

平成 14 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

ニューロピリン-1 を介する血管内皮増殖因子
誘導性網膜血管新生の新規分子機構

王 英泰

京都大学大学院医学研究科視覚病態学教室

要 約

目的：血管内皮増殖因子(VEGF)は網膜血管新生における最重要血管新生因子であるが、近年その受容体として新たにニューロピリン(NRP)ファミリーが発見された。血管内皮細胞では NRP-1 は VEGF₁₆₅アイソフォーム特異的受容体として機能し NRP-2 よりも優位に発現するが、その病理的血管新生局面における役割についてはまだよく解明されていないため、我々は網膜血管新生において検討を試みた。

結果：培養ウシ網膜血管内皮細胞(BREC)において、VEGF が NRP-1 を選択的に発現増強させることを見出した。この反応は転写の亢進によるもので、VEGF 受容体 2 を介するものであった。NRP-1 機能阻害抗体

により VEGF による BREC の増殖作用が抑制され、マウスの網膜血管新生モデルにおいては網膜血管新生が抑制されることを解明した。

結論：以上から、NRP-1 は VEGF 誘導性網膜血管新生において重要な役割を果たしており、有望な治療ターゲットになり得ることが推定された。(日眼会誌 107 : 651—656, 2003)

キーワード：網膜血管新生, 血管内皮増殖因子, ニューロピリン, 血管内皮細胞, 血管内皮増殖因子受容体

A Review

A Novel Molecular Mechanism Involving Neuropilin-1 for
Vascular Endothelial Growth Factor-induced Retinal Angiogenesis

Hideyasu Oh

Department of Ophthalmology & Visual Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Abstract

Purpose : The Neuropilin (NRP) family is a novel receptor family that has been found to bind to a key molecule in angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF). In vascular endothelial cells, NRP-1 functions as an isoform-specific receptor for VEGF₁₆₅ and has predominant expression compared to NRP-2. Since little is known about its role in pathologic angiogenesis, we studied it in retinal angiogenesis.

Results : In cultured bovine retinal endothelial cells (BREC), VEGF selectively up-regulates NRP-1 expression. This response is mediated by VEGF re-

ceptor-2 (VEGFR-2) and transcriptional activation. NRP-1 functional blocking antibody inhibited VEGF-induced mitogenesis of BRECs *in vitro*. Moreover, inhibition of NRP-1 in a murine model of angioproliferative retinopathy reduced angiogenic response in the retina.

Conclusion : Our results suggest that NRP-1 plays a critical role in VEGF-induced retinal angiogenesis and thus could be a viable therapeutic target for inhibition of retinal neovascularization. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 651—656, 2003)

別刷請求先：606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学大学院医学研究科視覚病態学教室 王 英泰
(平成 15 年 4 月 17 日受付, 平成 15 年 7 月 2 日改訂受理)

Reprint requests to : Hideyasu Oh, M. D. Department of Ophthalmology & Visual Sciences, Graduate School of Medical Science, Kyoto University, 54 Shogoin-Kawaramachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
(Received April 17, 2003 and accepted in revised form July 2, 2003)

Key words : Retinal neovascularization, Vascular endothelial growth factor, Neuropilin,

