

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 杉 下 靖 之

本研究は、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の循環器領域における多彩な作用を明らかにするため、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の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 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した。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。

2. 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解析した。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- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) やチロシキナーゼについて、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。
3. 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解析した。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 ( $16.0 \pm 8.4$  vs.  $6.6 \pm 2.1$  mmHg、 $p < 0.05$ )、LVEDV は有意に大きく ( $273.0 \pm 57.1$  vs.  $159.6 \pm 36.3$  ml、 $p < 0.05$ )、EF は有意に低かった ( $0.24 \pm 0.09$  vs.  $0.40 \pm 0.12$ 、 $p < 0.05$ )。

以上、本論文は心臓において VEGF が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を明らかにした。本研究は、これまで虚血に対する血管新生作用のみしか認識されていなかった VEGF の作用に対して実際には心臓自体にも様々な作用を有することを示し、今後このような視点からも十分に研究・考察する必要があることを新たに提言するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。