

Structure and Expression of VEGF Family :
Isolation of Bovine cDNA Encoding
VEGF-B, VEGF-C and PlGF, and Quantitative
Analysis of Their Expressions in Microvascular
Endothelial Cells and Pericytes

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/2297/9365

VEGFファミリー遺伝子群の構造と発現 — VEGF-B, VEGF-C, PlGFをコードするウシcDNAの分離と血管内皮細胞、 周皮細胞におけるVEGFファミリー遺伝子群発現の定量的解析 —

金沢大学医学部医学科生化学第二講座 (主任: 山本 博教授)

劉 暁 旭

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) ファミリーに属する新しいメンバー, VEGF-B, VEGF-C, 胎盤成長因子 (placenta growth factor, PlGF) の微小血管細胞での発現とその制御を明らかにする目的で, ウシ心臓由来cDNAライブラリーより各因子をコードするcDNAを分離して構造決定を行なった後, 決定した塩基配列に基づきウシ網膜微小血管周皮細胞とヒト皮膚微小血管内皮細胞でのVEGFファミリーの発現を定量的解析した. ウシVEGF-B cDNAは21アミノ酸のシグナル配列を含む188個のアミノ酸からなるタンパクをコードし, ヒト配列とヌクレオチドで93.7%, アミノ酸で93.6%の相同性を有していた. また, オルタナティブスプライシングにより生じたと考えられる186アミノ酸からなる成熟蛋白をコードするバリエーションが分離された. ウシVEGF-CのcDNAは20アミノ酸のシグナル配列を含む420個のアミノ酸からなるタンパクをコードし, ヒト配列と比較してヌクレオチドでは86.9%, アミノ酸では88.1%の相同性を有していた. ウシPlGF cDNAは20アミノ酸のシグナル配列を含む149個のアミノ酸からなるタンパクをコードし, ヒト配列とヌクレオチドでは74.9%, アミノ酸では75.2%の相同性を有していた. 正常酸素濃度または低酸素状態で培養したウシ網膜微小血管周皮細胞とヒト皮膚微小血管内皮細胞からポリA⁺ RNAを分離し, 逆転写 (reverse transcription, RT)-PCR法によりVEGFファミリーの発現を検討した結果, 両細胞でVEGFとともにVEGF-B, VEGF-C, PlGFすべてのmRNAが検出された. 競合PCR法により内皮細胞に存在するVEGFファミリーのmRNAは, おおよそVEGFが 7.5×10^5 コピー/ μ gポリA⁺ RNA, PlGFが 9.5×10^7 コピー/ μ gポリA⁺ RNAと算定された. VEGF-BとVEGF-Cは定量の範囲以下でそれぞれ 3.8×10^4 コピーおよび 4×10^2 コピー/ μ gポリA⁺ RNA以下と推定された. 同様に周皮細胞では, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, PlGF mRNAが μ gポリA⁺ RNAあたりそれぞれおおよそ 2.4×10^6 コピー, 1.2×10^5 コピー, 1.2×10^7 コピー, 2.4×10^4 コピーと算定された. 以上の結果より, 微小血管細胞自身がVEGFのみならずVEGFファミリーの他の因子を発現していること, なかでも内皮細胞ではPlGF, 周皮細胞ではVEGF-CがVEGFより多量に存在していることが明らかとなり, これら因子もVEGFとともにオートクリンまたはパラクリンに血管細胞自身に作用し血管の恒常性維持や血管新生に関与している可能性が考えられた.

Key words vascular endothelial growth factor family, microvascular endothelial cells, pericytes, hypoxia, cDNA cloning

血管新生は既存の毛細血管から新しい血管のネットワークが増生される現象で¹⁾²⁾, 個体の発生・成長や生殖, 創傷治癒が進行する上で必須である. また, がんの増殖・転移や糖尿病性微小血管症, リウマチ性関節炎などの進行・増悪は血管新生に依存することから, 血管新生のしくみおよびその制御機構を明らかにすることは, これら疾病の発症・進展の過程を理解し, その予防・治療法を解明する上で重要と考えられる.

実際の血管新生の場である微小血管は血管内皮細胞と血管周皮細胞から構成されており, これら二種の細胞間の相互作用が血管新生や血管機能の制御に重要と考えられる³⁾⁴⁾. 血管新生を誘導する最も主要な要因は組織の局所的な低酸素状態である

が, 金沢大学医学部生化学第二教室では先に, 微小血管を構成する細胞の培養系, すなわちヒト臍帯静脈内皮細胞とウシ網膜微小血管周皮細胞, を用いて低酸素状態での各々の細胞の動態を解析した結果, 低酸素状態で内皮細胞および周皮細胞で血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)⁵⁾をコードする遺伝子の発現が誘導されること, そして産生された分泌型VEGFがオートクリンまたはパラクリン的に作用して, 内皮細胞の増殖を促進することを発見した⁶⁾. また最近, ヒト成人皮膚微小血管内皮細胞の培養を用いて, 低酸素状態が微小血管内皮細胞でもその増殖と管腔形成を促進し, これがやはり血管細胞自身が産生するVEGFを介していることを明らかに

平成9年11月26日受付, 平成9年12月22日受理

Abbreviations : bp, base pairs; Flt-1 fms-like tyrosine kinase-1; Flt-4, fms-like tyrosine kinase-4; kbp, kilobase pairs; Kdr, kinase insert domain containing receptor tyrosine kinase; PlGF, placenta growth factor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGF-B, vascular endothelial growth factor-B; VEGF-C, vascular endothelial growth factor-C

した⁷⁻⁹。さらに、周皮細胞の低酸素状態での増殖促進が、低酸素で周皮細胞自身が産生するVEGFを介していることを明らかにした¹⁰。

ごく最近、VEGFと相同性を有する複数の因子、すなわちVEGF-B¹¹、VEGF-C¹²、胎盤成長因子 (placenta growth factor, PIGF)¹³が分離され、VEGFは複数のメンバーからなる遺伝子ファミリーを構成していることが明らかとなってきた。VEGF-Bの特異受容体はいまだ見出されていないが、VEGF-Cはfms様チロシンキナーゼ-4 (fms-like tyrosine kinase-4, Flt-4) [別名VEGF受容体-3 (VEGF receptor-3, VEGFR-3)] およびキナーゼインサートドメイン含有レセプターチロシンキナーゼ (kinase insert domain containing receptor tyrosine kinase, Kdr) (VEGFR-2) と、PIGFはFlt-1 (VEGFR-1) と相互作用することが示されている¹⁴。これらVEGFファミリーに属する新しいメンバーの生理機能はいまだ明確ではないが、これらの受容体はいずれも血管細胞で発現している⁷⁻¹⁰ことから、血管の恒常性維持や血管新生との関わりが考えられる。本研究では、血管細胞自身でのこれらVEGFファミリーの発現とその制御を明らかにすることを目的として、まずウシのVEGF-B、VEGF-C、PIGF

をコードするcDNAを分離して初めてそれらの構造を決定した。さらに、ウシ網膜微血管周皮細胞とヒト皮膚微血管内皮細胞におけるVEGFファミリーの各因子のmRNAの存在とその量比を明らかにすると共に低酸素に対する各遺伝子の応答性を解析した。

材料および方法

I. 材料

ウシ心臓由来cDNAライブラリーは、Uni-ZAPIIベクターに平均鎖長約1キロ塩基対 (kilobase pairs, kbp) のウシ心臓由来cDNAが挿入されたもので、Stratagene社 (La Jolla, 米国) から購入した。ヒト皮膚微血管内皮細胞はクラボウ社 (寝屋川) より恵与された。ウシ網膜周皮細胞は網膜微血管から既述の方法^{9,10}で分離し培養した。

II. ライブラリースクリーニング用プローブの調製

ヒトおよびマウスVEGF-B、VEGF-C、PIGFのホモロジー解析により両生物種間で保存度の高い領域を選定し、当該アミノ酸配列に対応するヒトcDNAのヌクレオチド配列に基づいてPCR用プライマーを設計した。VEGF-B用の5'および3'プライ

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used in RT-PCR and probes for detection of PCR products

mRNA	5' primer	3' primer	Probe
Human VEGF	5'-GGCCTCCGAAACCATGAACTTTCTGCT-3'	5'-CCTCCTGCCCGGCTCACCGC-3'	5'-GGTGAAGTTCATGGATGTCATTTCAGCGCAG-3'
Bovine VEGF	Same as above	Same as above	5'-CACACACTCCAGACTTTCGTCATTACAGCAG-3'
Human VEGF-B	5'-GCCAAACAGCTGGTGCCAG-3'	5'-CTTGGCAACGGAGGAAAGCTG-3'	5'-TCTGCATTCACACTGGCTGTGTTCTTCCA-3'
Bovine VEGF-B	5'-CACAGCCAGTGTGAATGCAGAC-3'	5'-GATGGCAGCCTTGAGAGAC-3'	5'-CACTGAGTCTGAAAAGCAGTTTGTACCTTCG-3'
Human VEGF-C	5'-GGTCCITCCACCATGCACTTGGC-3'	5'-GCATGCATTGAGTCTTCTCCACTC-3'	5'-CTCTGTTATGTTGCCAGCCTCCCTTCTCTT-3'
Bovine VEGF-C	5'-GAACAAGGCTTATGCAGGCAAAG-3'	5'-CCACATCTGTAGACGGACACAC-3'	5'-GTGGCATGCATTGAGTCTTCTCCACTCATTAT-3'
Human PIGF	5'-ACCATGCAGCTCCTAAAGAT-3'	5'-CACTGAATTCCTGAGGTCCTG-3'	5'-CTGAGAGAAGCTCAGCTCCAGTAGGA-3'
Bovine PIGF	5'-GTGCCCTTCCAGCAAGTGTG-3'	5'-CTCTCCGAGGACTGGTTAC-3'	5'-TCCACAAAGAAGGGCTGGTCCAGAGA-3'
β -actin	5'-ATCACCATTGGCAATGAGCG-3'	5'-TTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3'	5'-TGAGGCACTCTCCAGCCTT-3'

