

Mechanism of Hypoxia-Induced Proliferation of Vascular Cells – Autocrine and Paracrine Actions of Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) –

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8541

低酸素による血管細胞増殖誘導の分子機構

—血管内皮増殖因子 (VEGF) のオートクリン/パラクリン作用—

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

野村素弘

低酸素による血管新生機構を明らかにする目的で、初代培養ヒト臍静脈内皮細胞とウシ網膜血管周皮細胞を種々の酸素濃度下で培養し、1) 血管新生のキーステップである内皮細胞と周皮細胞の増殖、2) 血管内皮細胞に特異的な増殖因子である血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) およびその受容体をコードする遺伝子の発現、3) VEGF mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが内皮細胞増殖におよぼす効果につき検討した。その結果、1) 内皮細胞、周皮細胞のいずれにおいても低酸素条件下では通常の酸素濃度下に比し生細胞数が有意に増加することが認められた。2) ノーザンブロット分析および逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法により内皮細胞、周皮細胞の両方で VEGF をコードする mRNA が検出され、VEGF mRNA 量は酸素濃度の低下に依存して著しく増加することが見出された。また、内皮細胞では *fms* 様チロシンキナーゼ 1 (*fms*-like tyrosine kinase 1, *flt1*)、*fms* 様チロシンキナーゼ 4 (*fms*-like tyrosine kinase 4, *flt4*)、キナーゼインサートドメイン含有リセプター (kinase insert domain-containing receptor, *kdr*) の3種の VEGF 受容体 mRNA が酸素濃度に関わらず恒常的に発現しており、一方、周皮細胞では *flt1* mRNA の発現が低酸素で誘導されることが見出された。3) VEGF mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを化学合成し培地中に投与すると、低酸素下での内皮細胞の DNA 合成が有意に抑制された。以上の結果から、血管新生の場となる細小血管を構成する内皮細胞と周皮細胞の増殖は低酸素により誘導され、内皮細胞の増殖誘導にはこれらの血管細胞自身で産生される VEGF がオートクリンおよびパラクリン作用を介して関与しているものと結論された。

Key words endothelial cell, pericyte, hypoxia, vascular endothelial growth factor, receptor

血管新生は、既存の血管から新しい血管網が形成される現象で、個体の発生・成長、黄体形成、創傷治癒といった生理的過程や腫瘍、糖尿病性網膜症、閉塞性血管障害などの病的状態の進展や修復の過程で重要な役割をはたす。したがって、血管新生のメカニズムを明らかにすることはこれらの生理的過程を理解するのみならず種々の疾患の原因、病態、予防、治療法を解明するうえで必須と思われる。従来血管新生を惹起する主要因のひとつとして虚血の結果生ずる組織内酸素濃度の低下が考えられてきているが、低酸素によりどのように血管新生が引き起こされるかについては不明な点が多い。

最近に至り、内皮細胞に特異的な増殖因子である血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)¹⁾²⁾ 遺伝子の発現が低酸素状態で増大することが悪性神経膠腫で見い出され^{3)~5)}、低酸素時の血管新生と VEGF との関わりが示唆されてきた。

本研究では、低酸素による血管細胞増殖の誘導機構を VEGF のオートクリン/パラクリン作用という観点から追及した。すなわち、血管新生の場となる細小血管を構成する内皮細胞と周皮細胞を種々の酸素濃度下で培養し、その増殖を調べる

とともに、これらの血管細胞における VEGF 遺伝子、VEGF 受容体遺伝子の発現を解析し、さらに、VEGF に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが内皮細胞の DNA 合成におよぼす効果を検討した。

材料および方法

1. 細胞

1. 血管内皮細胞

ヒト臍静脈より初代培養した血管内皮細胞⁶⁾を用いた。細胞は15%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Cell Culture Laboratories, Cleveland, OH, USA), 100U/ml ペニシリン (和光純薬, 大阪), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (和光純薬), 100 μ g/ml エンドテリアルセルグロウスサプリメント (endothelial cell growth supplement, ECGS) (Collaborative Research, Bedford, MA, USA), 25 μ g/ml ヘパリン (sigma, St. Louis, MO, USA) を含む RPMI1640 (Gibco, Gland Island, NY, USA) と 199 培地 (medium 199 containing Hank's salts, medium 199) (Gibco) を等量混合した培地にて維持し、15~20 継代目の細胞を実験に供した。95%以上の細胞がアセチル化低

平成5年12月17日受付, 平成6年2月7日受理

Abbreviations: aFGF, acidic fibroblast growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; bp, base pair (s); DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum; *flt1*, *fms*-like tyrosine kinase 1; *flt4*, *fms*-like tyrosine kinase 4; *kdr*, kinase insert domain-containing receptor; PDGF, platelet-derived growth factor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction;

密度リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 取り込み陽性で血管内皮細胞と同定された。

2. 周皮細胞

ウシ眼球より初代培養した網膜血管周皮細胞⁹⁾を用いた。細胞は 20%FBS, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (日水製薬, 東京) にて維持し, 5~10継代目の細胞を実験に供した。95%以上の細胞が α -平滑筋アクチン陽性で周皮細胞と同定された。

3. 神経膠腫細胞

ヒト悪性神経膠腫由来の細胞株である U251MG を 10%FBS, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM にて培養した。

II. DNA の化学合成

1. プライマーおよびプローブ

VEGF および VEGF 受容体 mRNA 検出用プライマー, プローブとして以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計し, フォスフォアミダイド法により DNA 合成装置モデル 392 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて合成した。合成後のオリゴデオキシリボヌクレオチド精製には OPC カラム (Applied Biosystems) を用いた。プライマーは VEGF-U (5'-GAGAATTCGGCTCCGAAACCATGAACTTTCTGCT-3') (cDNA 塩基番号 44-70⁹⁾), VEGF-D (5'-GAGCATGCCCTCCTGCCCGCTCACCGC-3') (698-717⁹⁾), flt1-U (5'-GAGAA-TTCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT-3') (cDNA 塩基番号 3232-3258⁹⁾), flt1-D (5'-GAGCATGCGGTATAAAT-ACACATGTGCTTCTAG-3') (4289-4313⁹⁾), flt4-U (5'-AGCCA-TTCATCAACAAGCCT-3') (cDNA 塩基番号 429-448⁹⁾), flt4-D (5'-GGCAACAGCTGGATGTCATA-3') (707-726⁹⁾), kdr-U (5'-TATAGATGGTGTAAACCCGGA-3') (cDNA 塩基番号 873-892¹⁰⁾), kdr-D (5'-TTTGTCACTGAGACAGCTTGG-3') (1406-1427¹⁰⁾) であり, プローブは VEGF-I (5'-GGTGAAGTTCA-TGGATGTCTATCAGCGCAG-3') (176-205⁹⁾), flt1-I (5'-GAG-CTGAAAGGAAAATCGCGTGCTGCTCC-3') (4186-4215⁹⁾), flt4-I (5'-TTCCTTTCCAACCCCTTCTGCTGTCACATC-3') (662-691⁹⁾), kdr-I (5'-ATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAG-AACAG-3') (923-952¹⁰⁾) である。なお, 上記プライマー中 VEGF-U と flt1-U には *EcoRI* アダプター (GAGAATTC) を, VEGF-D と flt1-D には *SphI* アダプター (GAGCATGC) を 5' 端に付けた。

ヒト β -アクチン mRNA に対するプライマー (actin-U, actin-D), プローブ (actin-I) の配列は文献¹²⁾に従った。

2. アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチド

ヒト VEGF mRNA の開始コドンを含む 5' 領域に相補的な 22塩基のフォスフォロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび対照となるセンスオリゴヌクレオチドを DNA 合成装置モデル392を用いて合成し, AQUAPORE RP-300 カラム (Applied Biosystems) を用いた逆相分配高速液体クロマトグラフィーにて精製した。フォスフォロチオエート型オリゴヌクレオチドは通常のフォスフェイト型に比し安定性が高く, 細胞へ

の取り込みも良好であることが知られている¹³⁾。

III. 低酸素下での細胞培養

細胞を播種後 5% CO₂ 気相下で 37°C, 24時間培養し, 接着を確認後, 大気コントロール培養チェンバー (Bellco, Vineland, NJ, USA) 内に移した。O₂ (2.5%, 5%, 10%), CO₂ (5%) および N₂ の混合ガス (宇野酸素, 金沢) を 10l/min の流量にて 5 分間, 大気コントロール培養チェンバーに注入し, 37°C の恒温室に静置した。混合ガスは 24 時間毎に置換し, 培地は 48 時間毎に交換した。CO₂ 培養装置内での培養を通常の酸素濃度 (20%) 下での培養とした。

IV. 細胞増殖の定量

1. 生細胞数の算定

細胞を 24 穴のクラスターディッシュ (Costar, Pleasanton, CA, USA) に播種後経時的に 0.25% トリプシンで分散し, 0.17% (w/v) トリパンプルーを含む培地で希釈し血球計算板を用いて生細胞数を算定した。

2. DNA 合成能の測定

内皮細胞を 24 穴クラスターディッシュに各穴あたり 2×10^4 個播種し, 細胞の接着を確認したうえでアンチセンスあるいはセンスオリゴヌクレオチドを培地に加え, 24 時間培養後 Niyazono ら¹⁴⁾ の方法に従い DNA 合成を測定した。すなわち 1 μ Ci/ml の濃度で [³H] チミジン (82.9Ci/mmol, NEN Research Product, Wilmington, NC, USA) を加え, 4 時間インキュベーション後, 氷冷 5% トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) を加え 20 分間氷上に静置して細胞を固定し, 細胞を氷冷 5% TCA にて 3 回洗浄後, 1M NaOH 200 μ l を加え室温 20 分間の振盪により溶解した。1M HCl 200 μ l で中和後, 全量を 10ml の液体シンチレーターと混和し ³H 放射活性を測定した。

V. ポリ (A)⁺RNA の分離

各酸素濃度条件下で 24 時間培養し 150cm² の細胞培養用フラスコ (Corning, N.Y., USA) 中でコンフルエントとなった各種細胞から QuickPrep mRNA 精製キット (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いてポリ (A)⁺RNA を分離した¹⁵⁾。

