Carrion M. E., Dimitrov D., Armellino D. C., Gospodarowicz D., Böhlen P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 1579–1586 (1992).
- 30) Sawano A., Takahashi T., Yamaguchi S., Aonuma T., Shibuya M., *Cell Growth Diff.*, **7**, 213–221 (1996).
- 31) Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R. F., Alitalo K., Eriksson U., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 2576–2581 (1996).
- 32) Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K., *EMBO J.*, **15**, 290–298 (1996).
- 33) Achen M. G., Jeltsch M., Kukk E., Mäkinen T., Vitali A., Wilks A. F., Alitalo K., Stacker S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 548–553 (1998).
- 34) Perrin R. M., Konopatskaya O., Qiu Y., Harper S., Bates D. O., Churchill A. J., *Diabetologia*, **48**, 2422–2427 (2005).
- 35) Pritchard-Jones R. O., Dunn D. B., Qiu Y., Varey A. H., Orlando A., Rigby H., Harper S. J., Bates D. O., *Br. J. Cancer*, **97**, 223–230 (2007).
- 36) Soker S., Takashima S., Miao H. Q., Neufeld G., Klagsbrun M., *Cell*, **92**, 735–745 (1998).
- 37) Seetharam L., Gotoh N., Maru Y., Neufeld G., Yamaguchi S., Shibuya M., *Oncogene*, **10**, 135–147 (1995).
- 38) Sawano A., Takahashi T., Yamaguchi S., Shibuya M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238**, 487–491 (1997).
- 39) Kerber M., Reiss Y., Wickersheim A., Jugold M., Kiessling F., Heil M., Tchaikovski V., Waltenberger J., Shibuya M., Plate K. H., Machein M. R., *Cancer Res.*, **68**, 7342–7351 (2008).
- 40) Takahashi T., Shibuya M., *Oncogene*, **14**, 2079–2089 (1997).
- 41) Takahashi T., Ueno H., Shibuya M., *Oncogene*, **18**, 2221–2230 (1999).
- 42) Heldin C. H., Westermark B., *Physiol. Rev.*, **79**, 1283–1316 (1999).
- 43) Shibuya M., Claesson-Welsh L., *Exp. Cell Res.*, **312**, 549–560 (2006).
- 44) Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K., Shibuya M., *EMBO J.*, **20**, 2768–2778 (2001).
- 45) Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L., Schuh A. C., *Nature*,

- 376, 62–66 (1995).
- 46) Sakurai Y., Ohgimoto K., Kataoka Y., Yoshida N., Shibuya M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1076–1081 (2005).
- 47) Fong G. H., Rossant J., Gertsentein M., Breitman M. L., *Nature*, **376**, 66–70 (1995).
- 48) Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J., Noda T., Shibuya M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9349–9354 (1998).
- 49) Dumont D. J., Jussila L., Taipale J., Lymboussaki A., Mustonen T., Pajusola K., Breitman M., Alitalo K., *Science*, **282**, 946–949 (1998).
- 50) Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O’Shea K. S., Powell-Braxton L., Hillan K. J., Moore M. W., *Nature*, **380**, 439–442 (1996).
- 51) Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A., *Nature*, **380**, 435–439 (1996).
- 52) Bellomo D., Headrick J. P., Silins G. U., Paterson C. A., Thomas P. S., Gartside M., Mould A., Cahill M. M., Tonks I. D., Grimmond S. M., Townson S., Wells C., Little M., Cummings M. C., Hayward N. K., Kay G. F., *Circ. Res.*, **86**, E29–35 (2000).
- 53) Aase K., von Euler G., Li X., Pontén A., Thorén P., Cao R., Cao Y., Olofsson B., Gebre-Medhin S., Pekny M., Alitalo K., Betsholtz C., Eriksson U., *Circulation*, **104**, 358–364 (2001).
- 54) Karkkainen M. J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T. V., Jeltsch M., Jackson D. G., Talikka M., Rauvala H., Betsholtz C., Alitalo K., *Nat. Immuno.*, **5**, 74–80 (2004).