Table 2. Nucleotide sequences of the primers used for construction of the templates for competitor RNAs

mRNA	5' primer
Human VEGF	5'- <u>GGCCTCCGAAACCATGAACTTTCTGCT</u> AGGAGTACCCGATGAGATCGAGTAC-3' (nucleotides 244-269)
Bovine VEGF	5'- <u>GGCCTCCGAAACCATGAACTTTCTGCT</u> AGGAGTACCCAGATGAGATTGAGTTC-3' (nucleotides 730-755)
Human VEGF-B	5'- <u>GCCAAACAGCTGGTGCCAGCAGATCCTCATGATCCGGTACC</u> -3' (nucleotides 301-322)
Bovine VEGF-B	5'- <u>CACAGCCAGTGTGAATGCAGACCAGCTTCCCTCCGTTGTCAAGG</u> -3' (nucleotides 587-607)
Human VEGF-C	5'- <u>GGTCCITCCACCATGCACTT</u> GAGATCTGGAGGAGCAGTTACGG-3' (nucleotides 513-534)
Bovine VEGF-C	5'- <u>GAACAAGGCTTATGCAGGCAAAGGAAAGGAGGCTGGCAACATAG</u> -3' (nucleotides 378-398)
Human PIGF	5'- <u>ACCATGCAGCTCCTAAAGATCCAAGGTGCGGCGATGCTGTTCC</u> -3' (nucleotides 741-760)
Bovine PIGF	5'- <u>GTGCCCTTCCAGCAAGTGTGGCTGCTGCAGTATGAGAG</u> -3' (nucleotides 561-580)

Underlined sequences indicate the nucleotide sequences of the primers used in the competitive PCR, which are the same sequences as those used in the RT-PCR.

マーはそれぞれヒトcDNA¹⁰の塩基番号93-117と409-426に対応する。同様に、VEGF-CはヒトcDNA¹²の塩基番号968-987と1588-1609に、PIGFはヒトcDNA¹³の塩基番号443-462, 631-652にそれぞれ対応する。ウシ心臓からクイックプレップmRNA精製キット (Pharmacia, Uppsala, スウェーデン) を用いて分離したポリA⁺RNAを鋳型として各プライマーセットを用いたRT-PCRを行い、増幅DNA断片をpCR2.1ベクター (Invitrogen, San Diego, 米国) にクローン化した。得られた組み換えプラスミドを分離して塩基配列を決定した結果、VEGF-B, VEGF-C, PIGFプライマーで増幅されたDNA断片は対応するヒトcDNA領域とそれぞれ91.8%, 88%, 86.8%の相同性を示したことから、ウシVEGF-B, VEGF-C, PIGF cDNAの部分配列と判定された。各プラスミドを大量精製後制限酵素消化し、ベクターから切り出された挿入cDNA配列を低融点アガロース電気泳動で分離してプローブ標品とした。

III. cDNA クローニング

ウシ心臓由来ファージcDNAライブラリー (計10⁶個のファ-

ジブラク) をナイロン膜に転写後、上述のウシVEGF-B, VEGF-C, PIGF cDNA断片をプローブとしてスクリーニングを行った¹⁵。その結果、VEGF-Bプローブでは28個、VEGF-Cプローブでは22個、PIGFプローブでは13個の候補を得た。同様のブランクハイブリダイゼーションによりブランク精製を行った後、ヘルパーファージExAssistと大腸菌SOLRを用いた菌体内環状化システムにより各cDNAの全長をもつプラスミドクローンを得た。

IV. DNA塩基配列の決定

精製プラスミドDNAを鋳型としてモデル373 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社, Foster City, 米国) を用いてcDNAのヌクレオチド配列を決定した。センス鎖, アンチセンス鎖両鎖についてシーケンス反応を行い、5'→3', 3'→5'各方向のDNA伸長範囲が必ず一部重複するようにした (図1A, 3A, 4A参照)。

V. 血管細胞の低酸素培養

ヒト微小血管内皮細胞, ウシ網膜周皮細胞の培養フラスコを

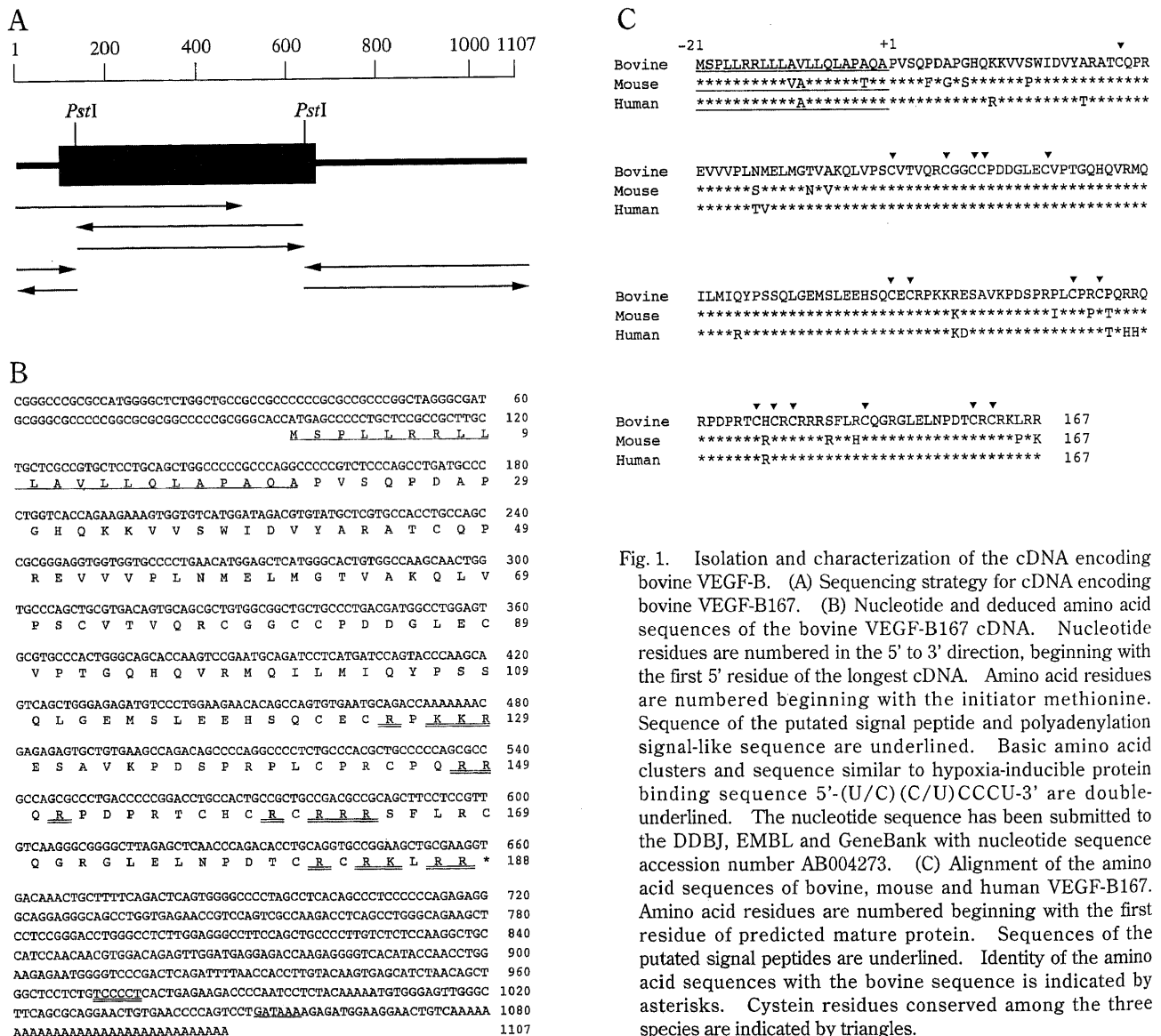


Fig. 1. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine VEGF-B. (A) Sequencing strategy for cDNA encoding bovine VEGF-B167. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the bovine VEGF-B167 cDNA. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction, beginning with the first 5' residue of the longest cDNA. Amino acid residues are numbered beginning with the initiator methionine. Sequence of the putated signal peptide and polyadenylation signal-like sequence are underlined. Basic amino acid clusters and sequence similar to hypoxia-inducible protein binding sequence 5'-(U/C)(C/U)CCCU-3' are double-underlined. The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ, EMBL and GeneBank with nucleotide sequence accession number AB004273. (C) Alignment of the amino acid sequences of bovine, mouse and human VEGF-B167. Amino acid residues are numbered beginning with the first residue of predicted mature protein. Sequences of the putated signal peptides are underlined. Identity of the amino acid sequences with the bovine sequence is indicated by asterisks. Cystein residues conserved among the three species are indicated by triangles.

