

血管新生因子 PIGF

上村 史朗 岩間 一 尾上 健児 竹田 征治 齋藤 能彦

要 旨：胎盤増殖因子(placental growth factor: PIGF)は血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)ファミリーに分類されるサイトカインであり，VEGF受容体-1(Flt-1)に特異的に結合する。VEGF受容体-1は血管内皮細胞だけでなくCD34陽性細胞などの血管前駆細胞にも発現しており，PIGFは既存の血管からの新しい血管分枝の誘導(angiogenesis)と骨髄由来の血管前駆細胞誘導(vasculogenesis)の2つの機序を介して，虚血性心疾患や悪性腫瘍などの疾患状態における血管新生に寄与している。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 305-310)

Key words: placental growth factor, angiogenesis, vasculogenesis

はじめに

血管新生は，胎生期における心血管系の発生だけでなく，成人での種々の疾患の発病と治癒機転に深く関与している。また最近の研究によって，血管新生はサイトカインなどの液性因子や骨髄あるいは臓器局所に存在する多分化能を有する血管前駆細胞によって複雑に調節されていることが明らかになってきた。特に，血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)とその関連因子，およびVEGF受容体群は血管新生に中心的な役割を担うことから，心血管疾患や悪性疾患での病態への関与と治療応用に関して精力的な研究が続けられている。しかしながら，VEGF-Aの遺伝子あるいはリコンビナント蛋白を用いた血管新生誘導療法は，実際の臨床例においては十分な効果が証明されていないのも事実である。本稿ではVEGFファミリーの一因子である胎盤増殖因子(placental growth factor: PIGF)に焦点を当てて，最近，著者らが明らかにした心筋梗塞におけるPIGFの役割を含めて血管新生との関連性を概説する。

胎盤増殖因子(PIGF)

PIGFは1991年にイタリアのMaglioneらによって，ヒト胎盤cDNAライブラリーの中からVEGFのPDGF(platelet

derived growth factor)like domainと53%の高い相同性を有する血管内皮細胞に対する増殖因子として発見され，現在VEGFファミリーに分類されている¹⁾。PIGF遺伝子はalternative splicingによってアミノ酸配列長とヘパリンあるいは受容体への親和性の異なる4つのアイソフォームに翻訳される。特にPIGF-2，PIGF-4は塩基性アミノ酸に富んで細胞膜上に留まりやすいことから，主にautocrineの機序で受容体に作用すると考えられる²⁾。VEGFのmRNAが広範な臓器に発現しているのに対して，成人正常組織におけるPIGF発現は胎盤，trophoblast，一部の血管内皮細胞に限局している。

PIGFはVEGFと同様に，翻訳後にglycosylationを受けてhomodimer(二量体)を形成して細胞外に分泌される。VEGFが2種類のチロシンキナーゼ型受容体であるVEGF受容体-1(Flt-1)とVEGF受容体-2(Flk-1, KDR)のいずれにも親和性があるのに対して，PIGFはVEGF受容体-1 のみに選択的に結合する点で特徴的である(Fig. 1)。従来からVEGF-AによるVEGF受容体-2を介した刺激伝達が血管内皮細胞の増殖や遊走に必須のシグナル伝達系であり，VEGFによるVEGF受容体-1を介する受容体刺激は細胞機能調節に影響は少ないと理解されてきた。すなわち，VEGFはVEGF受容体-1と高親和性($K_d = 1 \sim 10 \text{ pM}$)に結合するものの，チロシンキナーゼの自己リン酸化の程度は低い。しかしながら，

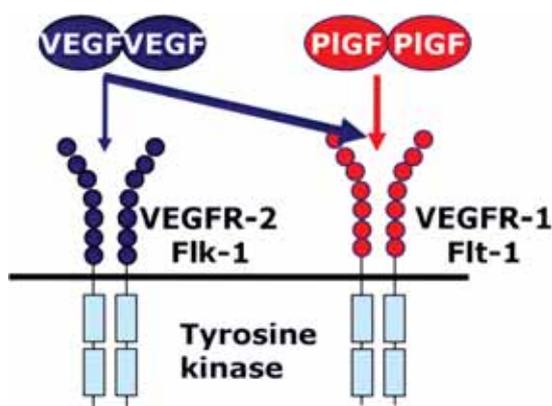


Figure 1 Structure of VEGF receptors and ligand selectivity.