VI. ノーザンプロット分析

2.5 μ g のポリ (A)⁺RNA を 1.1M ホルマリンを含む 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し, ナイロンフィルター (ハイボンド N⁺, Amersham, Buckinghamshire, UK) に転写した。フィルターに転写後, UV ストラタリンカー 2400 (Stratagene, CA, USA) を用いて 120 ミリジュールの波長 254nm の紫外線を照射し RNA を固定した。ついでフィルターを 50% ホルマリン, 5% 食塩-リン酸ソーダーエチレンジアミン四酢酸液 (saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid, SSPE), 5% デンハルト液 (0.1% ポリビニールピロリドン, 0.1% ウンアルブミン, 0.1% フィコール), 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 200 μ g/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma) からなる溶液中で 42°C, 6 時間プレハイブリダイズさせた後, 50% ホルマリン, 5% SSPE, 5% デンハルト液, 0.5% SDS, 340 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, プローブ 15ng からなる溶液中で 42°C, 16 時間ハイブリダイズさせた。プローブとして, U251MG より分離したポリ (A)⁺RNA 100ng を鋳型とし

SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline sodium citrate; SSPE, saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid; TCA, trichloroacetic acid; TGF- α , transforming growth factor- α ; TGF- β , transforming growth factor- β ; VEGF, vascular endothelial growth factor

プライマー VEGF-U, VEGF-D を用いて逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法にて増幅した618塩基対 (base pair, bp) の DNA 断片を用い、ランダムプライマーラベリングキット (Stratagene) と [α - 32 P] デオキシシチジン三リン酸 (NEN Research Product) を用いて標識した。ハイブリダイゼーション後、フィルターを2×食塩-クエン酸液 (saline sodium citrate, SSC), 0.1% SDS にて室温で20分間、2回、ついで 0.1×SSC, 0.1% SDS にて42°C, 10分間、2回洗浄し、-80°C でオートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィ後、VEGF プロブのシグナルが消退したのを確認し、 β -アクチン cDNA をプロブとしたハイブリダイゼーションを行った。

Ⅶ. RT-PCR とその産物のサザンブロット分析

GeneAmp RNA PCR キット (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) を用い、まず、ポリ (A)⁺RNA を鋳型として逆転写酵素にて cDNA を合成し、ついで、各 mRNA に特異的なプライマーを用いて Taq DNA ポリメラーゼにて DNA を増幅した。反応には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用した¹⁰⁾。

増幅後の DNA を、2%アガロースゲルにて電気泳動し、ナ

イロンフィルターに転写し、紫外線にて固定した。ついでフィルターを50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハルト液、1% SDS, 500 μ g/ml 変性サケ精子 DNA からなる溶液中で50°C, 6時間プレハイブリダイズさせた後、50%ホルムアミド、5×SSPE、5×デンハルト液、1% SDS, 500 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, オリゴヌクレオチドプローブ 10pmole からなる溶液中で55°C, 16時間ハイブリダイズさせた。プローブ標識には、DNA5' 末端標識キット (宝酒造, 京都) と [γ - 32 P] アデノシン三リン酸 (NEN Research Product) を使用した。ハイブリダイゼーション後、フィルターを2×SSC, 0.1% SDS にて室温で20分間、1回、ついで 0.5×SSC, 0.1% SDS にて室温で、20分間、1回、その後 0.1×SSC, 0.1% SDS にて50°Cで、10分間、2回洗浄し、-80°C でオートラジオグラフィを行った。さらにバイオイメージアナライザー FUJIX BA100 (富士フイルム, 東京) により放射活性の測定を行った。

成 績

1. 低酸素下での血管内皮細胞, 周皮細胞の増殖

図 1A に低酸素 (2.5%, 5%, 10%) および通常の酸素濃度 (20%) で培養したヒト臍静脈内皮細胞の増殖曲線を示した。通

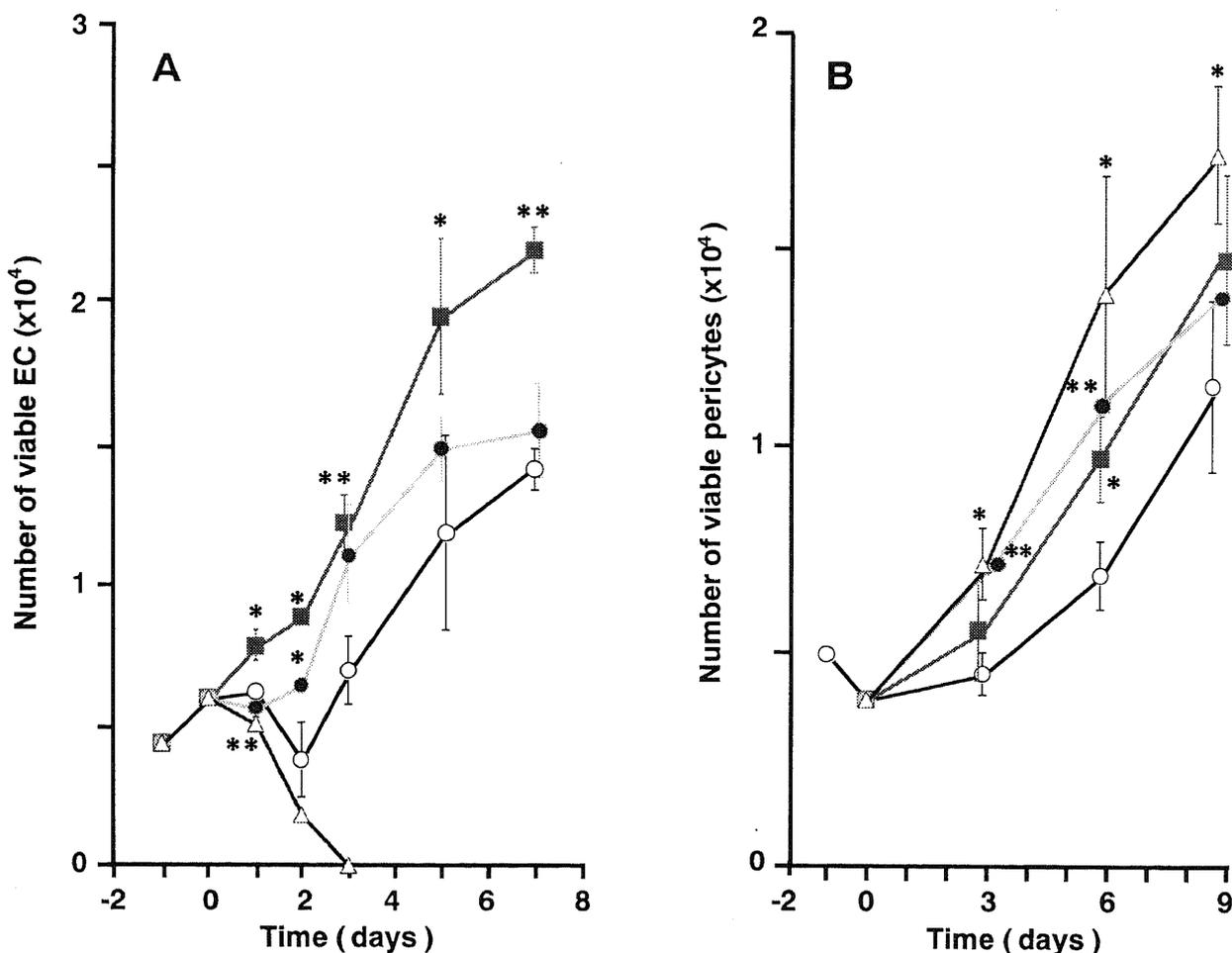


Fig. 1. Effect of hypoxia on the growth of endothelial cells (EC) (A) and pericytes (B). Cells were incubated under various oxygen tensions. Oxygen tension was changed on day 0 from 20% to the concentrations indicated. ○, 20% O₂; ●, 5% O₂; ■, 10% O₂; △, 2.5% O₂. Each point represents mean for triplicate experiments; vertical bars show standard deviation (SD) when larger than the symbol. *, p<0.05, **, p<0.01 compared to the number of the cells cultured under 20% O₂ (Student's *t* test).

常の酸素濃度では内皮細胞数は3日後から漸増し1週間で培養開始時の約2倍に増えた。ところが、酸素濃度を10%に下げると、24時間以内から内皮細胞の増殖が促進され、以後2日、3日、5日、7日のどの時点でも通常酸素濃度での培養に比し生細胞数は有意に増加した。7日目の細胞数は培養開始時の3.5倍に達していた。5%の酸素濃度でも内皮細胞の増殖は20%酸素濃度時以上に促進されることが認められた。酸素濃度をさらに2.5%に下げると、内皮細胞はむしろ減少し、3日間でほぼ死滅した。

ウシ網膜血管周皮細胞の増殖も低酸素下で促進された(図1B)。周皮細胞の場合、2.5%酸素下での細胞増加率が最大で、以下 $10\% \geq 5\% > 20\%$ の順であった。

II. 低酸素による血管細胞 VEGF 遺伝子の発現誘導

1. VEGF mRNA の検出

ヒト臍静脈内皮細胞とウシ網膜血管周皮細胞からポリ(A)⁺RNA を分離し、ヒト脳グリオーマ由来培養細胞 U251MG から RT-PCR 法で調整した VEGF cDNA をプローブとして VEGF mRNA の存在をノーザン法で分析した。その結果、図2に示すように、内皮細胞ポリ(A)⁺RNA、周皮細胞ポリ(A)⁺RNA の両者で、対照の U251MG ポリ(A)⁺RNA と同じく、およそ4キロ塩基対(kilobases, kb)の位置にハイブリダイゼーションバンドが検出された。このことは、VEGF 遺伝子がこれらの血管細胞自体でも発現していることを示す。