大気コントロール培養チェンバー (Bellco, Vineland, 米国) 内に置き、O₂ (5%, 2.5%または0%) とCO₂ (5%) とN₂ (90%, 92.5%または95%) の混合ガス (日本酸素, 東京) を10L/分の流量で5分間注入, 密閉した後, 37°Cで24時間培養した。チェンバー内のガス組成は±0.05%の精度で24時間一定に保たれる⁶⁾。

VI. 逆転写 (reverse transcription, RT)-PCR法

通常酸素濃度 (20% O₂) または低酸素濃度下で24時間培養したヒト皮膚微細血管内皮細胞, ウシ網膜周皮細胞からクイックプレップマイクロRNA精製キット (Pharmacia) を用いてポリA⁺ RNAを分離し, 表1に示す特異プライマーを用いてRT-PCRを行った。これらプライマーはオルタナティブスプライシングバリエーションを同時に検出できる。RT-PCR後, 生成物を2%アガロースゲル電気泳動で分離し, Hybond-N⁺ ナイロン膜 (アマシ

ヤム, Bucking hamshire, 英国) にプロット後, 5'末端³²P-標識特異プローブ (表1) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。定量はBAS1000Mac (富士写真フィルム, 浜松) を用いて行った。まず各因子のRT-PCR法による増幅条件の決定のため, 鋳型RNA量と増幅サイクル数を変えて反応を行いRT-PCRの定量域を決定した。その結果, ヒトVEGF-Bは鋳型ポリA⁺ RNA20ng, サイクル数35回; ヒトVEGF-Cは鋳型ポリA⁺ RNA20ng, サイクル数25回; ヒトPIGFは鋳型ポリA⁺ RNA20ng, サイクル数25回と決定した。同様にウシVEGF-Bには鋳型ポリA⁺ RNA20ng, サイクル数30回; ウシVEGF-Cには鋳型ポリA⁺ RNA10ng, サイクル数25回; ウシPIGFには鋳型ポリA⁺ RNA20ng, サイクル数25回と決定した。ヒトVEGF, ウシVEGFおよびβ-アクチンmRNA検出にはNomuraら⁹⁾の条件にしたがって行った。

VII. 競合RT-PCR

血管細胞に存在するVEGFファミリーのmRNA分子種の量を決定するため, 競合RT-PCR¹⁰⁾を行った。競合用標準RNAは, 上述のRT-PCR用各3'プライマーと表2に示した融合5'プライマーを用いて増幅したDNAをpCR2.1ベクターに組み込んで作製した鋳型より, T7 RNAポリメラーゼ (Promega, Madison, 米国) を用いた試験管内転写反応により調製した。こうして作製した競合用標準RNAと内在性mRNAより増幅されるDNA鎖長は以下のとおりである。ヒトVEGFではmRNA由来が602と470塩基対 (base pairs, bp), 競合用標準RNA由来が297bpである。同様に, ヒトVEGF-BではmRNA由来が420と319bp, 競合用標準RNA由来が234bp; ヒトVEGF-CではmRNA由来が409bp, 競合用標準RNA由来が257bp; ヒトPIGFではmRNA由来が384と321bp, 競合用標準RNA由来が230bpである。ウシVEGFではmRNA由来が599と467bp, 競合用標準RNA由来が297bp; ウシVEGF-BではmRNA由来が496と395bp, 競合用標準RNA由来が280bp; ウシVEGF-CではmRNA由来が348bp, 競合用標準RNA由来が258bp; ウシPIGFではmRNA由来が410と347bp, 競合用標準RNA由来が215bpである。

通常酸素濃度下で培養した内皮細胞と周皮細胞から分離したポリA⁺ RNAに競合用標準RNAを種々の量比で添加し, RT-PCR用3'プライマーを用いてrTth DNAポリメラーゼ (パーキンエルマー社) により65°Cで逆転写を行った後PCR反応を行った。産物をアガロースゲル電気泳動後, サイバークリーン (宝酒造, 大津) で染色し内在性mRNAおよび競合用標準RNAから増幅されたDNAをEpiLight-II (アイシンコスモス社, 豊田) にて検出・定量した。サイバークリーンで検出できない試料については, ナイロン膜に転写後, ³²P-標識オリゴヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションを行いBAS1000Macにて検出・定量した。内在性mRNAおよび競合用標準RNAから増幅されたDNAが等量となる点が, 内在性mRNAおよび競合用標準RNAを等量含む試料である。

成 績

I. ウシVEGF-Bの分離と構造

PCR増幅cDNA断片をプローブとしてウシ心臓cDNAライブラリーをスクリーニングした結果, VEGF-Bの全翻訳枠をカバーするcDNAクローンを得た。図1Bに最長のcDNA配列と推定されたアミノ酸配列を示す。ウシVEGF-B cDNAはポリAを



Fig. 2. Alignment of the nucleotide and deduced amino acid sequences of bovine VEGF-B167 cDNA (upper two lines) and a splice variant, VEGF-B186 cDNA (lower two lines). Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction, beginning with the first 5' residue of the VEGF-B167 cDNA. Amino acid residues are numbered beginning with the initiator methionine and expressed as three-letter codes, because this helps understand the splice site and the frameshift more decisively. Sequences of the putated signal peptides and basic amino acid clusters are underlined. Dashed line indicates the region which was alternatively spliced out in VEGF-B167mRNA. The nucleotide sequence of bovine VEGF-B186 has been submitted to the DDBJ, EMBL and GeneBank with nucleotide sequence accession number AB004274.

除くと1075ヌクレオチドからなり、188個のアミノ酸からなるタンパクをコードし、ヒトVEGF-B cDNAとヌクレオチド配列で93.7%, アミノ酸配列で93.6%の相同性を有していた。ウシVEGF-Bは、アミノ末端側にシグナル配列と推定される21アミノ酸の配列を有しており、分泌性タンパクをコードすると考えられた。成熟タンパクは167個のアミノ酸からなると推定され、アミノ酸配列から算定された分子量は21,305であった。ウシとヒトVEGF-B167は、16個のシステイン残基が完全に保存されていた(図1C)。ウシVEGF-B167は、C末端領域にヘパリン結合領域と考えられる塩基性アミノ酸のクラスターを4ヶ所(アミノ酸残基番号125-129, 148-151, 160-164, 184-188)有していた(図1B)。VEGF-B mRNAの3'非翻訳域には、mRNAの安定性に関与するとされる配列[5'-UUUUUA(U/A)(U/A)-3']⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾類似の配列は認められなかったが、最近チロシン水酸化酵素mRNAで同定された、低酸素により誘導されるmRNA結合因子の結合

配列[5'-(U/C)(C/U)CCCU-3']⁽¹⁹⁾と一致する配列が1ヶ所(塩基番号971-976)存在した(図1B)。

また、ウシ心臓cDNAライブラリーより分離した塩基配列を決定した全4個のうち1クローンは、図1Bに示した配列の塩基番号502と503の間に101bpの挿入配列を有していた。この結果、このcDNAは同一の開始コドンからはじまると仮定すると、207個アミノ酸からなるタンパク質をコードし成熟型の蛋白質は186アミノ酸からなると推定された(図2)。本cDNAは、ヒトVEGF-B186として報告された配列⁽²⁰⁾に相当すると考えられた。VEGF-B186はC末端領域の塩基性アミノ酸のクラスターは1ヶ所のみ(図2)であった。

II. ウシVEGF-Cの分離と構造

ウシVEGF-C cDNAはポリAを除き1760ヌクレオチドからなり420個のアミノ酸からなるタンパクをコードしていた(図3B)。ウシcDNAにコードされるアミノ酸数はヒトVEGF-Cよ

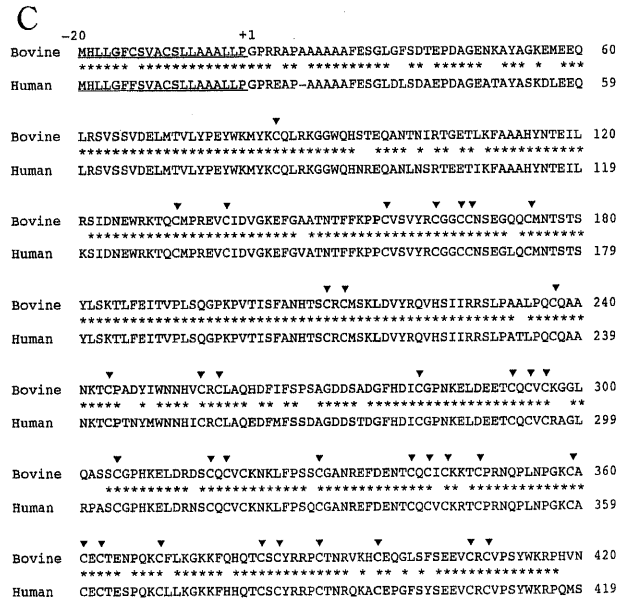
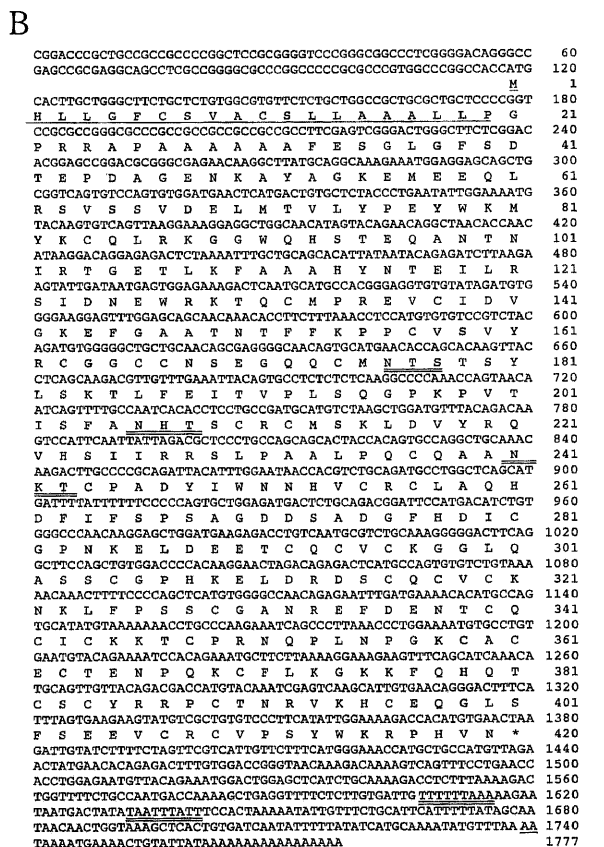
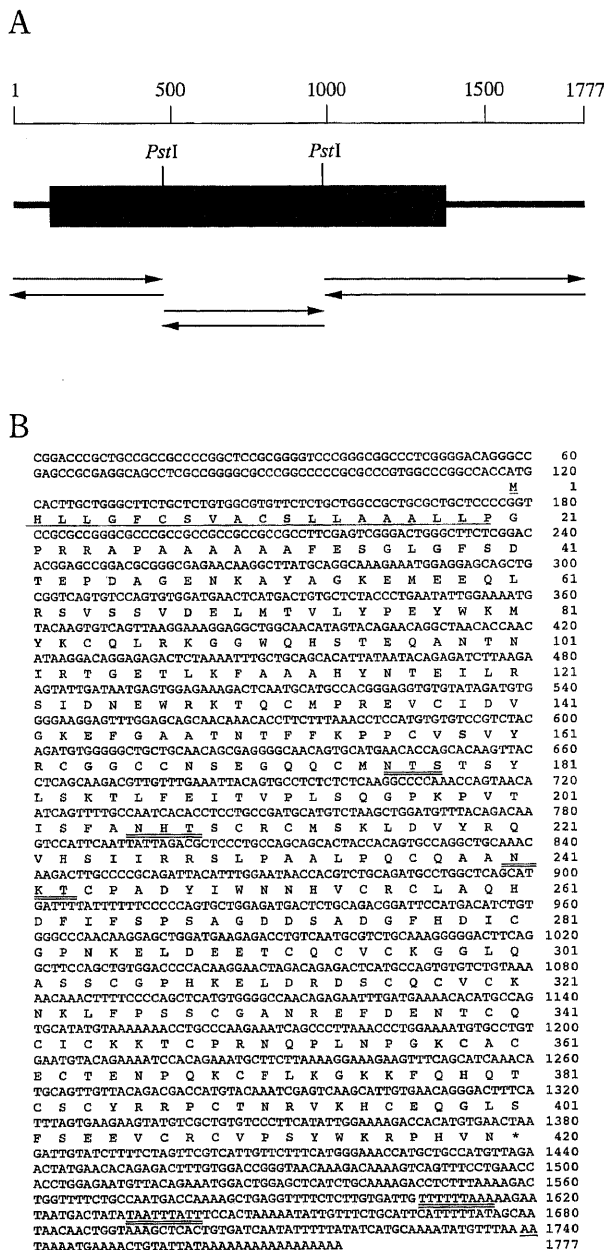