Vascular endothelial cells, Vascular endothelial growth factor receptor

I 緒 言

網膜血管新生において血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)は、その血管内皮細胞に対する選択性の高い増殖作用から中心的な血管新生因子であると目されている¹⁾。VEGF の受容体には以前から血管管腔形成に重要な VEGF receptor-1²⁾(VEGFR-1)と細胞増殖で重要な VEGFR 2³⁾が知られていたが、近年新たにニューロピリン(neuropilin, NRP)受容体ファミリーが VEGF アイソフォーム特異的受容体として機能することが報告⁴⁾された。NRP ファミリーはもともと中枢神経細胞において発見された受容体群でセマフォリン(semaphorin, SM)ファミリーをリガンドとし、NRP-1 は SM 3A, NRP-2 は SM 3C と SM 3F のそれぞれの反発性軸索ガイダンスに主として関わっている⁵⁻⁷⁾。一方、血管内皮細胞において NRP-1 は VEGFR-2 の共受容体として機能し、VEGF₁₆₅アイソフォームとのみ結合する(表 1)。NRP-2 は VEGF₁₄₅と VEGF₁₆₅の両アイソフォームに結合することが可能で、VEGFR-1 と共受容体様の複合体を形成するが、その役割については未だ解明されていない⁸⁾。とりわけ、NRP-1 は生理的・病理的状況で最も重要な VEGF₁₆₅の VEGFR-2 への結合性を 6 倍近く増強することから⁴⁾、我々は網膜血管新生局面におけるその発現制御と、選択的 NRP-1 機能阻害の網膜血管新生における抑制効果について検討した。

II NRP の網膜血管新生局面における発現動態 — *in vitro* における解析 —

我々は NRP の発現を制御する分子として、まず血管新生で中心的な役割を果たす VEGF 自身についてその可能性を検討した。培養ウシ網膜血管内皮細胞(bovine retinal endothelial cell, BREC)を用いて Northern blot 法で mRNA の発現解析を行った結果、VEGF 刺激により NRP-1 の発現が時間・容量依存性に増加し、最大で 3.8 倍発現増強することを見出した(図 1)。一方 NRP-2 は発現量が少なく、VEGF による刺激効果もみられなかった。BREC は微小血管内皮細胞に属するので、大血管ではどうかということを検討するため、ウシ大動脈血管内皮細胞(bovine aortic endothelial cell, BAEC)を用いて同様に VEGF の刺激効果を試した。BAEC では効果は BREC に比較して弱いものの、やはり 2.1 倍の NRP-1 発現増強があった。逆に、NRP-2 は発現そのものがみられなかった。また、NRP-1 のリガンドである SM 3A については BREC, BAEC ともにその mRNA 発現は検出されなかった。したがって、内皮細胞においては NRP-1 の結合因子としてはあくま

表 1 VEGF 受容体と NRP ファミリー

受容体	結合する VEGF アイソフォーム	共受容体の相手
VEGFR 1	全アイソフォーム	
VEGFR 2	全アイソフォーム	
NRP-1	VEGF ₁₆₅	VEGFR 2
NRP-2	VEGF ₁₄₅ , VEGF ₁₆₅	VEGFR 1

VEGF: 血管内皮増殖因子 VEGFR: VEGF receptor
NRP: ニューロピリン

で VEGF が中心で、神経系における NRP-1 のリガンドである SM 3A を介したオートクライン・ループが機能している可能性は低いと推察される。

次に、VEGF による NRP-1 の mRNA 発現増強のメカニズムを解析するため、転写阻害剤であるアクチノマイシン D を添加し、NRP-1 の mRNA の半減期について検討した。その結果、アクチノマイシン D の有無は NRP-1 の半減期に有意な影響を及ぼさなかったため、NRP-1 の発現増強は VEGF 刺激による半減期の増長効果ではないことが判明した(図 2)。逆に、核 run-on assay により転写速度を解析した結果、VEGF により NRP-1 の転写が 5.3 倍亢進していた。以上の両検討により、VEGF 刺激による NRP-1 mRNA 発現増強の分子メカニズムとして転写の亢進が主体であることを明らかにした。

