

血管成熟化促進作用を持つ新規天然物 vestaine の同定

第一三共株式会社 石 本 容 子

はじめに

血管は酸素と栄養を全身に供給し、また、老廃物を回収する重要な器官である。そのため、生体は血管新生という仕組みで新しい血管を誘導している。新生血管は、その後の成熟化と呼ばれる周細胞による被覆の過程を経ることで構造的に安定した血管となり、生体において機能を発揮している。

近年、血管成熟化の破綻が、糖尿病性網膜症や虚血後の脳梗塞の重症化、固形がんにおける抗癌剤の効果減弱など、様々な疾患の原因となることが示唆されてきている^{1)~3)}。上述罹患患者では周細胞に被覆されていない脆弱な血管が観察されており、これが血管内容物の漏出や低酸素状態を引き起こす一因であると言える。

以上より、血管の成熟化を促進する薬剤は、これら病態の改善に有効な治療法であると考えられる。本稿では、血管成熟化促進剤の創製を目指しておこなった我々の取り組みについて紹介する⁴⁾。

1. 血管成熟化促進物質のスクリーニング

血管成熟化は、血管新生因子と抗血管新生因子のバランスや血管内皮細胞と周細胞の相互作用など、様々な要因で制御される複雑な過程である。ゆえに、その機構は十分には解明されておらず、効果的な薬剤も開発されていない。このような背景を打破すべく、血管成熟化促進物質の探索は、共培養系による phenotype screening にておこなうことにした。また、スクリーニングソースとしては、天然物ライブラリを選択し、低濃度で最初から *in vivo* で作用を示す化合物の取得を目指した。

ヒト線維芽細胞 (NHDF) をフィーダーとし、その上に緑色蛍光蛋白 (EGFP) でラベルしたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を播種し、代表的な血管新生因子である血管内皮増殖因

子 (VEGF) および代表的な血管成熟化促進因子である angiopoietin-1 (Ang-1) 存在下で培養したところ、それぞれ特徴的な血管内皮細胞のネットワークが形成された (図1A, B)。そこで、Ang-1 による島状の phenotype に注目し、同様の形態を誘導する物質をイメージングアナライザーを用いて探索した。結果、*Streptomyces* sp. SANK 63697 株の抽出物に、島状の形態変化を誘導する活性を見出した (図1C)。

2. Vestaine の精製と構造決定⁵⁾

SANK 63697 株の培養液から、各種カラムクロマトグラフィーを経て、2つの活性物質 vestaine A₁ および B₁ を単離した。精製の過程で、vestaine A₁ および B₁ は、平衡関係にある2つの物質で構成されていることが分かった (図1D, E)。MS, NMR等を用いた構造解析の結果、vestaine類は、N-アセチルシステインと脂肪鎖から成る新規物質であること (図1F)、平衡関係にある2つの物質は、ケト-エノール互変異性を介したジアステレオマーであることが明らかとなった。また、vestaine A₁ と B₁ の違いは、脂肪鎖長であった。

合成的手法を用いた vestaine A₁ の構造活性相関からは、活性発現に脂肪鎖、ケトン、トリメチルアミンが必須であることが示唆された。

3. Vestaine の血管作用

3-1. VEGF との違い

Vestaine A₁ は、共培養系において EC₅₀ = 60 nM と強い活性を示し、その作用は VEGF に対して相加的であった (図2A)。

増殖期にある血管内皮細胞では ERK の活性化が優位に、成熟化し安定化している血管内皮細胞では Akt の活性化が優位となっている⁶⁾。Vestaine A₁ は ERK 及び Akt のリン酸化を誘導した。その誘導パターンは、Akt を強くリン酸化する一方