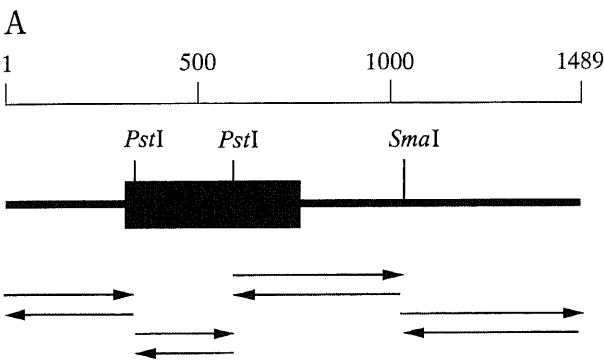
Fig. 3. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine VEGF-C. (A) Sequencing strategy for cDNA encoding bovine VEGF-C. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the bovine VEGF-C cDNA. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction, beginning with the first 5' residue of the longest cDNA. Amino acid residues are numbered beginning with the initiator methionine. Sequence of the putated signal peptide and polyadenylation signal sequence are underlined. Possible N-glycosylation sequences and sequences similar to 5'-UUUUUA(U/A)(U/A)-3' are double-underlined. The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ, EMBL and GeneBank with nucleotide sequence accession number AB004275. (C) Alignment of the amino acid sequences of bovine and human VEGF-C. Amino acid residues are numbered beginning with the first residue of predicted mature protein. Sequences of the putated signal peptides are underlined. Identity of the amino acid sequence with the bovine sequence is indicated by asterisks. Dash indicates gap in the bovine and human sequences in the maximal matched alignment. Cystein residues conserved between the bovine and human sequences are indicated by triangles.

り1個多かったが(図3C), ヒトVEGF-C cDNAと比較してヌクレオチド配列では86.9%, アミノ酸配列では88.1%の相同性を有していた. ウシVEGF-Cはシグナル配列と推定される20アミノ酸残基をアミノ末端側に有していることから, 分泌性タンパクと考えられた. N-グリコシレーション部位と推定される配列が3ヶ所存在した(ウシアミノ酸残基番号176-178, 206-208, 241-243). ウシとヒトVEGF-Cは, 36個のシステイン残基が完全に保存されていた(図3C). また, mRNAの3'非翻訳域に5'-UUAUUUA(U/A)(U/A)-3'¹⁷¹⁸に類似の配列が2ヶ所(塩基番号1607-1615, 1632-1640: 8/9一致)存在した(図2B).

III. ウシPIGFの分離と構造

ウシPIGF cDNAはポリAを除くと1472ヌクレオチドからな

り, 149個のアミノ酸からなるタンパクをコードしていた(図4B). ヒトPIGF配列とのホモロジーはヌクレオチド配列では74.9%, アミノ酸配列では75.2%であった. ウシPIGFは20アミノ酸のシグナル配列をもつ分泌性タンパクで, 成熟タンパクは129個のアミノ酸からなると推定され, 分子量は17,094と算定された. N-グリコシレーション部位と推定される配列が2ヶ所存在した(アミノ酸残基番号33-35, 101-103). アミノ酸数はヒトPIGF-1として報告された配列¹³と同一で, 9個のシステイン残基の位置はウシとヒトで完全に保存されていた(図4C). また, mRNAの3'非翻訳域に5'-UUAUUUA(U/A)(U/A)-3'¹⁷¹⁸に類似の配列が2ヶ所(塩基番号800-808, 850-858: 8/9一致), 5'-(U/C)(C/U)CCCU-3'¹⁹と一致する配列が2ヶ所(塩基番号



B

```

CACTGGCCGCTACGAGGGAGAGAGAGGACCCGGGATCGCGCTGGGGCTCCTGACCCG 60
CCCTCCACAGGACCCGCTGCCACGCGCCCGCCGCCCGGACTCTCTGCATCAGCC 120
TTACCTGCGGGCCCTCCAGAATCTCCAGGACTTTCAGAGGATGCTCAGGTCGCCACGG 180
GGACCTCGGGCAGCAGTGGGGGGCATCCAGTCCCATCCAATCCCGTCCGCGCCA 240
GGGCTCCCCCTGGAGATGAGCATGGTGGTTTCTCTGGAGTCCCTGGCTGGTACGT 300

CTGAGAAGATGCCTACCCTGAGACTGTTCACTTGCCTTCCTGCAGCTCCGCGGGGCTGG 360
  M P T V R L F T C F L O L L T G L V 18

TGTTGCTGCGCGTGCACGACGCACTGGGCTTGTCTCTGGAAACATTTTCATCGGAGG 420
  L P A V P T T Q W A L S P G N I S S E V 38

TGGAAAGTGGTCCCTTCCAGCAAGTGTGGAGCCGACGACTGCGCGCCGGTGGAGAGGT 580
  E V V P F Q Q V W S R S Y C R P V E R L 58

TGTTGACATPTGTCTGAGTACCCAGCAGATGGAGCATCTATTACGCCATCCTGCG 540
  V D I V S E Y P S E M E H L F S P S C V 78

TCTCCCTGATGCGCTGCAGTGGCTGTCAGTGTAGAGCATGCACTGCGTCCCTGG 600
  S L M R C T G C C S D E S M H C V P L E 98

AGACAGCCAAACGTCACCATGCACTGCAAGTACCGCTCTGGACAGCCCTTCTTTG 660
  T A N V T M Q L M K Y R S L D Q P F F V 118

TGGAGATGAGCTTCTCTCAGCAGCTCCCGTGCAGTGCAAAACCTTATGGGAGAAGATGA 720
  E M S F S Q H V R C E C K P L W E K M K 138

AGCAAACAAGGTGGTGTATCTATTTCCAGAGGTAACAGTCCCTCGGAAGAGAGAGA 780
  Q T R C G D T I S Q R * 149

CCCCCACCAGCTCGTGTATTTTACCGTCACTGCTCAGTTACCTCCCTGCTGGC 840
ACCTGCCCTCTATTTTATGACCAATTTGATCCCTGCTGAATGACTCACTCCCTCCATGGG 900
ACAGGACCTCAGGAATTCAGTGCCTTAAACAGAACGTTGAGAGAAAAGACAGACCCAT 960
GTGGCTCAGCTTGAGAAGGAGCAAGACTTACGGCTTTGTGATGGGCAGGCTGGCCCCA 1020
GAGGCCCGGGGCTTCCAGGAGGCTGGAGAAAGGACTGGAGACCCACCACCTGCC 1080
TCCCGGAACCTTTGGCTCTGCGCAGACAGCAAGCTTGGTGGGGCAGCTCCTGGTGGAA 1140
GTGGGGGTGTGGAGGCCCTGCTCTGGCCACCTGGCCCTGCTGAGAGGGTGGCGGGC 1200
AGCCACTCTGCACCCCGAGGTTGGAGCTTCACTGCTTGGAGAACAGTGTCTGCTGGGG 1260
GCCTTGCACCTCCTCGTCCCTCAGTCTGCCTCACCTCTTAACGCTGCTTGTGTCTGG 1320
GACATGCTCTTTGTGGCCAGGCATCATCATCTGCCCCCTCAAGGACAAAGGCAAAA 1380
AGTGGCCCAAGCTGGACATGGAGTGGAGTCCCTGCGCTGGCTGTCTGACTGCCAAGC 1440
CAGATTCTCTTGAATAAAGTATTCTAGTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1489
    
```

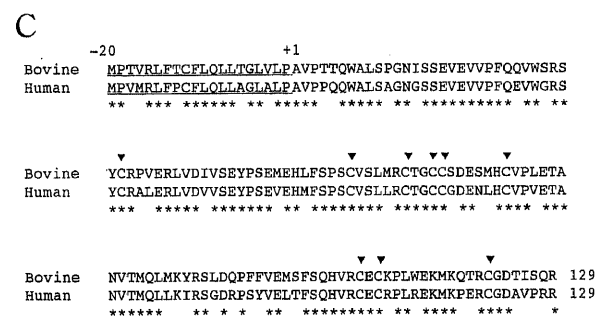


Fig. 4. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine PIGF. (A) Sequencing strategy for cDNA encoding bovine PIGF. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of the bovine PIGF cDNA. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction, beginning with the first 5' residue of the longest cDNA. Amino acid residues are numbered beginning with the initiator methionine. Sequence of the putated signal peptide and polyadenylation signal sequence are underlined. Possible N-glycosylation sequences and sequences similar to 5'-UUAUUUA(U/A)(U/A)-3' and sequences 5'-(U/C)(C/U)CCCU-3' are double-underlined. The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ, EMBL and GeneBank with nucleotide accession number AB004272. (C) Alignment of the amino acid sequences of bovine and human VEGF-C. Amino acid residues are numbered beginning with the first residue of predicted mature protein. Sequences of the putated signal peptides are underlined. Identity of the amino acid sequence with the bovine sequence is indicated by asterisks. Cysteine residues conserved between the bovine and human sequences are indicated by triangles.

