

FGF-2 による階層的血管新生制御メカニズム

米満 吉和^{*,**} 居石 克夫^{*}

要旨: 虚血性疾患への血管新生療法が注目され、すでに臨床での評価段階である。虚血組織救済には組織還流能を持つ機能的血管が必要であり、血管数は治療効果を反映しない。機能的血管新生には、現時点でFGF-2が最も有効であるが、その検討過程で内因性血管新生因子群の多段階誘導が重要であることを明らかにした。われわれはこれを「血管新生因子の階層的発現制御」と呼称し、生体での機能的血管新生システムの全容解明を目指している。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 151-156)

Key words: bFGF/FGF-2, "Functional/physiological" angiogenesis, Recombinant Sendai virus, Gene therapy, Therapeutic angiogenesis

はじめに

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF/FGF-2)は、血管新生因子としての歴史は最も古く、これまでに多くの研究がなされてきた。血管新生において主役をなす細胞は血管内皮細胞であることは疑う余地がなく、血管新生に関する研究対象は血管内皮細胞が主流であった。そして現在、「治療的血管新生」のストラテジーの開発や「抗血管新生薬」の開発という臨床応用への成果は、血管新生因子が血管内皮細胞に及ぼす生物学的機能解析の延長上にあるといっても過言ではない。一方で近年、angiopoietin/Tie-2 システムやplatelet-derived growth factor(PDGF)システムに代表されるように、血管内皮細胞とそれを取り巻く壁細胞/血管平滑筋細胞との相互関係を考えずして血管新生は理解できないという概念が提出され、定着しつつあるのも事実である。このような細胞間相互作用は液性因子と細胞接着、マトリックスとの相互作用などにより制御されていることは明らかであるが、このような、より高次的な解析には*in vitro*での解析に加え、*in vivo*での検証がきわめて重要な位置を占めてくる。

bFGF/FGF-2は他の血管新生因子とやや異なる生物学的特徴を持つ。詳細な生化学的特徴は他の著書にゆずるとして、強調しておきたいのはbFGF/FGF-2の血管内

皮細胞のみならず平滑筋細胞などの間葉系細胞に対しても作用することである。われわれはこのbFGF/FGF-2に着目し、その特徴的な生物学的機能、つまり間葉系細胞への作用が生体内での血管新生においてきわめて重要であることを明らかにしてきた。本稿ではbFGF/FGF-2の血管新生因子としての特徴と生物学的機能を概説し、さらにわれわれの提唱する「FGF-2による階層的血管新生制御機構の存在」について言及する。

bFGF/FGF-2の生物学的性質の概略とその遺伝子発現制御

ヒトbFGF/FGF-2タンパクは154個のアミノ酸からなる等電点9.6、分子量18kDの1本鎖ポリペプチドで、ヘパリンへの結合能があり、いわゆる古典的分泌シグナルを有しない。しかし種々の細胞で実際に分泌されていることが確認されており、われわれもヒトbFGF/FGF-2をコードするセンダイウイルスベクターを感染させた種々の培養細胞が非常に高いレベルのbFGF/FGF-2タンパクを分泌することを確認している¹⁾。この細胞外分泌のメカニズムとして、最近ATP依存性Na⁺-K⁺ポンプによる能動輸送経路が最も重要と考えられており²⁾、われわれもbFGF/FGF-2の分泌、特に局性を持つ上皮細胞からの内腔側への方向性分泌は、ウワバインなどのNa⁺-K⁺ポンプ阻害剤にて消失することを明らかにしている(未発表データ)。