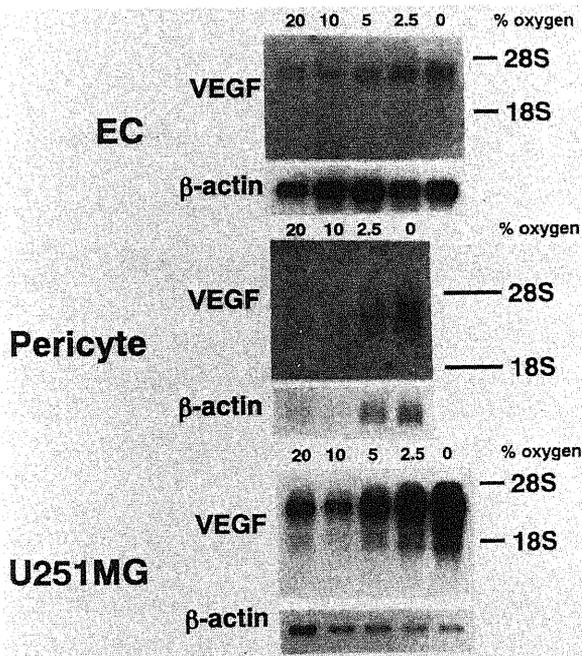


Fig. 2. Northern blot analysis of poly(A)⁺RNA. After endothelial cells (EC), pericytes and U251MG cells had been cultured under various oxygen tensions, poly(A)⁺RNAs were isolated from each culture. Two point five μ g (EC and U251MG cells) or 1 μ g (pericytes) of poly(A)⁺RNAs were electrophoresed, transferred onto nylon membranes and hybridized with ³²P-labeled vascular endothelial growth factor (VEGF) cDNA (upper panels). After analysis with VEGF cDNA, the membranes were hybridized with β -actin cDNA (lower panels). Bars indicate the position of 28S and 18S RNAs. The EC blot was exposed for 14 days, the pericyte blot was for 4 days and U251MG blot for 2 days.

ヒト VEGF 遺伝子からはオルタナティブスプライシングにより鎖長の異なる4種の mRNA が生じ¹⁰⁾、このうち鎖長の長い2つの mRNA 分子種からは非分泌型の VEGF₁₈₈、VEGF₂₀₆ が、残る2種からは分泌型の VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅ の蛋白質産物が生ずる(図3A)。そこで、血管細胞に存在する VEGF mRNA がどのタイプの産物をコードしているかを同定するため、ノーザン法に比べより高感度で、また、より詳細な鎖長算定が可能な RT-PCR 法での解析を行った。この際プライマーは、4種の VEGF mRNA いずれにも共通する5'および3'領域に対して作製した。その結果、図5に示すように、内皮細胞ポリ(A)⁺RNA、周皮細胞ポリ(A)⁺RNA のいずれを鋳型にした場合にも486bpと618bpのDNA断片が増幅された。これら2種の増幅産物はそれぞれ分泌型の VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅ に対応した(図3A参照)。非分泌型 VEGF に対応する mRNA 分子種は、最大100ngのポリ(A)⁺RNA を用いた50サイクルの RT-PCR でも検出されなかった。

2. 低酸素下での血管細胞 VEGF mRNA レベルの増大

つぎに、内皮細胞と周皮細胞における VEGF 遺伝子の発現が低酸素によりどう影響されるかを RT-PCR 法にて調べた。このため、まず U251MG より分離したポリ(A)⁺RNA を鋳型として RT-PCR 反応条件の検定を行った¹⁶⁾。図4Aは、横軸に鋳型 RNA 量、縦軸に増幅産物のシグナル強度をプロットした検量曲線である。486bp および 618bp の VEGF DNA 断片の増幅は鋳型 RNA 量 50ng までは鋳型量に依存して直線的に進行したが、鋳型量が 50ng を超えると増幅曲線は平坦化した。次にサイクル数依存性を見ると、図4Bに示すように、VEGF mRNA では増幅反応は30サイクルまで直線的に進行し、30サイクル以上ではプラトーに達した。したがって、以下の実験では定量性をもつと考えられる鋳型ポリ(A)⁺RNA 量 30ng、増幅サイクル数25回の条件で RT-PCR を行った。対照の β -アクチン mRNA 由来 DNA 断片についても同様の増幅曲線を作成し、鋳型量 30ng、15サイクルの条件にてコントロール反応を行った。

種々の酸素濃度で24時間培養した内皮細胞(0%, 2.5%, 5%, 10%, 20%O₂)と周皮細胞(0%, 2.5%, 10%, 20%O₂)からポリ(A)⁺RNA を分離し、上記の定量的 RT-PCR 法により VEGF mRNA レベルを検討した結果が図5である。内皮細胞、周皮細胞のいずれにおいても酸素濃度の低下に伴って VEGF mRNA レベルが著しく増大することが見いだされた。後に図8Aに示すように VEGF mRNA レベルは無酸素状態で最も高く、内皮細胞では20%酸素時の約8倍、周皮細胞では約9倍にまで増加した。シグナルが増強されたのは分泌型の VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅ に対応する 486bp、618bp の二本のバンドで、非分泌型の VEGF₁₈₈、VEGF₂₀₆ に対応する mRNA のバンドは無/低酸素状態でも検出されなかった。なお、この定量的 RT-PCR 解析から、内皮細胞、周皮細胞、U251MG 細胞に存在する VEGF mRNA 量の相対比もまとめられ、通常酸素濃度下ではおよそ 1:1:10、無酸素状態でもほぼ同率であった。無酸素時の内皮細胞および周皮細胞での VEGF mRNA レベルは、VEGF mRNA 含量の高いグリオーマ細胞の20%酸素濃度でのレベルにほぼ匹敵した。

III. 血管細胞における VEGF 受容体遺伝子の発現

1. サブタイプ特異的なプライマーとプローブを用いた VEGF 受容体 mRNA の検出

VEGF は他の増殖因子と同様細胞膜に局在する受容体を介して標的細胞に作用する¹⁸⁾¹⁹⁾。これまでヒト VEGF 受容体としては *flt1*⁹⁾²⁰⁾, *flt4*⁹⁾²¹⁾, *kdr*¹⁰⁾¹¹⁾ の 3 種が知られており、いずれも受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する。内皮細胞がどのタイプの VEGF 受容体遺伝子を発現しているかがつぎの問題となるが、*flt1*, *flt4*, *kdr* mRNA は塩基配列のホモロジーが高いため²¹⁾、通常のノーザン法では 3 種の mRNA を峻別しがたいと考えられた。そこで、サブタイプ特異的なプライマーとプローブを用いた RT-PCR 法による分析を試みた。すなわち、他の 2 種の mRNA とは比較的ホモロジーが低い部分に対し増幅産物のサイズも互いに異なるように設計したプライマーを用いて RT-PCR を行い、さらに、得られた増幅産物をサザンブロットング後配列特異性の高い内部プローブとハイブリダイズさせるという方法である (図 3B)。図 6A に内皮細胞ポリ (A)⁺RNA を鋳型とした場合の結果を示した。*flt1* プライマーでは 1098bp の DNA 断片が増幅され、この増幅産物は *flt1* プローブとハイブリダイズし、*flt4*, *kdr* プローブとはハイブリダイズしなかった。*flt4*, *kdr* プライマーを用いるとそれぞれ 298bp, 555bp の DNA 断片が増幅され、各産物は *flt4* あるいは

kdr プローブとのみハイブリダイズした。したがって、この RT-PCR 法により各 VEGF 受容体 mRNA 種が選択的に検出されると考えられた。なお、図 6B, C に示す検量曲線から、VRGF mRNA の場合と同様、ポリ (A)⁺RNA 30ng, 25 サイクルの条件で増幅反応が定量的に進行すると判定されたので、以下の実験ではこの条件を採用した。コントロールの β -アクチンはポリ (A)⁺RNA 30ng, 15 サイクルの条件で増幅を行った。

2. 内皮細胞における VEGF 受容体 mRNA の発現と低酸素の効果

内皮細胞では、*flt1*, *flt4* および *kdr* の 3 種の受容体サブタイプをコードする mRNA すべてに由来するバンドが検出された (図 7)。ハイブリダイゼーションバンドの放射活性を比較すると、発現程度は *kdr* \gg *flt4* $>$ *flt1* の順に大きかった。しかし、どの受容体 mRNA レベルも 24 時間の低酸素 (2.5%, 5%, 10%) あるいは無酸素 (0%) 培養では変化しなかった (図 8B)。

