

39. VEGFR2 を基軸とした臓器間ネットワークの解明

久保田 義顕

*慶應義塾大学 医学部 機能形態学研究室

Key words : VEGF, 血管新生, VEGFR2, 神経, 網膜

緒言

生体内のあらゆる組織はその発生過程において、動脈・静脈・毛細血管からなる血管ネットワークがくまなく張り巡らされる。これは組織に酸素・栄養を供給し、その恒常性を維持するために必須の機構である。この組織酸素供給に最適な血管のパターニングを規定するメカニズムは発生期血管新生だけでなく、血管新生がその進行に深くかかわるがん、糖尿病性網膜症、リウマチ、炎症性疾患など、いわゆる血管新生病の病態においても重要である。この血管新生に最も重要な役割を果たすのが、1983年、Harold Dvoracらによってクローニングされた血管内皮成長因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)¹⁾である。VEGFシグナルの血管発生における重要性は、VEGFのノックアウトマウスがホモ変異体で胎生8.5日、ヘテロ変異体ですら胎生11.5日前後で血管発生異常により致死であることから明らかである^{2,3)}。このVEGFのメインリセプターであるVEGFR2のノックアウトマウスはVEGFのノックアウトマウス同様、血管発生が殆ど進行せず、胎生8.5日前後で致死となる⁴⁾。VEGFR2は発生期から成体にいたるまで、基本的に血管内皮細胞およびその前駆細胞に特異的に発現することが、レポーターマウスなどの解析により知られている⁴⁾。ごく最近、VEGFR2には可溶性アイソフォーム (sVEGFR2) が存在することが報告されたもの⁵⁾、生体内では膜型アイソフォーム (mbVEGFR2) が優位であり、血管内皮細胞に発現するmbVEGFR2を介する細胞内シグナル伝達により、その*in vivo*の機能が説明されている。これらの背景の中、血管内皮細胞以外におけるVEGFR2の発現や機能に関しては知られておらず、またsVEGFR2の生体における意義も殆どわかっていない。本研究は、このVEGFR2のシグナルに焦点を当て、個体全体から見た広い視点での恒常性維持におけるその役割を明らかにすべく行った。特に、中枢神経系の一部である網膜の神経に発現するVEGFR2の役割につき、発生期眼球の視機能獲得におけるその重要性において精力的に解析を行った。

方法

まず、網膜神経においてVEGFR2を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Pax6aCre⁺Vegfr2^{flox/flox}) を作製し、このマウスの眼球の特徴を形態学的に徹底的に解析した。その後、その表現型のメカニズムとして、sVEGFR2のみを欠損したマウス、さらにはVEGFR2とともにリガンドであるVEGFも網膜神経において欠損するマウス、網膜神経においてVEGFのエンドサイトーシスが起こらない変異マウスを作製し、同様に形態学的解析を行った。

結果および考察

網膜神経においてVEGFR2を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Pax6aCre⁺Vegfr2^{flox/flox}) の網膜血管を解析したところ、早期に網膜深層に血管が陥入し (図1)、生後一週間の時点でdeep plexusが形成され、その後adultにおいても、網膜深層における血管密度が過剰になっていることを見出した。つまり、網膜表面上を二次的に成長するという、特徴的な血管成長様式からみて、神経方向へのいわゆる『異所性血管新生』が見られた。

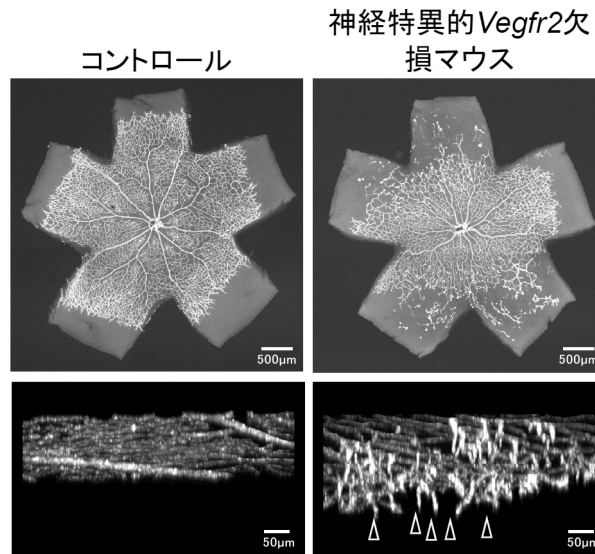


図1. 神経特異的に VEGFR2 を欠損させると異所性血管新生がおこる

生後6日目の網膜ホールマウント CD31 免疫染色像。神経特異的 *Vegfr2* 欠損マウスでは血管が垂直に深部の神経の方向へ伸びている (矢頭)。(文献6より改変し転載)