*九州大学大学院医学研究院病理病態学

** (株)ディナベック

2004年4月1日受理

bFGF/FGF-2は種々の間葉系細胞の増殖を促進するが、その中でも最も特徴的な作用は、血管内皮細胞の増殖促進・管腔形成の促進作用である。これらの作用は培養細胞のみならず、動物個体局所での作用も確認されている。

bFGF/FGF-2は細胞外に放出された後、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し安定化される。われわれはさらに生体内でのbFGF/FGF-2の安定化にヒアルロン酸も重要であることを明らかにした³⁾。bFGF/FGF-2のマトリックスからの遊離にはFGF-BPやCYR61が関与し、遊離FGF-2が生理作用を発現すると考えられている^{4,5)}。

bFGF/FGF-2には、読み取り枠の異なる22, 22.5, 24, 34kDの高分子型のアイソフォームが存在し、これらはすべて低分子量18kD bFGF/FGF-2と異なり分泌されずに核へ移行する。しかし低分子量bFGF/FGF-2も標的細胞の受容体に作用した後に細胞質に取り込まれ、G1期特異的に核へ集積することが観察されていた⁶⁾。最近、この低分子量bFGF/FGF-2の核移行がtranslokationというシャトルタンパクにより実行されていることが明らかになった⁷⁾。しかしながらこのbFGF/FGF-2の核移行の意義については、今なお明らかではない。

一方で、bFGF/FGF-2遺伝子発現を制御する因子に関する報告はほとんどされていない。現在のところbFGF/FGF-2タンパクレベルの主たる制御機構は、細胞から分泌されたbFGF/FGF-2が細胞外基質に豊富に存在するヘパラン硫酸に結合、安定化し、病的、または生理的な生体内イベントの一過程である細胞外基質分解に伴って遊離し、標的細胞に作用するという一連の流れで理解されている。われわれの*in vitro*における検討においても、代表的な炎症性サイトカインや増殖因子刺激、低酸素刺激は血管内皮細胞におけるbFGF/FGF-2遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。しかしながら、一方でわれわれは*in vivo*マウス重症下肢虚血モデルにおいて、重症虚血誘導後6時間という比較的早期に大腿筋肉中の内因性bFGF/FGF-2遺伝子の明らかな発現亢進を認め、後48時間における内因性bFGF/FGF-2タンパク発現亢進も確認している⁸⁾(Fig. 1a, b)。この虚血誘導に伴うbFGF/FGF-2発現亢進に関わる因子は現在のところ明確ではないが、*in vitro*においてアシドーシス環境がbFGF/FGF-2遺伝子発現を誘導するとの報告がされており⁹⁾、アシドーシスが重要な因子となる可能性は十分考えられる。いずれにしても、生体には重症虚血とい

うクライシスにおいて積極的にbFGF/FGF-2遺伝子発現を亢進するシステムが備わっている可能性が示唆される。

血管新生因子の発現制御因子としての bFGF/FGF-2

bFGF/FGF-2遺伝子発現が他の増殖因子による制御を受けにくい一方で、bFGF/FGF-2が他の増殖因子遺伝子発現、さらにはそれらの受容体遺伝子発現を制御しているとの報告は比較的多い。*in vitro*においてはvascular endothelial growth factor-A(VEGF-A)^{10,11)}、VEGF-C¹²⁾、hepatocyte growth factor(HGF)⁹⁾、anigopietin-2(Ang-2)³⁾、VEGF受容体Flk-1/KDR¹⁴⁾、PDGF受容体PDGF receptor- α (PDGFR- α)^{11,15)}などはすべてbFGF/FGF-2により発現誘導の制御を受ける(Fig. 1c)。

bFGF/FGF-2の血管内皮細胞に対する 直接作用

血管内皮細胞にはbFGF/FGF-2受容体FGF receptor-1(FGFR-1)が発現しており、*in vitro*においてbFGF/FGF-2/FGFR-1を介した細胞内シグナルによる、血管内皮細胞の増殖、遊走、分化(管腔形成)を誘導、加えてFlk-1/KDRやAng-2の遺伝子発現誘導することで血管新生促進に関与すると想定されている。FGFR-1を介したシグナル伝達系のうち、細胞増殖活性はRAS-p42/44 mitogen-activated protein kinase(MAPK)系やPI3キナーゼ非依存性p70S6キナーゼ系の関与が^{16,17)}、細胞の遊走は非受容体型チロシンキナーゼであるc-Fesやp42/44MAPK系、p38MAPK系の関与が^{18,19)}、分化活性には主にSrcキナーゼ系の関与が¹⁶⁾示唆されている。