血管内皮細胞に発現される VEGFR には VEGFR-1 (flt 1) と VEGFR-2 (kdr/flk 1) が、NRP ファミリーが血管内皮細胞で機能するという事実が発見される前から報告されている。どちらの受容体が NRP-1 の発現増強に関与するかということを検討するため、我々はまず BREC において VEGFR-2 の選択的阻害剤である SU-1498 を用いて VEGF 刺激下で NRP-1 の発現を解析した。その結果、SU-1498 がほぼ完全に NRP-1 発現増強効果を抑制することを見出した。BREC では VEGFR-1 の発現が VEGFR-2 に比べて圧倒的に少ないため、VEGFR-1 の関与を検討するに際し両受容体とも発現されているヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical endothelial cell, HUVEC)を用いて解析した。VEGFR-1 選択的リガンドである胎盤増殖因子を用いて刺激した結果、NRP-1 の発現には変化がみられなかったことから、VEGF による NRP-1 の発現増強は VEGFR-2 を介するものであることが判明した。さらに、NRP-1 自身が VEGF の効果を伝達するという可能性を除外するため、VEGF と結合できる受容体のうち NRP-1 のみを選択的に発現する乳癌細胞株 MDA-MB 231 細胞株を用いて VEGF の刺激効果を検討したが、やはり NRP-1 の発現には変化がなかった。VEGFR-2 の下流の主要なシグナル分子

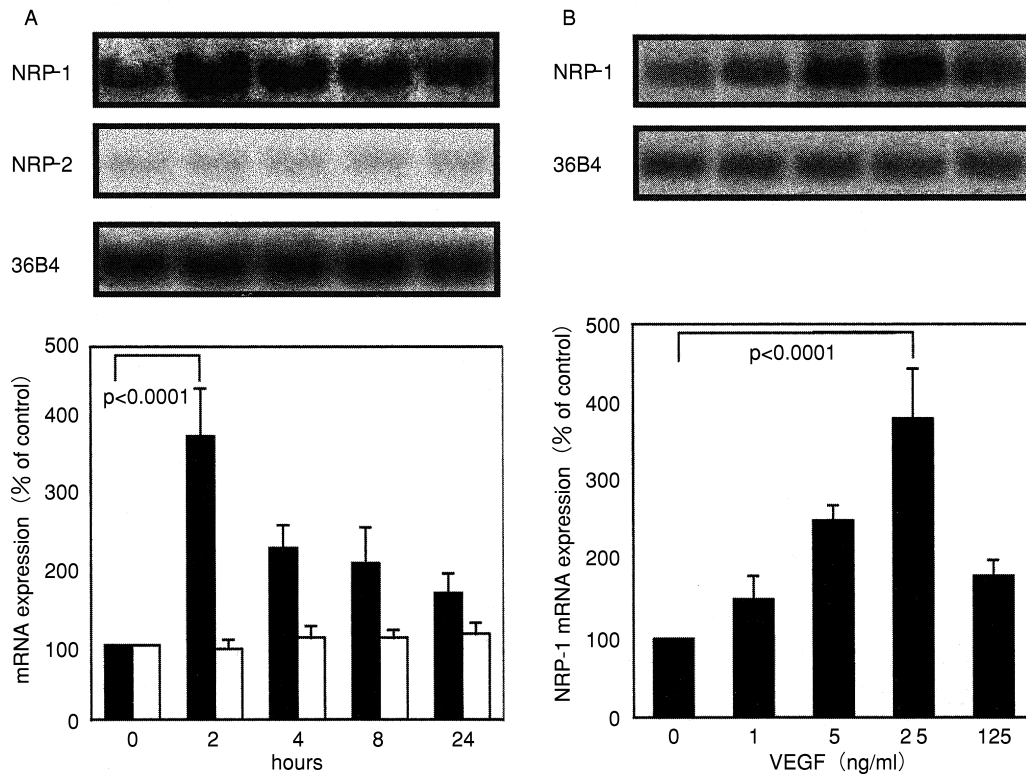


図 1 血管内皮増殖因子(VEGF)刺激によるニューロピリン(NRP)ファミリーの mRNA 発現制御。

A : VEGF 刺激による時間依存性 NRP-1 の選択的発現増強。グラフの値は NRP の解析値を対照遺伝子である 36 B 4 の値で標準化している。刺激後 2 時間で最大 3.8 倍の発現増加がみられた。黒棒 : NRP-1, 白棒 : NRP-2。

