

学位論文題名

細胞マトリックス・テネイシンXの血管新生に関する研究

Studies on the function of extracellular matrix tenascin-X involved
in the endothelial cell proliferation

学位論文内容の要旨

新規の細胞外マトリックス糖タンパク質であるテネイシンX(TNX)は、全長約70kbの遺伝子にコードされ、分子量約450kDaの巨大な多機能型タンパク質である。TNXはドメイン構造を持ち、N末端側から、ヘプタッドリピート、EGF様リピート、フィブロネクチンタイプIII(FNIII)リピート、フィブリノーゲン様ドメインより構成されている。TNXはほとんどの組織においてmRNAの発現が見られ、特に骨格筋や心臓、真皮、精巣、神経、消化管で高く発現が見られる。また、Burchらにより、12日目のラット胎仔期の心臓において心外膜でTNXの発現が見られ、その後心外膜下において形成中の血管周囲に発現が見られる事が報告されており、心外膜細胞の冠状毛細血管への分化過程にTNXが関与していることが示唆されている。

TNXの生体内機能を明らかにするために、酵母two-hybrid法によりTNXと相互作用する分子の探索を行なった。baitにはTNXのFNIII領域(M13, 14, 23, 24, 25)(TNX/FNIII13-25)を用い、HeLa cDNAライブラリーの 6×10^6 クローンをスクリーニングした。その結果、ポジティブクローンが219クローン得られ、19種類が同定された。その中に細胞外で存在する分子として知られているVEGF-Bが得られた。

血管内皮増殖因子VEGF-Bは、VEGFファミリーのメンバーであり血管新生を調節する。分子量約20kDaのサブユニットがホモ二量体を形成し、チロシンキナーゼ型リセプターVEGFR-1/Flt-1と結合する。オルタナティブスプライシングにより186aaと167aaの二つのフォームが存在し、VEGF-B₁₈₆は培養細胞での発現時、培地中に分泌されるが、一方のVEGF-B₁₆₇はヘパリン結合能を持ち、細胞表面に結合する。VEGF-Bの発現は様々な組織において見られ、特に心臓や骨格筋において高い発現がみられる。

TNXが血管周囲で発現し、血管形成に関与している可能性を考慮し、VEGF-Bに注目し更なる解析を行った。

まず、TNXの様々な欠失変換体を用いて、酵母two-hybrid法によりTNXのVEGF-B₁₈₆結合部位について解析した。その結果、スクリーニングに用いたFNIII13-25領域特異的にVEGF-B₁₈₆はTNXと結合することが明らかとなった。

さらに、VEGF-B₁₈₆の欠失変換体を用い、酵母two-hybrid法によりVEGF-B₁₈₆上のTNX結合部位について解析した結果、VEGF-B₁₈₆はN末115aa領域でTNXと結合することが明らかとなった。また、この領域を共有するスプライスバリエントであるVEGF-B₁₆₇においてもTNXとの結合が確認された。

次に、TNXとVEGF-B₁₈₆との結合を検証するために *in vitro* での結合実験を行った。大腸菌で発現させ精製した、GST-VEGF-B融合タンパク質とTNX/FNIII₁₃₋₂₅共存下でグルタチオンセファロース4Bを加え、GST融合タンパク質を回収した。VEGF-B存在下でTNXが検出され、TNXとVEGF-B₁₈₆の結合が*in vitro*で確認された。さらに、VEGF-B₁₈₆の欠失変換体を用いてTNXとの結合を解析した結果、*in vitro*においてVEGF-B₁₈₆のN末115aa領域でTNXが結合することが確認された。また、スプライシングバリエーションであるVEGF-B₁₆₇もTNXと結合することが確認された。

また、動物細胞で発現したタンパク質を用いてTNXとVEGF-B₁₈₆との結合を検証した。293T細胞でVEGF-B₁₈₆とFLAG-tag付きTNX/FNIII₁₃₋₂₅やTNX全長を強制発現させ、培養上清を回収し、抗FLAG抗体でTNX/FNIII₁₃₋₂₅やTNX全長を免疫沈降した。TNX/FNIII₁₃₋₂₅やTNX全長で共にVEGF-B₁₈₆が検出され、結合することが確認された。