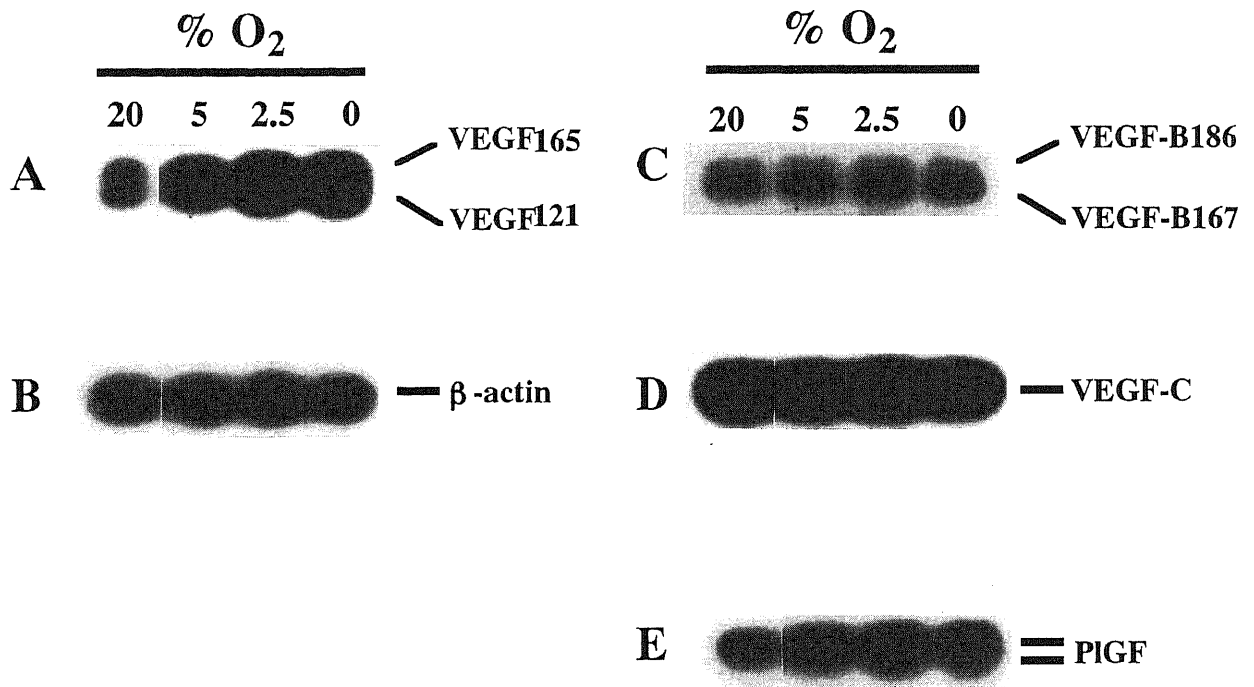


Fig. 5. RT-PCR analysis of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and PlGF mRNAs in pericytes. Poly A⁺ RNAs from microvascular pericytes, which had been cultured under various oxygen tensions, underwent quantitative RT-PCR analysis as described under Materials and Methods. The products were electrophoresed on 2% agarose gel, transferred onto nylon membranes, and hybridized with ³²P-end-labeled probe specific to VEGF (A), β -actin (B), VEGF-B (C), VEGF-C (D) and PlGF (E) mRNAs.

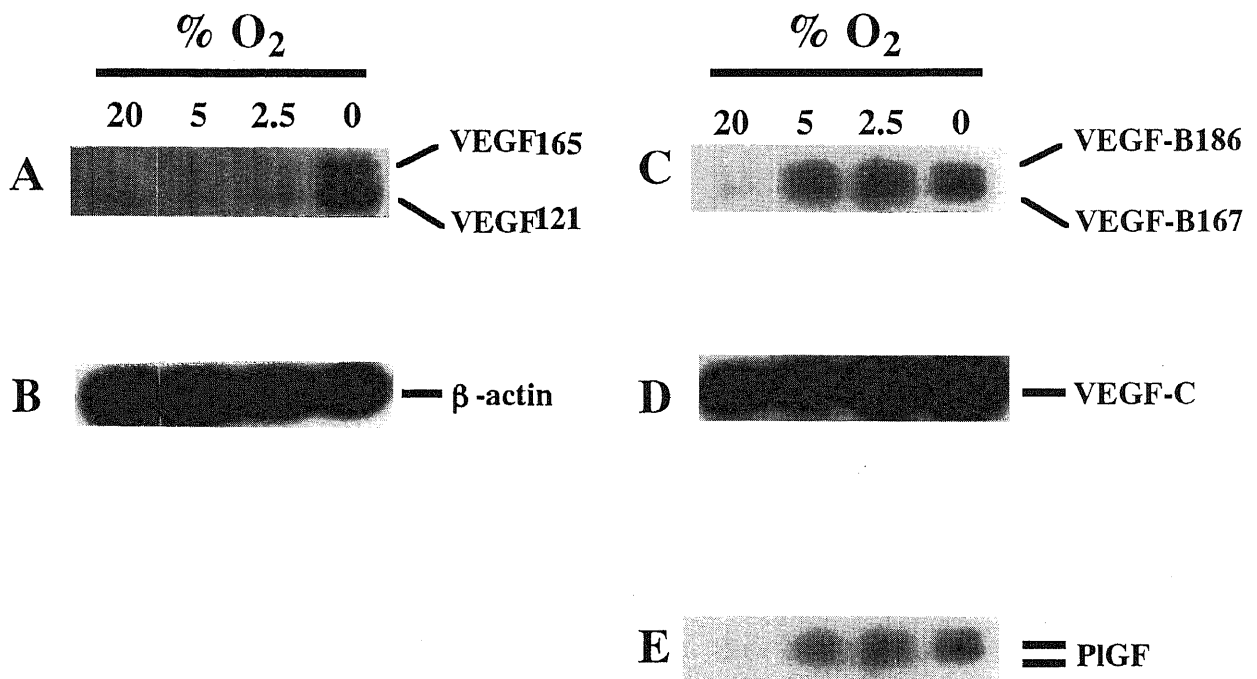


Fig. 6. RT-PCR analysis of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and PlGF mRNAs in microvascular endothelial cells. Poly A⁺ RNAs from microvascular endothelial cells, which had been cultured under various oxygen tensions, underwent quantitative RT-PCR analysis as described under Materials and Methods. The products were electrophoresed on 2% agarose gel, transferred onto nylon membranes, and hybridizes with ³²P-end-labeled probe specific to VEGF (A), β -actin (B), VEGF-B (C), VEGF-C (D) and PlGF (E) mRNAs.

888-893, 1278-1283) 存在した (図4B).

IV. ウシ網膜微小血管周皮細胞における VEGFファミリー遺伝子群の発現

正常酸素濃度または低酸素状態で培養したウシ網膜微小血管周皮細胞からポリA⁺ RNAを分離し、上記の方法でRT-PCR反応を行った。その結果、VEGFとともにVEGF-B、VEGF-C、PlGFすべての特異バンドが検出された (図5)。各バンドの直接シーケンシングによりそれぞれのバンドがウシVEGF-B、VEGF-C、PlGFの配列を有することを確認した。VEGFはこれ

までの報告どおり⁹⁾、VEGF165とVEGF121に由来する2本のバンドが増幅された。VEGF-Cは分離したcDNAから予想された348bpのバンドが増幅された。VEGF-Bは分離したオルタナティブスプライシングによる2種のcDNA (VEGF-B167, VEGF-B186) に対応する2本のバンドが増幅された。PlGFでも2本のバンド (347bpと410bp) が増幅され、うち鎖長の短い方は本研究で分離したcDNAに対応し、鎖長の長い方はヒトでPlGF-2として報告されているオルタナティブスプライシングによるパイアント²⁰⁾に対応すると考えられた。

