

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462731

研究課題名(和文) コラーゲン結合型VEGF-Cによる効果的なリンパ管新生の研究

研究課題名(英文) Development of collagen binding VEGF-C for Lymphangiogenesis

研究代表者

松本 洋(Matsumoto, Hiroshi)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20423329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ浮腫に対する新たなる治療法開発を目指し、コラーゲン接着型VEGF-Cの生産とその効果の検証を試みた。ガス壊疽菌の毒素の一部であるコラーゲン結合ドメインとリンパ管新生因子VEGF-Cの融合タンパクを作成し、昆虫細胞を用いた融合タンパクの生産系を確立した。コラーゲン接着試験により、コラーゲン結合能を確認した。しかし、リンパ管内皮細胞に対する増殖活性等が確認出来ず、MAPKシグナル伝達でもリン酸化シグナルが検出出来なかった。原因としては分泌経路を辿っていないため生理活性を有していない可能性が考えられた。シグナルペプチドを付加したタンパクを設計し生産を試みたが、生産には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We tried to make collagen binding VEGF-C and to verify its effect for developing a new treatment for lymphedema. A fusion protein of the collagen binding domain which is part of the gas gangrene toxin and the lymphangiogenic factor VEGF - C was designed and a fusion protein production system using insect cells was established. Collagen binding ability was confirmed by collagen adhesion test. However, proliferative activity against lymphatic endothelial cells could not be confirmed and phosphorylation signals could not be detected by MAPK signaling test. It is considered that there is a possibility that it has no physiological activity because it is not following the secretory pathway as a cause. We tried to design and produce a protein with signal peptide, but it did not lead to production.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ管新生 リンパ浮腫

1. 研究開始当初の背景

リンパ管研究は血管研究に比べるとまだまだ遅れていた。臨床においてリンパ輸送系が原因となる最大の疾患はリンパ浮腫であった。リンパ浮腫はリンパ流の鬱滞に起因する組織の浮腫であった。子宮癌や乳癌に対するリンパ節郭清後に起こることが多い。本邦での罹患者数は10~15万人と推定されていた。しかし、リンパ浮腫には決定的な治療法が無く、圧迫やマッサージなどの対症療法が中心であった。リンパ管静脈吻合術や血管付きリンパ節移植などの手術治療法もあるが、効果は一定していなかった。リンパ浮腫に対する新たな治療法の開発が待たれていた。

近年、様々なリンパ管新生因子が解明されてきているが、中でも VEGF-C は中心的なリンパ管新生因子である。VEGF-C を遺伝子導入したリンパ浮腫治療が動物実験では行われ、成果が出されていた。しかし、臨床応用を考えた場合、遺伝子導入は安全性や倫理的問題により実現には多くの障壁があった。

ガス壊疽菌の産生する毒素にはコラーゲンと結合するドメインが含まれている。このコラーゲン結合ドメイン (Collagen Binding Domain (CBD)) を薬物送達システムとして用いることができる。研究分担者の松下は、このコラーゲン結合ドメインの構造や機能、生理活性を明らかとしてきた。さらに bFGF や VEGF-A との融合蛋白を用いた動物実験において骨新生や血管新生が促進されることも明らかとしていた。

2. 研究の目的

このコラーゲン結合ドメインを用いた薬物送達システムのリンパ管新生への応用を考えた。コラーゲン結合ドメインと VEGF-C の融合蛋白を作成することにより、VEGF-C にコラーゲン結合能を持たせることができる。コラーゲンに結合することで長期間局所にとどまり、効率的にリンパ管新生を促進できると考えた。これを実証するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ブレビバチルス分泌発現システム (タカラバイオ) を用いたコラーゲン結合ドメインと VEGF-C の融合蛋白の生産

プラスミド pNCM02 のマルチプルクロニングサイトにコラーゲン結合ドメインと VEGF-C および Strep-tag の遺伝子を導入する。このプラスミドを大腸菌に導入し、クローニングする。この大腸菌よりプラスミド DNA を抽出し、DNA シークエンスを確認する。このプラスミドをブレビバチルスに導入し、融合タンパクを生産させる。融合タンパクは培養上清を硫酸沈殿にて濃縮し、Strep-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより抽出する。