3. 周皮細胞における VEGF 受容体 mRNA の発現と低酸素の効果

通常の酸素濃度で培養した周皮細胞では、*flt1*, *flt4*, *kdr* のどの mRNA も検出されなかった。ところが、周皮細胞を低酸

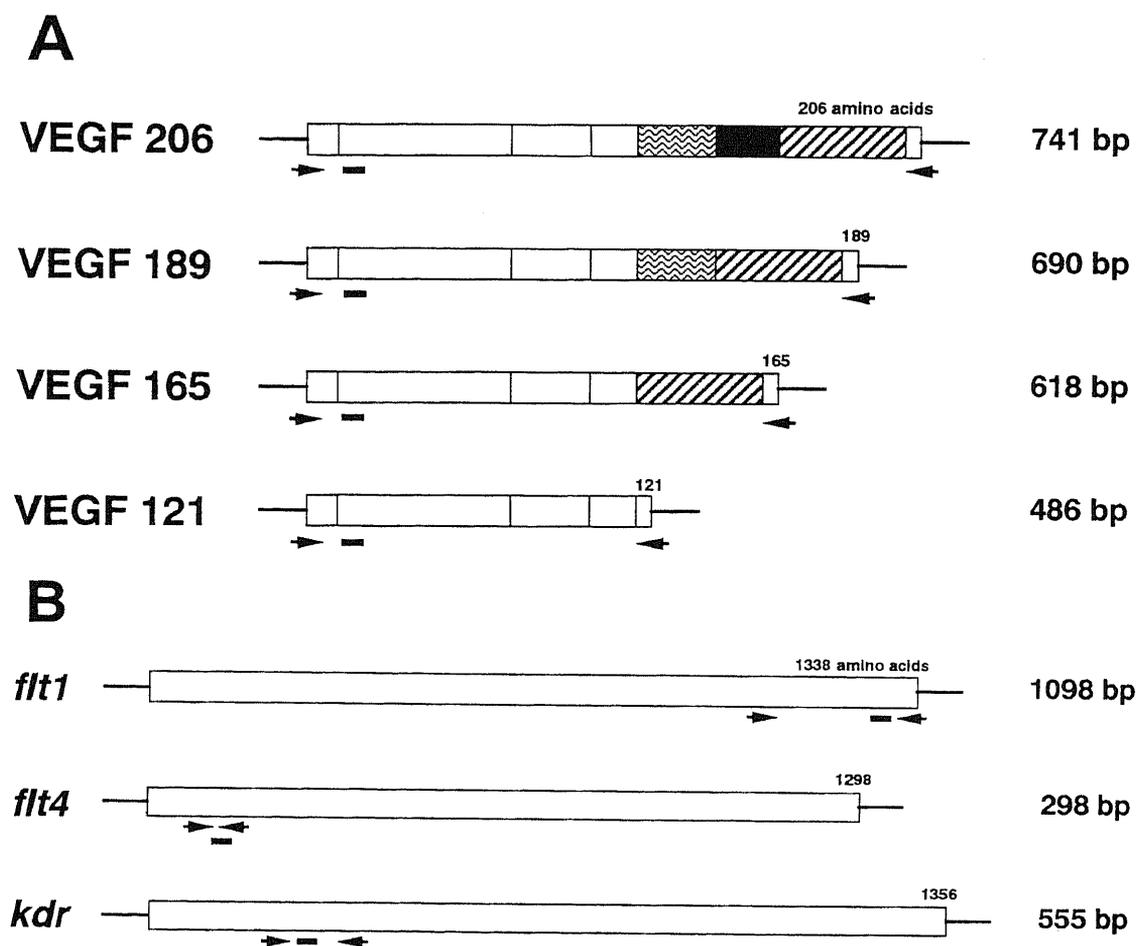


Fig. 3. Primers and probes for detecting VEGF and its receptor mRNAs. A) Schematic representation of four alternative splicing products of human VEGF gene. Boxes indicate open reading frames. Arrows indicate primers used for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Bars indicate probes for Southern hybridization. Expected sizes of RT-PCR products are indicated on the right. B) Schematic representation of human VEGF receptor mRNAs. Boxes indicate open reading frames. Arrows and bars indicate respective primers and probes that are specific for *fms*-like tyrosine kinase 1 (*flt1*), *fms*-like tyrosine kinase 4 (*flt4*) and kinase insert domain-containing receptor (*kdr*) mRNAs. Expected sizes of RT-PCR products are indicated on the right.

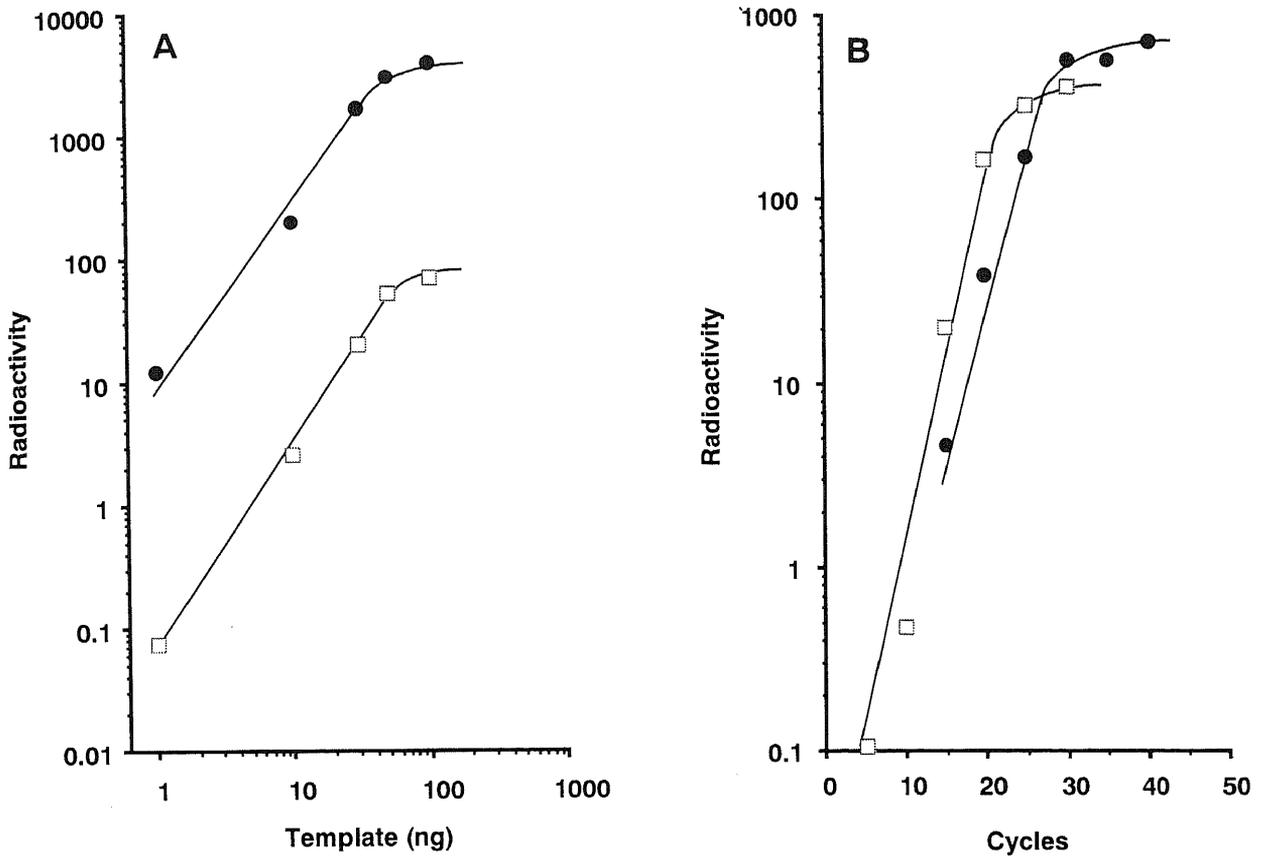


Fig. 4. Quantitative RT-PCR analysis of VEGF mRNA. Poly(A)⁺RNA from U251MG cells was used as template for the determination of the exponential range. Serial dilution for VEGF were carried to 25 cycles and for β -actin were to 15 cycles. All sequential cycles were initiated with 30ng of poly(A)⁺RNA. Signal intensities of RT-PCR products are expressed as the arbitrary logarithm values of radioactivities, and plotted against template amounts (A) and cycle numbers (B), respectively. Radioactivities of hybridization bands were measured with a Fujix BA100 BioImage analyser. ●, VEGF; □, β -actin.

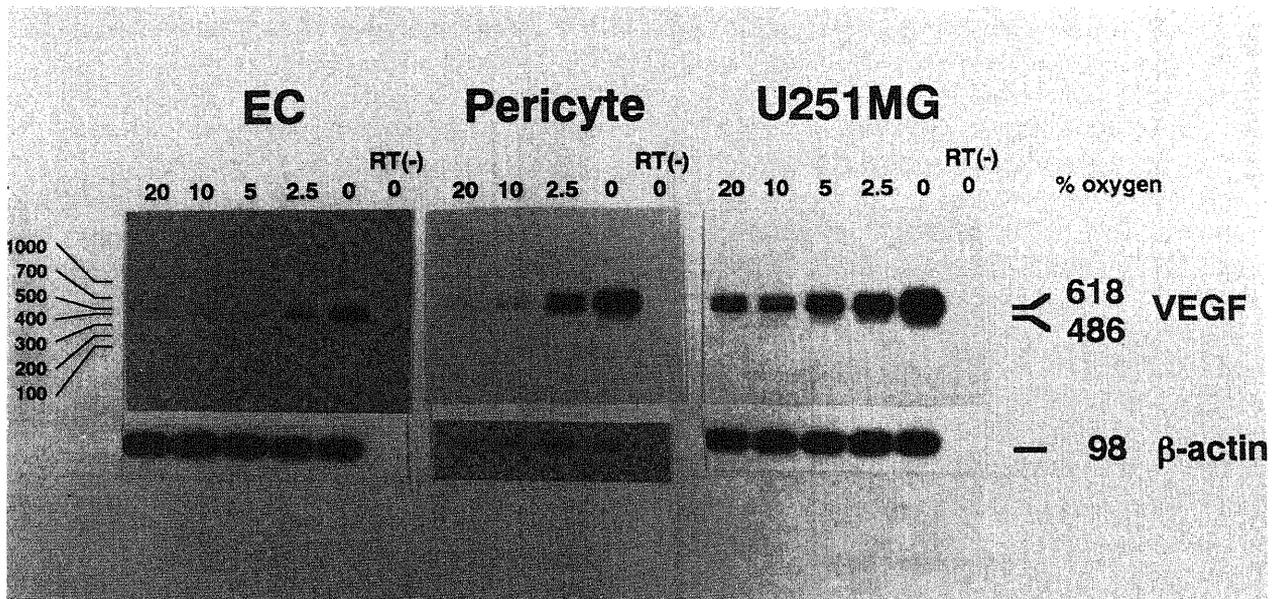
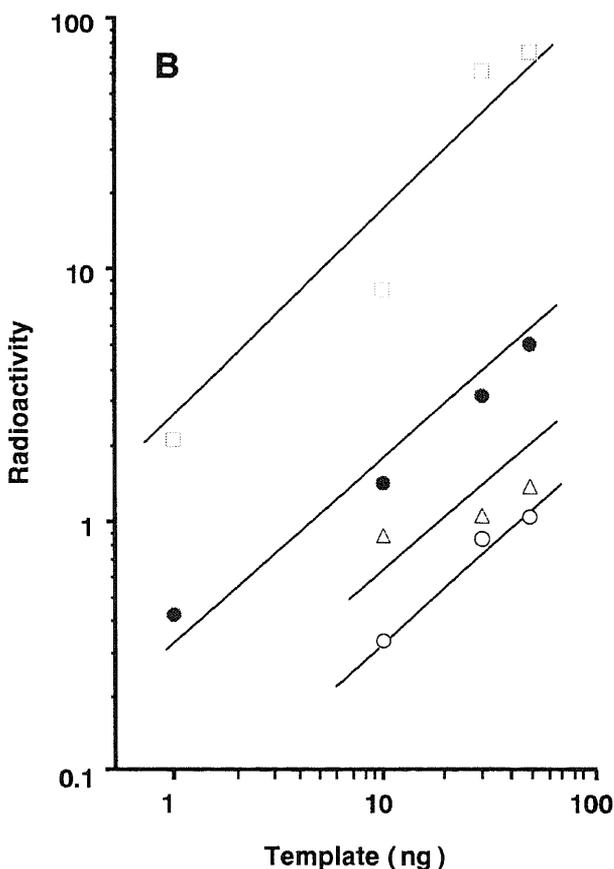
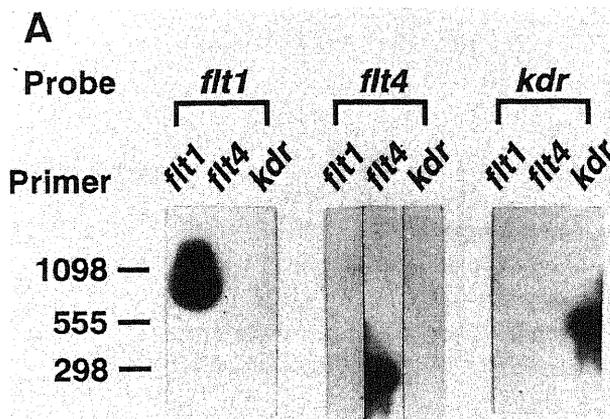


