VEGF-A 抗血管新生アイソフォームと血管新生障害

菊地良介*

Anti-angiogenic isoform of VEGF-A and neovascularization dysfunction

Ryosuke KIKUCHI

Key words: angiogenesis, PAD, VEGF-A, VEGF-A_{165b}

菊地良介

2005年3月 名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻卒業

2007年3月 名古屋大学大学院医学系研究科 博士課程前期課程 医療技術学専攻 病態解析学分野 修了

2007年4月 名古屋大学医学部附属病院 医療技術部臨床検査部門 入職 臨床検査技師

2011年3月 名古屋大学大学院医学系研究科 医学博士課程 分子総合医学専攻 循環器内科学講座 短縮修了 (社会人大学院生)

2011年6月 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター 助教 研究休職

2011年6月 ボストン大学医学部ワイタッカー心臓血管研究所 分子循環器分野 ポストドクトラルフェロー

2013年4月 名古屋大学医学部附属病院 医療技術部臨床検査部門 復職 臨床検査技師 現在に至る

1. はじめに

末梢動脈閉塞性疾患 (PAD) は、動脈の閉塞と十分な側副血管形成に起因する組織虚血から生じる。PAD 患者では、血管内皮増殖因子 (VEGF-A) 血中濃度が健常人と比較して優位に上昇しているにもかかわらず、下肢組織虚血が改善されないことが知られている¹⁾。その結果、下肢の冷感、疼痛、潰瘍や壊死を呈し、さらに悪化すると下肢切断を余儀なくされる疾患である。VEGF-A は、脈管形成および血管新生に関与する一群の糖タンパクである。VEGF-A

は主に血管内皮細胞表面にある血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) にリガンドとして結合し、微小血管の血管透過性を亢進させる働きがある。正常な体の血管新生に関わるほか、腫瘍の血管形成や転移など、悪性化の過程にも深く関与している。VEGFA mRNA 前駆体は 8 つのエクソンから特異的にスプライスされ、少なくともヒトにおいて 7 種類のタンパク質をコードする mRNA が報告されている。

2002 年に、VEGFA 遺伝子の 3'UTR における特異的なスプライスによって生成される別のアイソフォーム (VEGF-A_{165b}) が同定された²⁾。VEGF-A_{165b} は VEGF-A と同程度の親和性にて VEGF-R2 と結合できるが、NRP1 とは結合ができない。これは、exon8 が NRP1 と結合するために必要であるが、VEGF-A_{165b} では NRP1 と結合するための exon8 が exon8b へと変わっているためである。結果として、

*責任者連絡先:

名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門
〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65
Tel: 052-744-2588, Fax: 052-744-2589
E-mail: ryosuke-k@med.nagoya-u.ac.jp

図1 VEGF-A_{165b} の NRP1 受容体結合不全

VEGF-A_{165b} は血管新生能を増強するために必要なシグナルを細胞内へ伝達することが出来ない(図1). VEGF-A_{165b} は抗血管新生因子であると考えられており, VEGF-A によって誘発される血管内膜増殖, 上皮移動, 血管拡張, 生体内血管新生, 腫瘍成長を抑制することができる. 今回われわれは, 臨床検体およびマウス PAD モデルを用いた解析から, PAD 患者および糖尿病モデルマウスにおいて VEGF-A_{165b} が病態進展および血管新生能に影響を与えている可能性を見出したのでここに紹介する.

2. PAD 患者での抗血管新生因子 VEGF-A_{165b} 発現の上昇

PAD 患者および健康人の VEGF-A 血中濃度を ELISA kit を用いて測定した結果, 従来の報告通り健康人と比較して PAD 患者の血清 VEGF-A 濃度は優位に上昇していた³⁾.

しかし, PAD 患者および健康者血清のタンパク質を Western blot 法を用いて解析した結果, VEGF-A_{165b}(C 末側のアミノ酸だけを特異的に認識する抗 VEGF-A_{165b} 抗体を使用)発現が PAD 患者において優位に上昇していた³⁾. 一方で, 血管新生促進アイソフォーム(VEGF-A_{165a})の発現は PAD 患者におい

てほとんど検出されなかった³⁾.

通常用いられる VEGF-A ELISA は VEGF-A タンパクの N 末端側を認識しており, 血管新生促進型(VEGF-A_{165a})および抑制(VEGF-A_{165b})型の VEGF-A アイソフォームを認識するため, これら二つの相反するアイソフォームの区別ができていないことが明らかとなった(図2)³⁾. 今回のわれわれの結果から PAD 患者での VEGF-A 血中濃度が健康人と比較して優位に上昇しているにもかかわらず, なぜ下肢組織虚血が改善されないかの矛盾点について VEGF-A_{165b} が深く関与している可能性が考えられる.