昆虫細胞 Sf9 を用いたコラーゲン結合ドメインと VEGF-C の融合蛋白の生産

プラスミド pFastBac のマルチプルクロニングサイトにコラーゲン結合ドメインと VEGF-C および Strep-tag の遺伝子を導入する。このプラスミドを Bacmid ウイルス遺伝子が導入された専用の大腸菌 Competent DH10Bac に導入し、大腸菌内で目的遺伝子を Bacmid 遺伝子へ組み換える。大腸菌より Bacmid 遺伝子を抽出し、これを昆虫細胞 Sf9 に導入し遺伝子組換えバキュロウイルス粒子を生産させる。このバキュロウイルスを Sf9 に感染させ、融合タンパクを生産させる。融合タンパクは Sf9 細胞をフレンチプレスで破碎し、Strep-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより抽出する。

培養細胞等における融合蛋白の効果の観察

コラーゲン結合試験

融合タンパクの溶液を、不溶性コラーゲンを載せたカラムと載せないカラムを通過させ、通過液の融合タンパクを SDS-PAGE で解析した。

MTS 試験

あらかじめフィブロネクチンでコーティングしたプレートに 1×10^5 個/ml のマウスリンパ管内皮細胞懸濁液を播種し一晩培養する。培地を FBS 無添加で Almax を添加した培地に交換し 24 時間培養する。培地に融合タンパク等を添加し 48 時間培養した後に MTS 試薬を添加し 2 時間後に 490nm の吸光度を測定し細胞数を定量する。

管腔形成試験

Matrigel をコーティングした 96 well プレートに 1×10^4 個のマウスリンパ管内皮細胞を播種し、融合タンパク等を添加した培地で 4 日間培養し、Callstain で染色した後に蛍光顕微鏡で撮影し、解析ソフト Angiotool を用いて管腔形成を評価する。

細胞遊走試験

フィブロネクチンでコーティングしたプレートに細胞遊走試験用のカルチャーインサート (ibidi) を設置し、 1×10^5 個/ml のマウスリンパ管内皮細胞懸濁液を $70 \mu\text{l}$ ずつカルチャーインサートの二つのチャンバーに播種し、コンフルエントになるまで培養する。カルチャーインサートを除去し、PBS でリンスした後に融合タンパク等を添加した培地で 8 時間培養し、位相差顕微鏡で細胞の遊走を観察する。

リンパ管透過性試験

CultureCoat In Vitro Vascular Permeability Assay Kit (Trevigen) を用い、チャンバーの半透過性膜上でマウスリンパ

管内皮細胞を培養し、融合タンパク等を含む培地に交換した後、チャンバーに FITC デキストランを加え、20 分後にチャンバー外に漏出した FITC デキストランの蛍光強度を測定する。

MAPK シグナル伝達検出

フィブロネクチンコーティングしたウェルにマウスリンパ管内皮細胞を播種し培養する。成長因子を含まない基本培地 (EBM) に培地を置換し 24 時間飢餓状態にする。融合タンパク等を培地に添加し 12 分間培養した後、RIPA にて細胞を溶解し、溶解液を遠心分離して上清を採取する。上清を試料として電気泳動 (SDS-PAGE) し、ゲルから PVDF メンブレンにブロッティングする。このメンブレンに Erk とリン酸化 Erk (pErk) の一次抗体を作用させ、さらに二次抗体を作用させた後に発色させて撮影し、バンドの濃度を計測する。

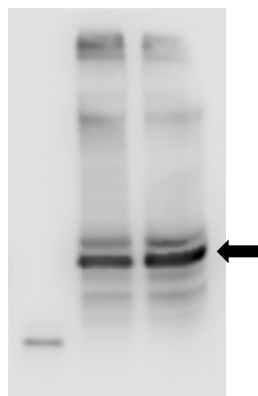
コラーゲンスポンジ埋め込みリンパ管内皮細胞誘導試験

融合タンパクの溶液に浸したコラーゲンスポンジとコントロールとして PBS に浸したコラーゲンスポンジをラットの頸部リンパ節を分割したところに埋め込む。2 週間飼育した後にコラーゲンスポンジを取り出し H-E 染色および Podoplanin 免疫染色を行い組織学的にリンパ管新生を評価する。

