

論文の内容の要旨

論文題目 心臓における血管内皮成長因子の発現とその
機能的意義

指導教官 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 杉下靖之

血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は、血管内皮細胞を特異的に増殖させる分子量約 45kDa の成長因子であり、その一方で血管透過性因子 (vascular permeability factor: VPF) としての作用も認識されている。VEGF は生体のさまざまな細胞、組織において発現し、これらの組織、細胞から分泌された VEGF は各種生体反応における血管透過性の亢進、血管新生に関与している。心臓や心筋細胞においても VEGF が発現していることは、1993 年より心筋梗塞の実験モデルや狭心症・心筋梗塞の臨床症例にて確認されている。さらに、血行再建術が困難な重症循環不全をきたした下肢や虚血性心疾患患者などの、実際の臨床症例に対する VEGF 遺伝子注入による血管新生療法も今日に至るまでにすでに施行されてきた。

VEGF の発現を誘導する因子としては虚血、低酸素が最も注目されているが、その他の因子として、tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 β といった炎症性サイトカイン、およびその類縁物質である lipopolysaccharide (LPS) も VEGF の発現を誘導することが報告されている。

VEGF やその発現に関与している hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α 、arylhydrocarbon-receptor nuclear translocator (ARNT)、および受容体である *fms*-like tyrosine kinase (Flt)-1、fetal liver kinase (Flk)-1/kinase domain receptor (KDR) について既にこれらのノックアウトモデルも作成されているが、これらはすべて胎生約 10 日前後で死亡してしまい、心血管系の発達、形態形成に異常をきたしていた。また、心臓においてはその原基が形成され始める頃には既に VEGF が発現していることも示されている。

他方、一般に心不全という病態に関わる因子として炎症性サイトカインが注目され、また近年不全心のリモデリングに関与する因子として matrix metalloproteinases (MMPs) が関心をもたれている。これまでの報告からこれら両者とも VEGF と発現調節について何らかの関係があることが示唆されている。

以上のように、VEGF は循環器領域において、虚血・低酸素刺激による血管新生という作用以外にも、胎生期における心血管系の発達や形態形成に関わる作用、各種炎症性サイトカインに対する作用、心機能障害・心不全の病態形成に関する作用等、多彩な作用を有することが考えられる。したがって本研究では、胎生期心における VEGF の発現と作用、炎症反応物質に対する応答としての VEGF の発現、不全心筋における VEGF 発現の意義、ということに焦点を絞り、心臓、特に心筋細胞における VEGF の発現とその機能的意義について検討することを目的とした。

まずはじめに、胎生 10 日目ニワトリ胚を用いて胎生期の心臓における VEGF の発現の状態について解析を試みた。ニワトリ胚の VEGF cDNA をクローニングした結果、ニワトリ胚 VEGF はウズラ胚とはアミノ酸レベルで 100%、ヒト、ラット、マウスとも 70%以上と種を超えて非常に高い相同性を示した。さらに、同一の mRNA の alternative splicing により 4 種類の isoform が生成されることが示唆された。また、Northern blot 法にてニワトリ胚心室筋細胞における VEGF mRNA の発現レベルを解析したところ、VEGF mRNA はすでに何も刺激を加えない基礎状態から有意に発現を認めた。そこに A キナーゼ、C キナーゼ刺激を加えるとその発現レベルはさらに上昇した。逆に、A キナーゼ、C キナーゼ阻害薬を加えても発現レベルは低下しなかったが、チロシンキナーゼ阻害薬では発現レベルの低下を認めた。また、ニワトリ

胚 flk-1 もあわせてクローニングし、RT-PCR や Northern blot 法にて心筋細胞における flk-1 mRNA の発現を解析した結果、どちらの手法によっても有意に発現していることが示された。さらに、*in situ hybridization* 法により実際に心筋細胞において VEGF mRNA と flk-1 mRNA が発現していることが示された。以上のことより、胎生 10 日目の心臓、心筋細胞において VEGF は有意に発現していること、その発現を維持するためにはチロシンキナーゼが重要な働きをしていることが示された。さらに胎生期には心筋細胞そのものにも VEGF の受容体である Flk-1 が発現している可能性が示唆され、この時期には心筋細胞において発現した VEGF が autocrine 作用にて心室筋細胞自身に何らかの作用を及ぼしていることが推察される。