B : VEGF 刺激による NRP-1 の容量依存的発現増強。VEGF 濃度 (25 ng/ml) で最大の効果がみられた。

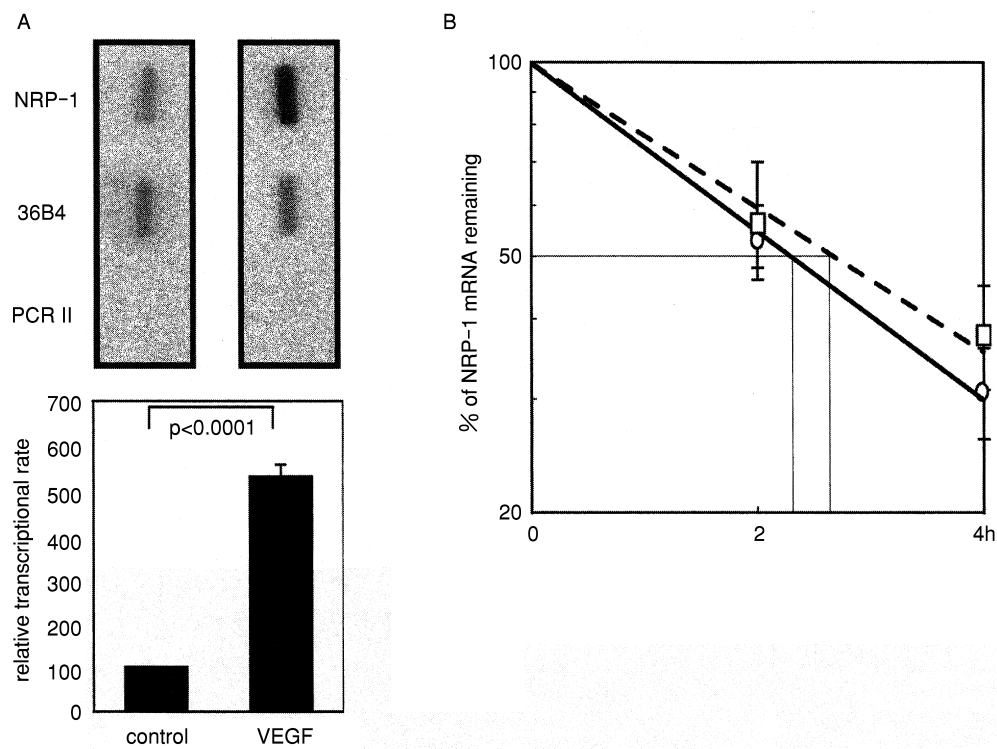


図 2 VEGF 刺激による NRP-1 発現増強の分子メカニズム。

A : VEGF 刺激下での核 run-on assay。約 5.3 倍の転写亢進がみられた。

B : 転写阻害剤による NRP-1 mRNA の半減期の検討。VEGF 刺激による有意な NRP-1 mRNA 安定効果はみられなかった。○ : 対照群, □ : VEGF 刺激群