4. 研究成果

ブレピバチルス分泌発現システム (タカラバイオ) を用いたコラーゲン結合ドメインと VEGF-C の融合蛋白の生産

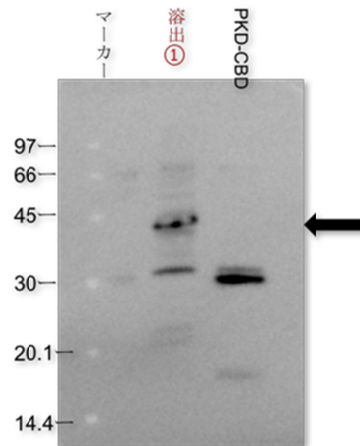
融合タンパクを生産し、SDS-PAGE および Western Blotting (右図矢印) により確認した。しかし、挟雑タンパクも多く、イオン交換カラムクロマトグラフィー、イオン交換高圧液体クロマトグラフィー、ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを試みたが、挟雑タンパクは除去出来なかったため、昆虫細胞による融合タンパク生産に切り替えることとした。



昆虫細胞 Sf9 を用いたコラーゲン結合ドメインと VEGF-C の融合蛋白の生産

融合タンパクを生産し、SDS-PAGE および Western Blotting (次図矢印) により確認し

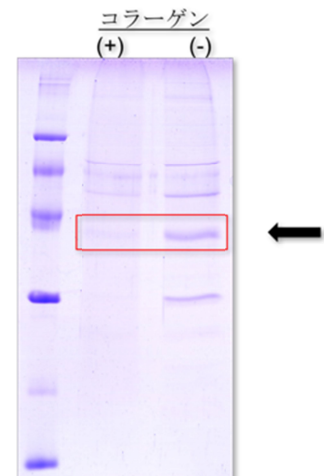
た。さらに SDS-PAGE のバンドを切り出し、ゲル内消化した後に LC/MS/MS にてアミノ酸配列を確認したところ、70.7%の一致率で、設計通りの融合タンパクが出来ていることが確認された。



培養細胞等における融合蛋白の効果の観察

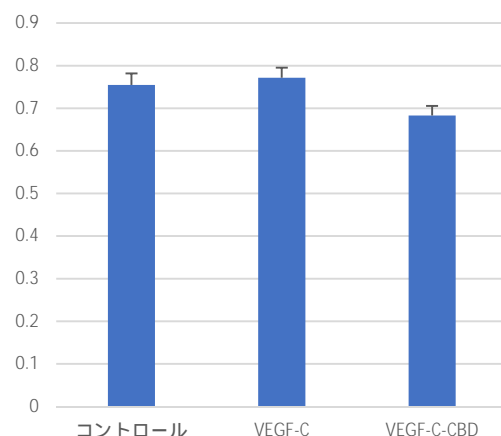
コラーゲン接着試験

通過液を SDS-PAGE で解析したところ (右図) コラーゲンを載せたカラムの通過液には融合タンパクがほとんど含まれておらず、コラーゲン結合能を有することが確認出来た。



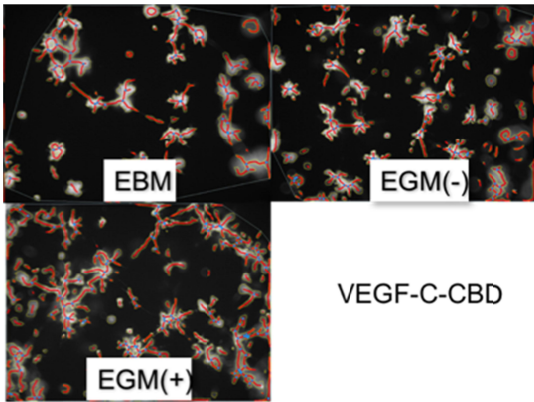
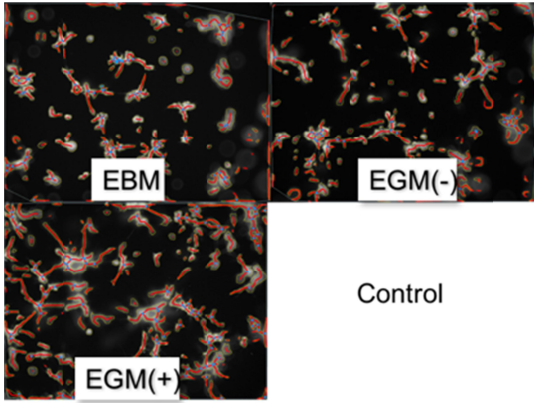
MTS 試験

条件などを検討しつつ何度も試験を行ったが、通常の VEGF-C も融合タンパクも、安定した増殖活性を示すことは無かった。下に代表的な結果を示す。コントロールと比較し、いずれも有意差は認めなかった。