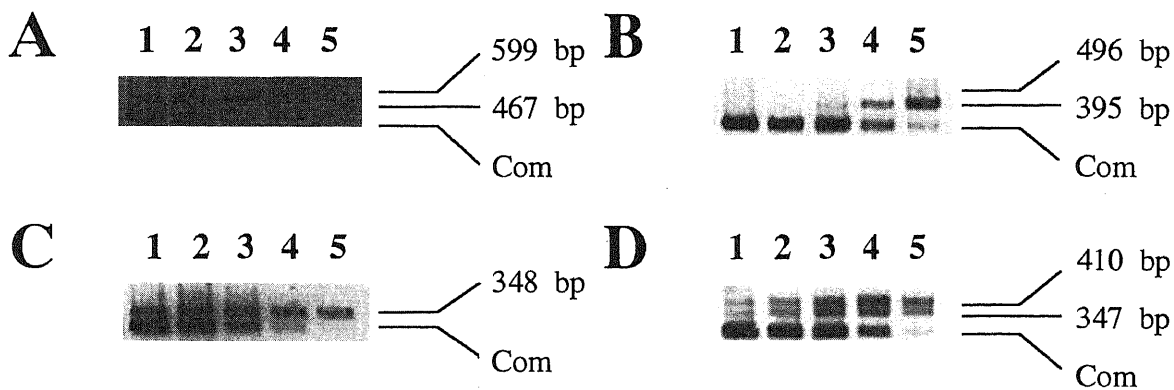


Fig. 7. Competitive RT-PCR analysis of VEGF family mRNAs of bovine pericytes. Competitive PCR was performed as described under Materials and Methods, and products were analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis and visualized with SYBR green. The RT-PCR product derived from the competitor (Com) has been designed to be slightly smaller than mRNA-derived products, of which length are indicated. (A) Competitive RT-PCR analysis of VEGF mRNA. Lanes 1-5 represent: 40 ng of polyA⁺ RNA from bovine pericytes with 1) 9.5×10^5 copies, 2) 3×10^5 copies, 3) 9.5×10^4 copies, 4) 3×10^4 copies, 5) 9.5×10^3 copies of competitor RNA, respectively. (B) Competitive RT-PCR analysis of VEGF-B mRNA. Lanes 1-5 represent: 20 ng of polyA⁺ RNA from bovine pericytes with 1) 9.5×10^4 copies, 2) 3×10^4 copies, 3) 9.5×10^3 copies, 4) 3×10^3 copies, 5) 9.5×10^2 copies of competitor RNA, respectively. (C) Competitive RT-PCR analysis of VEGF-C mRNA. Lanes 1-5 represent: 5 ng of polyA⁺ RNA from bovine pericytes with 1) 3×10^5 copies, 2) 9.5×10^4 copies, 3) 3×10^4 copies, 4) 9.5×10^3 copies, 5) 3×10^3 copies of competitor RNA, respectively. (D) Competitive RT-PCR analysis of PlGF mRNA. Lanes 1-5 represent: 40 ng of polyA⁺ RNA from bovine pericytes with 1) 3×10^4 copies, 2) 9.5×10^3 copies, 3) 3×10^3 copies, 4) 9.5×10^2 copies, 5) 3×10^2 copies of competitor RNA, respectively.

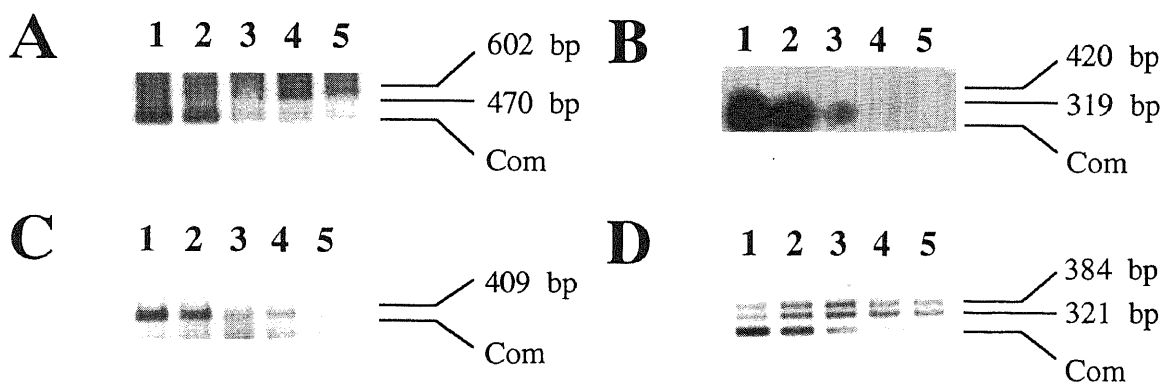


Fig. 8. Competitive RT-PCR analysis of VEGF family mRNAs of human microvascular endothelial cells. Competitive PCR was performed as described under Materials and Methods, and products were analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis and visualized with SYBR green (A, C, D) or autoradiography (B). The RT-PCR product derived from the competitor (Com) has been designed to be slightly smaller than mRNA-derived products, of which length are indicated. (A) Competitive RT-PCR analysis of VEGF mRNA. Lanes 1-5 represent: 40 ng of polyA⁺ RNA from human microvascular endothelial cells with 1) 9.5×10^4 copies, 2) 3×10^4 copies, 3) 9.5×10^3 copies, 4) 3×10^3 copies, 5) 9.5×10^2 copies of competitor RNA, respectively. (B) Competitive RT-PCR analysis of VEGF-B mRNA. Lanes 1-5 represent: 80 ng of polyA⁺ RNA from human microvascular endothelial cells with 1) 9.5×10^4 copies, 2) 3×10^4 copies, 3) 9.5×10^3 copies, 4) 3×10^3 copies, 5) 9.5×10^2 copies of competitor RNA, respectively. (C) Competitive RT-PCR analysis of VEGF-C mRNA. Lanes 1-5 represent: 80 ng of polyA⁺ RNA from human microvascular endothelial cells with 1) 3×10^5 copies, 2) 9.5×10^4 copies, 3) 3×10^4 copies, 4) 95 copies, 5) 30 copies of competitor RNA, respectively. (D) Competitive RT-PCR analysis of PlGF mRNA. Lanes 1-5 represent: 10 ng of polyA⁺ RNA from human microvascular endothelial cells with 1) 3×10^6 copies, 2) 9.5×10^5 copies, 3) 3×10^5 copies, 4) 9.5×10^4 copies, 5) 3×10^4 copies of competitor RNA, respectively.

VEGF mRNAは、これまでの報告どおり低酸素によりその mRNA量が増大し、約3倍となった。PIGF mRNAも低酸素により増大傾向を示し、約2倍にまで増加した。これに対し、VEGF-BとVEGF-CのmRNAレベルは低酸素状態でほとんど影響を受けなかった。

V. ヒト皮膚微小血管内皮細胞におけるVEGFファミリー遺伝子群の発現

ヒト皮膚微小血管内皮細胞でも、VEGFとともにVEGF-B、VEGF-C、PIGFのすべての特異バンドが検出された(図6)。VEGFはこれまでの報告どおり⁹⁾、VEGF165とVEGF121に由来する2本のバンド(319bpと420bp)が増幅された。VEGF-CはcDNAから予想された409bpのバンドが増幅された。VEGF-BおよびPIGFでは、それぞれ2本のバンドが増幅された。VEGF-Bで増幅された2本のバンド(395bpと496bp)は2種のmRNAバリエーション(VEGF-B167とVEGF-B186)に、PIGFの2本のバンド(321bpと384bp)はオルタナティブプライミングによるバ

リエーションPIGF-1とPIGF-2¹⁰⁾に対応した。

ヒト微小血管内皮細胞では、VEGFおよびPIGF mRNAは低酸素に反応してmRNA量が増大し、それぞれ最大7倍、6倍にまで増加した。周皮細胞とは異なり、VEGF-BとVEGF-CのmRNAレベルも低酸素状態で上昇傾向を示し、それぞれ最大約3倍、2.5倍に増加した。

VI. 競合PCRによるVEGFファミリーmRNA各分子種の定量

血管細胞におけるVEGF、VEGF-B、VEGF-C、PIGF mRNA分子種の存在量を決定するため、競合RT-PCRを行った。正常酸素濃度で培養したウシ網膜微小血管周皮細胞およびヒト皮膚微小血管内皮細胞より分離したポリA⁺RNAを用いて、実験方法記載のとおり競合PCRを行った。その結果を図7、8と表3に示す。

ヒト微小血管内皮細胞由来ポリA⁺RNA 40ngを用いた競合RT-PCRにおいてVEGFは3×10⁴コピーの競合用標準RNA存在

Table 3. Copy number of VEGF family mRNAs in human microvascular endothelial cells and bovine pericytes

mRNA	Endothelial cell		Pericyte	
	Copies/ μ g polyA ⁺ RNA	Copies/cell	Copies/ μ g polyA ⁺ RNA	Copies/cell
VEGF	$\sim 7.5 \times 10^5$	2 ~ 3	$\sim 2.4 \times 10^6$	~ 12
VEGF-B	$< \sim 3.8 \times 10^4$	< 0.1	$\sim 1.2 \times 10^5$	~ 1
VEGF-C	$< \sim 4 \times 10^2$	< 0.001	$\sim 1.2 \times 10^7$	~ 60
PIGF	$\sim 9.5 \times 10^7$	~ 300	$\sim 2.4 \times 10^4$	~ 0.1

Copy number of each mRNA was estimated by competitive PCR as described under Materials and Methods.

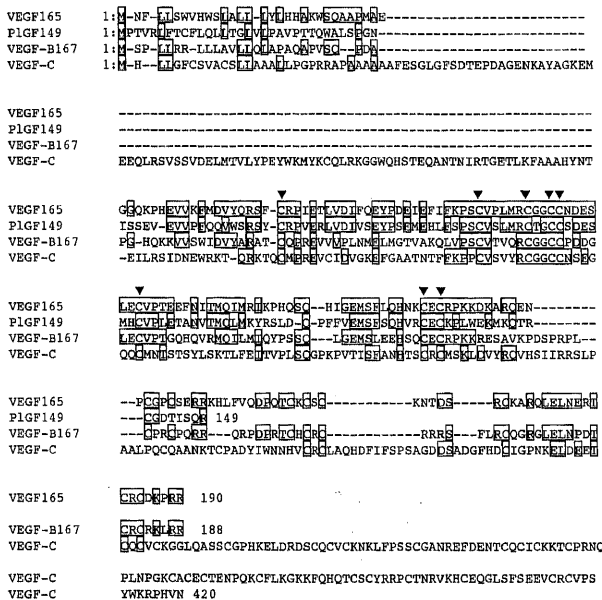


Fig. 9. Alignment of the amino acid sequences of bovine VEGF, VEGF-B, VEGF-C and PIGF. Amino acid residues are numbered beginning with the first methionine. Boxed amino acids indicate identical amino acids with the VEGF sequence. Cystein residues conserved among the four sequences are indicated by triangles. Dashes indicate gaps in the maximal matched alignment.

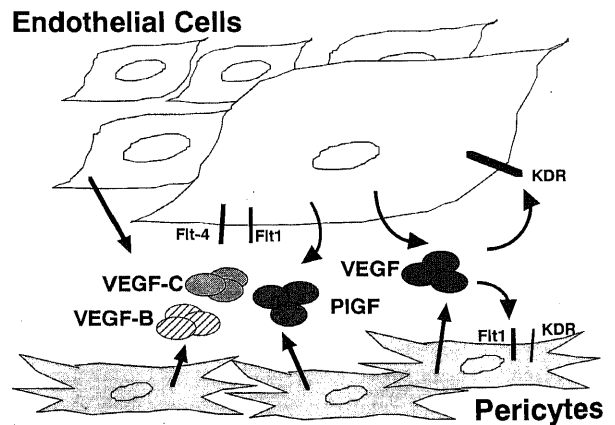


Fig. 10. Expression of the VEGF family in vascular endothelial cells and pericytes.