一方、 $Pax6aCre^{+}Vegfr2^{flx/flx}$ において、神経網膜細胞の増殖・生存・分化に異常は無く、VEGFR2 の神経保護作用に異常をきたしたことによる網膜構造の破綻がこの異所性血管新生の原因ではないことが推測された。VEGFR2 には通常の膜型タンパク (mbVEGFR2) と、splicing variant で exon14 以降を欠失する soluble *Vegfr2* (sVEGFR2) が存在する⁵⁾。そこで、神経網膜に発現する sVEGFR2 が、リガンドの VEGF をトラップすることで、局所的に血管内皮細胞の mbVEGFR2 と結合する VEGF タンパクの量を減少させ、血管侵入の抑制因子として働いているのではないかと考えた。これを検証すべく、VEGFR2 のうち、可溶型アイソフォームを splicing で生じさせないようなノックインマウスを作製し、同様に解析を行った。その結果、この sVEGFR2 欠損マウスにおいては $Pax6aCre^{+}Vegfr2^{flx/flx}$ のような異所性の血管新生は全く見られなかった。その一方、網膜神経において、VEGF のエンドサイトーシスが起らないマウスを作製したところ、同様の異所性血管新生が見られた。さらには、VEGFR2 とともに、VEGF をも網膜神経において欠損させたマウスを作製したところ、この異所性血管新生は見られなかった。これらの結果は、神経は通常、VEGFR2 を介して旺盛に VEGF を取り込み・消化しており、血管の進入を排除するという、新たな「神経-血管連関」の実体を明らかにするとともに、転写や翻訳後調節、細胞外マトリックスとの会合などとは独立した、全く新しい VEGF タンパクの局在調節機構を示している⁶⁾。

この VEGF 取り込みによる VEGF タンパクの局所濃度勾配形成というプロセスが、成体にとってどのような利点があるかについては、昨年度のわれわれの論文⁶⁾ においては明らかではなかった。ごく最近、前述の神経特異的 VEGFR2 ノックアウトマウスでは、胎生期網膜循環系である硝子体血管が、出生後もなお残存するという表現型を見出した。これは、新生仔期に一過性に神経に発現する VEGFR2 が、成獣型の血管ネットワークへの移行を負に制御するとともに、硝子体腔の VEGF タンパクの量を調節することで、胎仔型血管の退縮を正に制御しているという、いわゆる「血管発生ギアチェンジ因子」であることを示唆している (図2)⁷⁾。これらの結果は、もともと血管新生に不可欠であるとして知られてきた VEGFR2 が、網膜神経においては VEGF を希釈することで、眼球の形態形成を司るという、VEGFR2 を基軸とした時空間的な組織間ネットワークの一端を解明したと解釈できると考えられる。

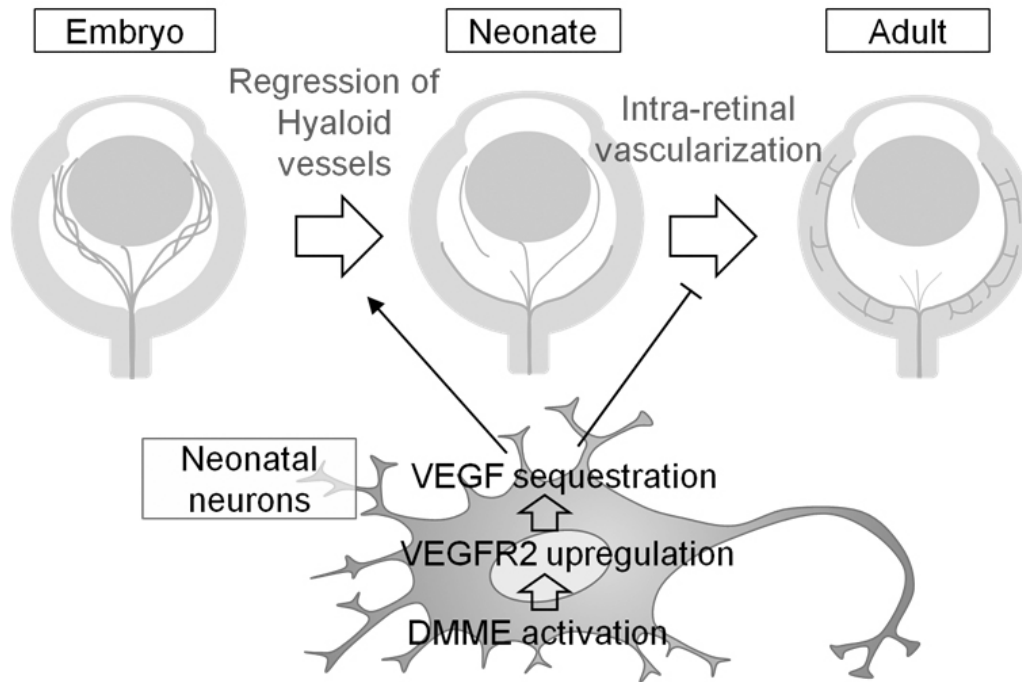


図2. VEGFR2による眼球血管系の段階的制御

新生仔期に一過性に神経に発現する VEGFR2 が、成獣型の血管ネットワークへの移行を負に制御するとともに、硝子体腔の VEGF タンパクの量を調節することで、胎仔型血管の退縮を正に制御している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部の岡部圭介および吉川祐輔である。本稿を終えるにあたり、本研究に対し、多大なる御支援をいただきました上原記念生命科学財団には心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983-5. PMID: 6823562.
- 2) Ferrara NL, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):439-42. PMID: 8602242.
- 3) Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoec A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):435-9. PMID: 8602241.
- 4) Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):62-6. PMID: 7596435.
- 5) Albuquerque RJ1, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ, Yamada K, Kaneko H, Green MG, Chappell J, Wilting J, Weich HA, Yamagami S, Amano S, Mizuki N, Alexander JS, Peterson ML, Brekken RA, Hirashima M, Capoor S, Usui T, Ambati BK, Ambati J. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1023-30. doi: 10.1038/nm.2018. Epub 2009 Aug 9. PMID: 19668192.
- 6) Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukouyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M, Kubota Y. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):584-96. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.025. PMID: 25417109.

- 7) 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. PMID: 27325890. DOI: 10.1084/jem.20151966.