次に、新生仔ラット培養心室筋細胞を用い、心筋細胞における LPS 刺激に対する VEGF の発現増強作用、およびその細胞内機構について検討した。Northern blot 法によって新生仔ラット培養心室筋細胞における VEGF mRNA の発現を解析したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 刺激にて、わずか 1 時間後というごく早期から VEGF mRNA の発現が増強してさらに 6 時間以上持続し、VEGF mRNA は iNOS mRNA と比較して非常に早い時間経過をたどることが示された。また、LPS が iNOS mRNA を誘導する際に重要な経路である転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) やチロシンキナーゼについて、これらの阻害薬を加えても、LPS 刺激 6 時間後の VEGF mRNA の発現レベルが減少することはなかった。さらに、ラット心室筋培養液中の VEGF 濃度を ELISA 法にて解析した結果、LPS 刺激 6 時間後にはコントロールと比較して VEGF 濃度が有意に増加し (約 38%)、さらに 12 時間後では VEGF 濃度は約 53% 高値を示した。以上の結果より、LPS によって新生仔ラット培養心室筋細胞における VEGF の mRNA 発現レベル、及び培養液中への VEGF の分泌が増強されることが示された。またその時間経過や各種阻害薬による前処理の結果からしてこれまでに知られていた LPS 刺激によって活性化する経路とは違うものが関与している可能性が示唆された。これまでも実験モデルにより LPS 投与 5-24 時間後に心臓において間質の浮腫が出現していることを認めており、今回の結果からすると VEGF の発現が間質浮腫の出現をきたし、さらには心臓のコンプライアンスが低下により拡張機能に影響を与える可能性が推察される。本研究で使用した LPS 刺激以外にも他の炎症性サイトカ

インでも同様に VEGF 発現の上昇をきたすことが考えられ、とすると炎症反応時に心筋は VEGF を発現して間質浮腫をきたし、心機能に影響を及ぼす可能性を秘めていることが推察される。

最後に、心不全症例より得た生検材料を用いヒト不全心筋における VEGF 発現と血行動態指標との関係について検討を加えた。ヒト不全心筋に対する免疫組織化学的検討の結果、11 例中 4 例で心筋細胞に VEGF の発現を認めた。しかも VEGF 陽性群では陰性群に比べ、LVEDP は有意に高く (16.0 ± 8.4 vs. 6.6 ± 2.1 mmHg、 $p < 0.05$)、LVEDV は有意に大きく (273.0 ± 57.1 vs. 159.6 ± 36.3 ml、 $p < 0.05$)、EF は有意に低かった (0.24 ± 0.09 vs. 0.40 ± 0.12 、 $p < 0.05$)。この結果、VEGF の発現している症例では発現していない症例に比べて心機能が低下している可能性が示された。心機能が低下することによって VEGF の発現が増強されるのか、あるいは逆に発現した VEGF が心機能の低下をさらに進行させるのか、双方とも可能性が考えられる。いずれにしろ、本研究の結果から、VEGF の発現と心機能の間には何らかの因果関係があることが推察される。

本研究においては、心臓における VEGF の発現及びその機能的意義ということに注目し、胎生期における発現とその細胞内機構、炎症反応物質による発現上昇作用、及び不全心における VEGF の発現と機能的意義、という点に焦点を絞って解析を試みた。その結果、これまで認識されてきたような血管新生を必要とする虚血状態のみだけでなく、胎生期における発達、炎症反応時、心不全状態、等のさまざまな場面で VEGF は心臓での発現が増強し、さらに心臓そのものにも影響を及ぼしている可能性があることが示唆された。現時点では虚血に対する血管新生作用のみを期待して VEGF の臨床応用が試みられているがそれ以外の作用についてはあまり考慮されていない。今後は、VEGF の心臓自体に対する作用についても十分な研究・考察がなされていく必要がある。