管腔形成試験

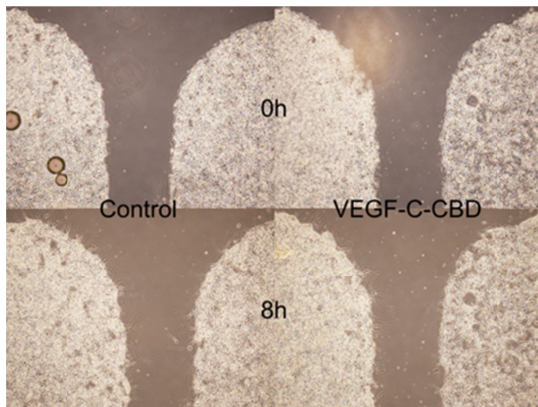
成長因子を全く加えていない基本培地 (EBM)、基本培地に各種成長因子を加えているが仔牛胎児血清 (FBS) を加えていない培地 (EGM-)、各種成長因子と FBS を加えた培地 (EGM+) の 3 種類の培地を用いた条件で比較した。いずれの条件においてもコントロールと融合タンパク添加との差は認められなかった。



	Total Number of Junctions	Junctions density	Total Vessels Length	Total Number of End Points	Average Lacunarity
Control EBM	81	0.0000600	8577	199	0.7088
Control EGM-	53	0.0000388	9163	261	0.6316
Control EGM+	110	0.0000799	15048	284	0.3752
VEGFC-CBD EBM	67	0.0000547	8165	131	0.7422
VEGFC-CBD EGM-	81	0.0000598	10002	249	0.5393
VEGFC-CBD EGM+	137	0.0001008	14690	266	0.4251

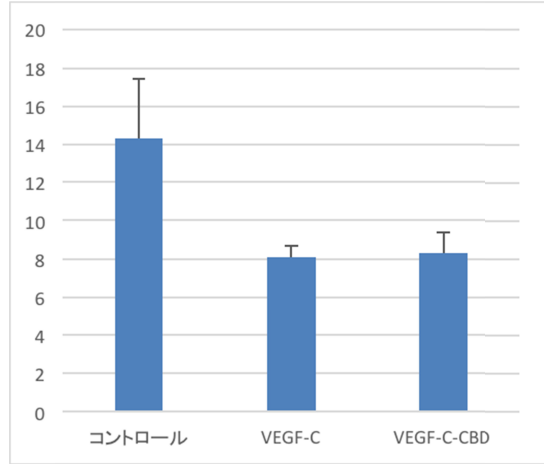
細胞遊走試験

カルチャーインサートを除去した後の間隙に遊走してきたリンパ管内皮細胞を観察したが、下図に示すとおり、コントロールと融合タンパク添加とは、差は認めなかった。



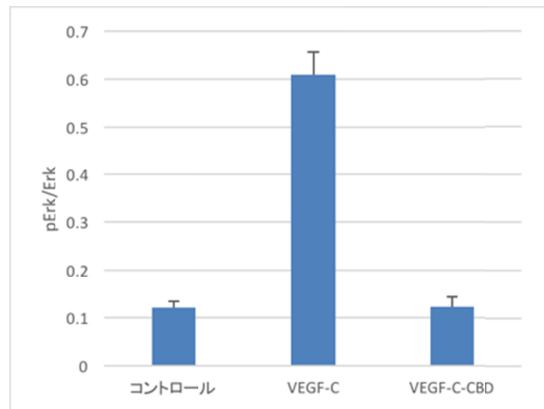
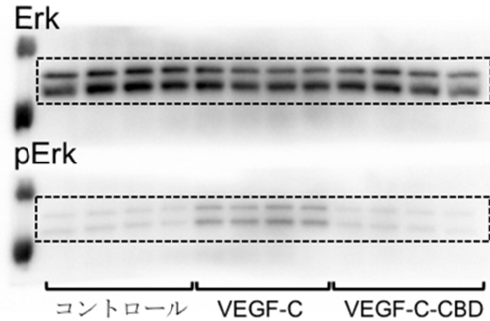
リンパ管透過性試験

次のグラフに示すとおり、チャンバー外に漏出した FITC デキストランの蛍光強度はコントロールよりも低く、融合タンパクや VEGF-C のリンパ管透過性亢進作用は認められなかった。