さらに、TNXと他のVEGFファミリーメンバーとの相互作用について検討した。293T細胞でVEGF-A₁₆₄とFLAG-tagの付いたTNXを強制発現させ、培養上清を回収し、抗FLAG抗体でTNXを免疫沈降した。その結果TNXとVEGF-A₁₆₄との結合が明らかとなった。

VEGF-B上のVEGFR-1の結合部位は、先で同定したTNXが結合するVEGF-BのN末115aa領域内に存在する。このことは、TNXとVEGFR-1が互いに競合関係にある可能性が推測される。

そこで、293T細胞でVEGF-BとTNX, VEGFR-1をそれぞれ強制発現させ、培養上清を回収し、抗FLAG抗体でVEGFR-1を免疫沈降した。VEGF-BとTNXには同じHA-tagをつけ、抗HA抗体でVEGF-BとTNXが同時に検出できるようにした。その結果、TNXとVEGF-Bのバンドが同時に検出された。これにより、VEGF-BがTNXと結合した状態でVEGFR-1と結合できることが明らかとなった。

TNXがVEGF-Bの細胞に対する活性にどのような影響を与えるのかを解析するために、ウシ血管内皮細胞初代培養株であるHH細胞にTNX, VEGF-Bを作用させ、トリチウム標識されたチミジンの取り込み実験を行ない、増殖活性を測定した。293T細胞でVEGF-BとTNXを発現させ、その培養上清を48時間飢餓状態にしたHH細胞の培養上清と置換し、16時間後にトリチウム標識されたチミジンを加え、30分後にその取り込みを測定した。その結果、TNX, VEGF-B共存下ではVEGF-Bのみに比べ、約4.4倍血管内皮細胞のDNA合成が促進された。このことにより、TNXの存在によりVEGF-Bの機能が増強されることが明らかとなった。

TNXがVEGF-BのVEGFR-1活性化に対して影響を及ぼしている可能性を考え、VEGFR-1のリン酸化について検討した。293T細胞でVEGF-BとTNXを発現させ、その培養上清を48時間飢餓状態にしたHH細胞の培養上清と置換し、5分後に細胞を回収した。抗VEGFR-1抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体によりリン酸化活性を検出した。その結果、TNX存在下ではVEGF-BによるVEGFR-1のリン酸化が増強されることが明らかとなった。このことは、TNXがVEGF-BとVEGFR-1の三者で結合することにより、VEGF-BとVEGFR-1の相互作用を促進し、VEGFR-1を活性化することが推察される。

最近、当研究室においてTNXのノックアウトマウスが作成された。TNX(-/-)マウスは正常に発生し生長するが、癌の浸潤転移が促進されることが明らかとなっている(論文投稿中)。

TNXが血管新生に関与する可能性が推測されたので、TNX, VEGF-B共に発現の高い心臓に着目し、TNXの有無、また各増殖因子の効果による初期胚心臓からの細胞の移動・増殖への影響を調べるために、TNX(+/+), TNX(-/-)マウスを用いて胎仔期9.5日のマウス初期胚(E9.5)の心臓の培養を試みた。心臓をコラーゲンゲル上

に置き、DMEM/HAM(1:1)血清不含の条件で培養した。さらに、血管新生に関与するVEGF-B186 (100ng/ml), VEGF-A165 (100ng/ml), bFGF (50ng/ml)を添加し、5日間培養を行ない細胞の移動・増殖度をTNX(+/+), TNX(-/-)マウスで比較した。その結果、VEGF-A添加時に、TNX(-/-)胚に比べTNX(+/)胚で、より細胞の移動・増殖が促進されていることが明らかとなった。このことは、TNXが血管新生時においてVEGF-A及びBの効果を増強する機能を持つことが強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助 教 授 松 本 健 一
副 査 助 教 授 松 岡 一 郎

学 位 論 文 題 名

細胞マトリックス・テネイシンXの血管新生に関する研究

Studies on the function of extracellular matrix tenascin-X involved
in the endothelial cell proliferation