3. 糖尿病モデルマウスにおける VEGF-A_{165b} 中和抗体による血流回復改善効果

肥満は糖尿病, 高脂血症, 高血圧を高率に合併するメタボリックシンドロームや動脈硬化などの心血管病の重要な発症基盤であり, 2 型糖尿病は微小血管障害に伴い PAD をはじめとした血管病発症の重要な基礎疾患である.

これまでに, 糖尿病モデルマウスを用いたマウス PAD モデルでは, VEGF-A 発現が上昇しているにも関わらず血流回復能が野生型マウス PAD モデルと比較して優位に減弱しているとの報告がある⁴⁾.

図2 末梢動脈閉塞性疾患患者における、血清中の pan-VEGF-A, VEGF-A_{165a} および VEGF-A_{165b} 発現量
文献3より改変引用

図3 糖尿病モデルマウスにおける VEGF-A_{165b} 中和抗体による血流回復能改善効果
文献3より改変引用

そこでわれわれは、糖尿病モデルマウスでのマウス PAD モデルで血流回復能が減弱する理由に VEGF-A_{165b} が関与しているのではないかと考え、高脂肪高ショ糖負荷による糖尿病モデルマウスを作製し、同様の検討を行った。

その結果、このマウスに VEGF-A_{165b} の作用を打ち消す中和抗体を腹腔内に投与すると、非投与群と比較して、減弱していた下肢虚血の血流回復能が優位に改善できることを観察した(図3)³⁾。すなわち、VEGF-A_{165b} 中和抗体は代謝障害を背景とした微小

血管障害の血流回復能を改善できる可能性が考えられる。

4. マクロファージでの Wnt5a による VEGF-A_{165b} 発現調節機序

VEGF-A_{165b} の発現調節について詳細な解析を行うためにわれわれは Wnt5a に着目した。Wnt5a は非古典的 Wnt 経路の一つであり、マクロファージ由来の Wnt5a は炎症と全身性代謝機能不全を促進することが知られている。実際に糖尿病モデルマウスの虚血下肢組織において Wnt5a 陽性マクロファージの大きな浸潤を観察した³⁾。

そこで、マウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) を用いた *in vitro* の検討を行った。

リコンビナント Wnt5a を RAW 264.7 細胞に添加すると、VEGF-A_{165b} 発現は Wnt5a 濃度依存的な上昇がみとめられた。さらに Wnt5a による VEGF-A_{165b} 発現調節には ROR2-JNK-SC35 経路が関与していることが、JNK inhibitor (SP600125)、shROR2 および shSC35 を用いた解析結果からあきらかになった³⁾。

5. 考察

PAD 患者では VEGF-A_{165b} の発現増加に伴い血管新生反応に必要な細胞内シグナル伝達ができなくなることが、微小血管障害を起こす要因のひとつとして考えられる。

今回のわれわれの研究成果から、生活習慣病を基盤とした代謝障害や動脈硬化を背景として発症する PAD 患者では、集積した血管内マクロファージ由来 Wnt5a が ROR2-JNK-SC35 経路を介して VEGF-A_{165b} 発現を優位に上昇させ微小血管障害を引き起こしている可能性が示唆される。現在、われわれは

VEGF-A_{165b} を標的とした臨床検査法を開発中である。病態進行度と ELISA を用いた臨床検査結果が合致しない症例がある場合には、一度その ELISA が“どのような抗体”で“なに”を認識しているのかを再確認することをお勧めしたい。

本稿で紹介した研究成果は、Kenneth Walsh 博士 (ボストン大学医学部 ワイタッカー心臓血管研究所)、室原豊明先生 (名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学講座教授)、松下正先生 (名古屋大学医学部附属病院輸血部教授・検査部部长) ほか、多くの先生方との共同研究で得られたものであり、ここに深く感謝いたします。

著者の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD: Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* **52**: 387–393, 2008.
- 2) Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ: VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62**: 4123–4131, 2002.
- 3) Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo DT, Shimizu I, Fuster JJ, Katanasaka Y, Yoshida S, Qiu Y, Yamaguchi TP, Matsushita T, Murohara T, Gokce N, Bates DO, Hamburg NM, Walsh K: An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med* **20**: 1464–1471, 2014.
- 4) Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH: Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res* **101**: 948–956, 2007.