bFGF/FGF-2の血管内皮細胞に対する 間接的作用

他の血管新生因子と異なるbFGF/FGF-2の大きな特徴は、その主たる受容体であるFGFR1が血管内皮細胞以外にも広く多種にわたる細胞に発現しており、その結果、bFGF/FGF-2は多種の細胞に対し作用し得ることである。そして、線維芽細胞をはじめ、血管平滑筋細胞など間葉系細胞に対する増殖活性作用に関する報告は枚挙にいとまがない。一方、血管内皮細胞は血管新生因子の受容体が発現しているものの、そのリガンドの多くは主として間葉系細胞が産生している。つまり、

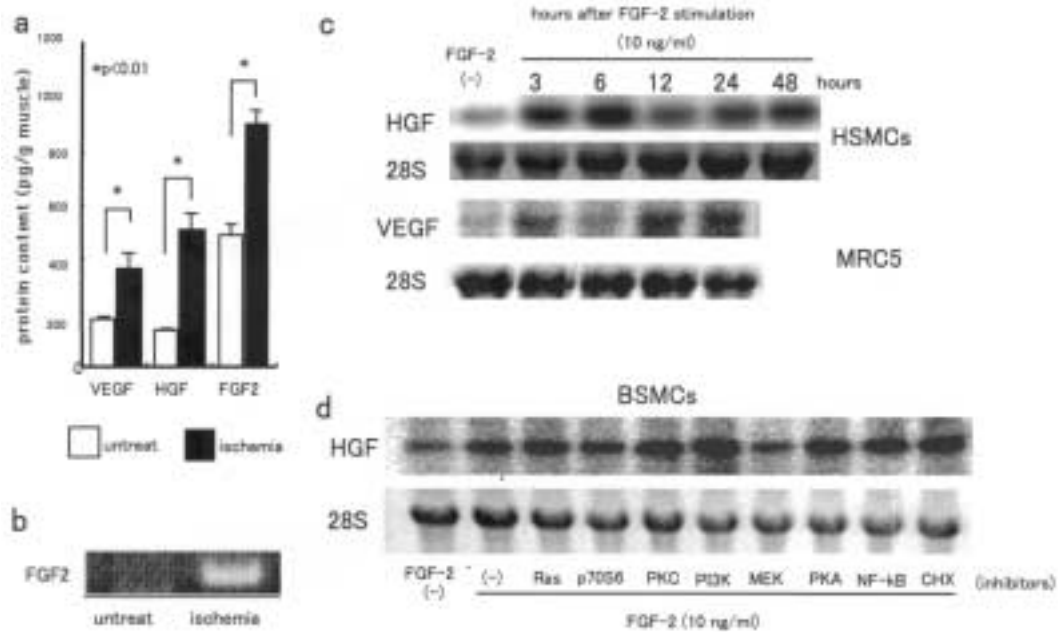


Figure 1
 a: Protein expression of endogenous VEGF, HGF, and FGF-2 48 hours after surgically induced murine limb ischemia (ELISA).
 b: mRNA expression of FGF-2 in skeletal muscle 6 hours after surgically induced limb ischemia (RT-PCR).
 c: Bi-phasic upregulation of HGF and VEGF in bovine aortic smooth muscle cells (BSMCs) and human lung fibroblasts (MRC-5) by FGF-2 (Northern blot).
 d: Effects of various inhibitors for cytoplasmic signals on early expression of HGF mRNA (3 hours) after FGF-2 stimulation. (modified from ref. 8)