VEGF受容体-1のリガンドがPIGFである場合には、チロシンキナーゼのリン酸化に引き続いて、VEGF受容体-2で認められるPLC γ -PKC系ではなく、MAP kinase系の活性化を介したDNA合成・細胞分裂の亢進、あるいは血管内皮細胞からの生理活性物質の産生を刺激することが明らかになっている³⁾(Table)。さらに最近になって、PIGFによるVEGF受容体-1の活性化は、VEGF-AによるVEGF受容体-2のシグナル伝達を細胞内において促進させるcross-talk機序によって血管新生を協調的に刺激することが示されており⁴⁾、PIGFは直接あるいは間接的に血管内皮細胞に対する増殖促進作用、すなわち血管新生(angio genesis)作用を有すると理解されている。

一方、血管新生には、既存の血管からの新しい血管の伸長(狭義のangiogenesis)だけでなく、骨髄に由来する血管前駆細胞(vasculogenesis)も関与している。最近になってPIGFの特異的受容体であるVEGF受容体-1がCD34陽性細胞に代表される広範な骨髄系幹細胞に発現していることが明らかになってきた。一般に、骨髄系幹細胞は骨髄中の“niche”と呼ばれる微小環境中に静止状態で留まっていると理解されているが、骨髄系幹細胞に作用する血管新生促進シグナルのうち、PIGFによるVEGF受容体-1を介した作用が、nicheからの離脱や末梢血中への流出に重要であることが示されている。さらにPIGFは骨髄間葉系細胞に作用してこれらの細胞からのMMP-9(matrix metalloproteinase-9)発現を亢進させ、骨髄局所でのMMP-9の発現亢進が骨髄幹細胞に対する強力な刺激因子であるkitリガンド(stem cell factor)の膜

型から遊離型へのcleavageを介して、骨髄系幹細胞の活性化を促進する機序も有していると報告されている⁵⁾。すなわち、PIGFは直接あるいは間接的に骨髄系幹細胞(血管前駆細胞)を活性化し、nicheからの離脱、末梢血中への遊離、血管新生が行われる局所への誘導などの一連の反応に促進的に作用すると考えられる。

PIGFの受容体であるVEGF受容体-1に関して新しい知見が得られている。VEGF受容体-1の遺伝子からはalternative splicingによって膜結合ドメインが欠損し、リガンドとの結合に必要な細胞外ドメインだけからなる可溶性VEGF受容体-1(可溶性Flt-1)が翻訳される。血中・組織液中の可溶性VEGF受容体-1は、遊離型のPIGFあるいはVEGFと結合し、これらのリガンドが細胞膜上にあるVEGF受容体と結合することを阻害することによって、血管内皮細胞機能や血管形態を調節している。特に、子癩前症の患者では、血中可溶性VEGF受容体-1が高度に上昇してPIGFあるいはVEGFの生理活性を過度に抑制することによって、子癩、あるいは妊娠中毒症における高血圧(血管反応性の異常)、胎盤機能障害などの臨床像を形成すると考えられるようになってきている⁶⁾。

疾患状態における血管新生の regulatorとしてのPIGF

VEGF(VEGF-A)の遺伝的欠損マウスは、欠損がヘテロであっても発生のごく初期から心血管系の形成異常、血島における有核赤血球数の減少を示す。さらに、胎生の11~12日で死亡することから、VEGFは発生初期のvasculogenesisとそれに引き続くangiogenesisの両方に必須の役割を担うことが明らかになっている。

一方、PIGFのホモ欠損マウスは生殖能力を含めて正常に発育することから、PIGFの発生期における役割は小さいと考えられている。しかしながら、このPIGF欠損マウスは、出生後の病的状態における血管新生反応が明らかに障害されている⁴⁾。すなわち、PIGF欠損マウスでは、下肢虚血の血管新生、骨髄幹細胞移植の生着、あるいは骨折後の創傷治癒が野生型動物に比して遷延すること、また腫瘍血管の抑制機序に伴う移植腫瘍の成長が遅延することが確認されている。さらに、下肢虚血動物モデルでは、PIGFの局所投与が虚血部位において毛細血管だけでなく動脈を含む側副血管の形成(arteriogenesis)を促進させる。また、この研究では