Fig. 5. Expression of VEGF mRNA in vascular cells. Thirty ng of poly(A)⁺RNAs from endothelial cells (EC), pericytes and U251MG cells, which had been incubated under various oxygen tensions, were amplified by RT-PCR. The RT-PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel, transferred onto nylon membranes and hybridized with ³²P-labeled VEGF (upper panel) or β -actin (lower panel) mRNA-specific probes. Bars on the left side indicate size markers and bars on the right side the size of each product in base pairs (bp). RT (-) indicates the reaction without reverse transcriptase. The EC and pericyte blots were exposed for 4 hr, and the U251MG blot was for 1 hr.

素下で培養すると *flt1* の遺伝子の発現が誘導され、*flt1* mRNA レベルは無酸素状態ではさらに増大することが見いだされた (図 9A, B). 他方、*flt4*, *kdr* mRNA は低/無酸素状態でも出現せず、鋳型ポリ (A)⁺RNA 量およびサイクル数を 100ng, 35回まで増やしても検出されなかった.

IV. VEGF mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドによる内皮細胞 DNA 合成の抑制



VEGF が低酸素による血管内皮細胞の増殖誘導に機能的に関わっているかどうかをみるため、VEGF mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (図10) を作製して内皮細胞の DNA 合成におよぼす効果を調べた. 図11にその結果を示した. 低酸素 (10%) 培養内皮細胞の培地中にアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与すると、DNA への [³H] チミジン取り込みが用量依存的に抑制され、³H 放射活性は 1, 2, 5, 10 μ M のアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度で各々対照の 82.3, 57.2, 34.8, 22.2% に有意に低下した. センスオリゴヌクレオチドは内皮細胞 DNA への [³H] チミジン取り込みを阻害しなかった.

考 察

血管新生は、腫瘍の増殖や虚血性病変の進行に伴って起こる医学上重要な生体反応のひとつで、つぎの4つの過程に大別される²²⁾²³⁾. すなわち、1) 細小血管内皮細胞の活性化とそれに引き続く基底膜の破壊、2) 内皮細胞の遊走、3) 内皮細胞の増殖、4) 内皮細胞による管腔形成と周皮細胞による包囲である. 筆者は、このうち血管細胞増殖の問題に関して、血管新生の主要因のひとつである低酸素がどのように内皮細胞と周皮細胞の増殖を誘導するかを追及した.

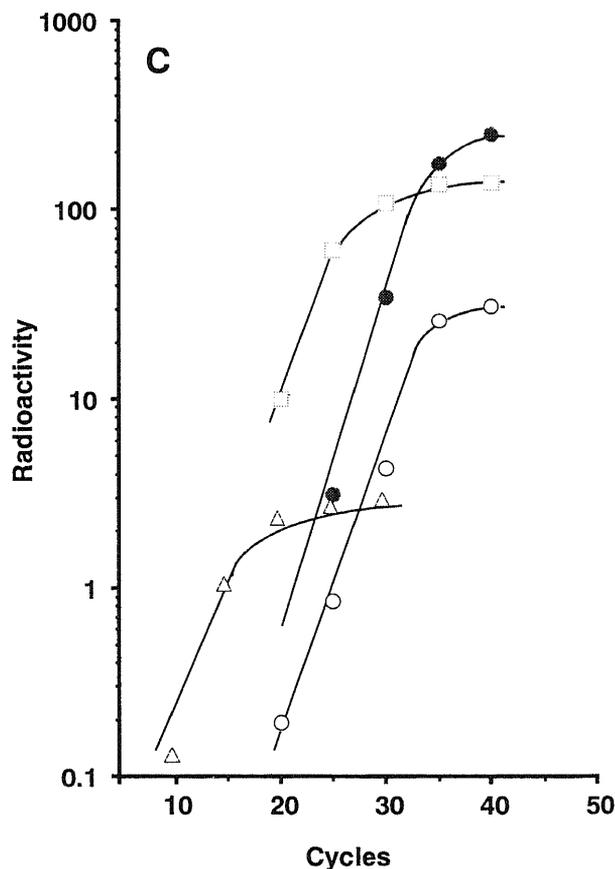


Fig. 6. Specific and quantitative detection of *flt1*, *flt4* and *kdr* mRNAs. A) Each probe specifically binds to the product of RT-PCR conducted with corresponding primers. Bars indicated the size of each product in bp. B) and C) Estimation of conditions for RT-PCR. Poly(A)⁺RNA from endothelial cells was used as template. Serial dilution for *flt1*, *flt4* and *kdr* were carried to 25 cycles and for β -actin were to 15 cycles. All sequential cycles were initiated with 30ng of poly(A)⁺RNA. Signal intensities of RT-PCR products are expressed as the arbitrary logarithm values of radioactivities, and plotted against template amounts (B) and cycle numbers (C), respectively. Radioactivities of hybridization bands were measured with Fujix BA100. \circ , *flt1*; \bullet , *flt4*; \square , *kdr*; \triangle , β -actin.

まず、培養化した内皮細胞と周皮細胞を低酸素にさらすと、いずれの細胞種でも生細胞数が有意に増加することが認められた。細胞増殖促進における酸素の最大有効濃度は内皮細胞で10%、周皮細胞で2.5%であった。この値は、内皮細胞が7.5

%²⁴⁾、周皮細胞は3%²⁵⁾の酸素濃度で最も増加したという他の研究者の観察値とほぼ一致する。

本研究で筆者は、血管内皮に特異的な増殖因子である VEGF をコードする mRNA が内皮細胞のみならず周皮細胞に

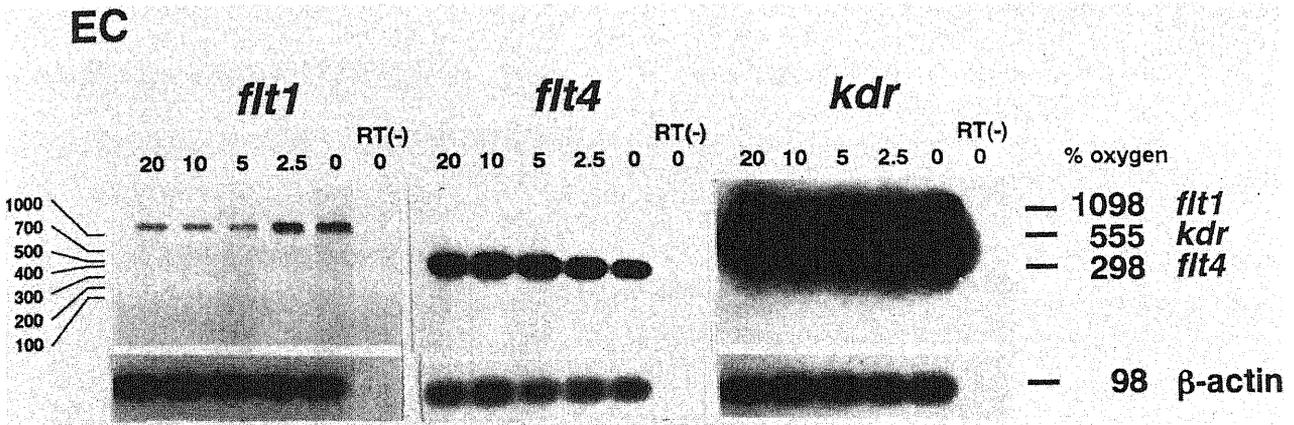


Fig. 7. Expression of VEGF receptor genes in endothelial cells (EC). Thirty ng of poly(A)⁺RNA from endothelial cells having been incubated under indicated O₂ concentrations was amplified by RT-PCR and hybridized with *flt1*, *flt4*, *kdr* (upper panels) and β -actin (lower panels) mRNA-specific probes. RT (-) indicates the reaction without reverse transcriptase. All blots were exposed for 18 hr. Bars on the left side indicate size markers and bars on the right side the size of each product in bp.

