

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860367

研究課題名(和文) 抗血管新生因子VEGF-A165bを標的とした心血管病の新しい検査法開発

研究課題名(英文) The development of the anti-angiogenic factor VEGF-A165b quantification methods for cardiovascular disease.

研究代表者

菊地 良介 (KIKUCHI, RYOSUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：30721435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：VEGF-A165(血管新生促進型)とVEGF-A165b(抑制型)は、C-末端側の6アミノ酸残基の配列だけが異なるため、これまでのVEGF-Aタンパク質発現・濃度測定に使用されているN末端側を認識する抗体では、VEGF-Aの血管新生促進型と抑制型の区別が出来ていなかった。本研究の中で、我々はVEGF-A165b特異的ELISA系の構築とVEGF-A165bの分子メカニズムを明らかにした。また、尿中のVEGF-A165b濃度測定結果から、VEGF-A165b濃度の変動が、腎機能障害の進展評価に有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The VEGF-A165 (pro-angiogenic) and VEGF-A165b (anti-angiogenic), only the sequence of 6 amino acid residues of the C-terminal side is different. The current ELISA system of VEGF-A does not discriminate between different VEGF-A isoforms (pro- or anti-angiogenic forms). Here, we made the development of VEGF-A165b specific ELISA system, and the clarified the molecular mechanisms of VEGF-A165b. Moreover, the urinary VEGF-A165b concentration was found to be useful for the development assessment of renal dysfunction.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：VEGF-A 臨床検査医学 VEGF-A165b 血管新生 抗血管新生因子

## 1. 研究開始当初の背景

1980年代に同定された血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)は、脈管形成および血管新生に關与する一群の糖タンパク質である。

VEGF-Aには様々なアイソフォームが存在することが報告されているが、その中でも特に、アミノ酸残基165個のVEGF-A<sub>165</sub>が生体内で最も多く存在し、血管新生能が最も強いVEGF-Aアイソフォームであることが知られている。

2002年、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新規アイソフォーム(VEGF-A<sub>165b</sub>)が同定された。VEGF-A<sub>165b</sub>は、従来考えられていたVEGF-Aの作用である血管内膜の増殖、生体内血管新生および腫瘍成長を抑制するため、本来のVEGF-Aの役割とは相反する「抗血管新生因子」として考えられている。VEGF-A<sub>165</sub>(血管新生促進型)とVEGF-A<sub>165b</sub>(抑制型)は、C-末端側の6アミノ酸残基の配列だけが異なるため、これまでのVEGF-Aタンパク質発現・濃度測定に使用されているN末端側を認識する抗体では、VEGF-Aの血管新生促進型と抑制型の区別が出来ていなかった。また、VEGF-A<sub>165b</sub>の詳細な発現メカニズムについても十分に明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、高精度なVEGF-A<sub>165b</sub>定量評価法の確立とVEGF-A<sub>165b</sub>の詳細な発現メカニズム解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) VEGF-A<sub>165b</sub> 定量評価法の確立

#### 測定対象検体

名古屋大学医学部附属病院生命倫理委員会承認のもと、当院臨床検査部門で保管されている残余検体を測定対象検体とした。

#### VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度測定

VEGF-A<sub>165b</sub>濃度測定には、Human Vascular Endothelial Growth Factor-165b ELISA Kit (MyBioSource)を使用した。血液サンプルは、

残余血清を用いて、至適化した前処理を施した後に測定した。尿サンプルは、残余随時尿を用いて測定した。

### (2) VEGF-A<sub>165b</sub> 発現メカニズムの解明

マウスマクロファージ様細胞(RAW264.7細胞)による解析：RAW264.7細胞を用いて、培養液中にリコンビナントWnt5a蛋白を添加し、VEGF-A<sub>165b</sub>発現誘導効果について検討した。

シグナル伝達経路の解析：RAW264.7細胞を用いて、培養液中にJNK阻害剤(SP600125)を添加して、Wnt5aにより誘導されるVEGF-A<sub>165b</sub>発現への影響について検討した。

関連受容体とスプライシングファクターの解析：RAW264.7細胞を用いて、Wnt5aの代表的な受容体であるROR2およびsplicing factor SC35のshRNA技術を用いたノックダウンにより、Wnt5aが誘導するVEGF-A<sub>165b</sub>発現への影響について検討した。