細胞外マトリックスは多細胞生物にとって、細胞同士をつなぎ合わせる静的な組織構築支持体としてのみならず、発生や分化の誘導に深く関わっていることが明らかとなってきた。細胞間や細胞-マトリックス間の細胞生物学的研究により、コラーゲンやフィブロネクチン、ラミニン、テネイシン（テネイシンC、TNC）などの多くの多機能型細胞外マトリックスが明らかにされた。コラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンは生体のいたるところに偏在すると言っても過言ではないが、それに対しTNCは癌巣周辺間質や初期発生増殖中の上皮周辺の間質に時期特異的に発現する。このような発現パターンより、TNCは上皮-間質相互作用を司る重要な細胞外マトリックスとして注目を浴びてきた。最近になり当研究において、TNCと構造上類似しているテネイシンX（TNX）が同定されテネイシンファミリーが明らかとなった。これまで、TNXの生体内での発現パターンはよく解析されていたが、直接TNXの機能を明らかにする研究はなされていなかった。

本研究では、TNXの生体内機能を明らかにする目的で、TNXに結合する分子の探索を酵母two-hybrid法により行なった。その結果細胞外分泌タンパク質である血管内皮増殖因子VEGF-Bを同定した。VEGF-Bは、VEGFファミリーのメンバーであり、チロシンキナーゼ型レセプターVEGFR-1/Flt-1と結合する。VEGF-Bの発現は様々な組織において見られるが特に心臓や骨格筋において高い発現がみられ、これはTNXの発現パターンと一致する。次に、TNXの

様々な欠失変換体を用いて、酵母two-hybrid法によりTNXのVEGF-B結合部位について検討した。その結果、スクリーニングに用いたFNIII₁₃₋₂₅領域特異的にVEGF-BはTNXと結合することが明らかとなった。次に、VEGF-Bの欠失変換体を用い、VEGF-B上のTNX結合部位について解析した結果、VEGF-BはN末側115aa領域でTNXと結合することが明らかとなった。また*in vitro* pull-down アッセイ、共免疫沈降法においても、この領域でのTNXとVEGF-Bの結合は確認された。同様に、TNXと他のVEGFファミリーメンバーとの相互作用について検討した結果、TNXとVEGF-Aとの結合が明らかとなった。

さらに、TNXがVEGF-Bの動物細胞に対する活性にどのような影響を与えるのかを調べるために、ウシ血管内皮初代培養細胞であるHH細胞にTNX、VEGF-Bを作用させ、³H標識したチミジンの取り込み実験を行ない、増殖活性を測定した。その結果、TNX、VEGF-B共存下ではVEGF-Bのみに比べ、約4.4倍血管内皮細胞のDNA合成が促進した。このことより、TNXの存在によりVEGF-Bの機能が增強されることが明らかとなった。さらに、TNX、VEGF-B共存下でのHH細胞に発現しているVEGFR-1のリン酸化活性を解析した結果、TNX存在下でVEGF-BによりVEGFR-1のリン酸化が增強されることが明らかとなった。次に、より*in vivo*に近い系として、TNXの有無、各増殖因子の効果による初期胚心臓からの細胞の移動、増殖を調べた。TNX(+/+),TNX(-/-)マウスを用いて胎仔期9.5日初期胚心臓を取り出し、VEGF-A、VEGF-Bを添加し、コラーゲンゲル上で培養を行った。培養5日後に、細胞の移動、増殖度をTNX(+/+), TNX(-/-)マウスで比較したところ、VEGF-A、-B添加時においてTNX(-/-)胚に比べTNX(+/+)胚で、より細胞の移動、増殖が促進されることが明らかとなった。これらの結果は、TNXは血管形成時においてVEGF-A及び-Bの効果を増強する機能を持つことを示唆する。

本学位論文に記載されている上記の内容は、細胞外マトリックス分野の進展、ひいては血管形成促進薬、血管形成阻害薬の基礎となる研究であり、博士（薬学）の学位を授与するに値する内容であると判断される。