

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06113・19K21231

研究課題名（和文）過剰量 VEGF による血管内皮細胞遊走抑制の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for suppressing the migration of endothelial cells by excessive VEGF

研究代表者

森田 茜（Akane, Morita）

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00828072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者がこれまでに新生仔マウス網膜を用いた研究において見出した VEGF による血管内皮細胞の遊走抑制という現象の分子基盤とその普遍性を明らかにすることを目的とした。ヒト臍帯静脈内皮細胞において、遊走は至適 VEGF 処置により促進されるものの、高濃度 VEGF 処置により抑制に転じることを見出した。細胞活性及び増殖能においては、両処置間で違いは認められなかった。これらの実験結果は、血管内皮細胞の遊走を促進させるための至適な VEGF 濃度範囲が存在し、それを超えると血管内皮細胞の遊走が抑制されるという現象がマウスの網膜血管以外の内皮細胞においても認められる普遍的なものであることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強力な血管新生促進因子として知られている VEGF が、血管内皮細胞の遊走を至適な濃度では促進するものの、高濃度になると抑制に転じさせることを見出した本研究は、これまでの血管新生における VEGF の概念を覆す基礎生物医学的に意義深い成果をもたらしたとともに、血管新生が問題となる眼疾患の病態解明や様々な虚血性疾患の治療に対しても応用可能な概念を生み出した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the molecular mechanisms of the phenomenon that excessive VEGF suppresses the migration of vascular endothelial cells in neonatal mouse retina. We found that higher concentrations of VEGF attenuated the migratory response of human umbilical vein endothelial cells, without decreasing the cell viability, proliferative activity, and level of phosphorylation of VEGF receptor 2. These results suggest that optimal concentration range of VEGF enhances both migration and proliferation of the endothelial cells, leading to the proper direction of angiogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管内皮細胞 血管生物学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、高齢者関連疾患の克服に加え、Quality of Life (QOL) の改善・維持を指向した医薬品開発が喫緊の社会的要請となっている。QOL維持という点では、外界からの情報の80%以上が視覚を介して入力されることから、視機能低下を伴う疾患への対応が特に重要である。未熟児網膜症や糖尿病網膜症では、虚血状態にある網膜から逸脱して硝子体内に伸長した新生血管から血漿成分の漏出や出血が起こり、急激な視力低下、重症の場合には失明に至る。正常な発生・発達において血管は低酸素組織領域へ向けて新生することから、発生・発達期と病態時とでは血管伸長の方向が異なっている。

血管新生を促進する代表的な因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は、血管内皮細胞の増殖、遊走および生存に中心的役割を演じている (引用文献①-③)。申請者は、網膜表層血管形成中期 (4日齢) のマウスに薬物処置をして軽度および重度の虚血領域、即ち VEGF 発現レベルの異なる虚血領域、を作製することにより、VEGF 発現レベルと血管新生の方向との関連について検討を行ってきた。そして、VEGF 発現の高い重度の虚血領域では血管新生が抑制されること、そして過剰な VEGF が血管内皮細胞の増殖能を低下させることなく遊走を抑制するという大変興味深い現象を見出している [引用文献④; 第25回血管生物医学会学術集会]。しかしながら、過剰な VEGF が血管内皮細胞の遊走を抑制するという現象の分子基盤と網膜以外の組織でも起こるのかという点については明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、過剰量の VEGF による血管内皮細胞遊走抑制の分子基盤とその普遍性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 過剰量の VEGF による血管内皮細胞の遊走抑制

新生仔マウス網膜で観察された過剰量 VEGF による血管内皮細胞の遊走抑制が普遍的な現象であるか否かについて、ヒトの臍帯静脈由来の血管内皮細胞において検討した。

市販されているヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、内皮細胞の遊走能や増殖能を亢進する至適量の VEGF (0.025-0.1 µg/mL) と病的状態を模倣した過剰量の VEGF (0.5-1 µg/mL) 間で、遊走能 (wound healing assay や Transwell® を用いた遊走実験) と増殖能 (増殖性細胞マーカー [Ki67] による蛍光免疫染色) を比較した。両条件における細胞活性については 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole (MTT) assay を用いて検討した。これらの実験により VEGF による血管内皮細胞の遊走促進と抑制のスイッチングについて明確にした。

### (2) 培養血管内皮細胞における VEGF 濃度と VEGF 受容体シグナルとの関連

VEGF が VEGF 受容体に結合すると、受容体の自己リン酸化と各種シグナル経路が活性化される。しかしながら、VEGF 濃度変化に伴いそれらが異なった挙動を示す可能性がある。そこで、培養血管内皮細胞を用いて VEGF 受容体のリン酸化レベルについて Western blot 法により検討した。