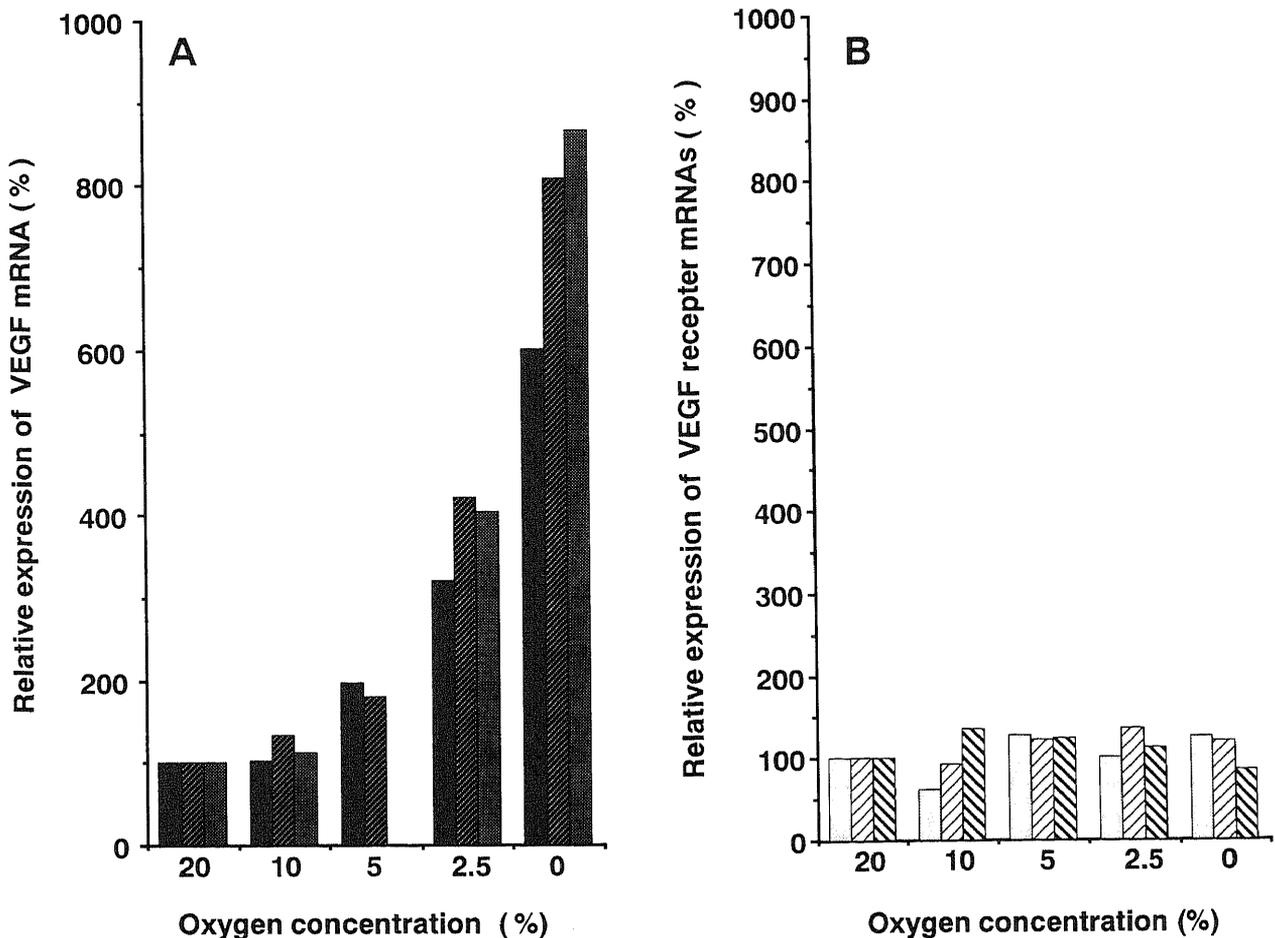


Fig. 8. Relative amounts of VEGF, *flt1*, *flt4* and *kdr* mRNAs in vascular cells. Radioactivities of hybridization bands seen in Figs. 5 and 7 were measured with Fujix BA100. Amounts of VEGF mRNA in endothelial cells, pericytes and U251MG cells (A) and of *flt1*, *flt4* and *kdr* mRNAs in endothelial cells (B) were standardized by that of β -actin mRNA, and related to the values under 20% O₂. ■, U251MG; ▨, endothelial cells; ■, pericytes; □, *flt1*; ▤, *flt4*; ▩, *kdr*.

も存在することを見出し、さらに、これらの血管細胞における VEGF 遺伝子の発現が低酸素により著しく誘導されることをはじめて明らかにした。VEGF は、Ferrara ら²⁶⁾によりウシ下垂体星状細胞培養液中から見いだされた血管内皮に特異的とされる増殖因子で、その cDNA クローニングによりほぼ同時期に血管の透過性を亢進させる因子として同定された血管透過性因子 (vascular permeability factor, VPF)^{27)~30)}と同一遺伝子の産物であることが判明した。その後、VEGF は卵巣³¹⁾³²⁾や腫瘍組織^{33)~36)}など血管新生のさかんな組織で産生されていることが報告され、また、悪性神経膠種の虚血部分や低酸素培養した悪性神経膠種細胞で VEGF mRNA レベルが増大していることも観察されてきたことから^{37)~5)}、生体が低酸素にさらされた際に血管新生を促す因子の最有力候補と目されている。本研究で筆者は、血管細胞自体で発現し低酸素で増加する VEGF mRNA は分泌型の VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅をコードしていることも明らかにした。この知見は、VEGF がオートクリンまたはパラクリンに作用して血管細胞自身の増殖誘導に関わっている可能性を示唆している。

一般に、増殖因子がその作用を発揮するには、増殖因子と結合シグナルを細胞内に伝える受容体が標的細胞で発現されている必要がある。VEGF 受容体遺伝子としては当初プロトオンコジーンとして見いだされた *flt1*⁴⁾⁸⁾²⁰⁾、*flt4*⁹⁾²¹⁾³⁷⁾と *kdr*¹⁰⁾¹¹⁾³⁸⁾³⁹⁾が知られており、いずれも細胞外に7個の免疫グロブリンドメイン、細胞内にはチロシンキナーゼドメインをもつ膜貫通型受容

体をコードしている²¹⁾。本研究で筆者は、内皮細胞では3種の VEGF 受容体遺伝子すべてが酸素濃度の高低にかかわらず構成的に発現していることをはじめて明らかにした。mRNA 量は *kdr* > *flt4* > *flt1* の順に多いことから、内皮細胞では *kdr* 蛋白が VEGF からのシグナルを受容する主要なレセプター分子種であろうと推定される。一方、周皮細胞では *flt1* mRNA のみが低/無酸素状態で検出された。同じ血管系細胞でありながら、*flt1* 遺伝子が内皮細胞では構成的、周皮細胞では誘導的というように発現様式を異にしていることは、今後 VEGF 受容体遺伝子の発現調節機構を考えるうえで興味深い。

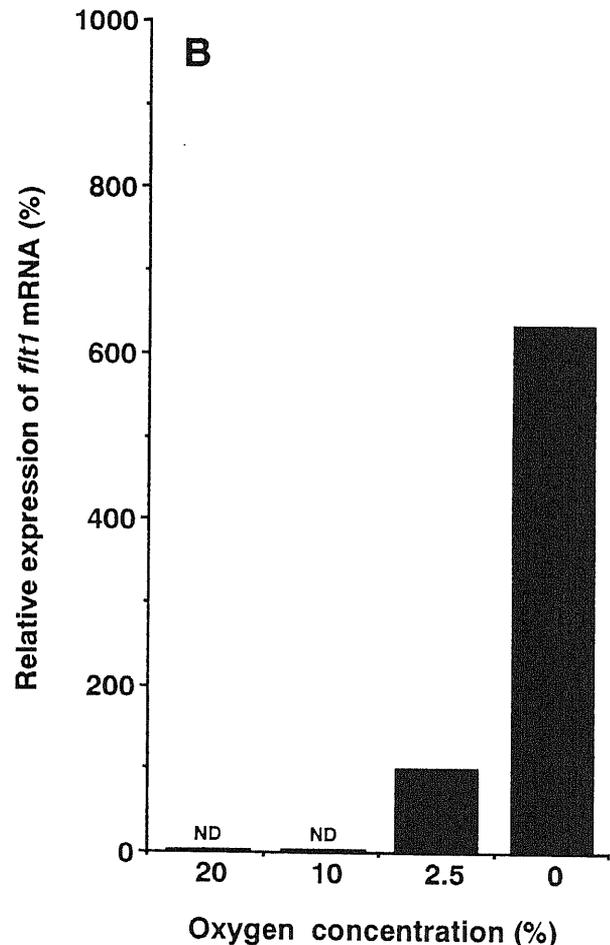
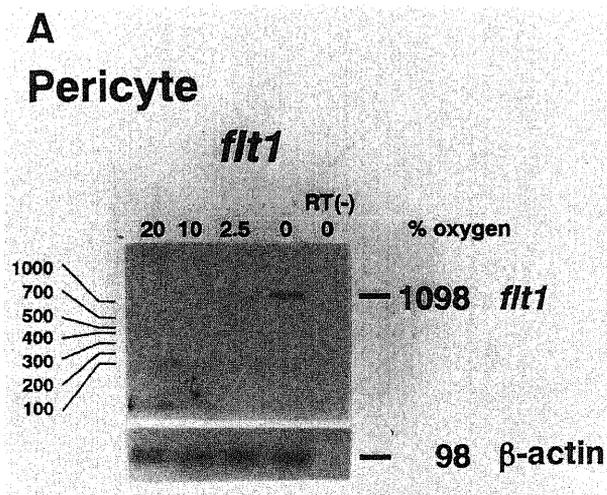
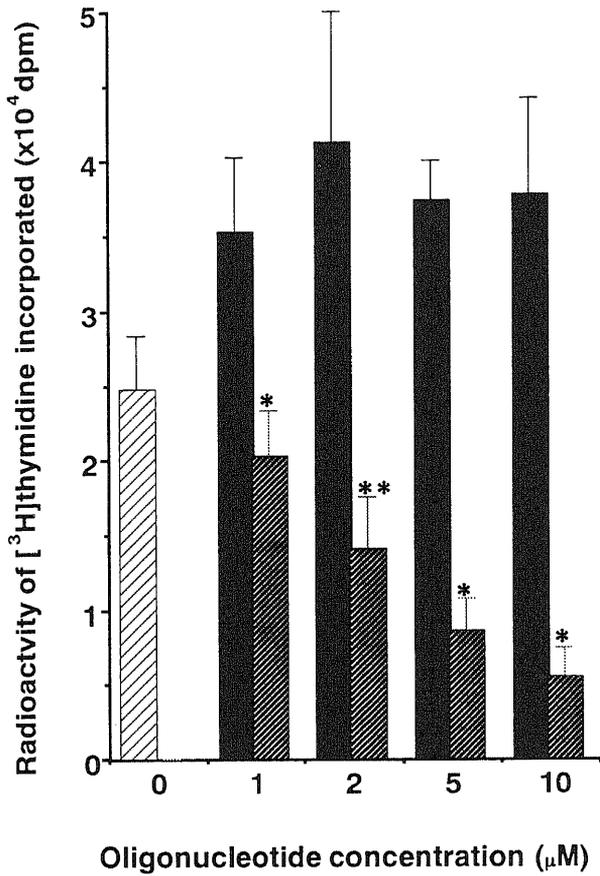


Fig. 9. Expression of *flt1* mRNA in pericytes. A) Southern blot analysis of quantitative RT-PCR products. Thirty ng of poly (A)⁺RNA from pericytes having been incubated under indicated O₂ concentrations was amplified by RT-PCR and hybridized with *flt1* (upper panels) and β -actin (lower panels) mRNA-specific probes. RT (-) indicates the reaction without reverse transcriptase. The film was exposed for 7 days. *flt4* and *kdr* transcripts were not detected. As a reason for it, the possibility that the primers and probes did not work well with the bovine mRNA sequences could not be excluded. Bars on the left side indicate size markers and bars on the right side the size of each product in bp. B) Relative amounts of *flt1* mRNA in pericytes. Radioactivities of hybridization bands seen in panel A were measured with Fujix BA100. The amount of *flt1* mRNA was standardized by that of β -actin mRNA and related to the value under 2.5% O₂. ND, not detected.