生体においては、間葉系細胞から分泌される血管新生因子がパラクライン的に血管内皮細胞に作用し血管新生活性が惹起されると想定される。よって、間葉系細胞に作用するbFGF/FGF-2は、血管新生因子の遺伝子発現亢進という形で間接的に血管内皮細胞に影響を及ぼしていることが示唆される。現にわれわれは間葉系細胞において、bFGF/FGF-2が主にp42/44MAPK系およびp70S6K系を介してVEGF、HGF持続性の遺伝子発現が誘導することを明らかとしている⁸(Fig. 1d)。

bFGF/FGF-2 は 機能的 血管新生を 促進する

われわれはこれまでに、生体内できわめて高い遺伝子発現効率を有するセンダイウイルスベクター (SeV)^{1,3,8,11,20,21}を用いて、マウス重症下肢虚血モデルの大腿筋肉中にVEGF、bFGF/FGF-2 遺伝子を導入し、VEGF過剰発現群とbFGF/FGF-2 過剰発現群における救肢効果や血流回復効果(治療効果)について比較検討し

てきた¹。VEGF過剰発現では救肢効果や血流回復効果を得ることはできず、逆に浮腫・炎症反応が目立ち、かえって予後を悪化させるという結果となった。一方、bFGF/FGF-2 過剰発現群では高い救肢効果、血流回復効果を得ることが可能であった。さらに、このbFGF/FGF-2 過剰発現による救肢、血流回復効果は、下肢の内因性VEGFあるいはHGFの活性を中和することにより抑制ないし消失することを見いだした。つまりbFGF/FGF-2 過剰発現による治療効果はbFGF/FGF-2 による血管内皮細胞への直接的作用の亢進によりもたらされるものではなく、内因性の血管新生諸因子に依存していることを示唆すると考えられた。bFGF/FGF-2 過剰発現群の下肢に、非導入群の5倍程度のCD31陽性血管が認められたが、興味深いことに、救肢・血流回復が得られないVEGF過剰発現群の虚血下肢にもCD31陽性血管数が同程度認められた。しかし一方で、 α -smooth muscle actin陽性となる血管数がbFGF/FGF-2 群と比較して有意に低値であった(Fig. 2)。

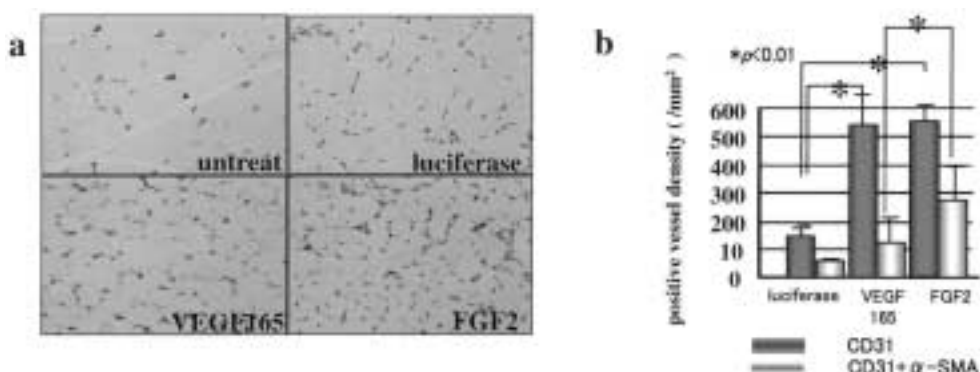


Figure 2
 a: Angiogenesis immunohistochemically assessed by PECAM-1 in ischemic thigh muscles 10 days after treatment by recombinant Sendai virus (SeV) expressing human VEGF165 or murine FGF-2.
 b: Assessment of microvessel density accompanying SMA-positive pericytes in same sections above. FGF-2 gene transfer accelerated the pericytes lining, but VEGF165 did not. (modified from ref.1)

これらの実験結果から、1) 新生血管には壁細胞に乏しく血流回復に寄与しない未熟な血管(「病的」新生血管)と血流回復に寄与する成熟した血管(「機能的」新生血管)があること、2) bFGF/FGF-2は効率的に「機能的」血管新生を誘導し得ること、3) bFGF/FGF-2の「機能的」血管新生の誘導にはVEGFなどの内因性の血管新生因子が必須の役割を担っていること、などbFGF/FGF-2が誘導する血管新生の特徴が次第に明らかになってきた。そして、われわれは、bFGF/FGF-2の有する「機能的」血管新生誘導効果には、上記したbFGF/FGF-2の血管内皮細胞に対する間接作用が重要な役割を担っており、血管内皮細胞と壁細胞を含めた間葉系細胞との相互作用、協調作用を強化することがbFGF/FGF-2の機能の本質であると考え、この観点から現在、bFGF/FGF-2が「いかにして壁細胞を伴う「機能的」血管を誘導するか」を中心とした血管新生の分子メカニズム解明に力を注いでいる。