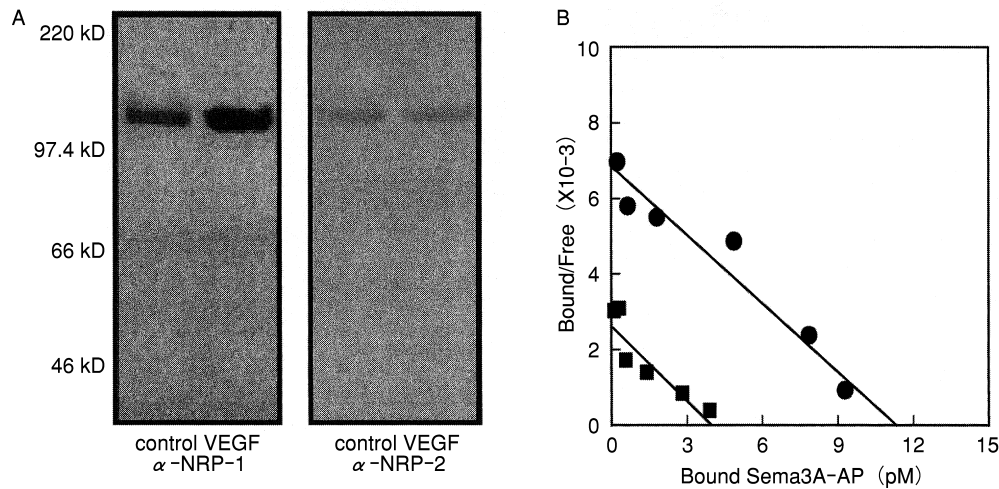


図3 VEGF刺激によるNRP蛋白発現制御。

A: VEGF刺激24時間後のNRP蛋白発現。選択的NRP-1発現増強がみられた。

B: セマフォリン(SM)3Aによる細胞表面binding assay(Scatchard解析)。細胞表面のNRP-1数が約2.8倍に増加し、結合親和性には変化がなかった。■: 対照群, ●: VEGF刺激群

としては、VEGFR-2自身がチロシンキナーゼであること、その他にphospholipase- γ (PLC- γ)、protein kinase C(PKC)、phosphatidylinositol 3-kinase(PI 3K)、mitogen-activated protein kinase(MAPK)などが報告されている。それぞれの選択的阻害剤を用いて検討した結果、チロシンキナーゼ阻害剤とMAPK阻害剤ではほぼ100%、PLC- γ 、PKC、PI 3Kの阻害剤ではそれぞれ74、70、80%の、NRP-1発現増強に対する抑制効果がみられた。以上の検討により、VEGFによるNRP-1の発現増強にはVEGFR-2と、その下流のシグナル分子群が実際に関与していることを明らかにした。

次に、我々は以上のmRNAレベルの発現解析をもとに、蛋白質レベルではどうかということについて検討を加えた。まず、NRP-1とNRP-2の蛋白質発現は転写レベルでの発現と同様、VEGFによりNRP-1のみが選択的に発現が増加していた(図3A)。さらに、NRP-1の蛋白質発現の増加が機能的NRP-1受容体の増加として反映されているかどうかを検討するため、アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase, AP)と融合させたSM 3A(SM 3A-AP)を用いて、細胞表面binding assayを行った。SM 3Aを用いたのはVEGFであるとNRP-1のみでなく他のVEGFRにも結合してしまうためである。図3Bのごとく、VEGF刺激によりSM 3Aの結合部位数、すなわち細胞表面にある機能的NRP-1の数は2.8倍へと増加した。一方、NRP-1のSM 3Aへの結合親和性には特に変化がみられなかった。

III NRPの網膜血管新生局面における発現動態—*in vivo*における解析—

*In vitro*でのVEGFによるNRP-1発現増強の解析結果をもとに、我々は次に*in vivo*でNRP-1の発現を解

析するべくマウスの網膜血管新生モデルを用いた⁹⁾。このモデルではSmithらが報告したように、生後7日目(postnatal day 7, P 7)からP 12まで75%の高酸素負荷で網膜血管を退縮させ、その後正常酸素に戻すことにより網膜虚血を惹起し、その結果P 17あたりを中心として硝子体腔に突出する著明な網膜新生血管が生じる。また、このモデルではVEGFが血管新生の主要因子として働くことが明らかになっている¹⁰⁾。そこで、我々は*in situ* mRNA hybridization法を用い、このモデルの網膜組織においてNRP-1 mRNAの発現を解析した結果、図4に示すがごとくP 17の特に網膜新生血管部位において顕著なNRP-1の発現増強を観察した。