Antisense : 5'-CCCAAGACAGCAGAAAGTT CAT-3'

Sense : 5'-ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGG-3'

Fig. 10. Nucleotide sequences of antisense and sense 22 mer oligodeoxyribonucleotides. Initiation codon and its complement are boxed.



以上の知見は、血管細胞自身が VEGF の生合成系と反応系とを合わせもつことを示している。内皮細胞の場合、VEGF 遺伝子の発現レベルは酸素濃度で変化するのに対し、VEGF 受容体遺伝子とくに *kdr* の発現は恒常的に高く保たれていることから、VEGF のオートクリン作用のうえでは VEGF 遺伝子の発現が律速段階と考えられる。

本研究ではさらに、低酸素による内皮細胞の増殖誘導に VEGF が原因に関係していることを示す証拠も得た。すなわち、VEGF mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドで VEGF 遺伝子の発現をブロックすると、低酸素下での内皮細胞の DNA 合成が有意に抑制されることである。これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて VEGF の機能の一端を解き明かした最初の例である。

以上本研究で得られた知見から、筆者は、低酸素による血管細胞の増殖誘導機構に関する一つのモデルを提唱する。すなわち、図12に示すように、通常の酸素濃度では内皮細胞と周皮細胞

Fig. 11. Effect of antisense oligodeoxyribonucleotide on DNA synthesis in endothelial cells. After endothelial cells had been cultured for 24 hr in the presence of indicated concentrations of antisense or sense oligonucleotides, [³H] thymidine was added to a final concentration of 1 μCi/ml and the cells were further cultured for 4 hr. Culture was carried out under 10% O₂ in RPMI1640/medium 199 (1/1) supplemented by 15% FBS without ECGS or heparin. Radioactivity of [³H] thymidine incorporated is expressed as dpm. Bars represent the mean for triplicate experiments ± SD. *, p < 0.05, **, p < 0.01 compared to the value for the culture without oligonucleotides (Student's *t* test). □, control; ■, sense; ▨, antisense.

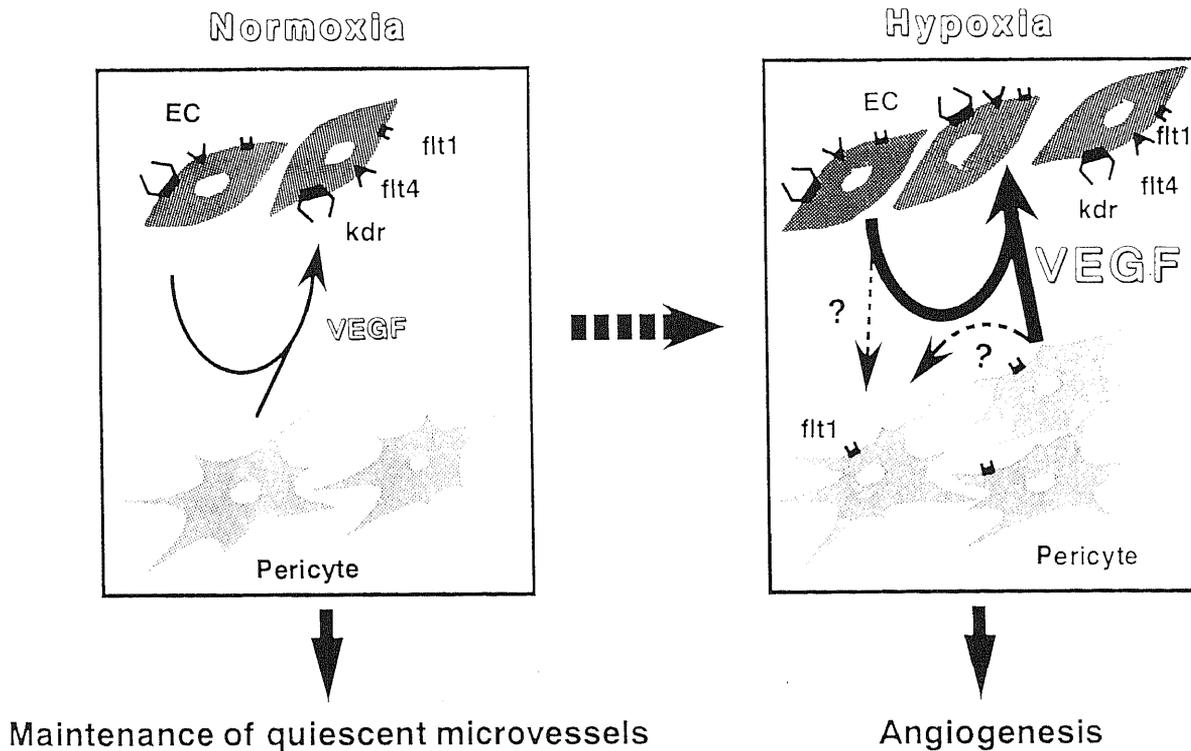


Fig. 12. A possible mechanism of hypoxia-induced proliferation of vascular endothelial cells (EC) and pericytes.

胞が少量の分泌型 VEGF を産生し、内皮細胞の修復維持に関係している。ところが、酸素濃度が低下すると、内皮細胞と周皮細胞の両方で VEGF 遺伝子の発現が増大し、分泌型 VEGF の産生が増し、この VEGF が内皮細胞では主として kdr 受容体、周皮細胞では flt1 受容体を介してオートクリン/パラクリンに作用する。この結果、血管細胞の増殖が誘導される、という考え方である。このモデルに従えば、上記の一連の過程をどこかの段階で断ち切ることで血管新生を阻止しないしは軽減することも理論上可能となる。例えば、本研究で用いたような VEGF mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムを局所的に投与して血管新生を抑制し腫瘍の進展を妨げるといった手段も考えられる。なお上記仮説中、内皮細胞に特異的な増殖因子とされる VEGF が実際周皮細胞の増殖にも関与するか否かは今後の検証を要する。

筆者のモデルは内皮細胞と周皮細胞の純培養系で得られた試験管内の実験結果に基づくもので、低酸素による血管細胞の増殖誘導機構の一部はこのモデルで説明できると考えられるが、生体でおこる血管新生のしくみの全容を理解するには他の増殖因子の関与も考慮する必要がある。血管新生に関係すると考えられる因子としては VEGF 以外に酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic fibroblast growth factor, aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF)、 α 型トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- α , TGF- α)、 β 型トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板由来増殖因子-B (platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) があり⁴⁰⁻⁴³、とくに bFGF⁴⁴、TGF- β ⁴⁵ と PDGF-B⁴⁶ は内皮細胞自身が産生する増殖因子としても知られている。これらのうち bFGF は、内皮細胞の遊走、増殖のみならず基底膜を破壊するプラスミノゲンアクチベーターの産生も促進するなど強力な血管新生活性を有する⁴⁷ が、低酸素下に内皮細胞をおいても bFGF mRNA レベルは変化しないことが示されている⁴⁸。TGF- β は、直接的には内皮細胞自身の増殖を抑制するが、マクロファージに種々の増殖因子を産生させ間接的に血管新生を促進する⁴⁹。しかし、TGF- β の発現も低酸素による影響を受けない⁴⁰。PDGF は、従来内皮細胞には作用しないとされていたが、最近 Funai ら⁴⁶ により毛細血管には PDGF- β 受容体が存在し、PDGF-B が内皮細胞の増殖を促進することが立証された。前二者とは異なり、内皮細胞における PDGF-B の発現は低酸素により増大することが示されている⁴⁶。したがって、通常の生理的条件下では内皮細胞のオートクリン因子として bFGF や VEGF、PDGF-B が内皮細胞の恒常性の維持に関係しており、低酸素時には主として増量した VEGF と PDGF-B が協調的に作用して内皮細胞増殖を促すものと推察される。この場合、VEGF と PDGF-B の量比や受容体後シグナル伝達機構の異同が問題となるが、これらの点については今後の検討を待たねばならない。

Yamagishi らは、周皮細胞は通常内皮細胞の増殖を抑制することを見出し、この増殖抑制因子が TGF- β もしくはヘパラン硫酸である可能性を示唆するとともに⁹、内皮細胞がエンドセリン 1 を介して周皮細胞の増殖を促進することを明らかにしている⁵⁰。低酸素状態では、内皮細胞でのエンドセリン 1 産生が増すことが知られており⁵¹、一方、本研究で周皮細胞における VEGF mRNA の発現が増大することも見出された。した

がって、周皮細胞は内皮細胞の増殖促進因子、抑制因子の両者の産生能を有する、内皮細胞増殖の指令細胞とも見なされる。低酸素状態における周皮細胞の挙動については不明な点が多いが、おそらく周皮細胞自身も「活性化」されて増殖促進因子優位の状態へと転換され、VEGF や PDGF、エンドセリンを介する相乗作用により内皮細胞共々増殖方向に向かうものと思われる。