下でmRNA由来と競合用標準RNA由来の増幅バンドが等量となったことから、VEGF mRNA量は $\sim 7.5 \times 10^5$ コピー/ μg ポリA' RNAと推定された。同様に、ポリA' RNA 10ngを用いた競合RT-PCRにおいてPIGF mRNAは、 9.5×10^5 コピーの競合用標準RNA存在下でmRNA由来と競合用標準RNA由来の増幅バンドが等量となったことから、 $\sim 9.5 \times 10^7$ コピー/ μg ポリA' RNAと推定された。VEGF-BおよびVEGF-C mRNAは両者とも80ngを用いても定量域以下であり、それぞれ $\sim 3.8 \times 10^4$ コピーおよび $\sim 4 \times 10^2$ コピー/ μg ポリA' RNA以下と推定された。

ウシ微小血管周皮細胞由来ポリA' RNA 40ngを用いた競合RT-PCRにおいてVEGF mRNAは、 3×10^4 コピーと 9.5×10^4 コピーの競合用標準RNAの間でmRNA由来と競合用標準RNA由来の増幅バンドが等量となったことから、 $\sim 2.4 \times 10^6$ コピー/ μg ポリA' RNAと推定された。同様に、ポリA' RNA 20ngを用いた競合RT-PCRにおいてVEGF-B mRNAは、 3×10^4 コピーと 9.5×10^5 コピーの競合用標準RNAの間でmRNA由来と競合用標準RNA由来の増幅バンドが等量となったことから、 $\sim 1.2 \times 10^5$ コピー/ μg ポリA' RNAと推定された。ポリA' RNA 20ngを用いた競合RT-PCRにおいてVEGF-C mRNAは、 9.5×10^4 コピーと 3×10^4 コピーの競合用標準RNAの間で、mRNA由来と競合用標準RNA由来の増幅バンドが等量となったことから、 $\sim 1.2 \times 10^7$ コピー/ μg ポリA' RNAと推定された。ポリA' RNA 40ngを用いた競合RT-PCRにおいてPIGF mRNAは、 9.5×10^5 コピーの競合用標準RNA存在下でmRNA由来と競合用標準RNA由来の増幅バンドが等量となったことから、 $\sim 2.4 \times 10^4$ コピー/ μg ポリA' RNAと推定された。

考 察

実際の血管新生の場である微小血管は、二種類の細胞のみ(血管内皮細胞と血管周皮細胞)から構成されている。著者が用いた血管細胞の培養のうち、周皮細胞はウシ由来であり、これまでにウシのVEGF-B、VEGF-C、PIGFの配列は明らかにされていなかったことから、まずこれらの配列を明らかにするためウシ心臓由来cDNAライブラリーよりVEGF-B、VEGF-C、PIGFの各cDNAの分離を行った。その結果、各因子の全長をコードするcDNAが得られた(図1-4)。ウシVEGF-B、VEGF-C、PIGFは、ウシVEGFのアミノ酸残基番号38-138の領域に相当する領域で、それぞれ約33%、44%、55%の相同性を示した(図9)。

今回得られたウシVEGF-B cDNAは188個のアミノ酸からなるタンパクをコードしており、成熟型蛋白は167アミノ酸からなることと推定され(図1B)、ヒトVEGF-B167に対応することからこのタイプをウシVEGF-B167と命名した。また、塩基配列を決定した全4個のうち1クローンは、ウシVEGF-B167の塩基番号502と503の間に101bpの挿入配列を有していた(図2)。本cDNAは、開始コドンを含まなかったが、VEGF-B167 cDNAと同一の開始コドンからはじまると仮定すると、207個アミノ酸からなるタンパク質をコードし成熟型の蛋白質は186アミノ酸からなることと推定された(図2)。このタイプは、ヒトVEGF-B186¹⁹⁾に対応することから、ウシVEGF-B186と命名した。VEGF-B167はC端領域に塩基性アミノ酸クラスターを4ヶ所有しており(図1B)、細胞外マトリックスあるいは細胞表面上に存在するヘパリン様分子に強固に結合すると考えられる。これに対し、VEGF186のC端領域には塩基性アミノ酸のクラスター

は1ヶ所しか存在せず(図2)、ヘパリン様分子との結合能を有すると推定されるが、より遊離しやすいと考えられた。この性質の違いは、VEGF-Bのバリエーションの生理機能、活性発現調節を明らかにしていく上で重要であろう。

ウシVEGF-C cDNAは420個のアミノ酸からなるタンパクをコードしていたが(図3B)、VEGFとの相同領域はVEGF-C前駆体の約1/3であった(図5)。最近VEGF-Cが活性を獲得するのに翻訳後プロセシングが重要な役割を果たしていることが報告されており²⁰⁾、本研究で明らかとなったウシ配列は予想されるプロセシング部位(ウシ配列アミノ酸残基番号103/104、112/113、228/229)が完全に保存されていることから、ウシでも同様のプロセシングを受けて活性を有する成熟型のVEGF-Cが生成されるものと考えられる。

本研究で分離されたウシPIGF cDNAがコードする蛋白は、149個のアミノ酸からなり(図4B)、配列中に塩基性アミノ酸のクラスターを持たず遊離型のタイプと考えられ、ヒトPIGF-1¹⁹⁾に相当した。PIGFには、オルタナティブスプライシングによって生じたC端領域に塩基性アミノ酸のクラスターを有するバリエーション(PIGF-2)²⁰⁾の存在が報告されているが、ウシ心臓由来cDNAライブラリーからはこのタイプは分離されず、ウシ心臓では遊離型のタイプの発現が主と考えられた。

血管新生を誘導する最も主要な要因は組織の局所的な低酸素状態であり、血管細胞でも低酸素により、VEGF mRNAの顕著な増大が起こる^{6) 10)}。低酸素によるVEGF mRNAレベルの上昇は、mRNA分子の安定化が大きな役割を果たすことが明らかにされており²¹⁾、最近、VEGF mRNAの3'非翻訳領域のアデニル酸/ウリジル酸豊富領域2ヶ所とピリミジン豊富領域1ヶ所に低酸素により誘導される因子が結合しmRNAの安定性が増大することが報告された²²⁾。ウシVEGF mRNA⁹⁾の3'非翻訳領域には、mRNAの安定性に関与するとされる配列[5'-UUAUUUA (U/A) (U/A)-3']^{17) 18)}に類似の配列が3ヶ所(塩基番号1481-1489、1498-1506、1527-1535)、最近チロシン水酸化酵素mRNAで同定された低酸素により誘導されるmRNA結合因子の結合配列[5'-(U/C) (C/U) CCCU-3']¹⁹⁾と一致する配列が1ヶ所(塩基番号1141-1146)存在している。VEGF-B、VEGF-C、PIGF mRNAの3'非翻訳領域にもこういった配列に類似した配列が認められた(図1B、3B、4B)ことから、VEGFファミリーの他の因子のmRNAも低酸素により調節を受ける可能性が考えられた。

次に、血管細胞でのVEGFファミリーの発現を解明するため、今回明らかにしたウシ配列と報告されているヒト配列をもとにプライマーを作製し様々な酸素濃度で培養した微小血管周皮細胞と微小血管内皮細胞より分離したポリA' RNAを用いてRT-PCR法を行った。その結果、周皮および内皮両細胞でVEGFファミリーのすべてのmRNAが検出された(図5、6)。周皮細胞では、VEGFおよびPIGF mRNAが低酸素により増加を示したのに対し、VEGF-BとVEGF-CのmRNAレベルは低酸素状態ではほとんど影響を受けなかった(図5)。また、内皮細胞では、VEGFおよびPIGF mRNAはもとより、VEGF-BとVEGF-CのmRNAレベルも低酸素状態で増加を示した(図6)。ごく最近、Enholmら²³⁾は、ラットC6グリオブラストーマ細胞株でVEGF-C mRNAの構造不明のマイナーなバリエーションが低酸素により誘導されるがVEGF-Cの主要なmRNAおよびVEGF-B mRNAは低酸素の影響を受けないこと、ヒトIMR-90繊維芽細胞株ではVEGF-B、VEGF-C mRNAとも低酸素の影響を受けないことを

報告した。内皮細胞、周皮細胞とC6グリオブラストーマ細胞株、IMR-90繊維芽細胞株での低酸素に対するVEGF-B、VEGF-CのmRNAレベルの動態の違いの機構は現在のところ明らかではないが、細胞種の違いあるいはmRNAの3'非翻訳領域に存在するアデニル酸/ウリジル酸豊富領域やピリミジン豊富領域の数や性質の差によるものかも知れない。VEGF-B、VEGF-C、PIGF各遺伝子の転写調節領域の構造と機能の詳細はいまだ明らかではないが、mRNAの3'非翻訳領域による制御に加えて遺伝子の5'転写調節領域に存在する低酸素誘導性因子(hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)²⁹およびHIF-1 α 様因子(HIF-1 α -like factor, HLF)²⁰結合配列の有無が各因子の低酸素に対する反応性の違いを生んでいる可能性も考えられる。