IV 網膜血管新生におけるNRP-1抑制の効果

NRP-1の共発現によりVEGF₁₆₅のVEGFR-2への結合親和性が6倍近く増強するが⁴⁾、果たしてそれが血管内皮細胞の生理的機能の面でどのように反映されているのかという点については未だ解明されていなかった。我々はNRP-1選択的機能阻害抗体を用いて、まずBRECの増殖におけるNRP-1抑制の効果を調べた。その結果、NRP-1中和抗体は容量依存的にVEGF₁₆₅の増殖作用を抑制し得ることを解明した。この抑制作用は、VEGF₁₂₁や肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子などによる増殖作用には効果を示さなかった。さらに、抗体投与下でVEGFR-2のリン酸化レベルを検討したところ、実際にVEGF₁₆₅刺激によるリン酸化を選択的に抑制していることを解明した。次に、我々はNRP-1抑制の*in vivo*における効果を検討するため、NRP-1機能阻害抗体をSmithらの網膜血管新生モデルにおいて硝子体注入し、新生血管の数を計測した。その結果、対照抗体注入群やbalanced salt solution(BSS)注入群と比較し、NRP-1

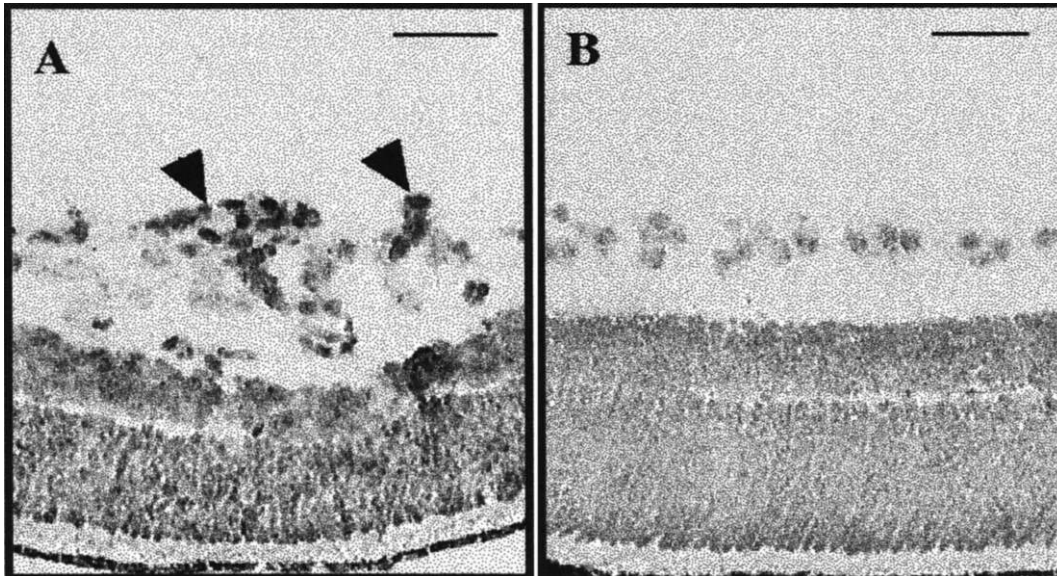


図 4 *In situ hybridization* 法によるマウス網膜血管新生モデルにおける NRP-1 mRNA の発現解析。
 A：生後(P)17の網膜虚血誘導群の硝子体腔へ突出する新生血管(矢じり)において著明な NRP-1 mRNA 発現がみられる。
 B：同じく P 17 の正常群における NRP-1 シグナル。強い発現はみられない。バーは 50 μm