Table Different signal transduction properties of VEGF receptors

	VEGF/ VEGFR-2 (Flk-1)	VEGF/ VEGFR-1 (Flt-1)	PlGF/ VEGFR-1 (Flt-1)
Tyr phosphorylation	++	-/+	+
PLC γ phosphorylation	+	-	-
MAPK activation	++	-	+
EC proliferation	+	-	+
EC migration	+	-	-

PlGFによるarteriogenesisには血管前駆細胞などが含まれる末梢血単核球分画の集簇と活性化(vasculogenesis)の重要性が示されている⁷⁾。

また、前述のように成人健常状態ではPlGFの発現は胎盤組織などの限られた部位に強い発現を示すが、障害組織においてはPlGF自体の発現が強力に誘導されることも明らかになっている。これらの知見から、PlGFは胎生期における血管新生への関与は比較的小さいが、出生後の疾患状態における血管新生に非常に重要な因子であると考えられる。

急性冠症候群におけるPlGFの発現とその役割

急性心筋梗塞(acute myocardial infarction: AMI)後の治癒過程には、血管内皮前駆細胞などの多機能幹細胞の関与が示されているが、梗塞心筋に由来するどのようなシグナルが骨髄系細胞の動員に関与しているかは明らかになっていない。著者らは、AMIを対象として、梗塞急性期の心筋で産生されて末梢血中に分泌され、血管内皮前駆細胞を含む単核球分画の遊離を促進するサイトカインのスクリーニングを行った。その結果、PlGFが梗塞発症後の早期に心臓で産生され、末梢血中で上昇したPlGF濃度が梗塞後の心機能の温存に關与することを観察したので、その成績の一部を紹介する⁸⁾。

AMI患者55例と健常者43例を対象とした検討では、AMI発症第3病日の末梢血PlGF値は健常者群に比して有意に高値を示した(35.1 ± 26.5 pg/ml vs 13.4 ± 5.7 pg/ml, $p < 0.001$)。さらに、AMI患者での冠動脈再灌流直後における血漿PlGF値の冠動脈入口部と冠静脈洞での濃度較差[CS][CA]は、再灌流前に比して有意に上昇しており(14.1 ± 10.6 vs 0.0 ± 1.1 pg/ml, $p < 0.01$)、梗塞心臓でのPlGF発現と再灌流による末梢血中への遊出が明らかとなった(Fig. 2)。また、発症第3病日の血

漿PlGF値は、心筋梗塞発症後の末梢血単球数および末梢血CD34陽性細胞数と有意の正相関を示し、さらにAMI発症6カ月後の左室機能の改善率と正相関を示した(Fig. 3)。

また、AMIマウスモデルを用いた検討では、PlGFは梗塞部周辺の血管組織に強く発現しており、PlGF mRNA発現は対照動物の心筋に比して約23倍に亢進していた。蛍光免疫組織染色では、梗塞部の血管の内皮細胞と一部の間質細胞にPlGFの高発現を認めた(Fig. 4)。以上の成績から、AMIの急性期では梗塞心筋、特に虚血領域の血管内皮でPlGFが産生され、閉塞冠動脈の再灌流によって末梢血中に遊出すると考えられる。さらに、末梢血でのPlGF濃度の上昇は骨髄由来CD34陽性細胞など多機能幹細胞の末梢血中への遊離を促進し、傷害心筋における血管新生作用を介して心筋梗塞後の心機能の温存に寄与している可能性がある。

PlGFを標的とした血管新生 / 抗血管新生治療の可能性

VEGF-Aの強力な血管新生効果は多くの基礎実験で確認されていることから、虚血性心疾患および閉塞性動脈硬化症を対象とした臨床試験がいち早く行われた。初期に行われた複数の小規模臨床試験では、VEGFによる血管新生作用が心筋あるいは下肢の虚血を改善するとの成績が得られたが、最近になって報告されたプラセボを用いたランダム化試験では、VEGFの遺伝子あるいはリコンビナント蛋白を用いた有効性は確認されていない⁹⁾。その理由として、VEGFによって誘導される血管は、毛細血管レベルの比較的脆弱な組織であることや機能の備わらない血管腫を形成することなどが考えられる。

