

Title	Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165.
Sub Title	マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は結合組織成長因(CTGF)を分解することにより血管内皮成長因子(VEGF165)の血管新生活性を再活性化する
Author	橋本, 学爾
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.26-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040302-0026

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165.

(マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は結合組織成長因子 (CTGF) を分解することにより血管内皮成長因子 (VEGF₁₆₅) の血管新生活性を再活性化する)

橋 本 学 爾

内容の要旨

論文審査の要旨

血管内皮成長因子 (VEGF) は強力な血管新生活性を有する成長因子である。すでに我々は VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅ が結合組織成長因子 (CTGF) と結合し、さらに VEGF/CTGF の複合体形成により前記 VEGF の血管新生活性を抑制することを明らかにしてきた (副論文)。本論文ではマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) による活性制御への影響を検討する目的で、VEGF₁₆₅/CTGF 複合体を各種 MMP で消化し、代表的な MMP 消化による活性変化を *in vitro* と *in vivo* で検討した結果を報告する。VEGF₁₆₅/CTGF 複合体を MMP-1、2、3、7、9、13、ADAMTS4、プラスミン、エラスターゼで 37℃、24 時間消化した結果、MMP-1、3、7、13 は CTGF のみを分解したが、プラスミンとエラスターゼは CTGF のみならず VEGF₁₆₅ も分解した。一方、ADAMTS4 は両成長因子とも分解しなかった。CTGF を分解した MMP のうち、MMP-13 の CTGF 活性が最も強力であった。いずれの MMP についても CTGF における切断部位は von Willebrand type C repeat ドメインと Thrombospondin ドメインの間に限局していた。VEGF₁₆₅/CTGF 複合体に対して MMP 消化させた後の CTGF 断片の挙動を検討するため、VEGF₁₆₅ をコートしたプレートに ¹²⁵I 標識した CTGF を添加して複合体を形成させた後、MMP-3 消化を行い、上清に対して CTGF の N 末端、C 末端側を認識する抗体で免疫沈降を行った。その結果、24 時間までに MMP-3 で分解された CTGF 断片は VEGF₁₆₅ からほぼ解離することを明らかにした。VEGF₁₆₅/CTGF 複合体をコラーゲンゲルで培養したウシ大動脈由来血管内皮細胞に添加して 3 日間培養した結果、著しく管腔形成が抑制されたのに対して MMP-1、3、13 で消化した複合体を添加すると管腔形成が VEGF₁₆₅ 単独による活性レベルまで回復した。さらに VEGF₁₆₅/CTGF 複合体、および MMP-3 消化した複合体を含むマトリゲルをマウス皮下に注入し、5 日後に回収して血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor (vWF) 陽性の紡錘状細胞と血管数を測定した。その結果、VEGF₁₆₅/CTGF 複合体存在下で vWF 陽性細胞数と血管数共に減少したが、予め MMP-3 消化した複合体は VEGF₁₆₅ 単独と同レベルの血管新生活性を有していた。以上の結果より、VEGF₁₆₅/CTGF 複合体形成で抑制された VEGF₁₆₅ の血管新生作用は MMP の消化により CTGF 断片が解離することで回復することが明らかとなった。MMP は CTGF の分解により胎児発生、組織の恒常性維持および関節リウマチ等の病態において重要な役割を果たしていることが示唆された。

変形性関節症 (OA) における関節軟骨中に VEGF の発現が亢進していることから同軟骨中に VEGF 抑制因子の存在が推測された。酵母 2-ハイブリッド法を用いたスクリーニングにより結合組織成長因子 (CTGF) が VEGF₁₆₅ と結合し、VEGF の活性を阻害していることが既に示されている。本研究では OA の進行と共に発現誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のプロテアーゼ活性が VEGF₁₆₅/CTGF 複合体に与える影響について検討を行った。その結果、MMP-1、3、7、13 は CTGF を基質として分解し、切断された CTGF 断片は VEGF₁₆₅ から解離することが示された。さらに、血管内皮細胞の管腔形成アッセイとマトリゲルを用いたマウス皮下注入による血管新生アッセイから、MMP 消化によって VEGF₁₆₅ の血管新生活性が回復することを実証した。MMP は CTGF の分解により胎児発生、組織の恒常性維持および関節リウマチ (RA) 等の血管新生を伴う生理的および病的組織において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

審査では、まず血管内皮細胞の管腔形成アッセイでは本当に管腔が形成されているかについて質問がなされた。これに対し、過去の文献を引用し、コラーゲンゲルを重層した本アッセイでは、断面を観察すると管腔が形成されているとの回答がなされた。次いで、CTGF に対する分解活性が強かった MMP-1、3、7、13 の OA 関節軟骨での発現について質問がなされた。これに対し、程度の差はあるもののいずれの MMP も OA や RA 関節軟骨で発現亢進しているとの回答がなされた。管腔形成アッセイにウシ由来の血管内皮細胞を使っている理由を求められた。これに対し、コラーゲンゲルを重層して平面的に細胞培養を行う本方法では、HUVEC などのヒト由来細胞では伸長が起こらないとの回答がなされた。一方、CTGF と MMP による VEGF の活性制御機構の検討にはヒトの検体や動物の OA モデルを用いて検証することが重要であるとコメントされた。さらに VEGF/CTGF 複合体形成が実際に生体内で生じているのか、との質問がなされた。これに対しては、生体内でこの系が働いている証拠はまだ得られていないものの、CTGF が細胞外マトリックス分子に結合しやすいとの知見を得ており、VEGF、CTGF の両者の間にマトリックスが介在することにより複合体形成が起こりやすくなっている可能性があるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点はあるものの、CTGF とプロテアーゼを介した VEGF 活性の制御機構を明らかにしたことは様々な生体機能維持、あるいは OA や RA をはじめとした疾患を理解する上で意義があり、病理学的にも価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 岡田 保典
内科学 池田 康夫 病理学 坂元 亨字
発生・分化生物学 須田 年生
学力確認担当者：北島 政樹、池田 康夫
審査委員長：池田 康夫

試問日：平成16年1月16日