さらに、血管細胞で発現しているVEGFファミリーのmRNA量比を明らかにするため、競合PCRを行った(図7, 8)。その結果、ヒト微小血管内皮細胞とウシ微小血管周皮細胞に存在するVEGFファミリーのmRNAのコピー数は表3のように算出され、通常酸素濃度下のヒト微小血管内皮細胞ではPIGFが最も多く発現していることが示された。内皮細胞のポリA⁺RNA 1 μ gは約 3×10^6 個の細胞に相当することから、細胞あたりおよそVEGF 2~3分子およびPIGF 300分子のmRNAが存在していると推定された。内皮細胞のVEGF-BとVEGF-Cは、RT-PCRで検出されるが定量PCRでは両者とも定量範囲以下であり、それぞれ細胞あたり1分子以下で内皮細胞の一部のみがVEGF-BとVEGF-Cを産生しているものと推定された。また、通常酸素濃度下のウシ周皮細胞ではVEGF-Cが最も多く産生されていることが示された。血管周皮細胞のポリA⁺RNA 1 μ gは約 2×10^6 個の細胞に相当することから、周皮細胞では細胞あたりおよそVEGF 12分子、VEGF-B 1分子、VEGF-C 60分子のmRNAが存在していると推定された。また、周皮細胞のPIGFは細胞あたり1分子以下で、周皮細胞の一部のみがPIGFを産生しているものと考えられた。

現在のところVEGF-B、VEGF-C、PIGFの生理機能は未だ明確ではないが、VEGF-Cは、その主要な受容体であるFlt-4がリンパ管内皮細胞に特異的に発現することから、リンパ管内皮細胞に特異的に作用すると考えられてきた^{27,28}。しかしながら、本研究において周皮細胞がVEGFの約5倍のVEGF-C mRNAを発現していることが示されたこと(表3)、Flt-4受容体は微小血管内皮細胞でも発現が認められること^{7,9}また翻訳後修飾により産生されたVEGF-Cが培養細胞を用いた実験で内皮細胞上のKdr(VEGFR-2)に作用しVEGF様の作用が観察されること²⁰から、VEGF-Cは血管内皮細胞においても重要な機能を担っていることが考えられる。また、PIGFはFlt-1受容体に作用するとされてきたが、最近VEGFとPIGFがヘテロダイマーを形成しKdr受容体にも作用して内皮細胞増殖を促進することが報告された²⁹。本研究において微小血管内皮細胞がVEGFの約100倍のPIGF mRNAを含んでいること(表3)が示されたことは、血管内皮細胞で産生されるVEGFの多くがPIGFとのヘテロダイマーとして分泌される可能性を示唆しており、低酸素による内皮細胞の増殖促進がVEGFアンチセンスオリゴヌクレオチドのみならずPIGFアンチセンスオリゴヌクレオチドでもほぼ完全に抑制されるという観察(野村ら、未発表データ)に合致すると考えられる。VEGF-Bはいまだその受容体が同定されていないが、血管内皮細胞に作用してDNA合成を促進することが報

告されている¹⁰。VEGF-Bは内皮細胞と周皮細胞で同程度の発現が認められたことから、血管細胞での機能が注目される。

本研究で、血管細胞自身がVEGFのみならずVEGF-B、VEGF-C、PIGFを発現していることが示されたことから、これら因子もVEGFとともにオートクリンまたはパラクリンに血管細胞自身に作用している可能性が考えられた(図10)。今後血管機能の恒常性維持や血管新生の機構を明らかにしていくうちに、これらVEGFファミリーの機能の解明が必須と考えられる。

結 論

1. 本研究により、VEGFファミリーに属する新しいメンバー、VEGF-B、VEGF-C、PIGFのウシcDNAとこれらがコードする蛋白の構造が初めて明らかとなった。

2. ウシ網膜微小血管周皮細胞とヒト皮膚微小血管内皮細胞でのVEGFファミリーの発現をRT-PCR法により検討した結果、両細胞種でVEGFとともにVEGF-B、VEGF-C、PIGFすべてのmRNAが検出された。血管新生の主要因である低酸素によって周皮細胞ではVEGF mRNAとPIGF mRNAが、内皮細胞では4 mRNA分子種すべてが増加した。

3. 競合PCR法により、微小血管内皮細胞におけるmRNA量比はPIGF > VEGF > VEGF-B、VEGF-Cの順に高く各々細胞あたり約300分子、2~3分子、1分子以下と算定された。周皮細胞ではVEGF-C (60分子/細胞) > VEGF (12分子/細胞) > VEGF-B (1分子/細胞) > PIGF (1分子以下/細胞)の順であった。

以上より、微小血管細胞自身がVEGFのみならずVEGF-B、VEGF-C、PIGFを産生していることが明らかとなり、これらの因子もVEGFとともにオートクリンまたはパラクリンに血管細胞自身に作用し、血管の恒常性維持や血管新生に関与している可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導と本論文の御校閲を賜りました山本 博教授に深甚なる謝意を表します。また、始終直接御指導頂きました米倉秀人助教授と御支援御協力頂きました金沢大学医学部生化学第二講座の皆様へ感謝致します。

文 献

- 1) Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48-50, 1997
- 2) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989
- 6) Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashima

- T, Yamashita J, Yamamoto H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270: 28316-28324, 1995
- 7) 川上卓久, 山岸昌一, 野村素弘, 藤森英希, 劉 曉旭, 原田真市, 浦山 博, 渡辺洋宇, 米倉秀人, 山本 博. 血管新生と血管VEGF: 低酸素応答における内皮heterogeneityと管腔形成へのVEGFの関与. *生化学* 68: 1054, 1996
- 8) Yamamoto H, Nomura M, Yamagishi S, Kawakami T, Harada S, Tsubamoto S, Liu X, Yonekura H. Vascular VEGF: The expression and roles in hypoxia-driven angiogenesis. *J Vasc Res* 33 (S1): 110, 1996
- 9) 米倉秀人, Xiaoxu Liu, 山岸昌一, 野村素弘, 右田秀幸, Kari Alitalo, 山本 博. 血管新生のオートクリン制御. *生化学* 69: 488, 1997
- 10) 山本靖彦, 藤森英希, 山岸昌一, 野村素弘, 米倉秀人, 山本 博. 低酸素の周皮細胞増殖促進作用はVEGFをメディエーターとする. *生化学* 69: 780, 1997
- 11) Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2576-2581, 1996
- 12) Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15: 290-298, 1996
- 13) Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9267-9271, 1991
- 14) Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinase involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129: 895-898, 1995
- 15) Yonekura H, Nata K, Watanabe T, Kurashina Y, Yamamoto H, Okamoto, H. Mosaic evolution of prepropancreatic polypeptide. II Structural conservation and divergence in pancreatic polypeptide gene. *J Biol Chem* 263: 2990-2997, 1988
- 16) Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9717-9721, 1989
- 17) Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ. AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol* 14: 7984-7995, 1994
- 18) Zubiaga AM, Belasco JG, Greengard ME. The nonamer UUAUUUAU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 15: 2219-2230, 1995
- 19) Czyzyk-Krzeska MF, Beresh JE. Characterization of the hypoxia-inducible protein binding site within the pyrimidine-rich tract in the 3'-untranslated region of the tyrosine hydroxylase mRNA. *J Biol Chem* 271: 3293-3299, 1996
- 20) Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 271: 19310-19317, 1996
- 21) Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Vecchio SD, Lei K-J, Chou JY, Persico MG. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 8: 925-931, 1993
- 22) Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 16: 3898-3911, 1997
- 23) Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol Chem* 271: 25492-25497, 1996
- 24) Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factor, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 14: 2475-2483, 1997
- 25) Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: HIFing and HIFing. *Cell* 89: 9-12, 1997
- 26) Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4273-4278, 1997
- 27) Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122: 3829-3837, 1996
- 28) Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276: 1423-1425, 1997
- 29) Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang M-K, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML-S. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271: 3154-3162, 1996

Structure and Expression of VEGF Family – Isolation of Bovine cDNAs Encoding VEGF-B, VEGF-C and PIGF, and Quantitative Analysis of Their Expressions in Microvascular Endothelial Cells and Pericytes – Xiaoxu Liu, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med Soc., **106**, 614 – 626 (1997)

Key words vascular endothelial growth factor family, microvascular endothelial cells, pericytes, hypoxia, cDNA cloning

Abstract

As a first step toward the elucidation of the expression and function of new members of the VEGF family, the author isolated the bovine cDNAs encoding VEGF-B, VEGF-C and PIGF from the bovine heart-derived cDNA library. (1) The bovine VEGF-B cDNA, which was named as VEGF-B167, encoded 188-amino acid protein containing 21-amino acid signal sequence. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the bovine and human cDNAs shared 93.7% and 93.6% sequence identity, respectively. A splice variant encoding mature VEGF-B of 186 amino acids was also isolated. (2) The bovine VEGF-C cDNA encoded 420-amino acid protein containing 20-amino acid signal sequence. The nucleotide and deduced amino acid sequences of bovine and human cDNAs shared 86.9% and 88.1% sequence identity, respectively. (3) The bovine PIGF cDNA encoded 149-amino acid protein containing 20-amino acid signal sequence. The nucleotide and deduced amino acid sequences of bovine and human cDNAs shared 74.9% and 75.2% sequence identity, respectively. Next, bovine retinal pericytes and human dermal microvascular endothelial cells were cultured under various oxygen tensions, and subjected to the analysis of expression of the VEGF family genes in these cell types. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis demonstrated that both cells possess not only VEGF mRNA but also VEGF-B, VEGF-C and PIGF mRNAs. To quantify the amount of each mRNA species, the author conducted competitive PCR using mRNAs from human microvascular endothelial cells and from bovine pericytes cultured under normoxia. The competitive PCR established that 1 μ g polyA⁺ RNA from the endothelial cells contains about $\sim 7.5 \times 10^5$ molecules of VEGF mRNA and $\sim 9.5 \times 10^7$ molecules of PIGF mRNA, and VEGF-B and C mRNAs below quantitative level (less than $\sim 3.8 \times 10^4$ copies and $\sim 4 \times 10^2$ copies/ μ g polyA⁺ RNA, respectively). The competitive PCR also showed that 1 μ g polyA⁺ RNA from the pericytes contains $\sim 2.4 \times 10^6$, $\sim 1.2 \times 10^5$, $\sim 1.2 \times 10^7$ and $\sim 2.4 \times 10^4$ copies of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and PIGF mRNAs, respectively. These results suggest that the members of the VEGF family play important roles in the homeostasis of the microvascular system and in angiogenesis in autocrine and paracrine manners.