

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15089

研究課題名(和文)血管安定化過程におけるVEGF/VEGFR2シグナルの役割

研究課題名(英文)Role of the VEGF/VEGFR2 signaling in vascular stability

研究代表者

久保田 義顕 (Kubota, Yoshiaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：50348687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内のあらゆる組織はその発生過程において血管がくまなく張り巡らされる。この血管成長を担っているのが、血管内皮成長因子(VEGF)と、その受容体であるVEGFR2のシグナルである。VEGFシグナルの発芽、血管増殖に関する役割は広く認知されているものの、血管の安定化・成熟化の過程に関してはよく知られていない。本研究は、最新の遺伝子改変マウス、可視化テクノロジーを駆使しVEGFシグナルの血管安定性維持における役割を明らかにすべく遂行された。具体的には神経特異的VEGF欠損マウス網膜では、既に成熟した血管の安定性が損なわれており、この表現型は血管内皮特異的VEGFR2欠損マウスでも再現された。

研究成果の概要(英文)：Blood vessels are distributed throughout the body during development. This developmental process depends on the signaling of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its main receptor, VEGFR2. However, the precise role of VEGF on vascular endothelial cells, in particular the role in the maintenance of their stability is not clear. In this study, we generated tamoxifen-inducible endothelial VEGFR2 knockout mice (Cdh5-BAC-CreERT2+;Vegfr2flox./flox) and morphologically analyzed the retina of the mutant mice at a single cell level. We found not only abrogation of the formation of new vessels but also the striking regression of established ones. This phenotype was mostly recapitulated by neuron-specific VEGF knockout mice (Chx10-Cre+Vegfaflox/flox). Overall our study suggests that the VEGF/VEGFR2 signaling positively regulates the stability of established blood vessels.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管 血管新生 VEGF VEGFR2

1. 研究開始当初の背景

生体内のあらゆる組織は、その恒常性を維持するために血管から酸素・栄養が供給されることが必須である。この目的を達成すべく、組織には動脈・静脈・毛細血管からなる血管ネットワーク構築が全身くまなく張り巡らされる。血管内皮最長因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) シグナルの血管新生における重要性は、これまでの多くの基礎研究により確立されており、既に臨床の場において VEGF 阻害(ベバシツマブなど)による抗血管新生療法が、有意な制がん効果を有するということが判明している。しかしながらその延命効果については、がんの種類によっては極めて限定的であり、マウスなどの動物実験における結果と比較すると、VEGF 阻害の効果はかなり軽微なものと言える。さらには、VEGF 阻害による脳出血・消化管出血などの副作用も強く、血管研究の分野では、VEGF 阻害に対して如何に腫瘍が抵抗するか、そして当初新生血管のみに必要とされると考えられてきた VEGF シグナルの遮断がなぜ健常血管を傷害するかに関しても、改めて詳細に解析する必要性が示唆されている。

2. 研究の目的

血管内皮細胞 1 個 1 個の挙動に対する VEGF/VEGFR2 シグナルの作用は、特に in vivo においては十分に解析されてこなかった側面がある。VEGF シグナルの血管内皮細胞に対して発芽、増殖を促進するという役割は、その下流の細胞内分子シグナルを含めて広く認知されているものの、血管の安定化、成熟化における役割に関しては不明である。これを受けて、in vivo における VEGF シグナルの血管内皮細胞に対する影響について、最新の遺伝子改変マウス、可視化技術を駆使し、特に血管の安定性維持における VEGF シグナルの役割について明らかにすべく、本研究は行われた。

3. 研究の方法

当研究室の作成した新規タモキシフェン誘導性血管内皮特異的 Cre マウス (Cdh5-BAC-Cre^{ERT2}) と、血管新生に必須の受容体であり、VEGF のメイン受容体である VEGFR2 の flox マウス (Vegfr2-flox) を交配し、得られたマウスを用いて、出生後血管内皮細胞の VEGFR2 をノックアウトし、網膜における血管構造の変化を、当研究室の可視化テクノロジーを駆使して、形態学的に観察を行った。また、同様の解析を神経特異的 VEGF 欠損マウス (Chx10-Cre⁺Vegfa^{fl/fl}) についても行った。

4. 研究成果

まず、タモキシフェン誘導性血管内皮特異的 VEGFR2 ノックアウトマウスに対し、生後 1 日目からタモキシフェン投与を行ったと

ころ、生後 6 日目網膜において、血管形成が全く見られなかった。この結果は、他の類似のタモキシフェン誘導性血管特異的 Cre ラインにおける VEGFR2 のノックアウトで得られた表現型に比べて、明らかに重篤な表現型であり、網膜血管形成において血管内皮細胞における VEGFR2 シグナルが極めて重要であることが示されるとともに、類似のマウスより遥かに効率よく血管内皮で遺伝子をノックアウトできることが示された。次に、生後 3 日目からのタモキシフェン投与に変更し、既に完成した血管網に対する VEGFR2 欠損の影響を調べた。その結果、血管が生後 3 日目以降成長しないばかりか、既存血管の密度の著しい減少、つまり安定化した後の血管の退縮も見られた。これは成熟血管内皮細胞に対して、VEGFR2 シグナルがその安定性の維持に機能していることを示唆している。また、無血管領域のアストロサイトのみで発現するとされる VEGF の発現をより詳細に in situ hybridization で解析した結果、アストロサイトだけではなく、神経からも VEGF が発現することを見出した。興味深いことに、神経における VEGF の発現は、血管が張り巡らされた場所でも見られ、アストロサイト由来 VEGF とは異なる役割を有することが示唆された。さらには、神経特異的 VEGF 欠損マウスの網膜血管を解析したところ、上記 VEGFR2 欠損マウス同様、安定化後の血管の著しい退縮が見られた。これらの結果は神経由来 VEGF が、成熟血管内皮に発現する VEGFR2 のシグナルを介し、血管の安定性維持を正に制御しているという事実を示唆するものであり、VEGF 阻害剤による健常血管に対するダメージの根拠となるものである。