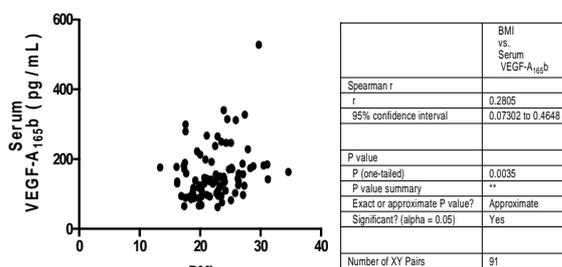
## 4. 研究成果

### (1) VEGF-A<sub>165b</sub> 定量評価法の確立

我々は、市販ELISA kitを用いた性能評価に関する再評価を行った。その結果、添付文書に記載されている従来通りの方法では、ほとんどすべての検体が測定感度以下となった。そこで我々は、VEGF-A<sub>165b</sub>の立体構造解析を行い、VEGF-A<sub>165b</sub>特有のアミノ酸配列について詳細な解析を行った(data not shown)。解析結果を踏まえて、至適化した条件下で前処理を施し測定を行うことで、測定系が安定するとの仮説を立て検討を進めた。その結果、前処理を施すことですべての検体のVEGF-A<sub>165b</sub>濃度が検出可能となった。我々は、前処理方法によるELISA系への反応阻害についての確認も検討した。これらの結果を踏まえて、我々はVEGF-A<sub>165b</sub>測定法について、至適化した検体前処理法と市販キットの組み合わせにより、高精度なVEGF-A<sub>165b</sub>定量評価法を確立することが出来た。

## (2) 血中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度と BMI との関連

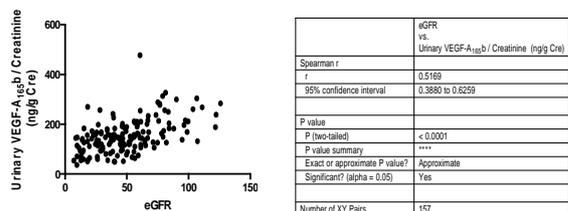
我々はこれまでに、VEGF-A<sub>165</sub>b が肥満時の代謝障害による微小血管障害の誘発に関与していることを報告してきた(Ngo DT, Kikuchi R et.al. *Circulation*. 2014)。この報告の中で、肥満症(BMI:44±8 kg/m<sup>2</sup>)と健常人(BMI:21±2 kg/m<sup>2</sup>)を比較した場合、肥満症において有意に VEGF-A<sub>165</sub>b 発現量が増加していることを見出していた。しかし、これまでの VEGF-A<sub>165</sub>b 発現量の解析は患者血清を直接用いた Western Blot 法による解析にて行ってきた。そこで、我々は構築した VEGF-A<sub>165</sub>b 定量評価法を用いて、これまでの研究成果の追試を行った。残余検体 91 検体を用いて VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度を測定し、BMI との相関関係の検討を行った。その結果、血中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度は有意に BMI と相関していることが明らかとなった(図 1)。



(図 1. 血中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度と BMI との相関)

## (3) 尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度と推算糸球体濾過量との関連

心血管疾患の予測因子としての慢性腎臓病(CKD)についてはこれまでにいくつも報告されている。腎機能を早期に評価し、CKD 発症を未然に防ぐことは極めて重要である。そこで我々は、残余尿 157 検体を用いて、尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度を測定し、腎機能との関連性について評価した。

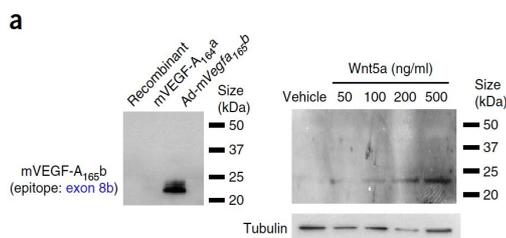


(図 2. 尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度と eGFR との相関)

その結果、尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度が推算糸球体濾過量(eGFR)と有意に相関することを見出した(図 2)。

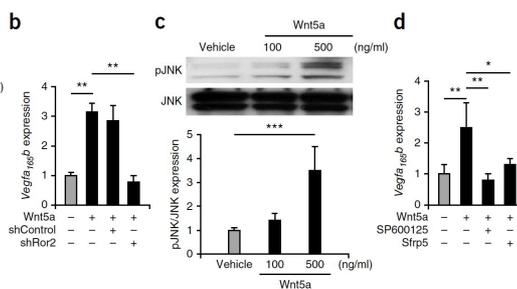
## (4) VEGF-A<sub>165</sub>b 発現メカニズムの解明

VEGF-A<sub>165</sub>b 発現メカニズム解析において、RAW264.7 細胞にリコンビナント Wnt5a 蛋白を添加することにより、Wnt5a 濃度依存的に VEGF-A<sub>165</sub>b 発現を誘導できることを確認した(図 3a)。



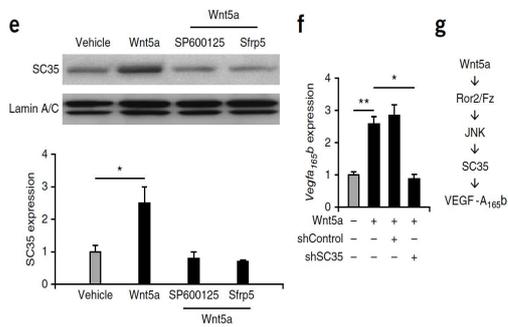
(図 3. VEGF-A<sub>165</sub>b 発現メカニズム)