一方、PlGFは、虚血性疾患において強力に発現され

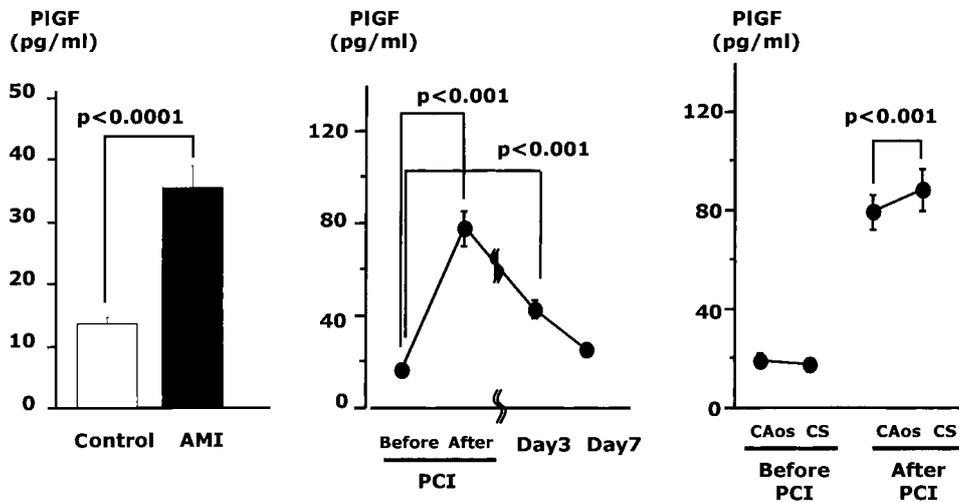


Figure 2 A: Peripheral blood plasma PIGF levels in patients with acute myocardial infarction (AMI) on the 3rd hospital day. Bars represent means \pm SE. B: Time course of plasma levels of PIGF after AMI. C: PIGF levels in plasma samples taken from the coronary artery ostium (CAos) and coronary sinus (CS) before and just after percutaneous coronary intervention (PCI). Before PCI of an infarct-related artery, plasma PIGF levels were similarly low in the CAos and CS. After re-canalization (RC), PIGF levels were significantly increased in both the CAos and CS, as compared to before PCI, and levels in the CS were significantly higher than in the CAos. Closed circles and bars represent means \pm SE.

A | B | C

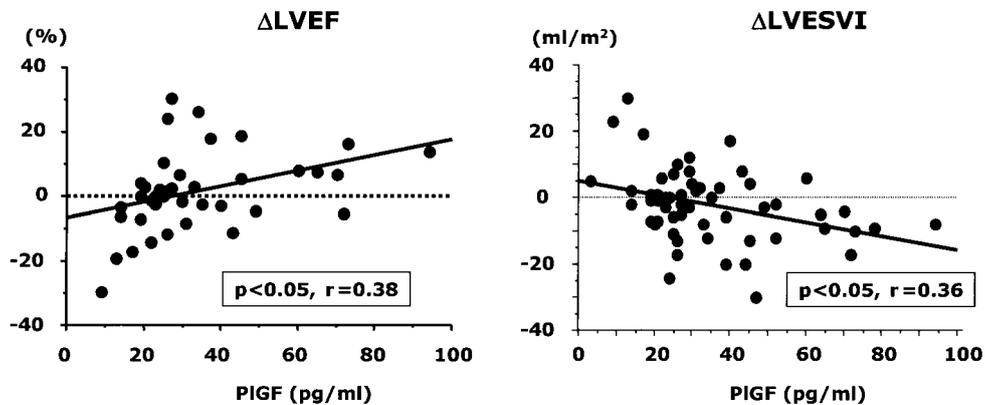


Figure 3 Relation between plasma PIGF levels and left ventricular function in chronic phase. Plasma PIGF levels on day 3 post-myocardial infarction were positively correlated with the changes of left ventricular EF (Δ LVEF) and negatively correlated the left ventricular end-systolic volume index (Δ LVESVI).

