

学 位 論 文 要 旨

血管形成を促進する微生物由来生理活性物質の探索研究 Exploratory studies of microbe-derived compounds that promote blood vessel formation.

高畑（廣田）由紀
Yuki Hirota-Takahata

血管は、全身に酸素や栄養を供給し、二酸化炭素や老廃物を回収する重要な器官である。動脈硬化や血栓等で血管が狭窄、あるいは閉塞すると、血流が滞り、細胞は低酸素・低栄養状態に陥る。特に、低酸素状態は生命にとって危険な状態であり、短時間で細胞の機能障害や、壊死を招き、さらには死へと至る。そこで、血管を人為的に形成することで虚血部位への血流回復をはかろうとする治療的血管新生と呼ばれる研究がなされている。

これまでに血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）や塩基性繊維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor; bFGF）等の血管新生作用を有する因子の補充やそれらの遺伝子発現を利用した治療が試みられているが、十分な成果は得られていない。

機能的な血管は、血管新生と、それに続く血管安定化という2つの過程を経て形成されるが、そこには多くの血管新生因子、抗血管新生因子や血管安定化因子が関与している。そして、これらの因子の活性は、その量的バランスや、血管内皮細胞とそれを取り巻く周細胞との物理的な相互作用等、様々な要因で制御されている。先に述べた VEGF や bFGF 等の血管新生因子の単独補充が十分な機能血管を誘導できなかったのは、この過程を十分に促進できなかったためと考えられる。そこで、これら2つの過程を、様々な因子が関与する生体本来の血管形成環境に近い状態で促進させることができる物質は、機能的な血管の形成を促進し、治療的血管新生に有用であると考えた。そして、そのような物質を取得するために、以下に述べる2つのアプローチをとった。1つは、生体が低酸素条件下で行う血管新生を模倣するアプローチで、もう1つは血管新

生と同時に血管安定化も誘導するアプローチである。また、創薬シードの探索ソースには微生物培養液サンプルを用いることとし、低濃度で活性を示す物質の取得を目指すことにした。

低酸素条件下の血管新生を模倣するアプローチでは、この過程に重要な役割を果たすことが知られている hypoxia-inducible factor (HIF) に着目した探索を実施した。生体は、低酸素状態に陥ると HIF を安定化し、VEGF を含む多くの血管新生因子や、赤血球造血因子 (erythropoietin; EPO) 等を発現誘導して、低酸素に対処する。このことから、常酸素条件下で HIF を活性化する物質は、生体が有している血管新生環境を模倣させることが可能と考えた。

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 に HIF 応答性ルシフェラーゼレポーターを導入した細胞株を樹立し、それを用いてスクリーニングした結果、*Streptomyces* sp. SANK 60101 株の培養液中に強い活性を見出した。そして、その培養液からインドリン骨格を有する新規物質 A-503451 A と、テトラヒドロキノリン骨格を有する既知物質 virantmycin を取得した。A-503451 A と virantmycin は、骨格は異なっていたが、窒素原子の β 位に塩素原子を有する点が共通していた。A-503451 A を用いて各種評価を実施したところ、VEGF、および EPO をタンパク質レベルでも誘導し、目的とした HIF 活性化能を有する物質であることが明らかとなった。

血管新生と血管安定化の両方を誘導するアプローチでは、安定化の機構が十分には解明されていないため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) とヒト皮膚繊維芽細胞 (normal human dermal fibroblasts; NHDF) との共培養系によるフェノタイプアッセイを用いたスクリーニングを実施した。本アッセイ系において、VEGF は HUVECs の形態を管状に誘導するのに対し、代表的な血管安定化因子である angiopoietin-1 (Ang-1) は、島状に誘導する。そこで、VEGF とは異なり、Ang-1 様の形態を誘導する物質は、機能的な血管形成を誘導することが可能と考え、そのような物質を探索した。その結果、*Streptomyces* sp. SANK 63697 株、および *Incrucipulum* sp. SANK 10414 株の培養液から、島状形態を誘導する新規物質 vestaine 類、および島状と管状の両方の形態を誘導する新規物質 F-36316 類をそれぞれ発見した。Vestaine 類は、*N*-アセチルシステインと脂肪鎖から成る両親媒性物質であり、ケト-エノール互変異性を介したジアステレオマーで構成され、同一分子内にトリメチルアンモニウムとカルボキシラートアニオンを有する等、非常にユニークな物質だった。一方、F-36316 類は、3-アシル化テトロン酸構造を有する物質であり、両親媒性であることや、ケト-エノール互変異性を有する点は vestaine 類と共通していた。そして、両物質は共に、マウスを用いた耳透過抑制試験において VEGF が誘導する血液の漏出を抑制し、血管安定化剤としての可能性を示した。

本研究で発見した HIF 活性化物質 A-503451 類と、機能的血管形成促進物質 vestaine 類および F-36316 類は、虚血性疾患の新たな治療法の開発に役立つことが期待される。