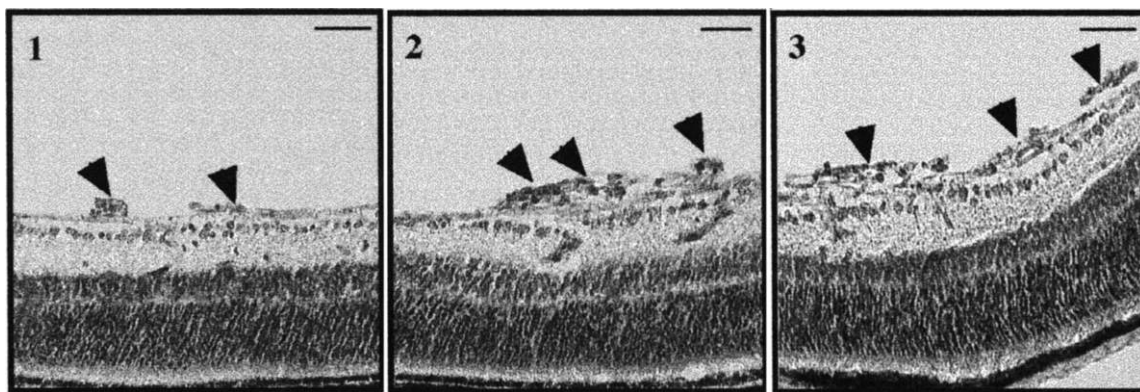


図 5 NRP-1 機能阻害抗体の硝子体注入による網膜血管新生の抑制効果。
 1：NRP-1 機能阻害抗体注入群において著明な網膜血管新生抑制がみられた。矢じり：網膜血管新生。
 2：対照抗体投与群，3：balanced salt solution (BSS) 投与群。バーは 50 μm

機能阻害抗体注入群では網膜新生血管数が約半分の 53% に抑制されるという効果を見出した(図 5)。

V おわりに

虚血性網膜血管新生，とりわけ VEGF 誘導性網膜血管新生において，近年新たに血管内皮細胞で VEGFR として機能することが報告された NRP ファミリーについて，その血管新生局面における発現動態を解明した。さらに，選択的 NRP-1 の発現増強が観察されたことから，その機能阻害の効果を *in vivo* で解析し，網膜血管新生抑制治療のターゲットとなり得ることを明らかにした。VEGF-VEGF 受容体系の完全な抑制は生理的な血管まで破綻をもたらすことが報告¹¹⁾されていることから，血管内皮細胞の生存や増殖などの本質的な生理機能

を左右する VEGFR-2 そのものの抑制ではなく，共受容体である NRP-1 の方への絞ることにより，血管系の劇的な破綻を避けたコンプライアンスの高い網膜血管新生抑制治療が可能となり得るのではないかと考える次第である。

稿を終えるに当たり，受賞講演の機会を与えて下さいました学術奨励賞選考委員各位，第 107 回日本眼科学会総会長の 大島健司教授，座長の西田輝夫教授に心より感謝申し上げます。また，ご指導を頂きました本田孔士教授をはじめ共同研究者の諸先生方に深謝いたします。

本研究内容は Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 : 383-388, 2002. (Copyright 2002 National Academy of Sciences, U. S. A.) に掲載された。

文 献

- 1) **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al** : Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331 : 1480—1487, 1994.
 - 2) **Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML** : Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376 : 66—70, 1995.
 - 3) **Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al** : Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376 : 62—66, 1995.
 - 4) **Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M** : Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92 : 735—745, 1998.
 - 5) **Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD** : Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90 : 753—762, 1997.
 - 6) **Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M** : Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19 : 547—559, 1997.
 - 7) **He Z, Tessier-Lavigne M** : Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* 90 : 739—751, 1997.
 - 8) **Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shibuya M, Neufeld G** : Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem*. 276 : 18688—18694, 2001.
 - 9) **Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al** : Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 101—111, 1994.
 - 10) **Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al** : Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 10457—10461, 1995.
 - 11) **Meeson AP, Argilla M, Ko K, Witte L, Lang RA.** : VEGF deprivation-induced apoptosis is a component of programmed capillary regression. *Development* 126 : 1407—1415, 1999.
-