bFGF/FGF-2の「機能的」血管新生誘導メカニズムの新展開

われわれは、bFGF/FGF-2の間葉系細胞への作用を中心に研究を進めていく中で、間葉系細胞におけるbFGF/FGF-2依存性のVEGFやHGF遺伝子発現誘導機構にはPDGF-AA/PDGFR-α/p70S6Kシステムが重要な役割を果たすことを見いだした¹¹⁾。つまり、bFGF/FGF-2に

よるVEGFやHGF発現誘導はp42/44MAPKシステムによる直接的な誘導よりもむしろPDGF-AA/PDGFR-α/p70S6kシステムに依存しており、bFGF/FGF-2の重要な役割は、PDGF-AやPDGFR-αの発現誘導を介してPDGF-AA/PDGFR-α/p70S6kシステムを誘導、活性化することにあると考えられる。さらにわれわれは、bFGF/FGF-2が間葉系細胞においてVEGF-Cの発現を亢進することを見だし、一方、このVEGF-CがPDGF-BBの発現制御に関与することを見いだしている(投稿準備中)。in vivoにおいてはPDGF-AA/PDGFR-α/p70S6kシステムやVEGF-C/Flt-4システムをブロックすることによりbFGF/FGF-2による救肢効果が完全に消失することから、これらシステムが機能的血管新生誘導過程において重要であることは間違いない。

“integrated” therapeutic angiogenesisの提唱

血管新生促進効果を有するサイトカインを外来性に虚血組織に投与し、血管新生を誘導することで虚血状態の改善を図る「治療的血管新生療法(therapeutic angiogenesis)」を考える場合、治療薬の選択が問題となる。治療薬の選択は血管新生の分子メカニズムを背景に、より有効なものを選択すべきであることは言うまでもない。詳細な血管新生分子メカニズムの解明は、現在においてまだ発展途上と言わざるを得ないが、われわれ

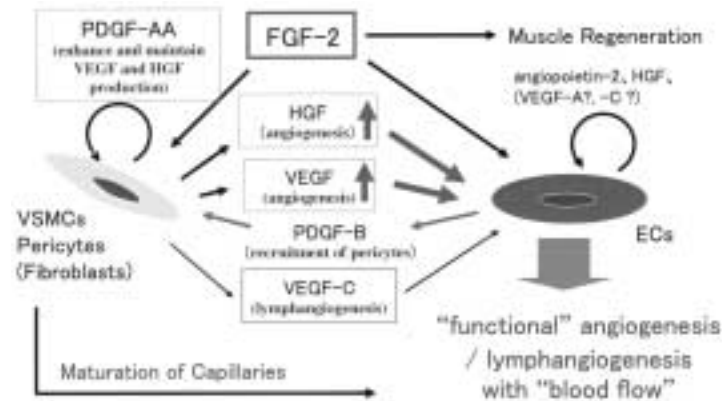


Figure 3 Schematic representation of a possible mechanism of determining “functional/physiological” or “pathological” angiogenesis. Overexpression of FGF-2 induces balanced expression of endogenous angiogenic factors, including VEGF and HGF, to form functional neovascularization.