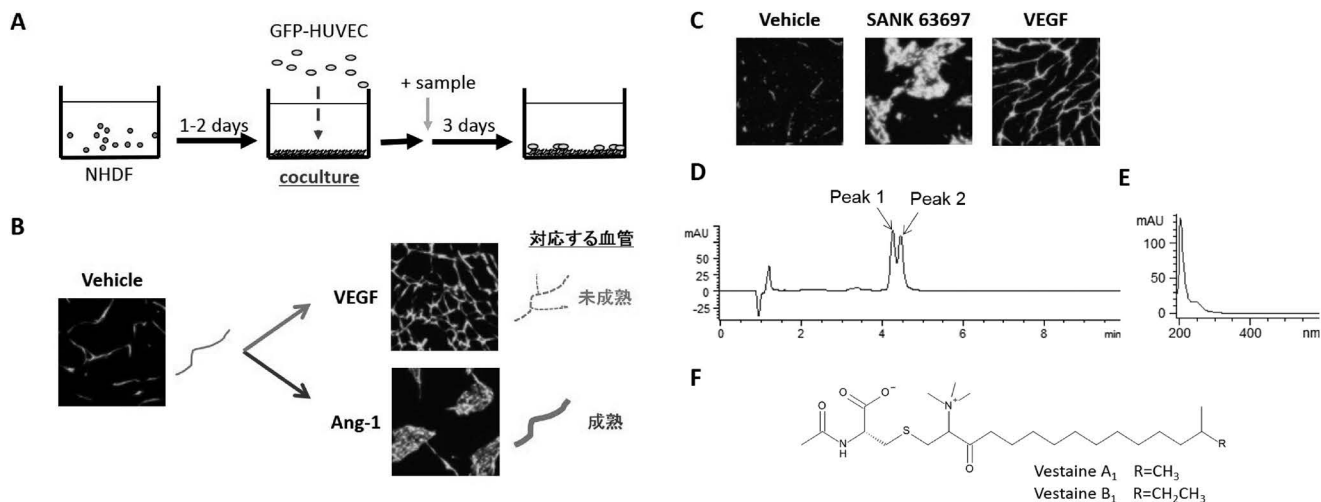


図1 共培養系と vestaine

A) 共培養系 B) 代表的な phenotype C) SANK 63697 の phenotype

D) vestaine A₁ の HPLC chart E) Peak1 の UV スペクトラム F) vestaine の構造

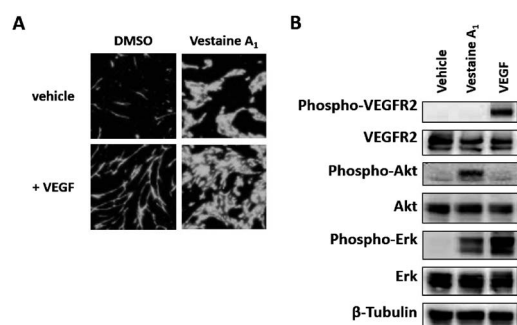


図2 Vestaine A₁の活性
A) VEGF存在下での形態変化
B) シグナル伝達経路に与える影響

ERKのリン酸化は弱く、VEGFとは異なるものであった。また、VEGFR2の活性化も誘導しなかった(図2B)。これらの結果から、Vestaine A₁はVEGF経路を介さずに、血管内皮細胞に作用することが確認された。

3-2. 血管新生作用

Vestaineの血管新生作用の有無を調べるために、代表的な血管新生活性評価系であるmatrigel tube formation assayと血管内皮細胞に対する生存改善試験をおこなった。Vestaine A₁はmatrigelの系にて強くtube形成を誘導した。また、血清飢餓による血管内皮細胞死を抑制したことから、血管新生作用を有することが示唆された。

3-3. 血管透過性抑制作用(血管成熟化促進作用)

血管成熟化の破綻が認められる病態においては、過剰なVEGF産生による血管透過性の亢進が問題となる。血管透過性に対する作用をHUVEC単層培養系における電気抵抗値にて評価したところ、Vestaine A₁は単独で電気抵抗値を上昇させた。更に、VEGF添加3時間後にvestaine A₁を添加したところ、vestaine A₁はVEGFによる電気抵抗値の低下を抑制することが示された(図3A)。続いて、Vestaine A₁が*in vivo*においても血管透過抑制作用を発揮するか、マウス耳血管におけるEvans blue dyeの漏出を指標に調べた。その結果、vestaine A₁の前投与により、VEGFによるEvans blue dyeの漏出は抑制された(図3B)。以上より、vestaine A₁は*in vitro*および*in vivo*いずれにおいても、VEGF誘導性の血管透過性の亢進を強力に抑制することが示唆された。

おわりに

天然物に対するphenotype screeningより、新規物質vestaineを同定した。Vestaineは、VEGF同様血管新生作用を有する一方、血管透過性制御においてはVEGFに対して阻害的に働くユニークな生理活性物質であることが示唆された。Vestaineの血管への活性は非常に強く、異常な血管新生に起因する病気の治療薬の候補化合物となり得る。加えて、血管透過性の制御を始めとする血管成熟化を解析するためのツール化

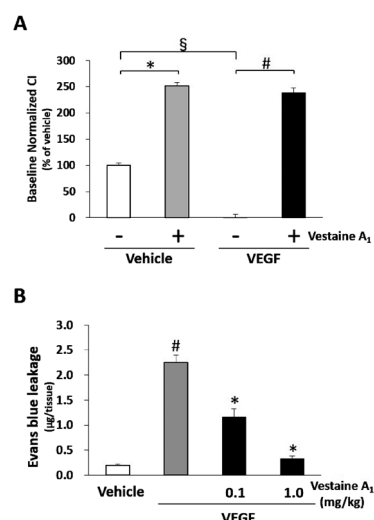


図3 Vestaineの血管透過性抑制作用(血管成熟化促進作用)
A) *in vitro* (血管内皮細胞電気抵抗値)
B) *in vivo* (マウス耳血管血管透過性)

合物としても、有用と考えられる。

(引用文献)

- 1) Hendrick AM, Gibson MV, Kulshreshtha A. Diabetic Retinopathy. *Prim Care*, 42, 451-464 (2015)
- 2) Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T, Effects of angiotensin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats. *PLoS ONE*, 9, e98639 (2014)
- 3) Carmeliet P, Jain RK, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 417-427, (2011)
- 4) Ishimoto Y, Hirota-Takahata Y, Kurosawa E, Chiba J, Iwadate Y, Onozawa Y, Hasegawa T, Tamura A, Tanaka M, Kobayashi H. A novel natural product-derived compound, vestaine A₁, exerts both pro-angiogenic and anti-permeability activity via a different pathway from VEGF. *Cell Physiol Biochem*, 39 (5), 1905-1918, (2016)
- 5) Hirota-Takahara Y, Kurosawa E, Ishimoto Y, Iwadate Y, Kizuka M, Chiba J, Hasegawa T, Tanaka M, Kobayashi H. Vestaines, novel vasoactive compounds, isolated from *Streptomyces* sp. SANK 63697. *J Antibiot.*, 70 (2), 179-186, (2017).
- 6) Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiotensin-1. *Nat Cell Biol*, 10, 513-526 (2008)

謝 辞 本研究は、第一三共株式会社および第一三共RDノバールにておこなわれたものです。実験を一緒におこなってくださったプロジェクトメンバーの皆様、終始ご指導を賜りました皆様に深く感謝致しますと共に、この場を借りて厚く御礼を申し上げます。