結 論

血管新生の主要因のひとつである低酸素がどのように血管内皮細胞、周皮細胞の増殖を誘導するかにつき VEGF の発現と作用の観点から追及し、以下の新知見を得た。

1. 培養化した内皮細胞、周皮細胞の増殖は低酸素により促進された。
2. 内皮細胞、周皮細胞ともに VEGF mRNA を発現しており、低酸素は両者での VEGF mRNA レベルを増大させた。
3. 内皮細胞では VEGF 受容体である *flt1*、*flt4*、*kdr* の三種の mRNA すべてが酸素濃度にかかわらず恒常的に発現しており、その発現程度は *kdr* \gg *flt4* $>$ *flt1* の順であった。一方、周皮細胞では *flt1* mRNA の発現が低酸素により誘導された。
4. VEGF mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により低酸素下での内皮細胞 DNA 合成が有意に抑制された。

以上の結果から、低酸素状態では内皮細胞、周皮細胞の増殖が誘導され、この誘導には VEGF がオートクリン/パラクリン作用を介して関与していると結論された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました金沢大学医学部生化学第二講座の山本 博教授に心から感謝致します。さらに御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部脳神経外科学講座ならびに生化学第二講座の皆様にも感謝致します。

文 献

- 1) Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-1309 (1989).
- 2) Gospodarowicz, D., Abraham, J. A. & Schilling, J.: Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7311-7315 (1989).
- 3) Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E.: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**, 843-845 (1992).
- 4) Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A. & Risau, W.: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature*, **359**, 845-848 (1992).
- 5) Phillips, H. S., Armani, M. P., Stavrou, D., Ferrara, N. & Westphal, M.: Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial

neoplasms: association with regions of necrosis. *Int. J. Oncol.*, **2**, 913-919 (1993).

6) Yamagishi, S., Kobayashi, K. & Yamamoto, H.: Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 418-425 (1993).

7) Weindel, K., Marmé, D. & Weich, H. A.: AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1167-1174 (1992).

8) Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsumura, H. & Sato, M.: Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene*, **5**, 519-524 (1990).

9) Galland, F., Karamysheva, A., Pebusque, M.-J., Borg, J.-P., Rottapel, R., Dubreuil, P., Rosnet, O. & Birnbaum, D.: The *FLT4* gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene*, **8**, 1233-1240 (1993).

10) Terman, B. I., Carrion, M. E., Kovacs, E., Rasmussen, B. A., Eddy, R. L. & Shows, T. B.: Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, **6**, 1677-1683 (1991).

11) Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D. & Böhlen, P.: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 1579-1586 (1992).

12) Ninomiya, I., Endo, Y., Yonemura, Y., Noguchi, M., Fushida, S., Nakai, M., Takamura, H., Harada, F., Suzuki, T., Miyazaki, I. & Sasaki, T.: Specific detection of *c-erbB-2* mRNA expression in gastric cancers by the polymerase chain reaction following reverse transcription. *Br. J. Cancer*, **66**, 84-87 (1992).

13) Thomas, L. L. & Price, C. M.: Cellular uptake, distribution, and degradation of phosphorothioate oligonucleotides in *Euplotes crassus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **660**, 328-330 (1992).

14) Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F. & Heldin, C.-H.: Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4098-4103 (1987).

15) Aviv, H. & Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1408-1412 (1972).

16) Wang, A. M., Doyle, M. V. & Mark, D. F.: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9717-9721 (1989).

17) Ferrara, N., Winer, J. & Burton, T.: Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*, **5**, 141-148 (1991).

18) Ullrich, A. & Schlessinger, J.: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212 (1990).

19) Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. & Soltoff, S.: Oncogenes and signal transduction. *Cell*, **64**, 281-302 (1991).

20) De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. & Williams, L. T.: The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, **255**, 989-991 (1992).

21) Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R. & Alitalo, K.: Flt4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.*, **52**, 5738-5743 (1992).

22) Folkman, J. & Shing, Y.: Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931-10934 (1992).

23) Folkman, J. & Haudenschild, C.: Angiogenesis *in vitro*. *Nature*, **288**, 551-556 (1980).

24) Kan, M., Kato, M. & Yamane, I.: Long-term serial cultivation and growth requirements for human umbilical vein endothelial cells. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **21**, 181-188 (1985).

25) Brighton, C. T., Lorch, D. G., Kupcha, R., Reilly, T. M., Jones, A. R. & Woodbury II, R. A.: The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin. Orthopaed.*, **275**, 287-299 (1992).

26) Ferrara, N. & Henzel, W. J.: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 851-858 (1989).

27) Lobb, R. R., Key, M. E., Alderman, E. M. & Fett, J. W.: Partial purification and characterization of a vascular permeability factor secreted by a human colon adenocarcinoma cell line. *Int. J. Cancer*, **36**, 473-478 (1985).

28) Bruce, J. N., Criscuolo, G. R., Merrill, M. J., Moquin, R. R., Blacklock, J. B. & Oldfield, E. H.: Vascular permeability induced by protein product of malignant brain tumors: inhibition by dexamethasone. *J. Neurosurg.*, **67**, 880-884 (1987).

29) Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., Siegel, N. R., Leimgruber, R. M. & Feder, J.: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1470-1478 (1989).

30) Connolly, D. T., Olander, J. V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B. L., Leimgruber, R. & Feder, J.: Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20017-20024 (1989).

31) Phillips, H. S., Hains, J., Leung, D. W. & Ferrara, N.: Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology*, **127**, 965-967 (1990).

32) Garrido, C., Saule, S. & Gospodarowicz, D.: Trans-

- criptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors*, **8**, 109-117 (1993).
- 33) Levy, A. P., Tamargo, R., Brem, H. & Nathans, D.: An endothelial cell growth factor from the mouse neuroblastoma cell line NB41. *Growth Factors*, **2**, 9-19 (1989).
- 34) Conn, G., Soderman, D. D., Schaeffer, M-T., Wile, M., Hatcher, V. B. & Thomas, K. A.: Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1323-1327 (1990).
- 35) Senger, D. R., Connolly, D. T., Van De Water, L., Feder, J. & Dvorak, H. F.: Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.*, **50**, 1774-1778 (1990).
- 36) Morii, K., Tanaka, R., Washiyama, K., Kumanishi, T. & Kuwano, R.: Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 749-755 (1993).
- 37) Aprelikova, O., Pajusola, K., Partanen, J., Armstrong, E., Alitalo, R., Bailey, S. K., McMahon, J., Wasmuth, J., Heubner, K. & Alitalo, K.: *FLT4*, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. *Cancer Res.*, **52**, 746-748 (1992).
- 38) Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Manseau, E. J., Senger, D. R. & Dvorak, H. F.: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.*, **53**, 4727-4735 (1993).
- 39) Quinn, T. P., Peters, K. G., De Vries, C., Ferrara, N. & Williams, L. T.: Fetal liver kinase is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7533-7535 (1993).
- 40) Carpenter, G. & Cohen, S.: Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7709-7712 (1990).
- 41) Massagué, J.: Transforming growth factor- α . *J. Biol. Chem.*, **265**, 21393-21396 (1990).
- 42) Massagué, J.: Transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 597-641 (1990).
- 43) Folkman, J. & Klagsbrum, M.: Angiogenic factors. *Science*, **235**, 442-447 (1987).
- 44) Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J. A., Fiddes, J. C. & Gospodarowicz, D.: Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*, **325**, 257-259 (1987).
- 45) Sato, Y., Tsuboi, R., Lyons, R., Moses, H. & Rifkin, D. B.: Characterization of the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating systems. *J. Cell Biol.*, **111**, 757-763 (1990).
- 46) Heldin, C-H.: Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBOJ.*, **11**, 4251-4259 (1992).
- 47) Sato, Y. & Rifkin, D. B.: Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, **107**, 1199-1205 (1988).
- 48) Kourembanas, S., Hannan, R. L. & Faller, D. V.: Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **87**, 670-674 (1990).
- 49) Funai, K., Papanicolaou, V., Juhlin, C., Rastad, J., Akerström, G., Heldin, C-H. & Öberg, K.: Expression of platelet-derived growth factor β -receptors on stromal tissue cells in human cartinoid tumors. *Cancer Res.*, **50**, 748-753 (1990).
- 50) Yamagishi, S., Hsu, C-C., Kobayashi, K. & Yamamoto, H.: Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 840-846 (1993).
- 51) Kourembanas, S., Marsden, P. A., McQuillan, L. P. & Faller, D. V.: Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1054-1057 (1991).

Mechanism of Hypoxia-Induced Proliferation of Vascular Cells — Autocrine and Paracrine Actions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) — Motohiro Nomura, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 103, 394—407 (1994)

Key words endothelial cell, pericyte, hypoxia, vascular endothelial growth factor, receptor

Abstract

As a first step toward the elucidation of the mechanism for hypoxia-induced angiogenesis, human umbilical vein endothelial cells and bovine retinal pericytes were cultured under various oxygen tensions, and subjected to the following examinations: (1) the growth of the vascular cells, the key step of angiogenesis, (2) expression of the gene coding for vascular endothelial growth factor (VEGF), a specific mitogen for endothelial cells, and genes for their receptors, and (3) the effect of antisense oligodeoxyribonucleotide complementary to VEGF mRNA on the proliferative ability of endothelial cells. As a result, (1) the number of viable endothelial cells and pericytes was significantly increased under hypoxic conditions. (2) Northern blot and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analyses demonstrated that VEGF mRNA is present in both endothelial cells and pericytes, and that the VEGF mRNA level is significantly increased under hypoxic conditions. The three genes for VEGF receptors, *fms*-like tyrosine kinase 1 (*flt1*), *fms*-like tyrosine kinase 4 (*flt4*) and kinase insert domain-containing receptor (*kdrr*), were found to be constitutively expressed in endothelial cells, whereas only the *flt1* mRNA was detected in pericytes under hypoxic conditions. (3) Antisense oligonucleotide against VEGF mRNA significantly inhibited DNA synthesis in endothelial cells cultured under hypoxic conditions. These results indicate that the hypoxia-induced proliferation of vascular endothelial cells and pericytes is mediated by autocrine and paracrine actions of VEGF.