## 4. 研究成果

新生仔マウス網膜で観察された過剰量 VEGF による血管内皮細胞の遊走抑制が普遍的な現象であるか否かについて、ヒトの臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて検討した。Wound healing assay において、VEGF (0.025 又は 0.1 µg/mL) 処置は HUVECs の遊走を促進した。しかしながら、より高濃度の VEGF (0.5 又は 1 µg/mL) 処置では遊走の促進は生じなかった。

Wound healing assay において、VEGF (0.5 又は 1 µg/mL) 処置により HUVECs の遊走が抑制されたため、次に Transwell® を用いて migration assay を行った。Migration assay において、VEGF (0.025, 0.1 又は 0.5 µg/mL) 処置は遊走した HUVECs の数を増加させた。しかしながら、VEGF (1 µg/mL) 処置では、遊走細胞数の増加は観察されなかった。これらの結果から、過剰量の VEGF が血管内皮細胞における遊走を抑制することが示唆された。

過剰量の VEGF が HUVECs の遊走を抑制することを示す結果が得られたため、次に過剰量の VEGF が HUVECs の増殖に及ぼす影響について、増殖性細胞マーカーである抗 Ki67 抗体を用いて蛍光免疫染色を行うことにより検討した。VEGF (0.1 又は 1 µg/mL) 処置 24 時間後の総細胞数は、VEGF 処置による影響を受けなかった。Ki67 陽性 HUVECs 数は VEGF (0.1 及び 1 µg/mL) 処置により有意に増加した。しかしながら、VEGF の処置濃度 (0.1 及び 1 µg/mL) 間で有意な差は認められず、高濃度の VEGF 処置下においても HUVECs の増殖は促進していることが示された。

また、MTT assay による細胞活性の評価においても VEGF の処置濃度 (0.1 及び 1 µg/mL) 間で差は認められず、過剰量の VEGF は細胞活性に影響を及ぼさないことが示された。

VEGF が VEGF 受容体に結合した後、受容体の自己リン酸化と各種シグナル経路が活性化される。そこで、過剰量の VEGF が 2 型 VEGF 受容体 (VEGFR2) のリン酸化に及ぼす影響について Western blot 法により検討したが、VEGFR2 のリン酸化は VEGF (1 µg/mL) 処置によって抑制されることはなかった。

今回の検討から、血管内皮細胞応答は、VEGF の濃度変化に伴い変化し、VEGF が過剰量になると血管内皮細胞の遊走能が低下するというスイッチング現象が、ヒトを含めた他の動物種および網膜以外の組織の血管においても起こり得る普遍的なものであることを示唆された。

本研究において過剰量の VEGF が VEGFR のリン酸化には影響を及ぼさないことが示されたが、分子基盤の詳細は現在も明らかではない。今後、過剰量の VEGF による血管内皮細胞遊走抑制の分子基盤を明らかにするために、更なる検討が必要である。

#### <引用文献>

- ① Ozaki H, Seo M, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N, Hofmann F, Wood J, Campochiaro P., Blockade of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor Signaling Is Sufficient to Completely Prevent Retinal Neovascularization 2000. *Am. J. Pathol.* 156, 697-707
- ② Olsson A, Dimberg A, Kreuger J, Welsh L., VEGF Receptor Signalling - In Control of Vascular Function. 2006. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 359-71
- ③ Morita A, Nakahara T, Abe N, Kurauchi Y, Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K. Effects of pre- and post-natal treatment with KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on retinal vascular development and patterning in mice. 2014. *Exp. Eye Res.* 120, 127-137
- ④ Morita A, Mori A, Arima S, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K, Nakahara T. Transient phenotypic changes in endothelial cells and pericytes in neonatal mouse retina following short-term blockade of vascular endothelial growth factor receptors. 2018. *Dev. Dyn.* 247, 699-711

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Morita Akane, Mori Asami, Arima Shiho, Sakamoto Kenji, Nagamitsu Tohru, Ishii Kunio, Nakahara Tsutomu   | 4. 巻<br>247             |
| 2. 論文標題<br>Transient phenotypic changes in endothelial cells and pericytes in neonatal mouse retina following short-term blockade of vascular endothelial growth factor receptors | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Developmental Dynamics  | 6. 最初と最後の頁<br>699 ~ 711 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/dvdy.24614   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>森田茜, 郷古朋美, 松村麻美, 森麻美, 坂本謙司, 中原努        |
| 2. 発表標題<br>過剰な VEGF は血管内皮細胞の遊走を抑制することにより血管新生を抑制する |
| 3. 学会等名<br>第 38 回日本眼薬理学会                          |
| 4. 発表年<br>2018年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|