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 5 件)

全て査読有。*corresponding author

1. Yoshikawa Y, Yamada T, Tai-Nagara I, Okabe K, Kitagawa Y, Ema M and *Kubota Y. Developmental regression of hyaloid vasculature is triggered by neurons. *J Exp Med* 213(7):1175-83, 2016. pubmed/27325890
2. Kim K, Kim IK, Yang JM, Lee E, Koh BI, Song S, Park J, Lee S, Choi C, Kim JW, Kubota Y, Koh GY and *Kim I. SoxF Transcription Factors Are Positive Feedback Regulators of VEGF Signaling. *Circ Res* 119(7):839-52, 2016. pubmed/27528602
3. Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T and *Takubo K. p38 α activates purine metabolism to initiate hematopoietic

- stem/progenitor cell cycling. *Cell Stem Cell* 19(2):192-204, 2016. pubmed/27345838
- Ozaki T, *Muramatsu R, Sasai M, Yamamoto M, **Kubota Y**, Fujinaka T, Yoshimine T and *Yamashita T. The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning. *Sci Rep* 6:25893. doi: 10.1038/srep25893, 2016. pubmed/27173846
 - Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, **Kubota Y** and *Alitalo K. VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(3): 761-766, 2015. pubmed/25561555

〔学会発表〕(計 14 件)

- Kubota Y**. Cell-cell interactions for retinal vascular development. *The 14th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology*. 8 December, 2016, 長崎ブリックホール(長崎県長崎市) 2016年12月8日)(Invited speaker).
- 久保田義顕**: 共焦点顕微鏡による血管新生の形態学的解析 **第39回日本分子生物学会年会ランチョンセミナー**(パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年12月2日)(招待講演).
- 久保田義顕**: 血管ネットワーク多様性の獲得原理 **昭和大学 学士会 後援セミナー**(昭和大学歯学部(東京都品川区) 2016年11月30日)(招待講演).
- Kubota Y**. Diversity of organ-specific vascular patterning. *27th CDB Meeting "Body surface tactics"*. (RIKEN CDB(兵庫県神戸市)2016年11月14日)(Invited speaker).
- Kubota Y**. Neuro-vascular crosstalk in the developing retina. *19th International Vascular Biology Meeting*. 1 November, 2016, Sheraton Boston Hotel, Boston, USA (Invited speaker).
- 久保田義顕**: 組織特異的血管パターンニングの獲得機構 **第2回六甲医学研究会**(六甲山ホテル(兵庫県神戸市) 2016年10月30-31日)(招待講演).
- 久保田義顕**: Neuro-vascular crosstalk in the central nervous system **第89回日本生化学会大会**(東北大学川内北キャンパス、(宮城県仙台市) 2016年9月25日)(招待講演).
- 久保田義顕**: 胎盤迷路の構築には FLRT2/UNC5B シグナルによる血管内皮細胞間反発作用が必須である **秋期特別日本血管生物医学学会シンポジウム**(東京医科歯科大学(東京都文京区) 2016年9月10日)(招待講演).
- 久保田義顕**: 血管新生におけるミクログリアの役割 **第44回日本臨床免疫学会総会**(京王プラザホテル(東京都新宿区) 2016年9月8日)(招待講演).
- Kubota Y**. Organ-specific vascular morphogenesis. *Summer Programs 2016: Stem Cell Research and Regenerative Medicine*. (慶應義塾大学医学部(東京都新宿区) 2016年8月18日)(Invited speaker).
- 久保田義顕**: 発生期・腫瘍血管新生におけるマクロファージの役割 **第37回炎症再生医学会シンポジウム「炎症と血管新生」**(京都市みやこめっせ(京都府京都市) 2016年6月16-17日)(招待講演).
- 久保田義顕**: Neuro-vascular crosstalk in the retina **第68回細胞生物学会**(京都テルサ(京都府京都市) 2016年6月15-17日)(招待講演).
- 久保田義顕**: 中枢神経系における血管パターンニングの制御機構 **第2回軟骨・椎間板研究会**(慶應義塾大学医学部(東京都新宿区) 2016年4月19日)(招待講演).
- 久保田義顕**: 網膜血管パターンニングの制御機構 **第121回日本解剖学会総会シンポジウム**(ビッグパレット福島(福島県福島市) 2016年3月28-30日)(招待講演).

〔図書〕(計 2 件)

- 久保田義顕**: <書籍『細胞工学』特集企画書. **実験医学増刊号「抗腫瘍血管新生療法の新展開」**学研メディカル秀潤社35(1), 10-12, 2016.
- 久保田義顕**: 中枢神経系血管パターンニングの制御機構. **糖尿病学 2016 診断と治療**社 41-46, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.keiovascular.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久保田 義顕 (KUBOTA YOSHIAKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50348687