で治癒機転に深く関与している。さらに、毛細血管レベルのangiogenesisに加えて、側副血行を含む動脈の形成をも誘導する可能性が示されているため、今後、大動物での効果や安全性の確認後に血管新生療法としての臨床試験が行われることが期待される。

さらに、PIGF過剰発現マウスではVEGF受容体-1の

シグナリングを介して腫瘍血管新生が促進されることが知られており、悪性腫瘍の血管新生においてPIGF/VEGF受容体-1系は非常に重要な役割を担っている。現在、VEGF受容体-1のIgドメインからなる可溶性タンパク(VEGF-trap)を用いた悪性腫瘍を対象とした臨床試験が進行中であり¹⁰⁾、その成績の公表が待たれる。

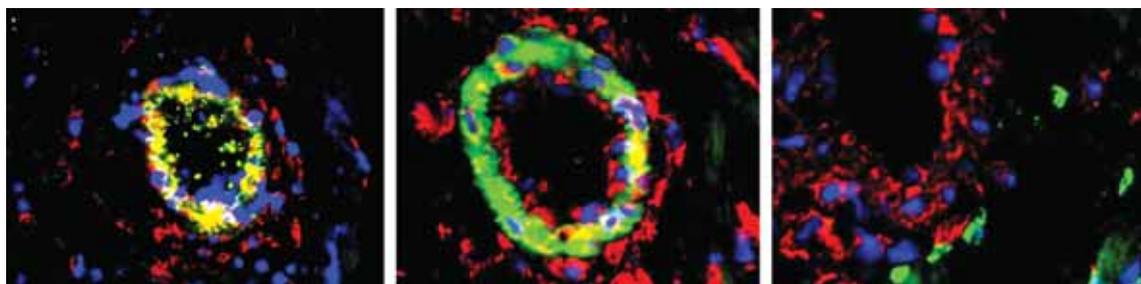


Figure 4 Photomicrographs showing immunofluorescent staining of a small artery and infiltrating cell within the infarct myocardium.

A: Combination staining of the target vessel with anti-PIGF (red) and anti-von Willebrand factor (green) antibodies. Yellow coloration indicates PIGF expression within vascular endothelial cells.

B: Combination staining with anti-PIGF (red) and anti-alpha-smooth muscle actin (green) antibodies. Note that PIGF expression is restricted to the intima of the target vessel.

C: Combination staining with anti-PIGF (red) and anti-CD11b (green) antibodies. PIGF-expressing cell in the interstitium did not cross-react with CD11b-positive cell (macrophage).

Original magnification: 800 \times , DAPI was used for nuclear staining (blue).

A | B | C

おわりに

VEGFファミリーに属するサイトカインと複数の受容体は複雑なcross-talkを介して血管新生を調節しているが、特にPIGFは出生後の疾患状態における血管新生に重要な役割を担っていると考えられる。今後のVEGFファミリーの研究の進展によって、PIGFをターゲットとした治療法が虚血性疾患、悪性腫瘍に対する臨床応用につながることを期待したい。

文 献

- 1) Maglione D, Guerriero V, Viglietto G et al: Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 9267–9271.
- 2) Yang W, Ahn H, Hinrichs M et al: Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PIGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol*, 2003, **60**: 53–60.
- 3) Landgren E, Schiller P, Cao Y et al: Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C- γ and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene*, 1998, **16**: 359–367.
- 4) Carmeliet P, Moons L, Luttun A et al: Synergism between

vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 2001, **7**: 575–583.

- 5) Rafii S, Avezilla S, Shmelkov S et al: Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **996**: 49–60.
- 6) Levine RJ, Maynard SE, Qian C et al: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 2004, **350**: 672–683.
- 7) Pipp F, Heil M, Issbrucker K et al: VEGFR-1-selective VEGF homologue PIGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res*, 2003, **92**: 378–385.
- 8) Iwama H, Uemura S, Naya N et al: Cardiac expression of placental growth factor predicts the improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2006, **47**: 1559–1567.
- 9) Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 2003, **107**: 1359–1365.
- 10) Holash J, Davis S, Papadopoulos N et al: VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 11393–11398.

Placental Growth Factor (PlGF)

Shiro Uemura, Hajime Iwama, Kenji Onoue, Yukiji Takeda, and Yoshihiko Saito

First Department of Medicine, Nara Medical University, Nara, Japan

Key words: placental growth factor, angiogenesis, vasculogenesis

Placental growth factor (PlGF) is a member of vascular endothelial growth factor (VEGF) family that specifically binds to VEGF receptor-1 (Flt-1). VEGF receptor-1 is expressed not only in endothelial cells but also in multipotent stem cells in bone marrow. It seems likely that PlGF has potent activity to stimulate endothelial cell growth (angiogenesis) as well as to recruit bone marrow derived vascular progenitor cells to injured tissue (vasculogenesis) in pathological conditions such as ischemic heart disease, peripheral arterial disease and tumor angiogenesis. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 305–310)