MAPK シグナル伝達検出

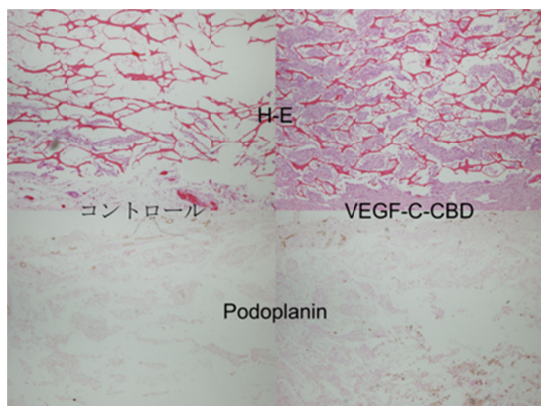
下図に示すとおり、VEGF-C では pErk が有意に上昇していたが、融合タンパクではコントロールと差を認めなかった。



コラーゲンスポンジ埋め込みリンパ管内皮細胞誘導試験

H-E 染色ではコントロールに比べて融合タンパクに浸したコラーゲンスポンジ内に多数の細胞が入り込んでいた。Podoplanin 免疫染色において、コントロールではスポンジ内にはほとんど染色される細胞を認めなかった。

のに対し、融合タンパクに浸したスポンジ内



には染色されたリンパ管内皮細胞を多数認められた。

【総括】

Sf9 を用いたタンパク生産系を利用し、コラーゲン結合型 VEGF-C の生産系を確立出来た。しかし VEGF-C としての活性を評価したところ活性が認められなかった。VEGF-C 活性の評価法として、MTS アッセイや細胞遊走活性、チューブ形成活性などを試みたがいずれも VEGF-C 活性の評価が難しかった。最終的には細胞内シグナル伝達の MAPK 経路の Erk リン酸化解析にて評価を行うことが出来た。生産したコラーゲン結合型 VEGF-C に VEGF-C としての活性が無い原因を検討したところ、Sf9 を用いたタンパク生産過程で細胞内からタンパクを回収していたため、きちんと分泌経路をたどっていないことが原因では無いかと考えられた。そこで昆虫細胞 (Sf9) を用いたタンパク生産系において、きちんと分泌経路を辿ることで生理活性を有する VEGF-C が生産出来ることを確認した。N 末端に分泌シグナルの 1 種である Melittin を付加し、C 末端に回収用の His タグを付加した VEGF-C の DNA 配列を設計し、2 本鎖 DNA 作成した。この DNA を TA クローニングし、シーケンサーで配列を確認した。これを元に Sf9 でタンパクを生産した。TA クローニングした DNA 配列を、昆虫細胞へ導入するための pFastBac に載せ換えて、DH5 に導入した。導入した DH5 より pFastBac を回収し、DH10Bac に導入し、DH10Bac 内で目的の配列を Bacmid に導入した。この DH10Bac より Bacmid を抽出し、Sf9 に感染させ目的の配列を持つバキュロウイルスを作成した。このウイルスを繰り返し感染させることによりウイルス濃度を上げ、最終的には培養上清から目的の VEGF-C タンパクを回収した。この VEGF-C を用いて Erk リン酸化解析を行い、生理活性を有することを確認した。次に、新たなプライマーを設計し、この Melittin を付加した VEGF-C の DNA と以前使っていた PKD-CBD の DNA とを PCR で合成し、N 末端に Melittin が C 末端に His タグが付いており、それぞれ VEGF-C の前と後に PKD-CBD が付加された DNA を作成した。PCR で合成した DNA

を TA クローニングし、シーケンサーで配列を確認した。前回同様に TA クローニングした DNA 配列を、昆虫細胞へ導入するための pFastBac に載せ換えて、DH5 に導入した。しかし、導入した DH5 はコロニー形成不良で、形成したコロニーを培養しても増えなかった。DH5 からの DNA の回収効率の問題を考え、抽出過程などの条件を検討したが、残念ながらコロニーは得られなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

杉山成史、徳山英二郎、松本洋、木股敬裕、細胞外マトリックスが培養リンパ管内皮細胞の増殖活性評価系に及ぼす影響、第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会、2015 年 10 月 8 日、盛岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 洋 (MATSUMOTO Hiroshi)

岡山大学病院・形成外科・医員

研究者番号：20423329

(2) 研究分担者

松下 治 (MATSUSHITA Osamu)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病原細菌学・教授

研究者番号：00209537

杉山 成史 (SUGIYAMA Narushi)

岡山大学病院・形成外科・助教

研究者番号：80379776

美間 健彦 (MIMA Takehiko)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病原細菌学・助教

研究者番号：80596437