Wnt5a 濃度依存的に VEGF-A<sub>165</sub>b 発現を誘導 RAW264.7 細胞における Wnt5a により誘導される VEGF-A<sub>165</sub>b 発現は、Wnt5a の代表的な受容体である ROR2 ノックダウンと代表的なシグナル伝達因子である JNK の阻害により、Wnt5a が誘導する VEGF-A<sub>165</sub>b 発現を抑制されることを見出した(図 3b,c,d)。



(図 3. VEGF-A<sub>165</sub>b 発現メカニズム)

さらに、Wnt5a により splicing factor SC35 発現が増強されること、shSC35 によるノックダウンにより、Wnt5a が誘導する VEGF-A<sub>165</sub>b 発現が抑制されることを確認した(図 3e,f)。すなわち、Wnt5a により誘導される VEGF-A<sub>165</sub>b 発現調節に ROR2 / JNK / SC35 経路が関与していることが明らかとなった(図 3g)。



(図 3. VEGF-A<sub>165</sub>b 発現メカニズム)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Doan TM, Shimizu I, Fuster J, Katanasaka Y, Qiu Y, Yamaguchi P, T, Matsushita T, Murohara T, Bates O,D, Hamburg N,M, Walsh K.  
An anti-angiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat.Med.*20(12):1464-1471.2014.  
doi:10.1038/nm.3703. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 菊地良介  
重症虚血肢へのヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植の治療効果判定指標としての臨床検査法探索研究. 第2回日本血管生物医学会若手研究会 2016.3.5 – 3.6 (東北大学加齢医学研究所スマートエージング国際共同研究センター国際会議室・宮城県・仙台市)
2. Kikuchi R, Matsumoto H, Matsushita T.  
Anti-angiogenic Actions of VEGF-A inhibitory isoform in Human Obesity  
第 64 回日本医学検査学会学術集会 2015.5.16- 5.17 (福岡国際会議場・福岡県・博多市)
3. 菊地良介  
Sfrp5/Wnt5a シグナリングによる抗血管

新生因子 VEGF-A<sub>165</sub>b を介した血管新生抑制について

第 1 回日本血管生物医学会若手研究会  
2015.2.6 – 2.7 (東京大学・東京都・文京区)

4. Kikuchi R, Walsh K, Murohara T.  
The Sfrp5–Wnt5a–VEGF-A<sub>165</sub>b axis as a new regulator of vascular response to tissue ischemia  
第 3 回 IRG meeting. 2015.1.16 – 1.17 (品川プリンスホテル・東京都・品川区)
5. Kikuchi R, Walsh K, Matsumoto H, Matsushita T.  
VEGF-A<sub>165</sub>b, the potential as a novel biomarker of obesity-related disorders.  
The 31<sup>th</sup> World congress of biomedical laboratory science (IFBLS),  
2014.10.03-10.07 (Taipei International Convention Center・台湾・台北).
6. 菊地良介, Kenneth Walsh, 室原豊明  
VEGF-A 抗血管新生アイソフォームを中心とした心血管病評価法開発研究 - 末梢動脈疾患における VEGF-A<sub>165</sub> 血管新生抑制アイソフォームの存在 -  
第 9 回 VBIC 研究会 2014.8.23-8.24 (ホテル椿山荘東京・東京都・品川区)

〔図書〕(計 4 件)

1. 菊地良介 他  
抗血管新生因子としての VEGF-A.  
細胞工学 1 月号 35(1), 48-50. (2016)  
学研メディカル秀潤社
2. 菊地良介 他  
血管新生と VEGF-A パラドックス.  
-抗血管新生因子 VEGF-A<sub>165</sub>b の可能性-  
週刊「医学のあゆみ」255(8), 841-842.  
(2015) 医歯薬出版株式会社
3. 菊地良介 他  
VEGF-A の相反する二面性  
-VEGF-A 血管新生抑制型アイソフォームと PAD-.  
感染・炎症・免疫 45(3), 244 - 246.  
(2015) 鳥居薬品株式会社

#### 4 菊地良介 他

VEGF-A 抗血管新生アイソフォームと  
血管新生障害.

日本血栓止血学会誌 トピック 26 (3),  
323 - 326. (2015) 日本血栓止血学会

#### 〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b を指標とした腎機能  
の検査方法及び検査装置、腎機能の検査装置  
として機能させるためのプログラム及び記  
録媒体

発明者：菊地良介、松下正、室原豊明

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2015-110113

出願年月日：2015 年 5 月 29 日

国内外の別：国内

#### 〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/labmed/index.ht  
ml](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/labmed/index.html)

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

菊地良介 (KIKUCHI, Ryosuke)

名古屋大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：30721435

##### (2) 研究分担者

なし