のこれまでの検討から、治療効果に反映される血管新生の誘導、つまり「機能的」血管新生を誘導するためには、各血管新生因子が有する血管新生活性をバランスよく亢進させ、血管内皮細胞と間葉系細胞との間の協調作用を高めることが重要であると考えられる (Fig. 3)。われわれはこのことを“integrated” therapeutic angiogenesisと呼び、血管新生を治療に応用する際の基礎的概念とすることを提唱している。現時点でこのコンセプトに合致する治療薬としてbFGF/FGF-2が最も有効であり、現在、九州大学において「FGF-2搭載非伝播型組換えセンダイウイルスベクターを用いた重症虚血肢に対する血管新生遺伝子治療臨床研究」の準備が整いつつある。

終わりに

血管新生過程における詳細な分子メカニズムはまだ不明な点が多い。血管新生には多くの因子が関与し、複数の細胞の相互作用、協調的作用の上に成り立っている生体現象である以上、血管新生メカニズムの全貌解明は、今後、多くの、より高次的な研究成果を待たなければならない。しかし、近い未来、地道な各血管新生因子の詳細な機能解析の延長上に血管新生をターゲットとした治療戦略を確立する上ではっきりとした基盤が見えてくるであろう。この分野におけるさらなる研究の発展を期待したい。

文 献

1) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A et al: Angiogenic gene

therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*, 2002, **90**: 966–973.

2) Florkiewicz RZ, Anchin J, Baird A: The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺, K⁺-ATPase. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 544–551.

3) Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S et al: Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol*, 2002, **168**: 450–457.

4) Czubayko F, Liaudet-Coopman ED, Aigner A et al: A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat Med*, 1997, **3**: 1137–1140.

5) Kolesnikova TV, Lau LF: Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene*, 1998, **16**: 747–754.

6) Baldin V, Roman AM, Bosc-Bierne I et al: Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J*, 1990, **9**: 1511–1517.

7) Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L et al: Translokoin is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 433–439.

8) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tani M et al: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res*, 2002, **91**: 923–930.

9) D’Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM et al: Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces

- basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res*, 2000, **86**: 312-318.
- 10) Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA et al: Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*, 1995, **92**: 11-14.
 - 11) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y et al: Essential role of PDGFR α -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFR α during angiogenesis. *Circ Res*, 2004, **94**: 1186-1194.
 - 12) Kubo H, Cao R, Brakenhielm E et al: Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 8868-8873.
 - 13) Mandriota SJ, Pepper MS: Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res*, 1998, **83**: 852-859.
 - 14) Hata Y, Rook SL, Aiello LP: Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes*, 1999, **48**: 1145-1155.
 - 15) Schollmann C, Grugel R, Tatje D et al: Basic fibroblast growth factor modulates the mitogenic potency of the platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms by specific upregulation of the PDGF α receptor in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 18032-18039.
 - 16) Klint P, Kanda S, Kloog Y et al: Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene*, 1999, **18**: 3354-3364.
 - 17) Kanda S, Hodgkin MN, Woodfield RJ et al: Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 23347-23353.
 - 18) Kanda S, Lerner EC, Tsuda S et al: The nonreceptor protein -tyrosine kinase c-Fes is involved in fibroblast growth factor-2-induced chemotaxis of murine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 10105-10111.
 - 19) Tanaka K, Abe M, Sato Y: Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 1999, **90**: 647-654.
 - 20) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S et al: Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 970-973.
 - 21) Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K et al: Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J*, 2001, **15**: 1294-1296.

FGF-2 Regulating Multiple Angiogenic Factors in Hierarchical Mode of Action

Yoshikazu Yonemitsu^{*,**} and Katsuo Sueishi^{*}

^{*}Division of Pathophysiological and Experimental Pathology, Department of Pathology,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

^{**}DNAVEC Corporation

Key words: bFGF/FGF-2, "Functional/physiological" angiogenesis, Recombinant Sendai virus,
Gene therapy, Therapeutic angiogenesis

Recently, we have demonstrated that gene transfer with fibroblast growth factor-2 (FGF-2/bFGF) constantly facilitates functionally and morphologically mature neovessels in ischemic tissue, achieving in the high therapeutic effectiveness to treat subjects with critical limb ischemia. We demonstrated that FGF-2 induced multiple angiogenic growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in mesenchymal cells, and found that this was controlled by platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR α)/p70S6K, thus, our studies indicate that the PDGFR α -p70S6K pathway is an essential regulator for therapeutic neovascularization using FGF-2 which was regulated by hierarchical mode of action of FGF-2. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 151-156)