

学位論文題名

ヒト正常及び心筋梗塞心における Vascular  
Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現と局在

学位論文内容の要旨

緒言

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管内皮増殖作用、血管新生作用、血管透過性亢進作用を有する増殖因子で、その発現は血管増生の著しい Glioblastoma などの腫瘍細胞での報告はあるがヒト心臓での VEGF の発現とその役割については未だ報告されていない。心臓で血管新生が著明に認められる病態の一つに心筋梗塞があげられ、梗塞後の側副血行路の形成は虚血心筋の回復の為に重要な役割をはたすことが知られており、この血管新生については最近、梗塞部位における basic fibroblast growth factor (b-FGF) 等の増殖因子の関与も報告されているが、梗塞部位においては複数の異なる angiogenic factor が血管新生に関与している可能性が考えられる。本研究の目的はヒト正常心および心筋梗塞症例心における VEGF の mRNA の発現とその局在を検討し、VEGF のヒト心臓における役割を明らかにする事である。

方法

(1) 対象

対象は北海道大学医学部附属病院及び関連病院において剖検された、非心疾患症例 7 例と急性心筋梗塞症例 4 例及び陳旧性心筋梗塞症例 4 例の計 15 例であり、いずれも死後 3 時間以内に臓器が摘出された症例である。

(2) 細胞

実験の陽性コントロールとして、VEGF mRNA の発現が報告されている HT1080 cell line を用いた。

(3) DNA と RNA プローブの作製およびプライマーの作製

Southern blot analysis に用いたプローブは、Human VEGF<sub>189</sub> cDNA を含むプラスミドから 930bp のインサートを切り出し、ランダムプライマー法により  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP でラベルした。in situ hybridization に用いたプローブは、このインサートを pBlue script KS の EcoRI site にサブクローニングし、T<sub>3</sub> / T<sub>7</sub> RNA polymerase と uridine 5-d- [<sup>35</sup>S] thiotriphosphate でラベルし使用した。RT-PCR に用いたプライマーは、VEGF 各 subtype の検出のためエクソン 5 上とエクソン 8 上に 2 種のオリゴヌクレオチドプライマーを作製した。

(4) RNA の抽出

非心疾患例は、右心房、左心室、僧帽弁と脳の組織を、また心筋梗塞例は予め連続面のパラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色にて梗塞周囲部分と対側健常部分を区別した各心筋組織を、acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform 法に基づいて行った。

### (5) reverse transcription-PCR

RT-PCRはヘキサランダムプライマーを用いて常法に従って行った。PCRはDNA thermal cyclerによりdenature 93°C 1分、annealing 63°C 2分、extension 72°C 3分を30サイクル施行した。

### (6) Southern blot analysis

RT-PCRの結果を確認するためPCRの増幅産物10 µlを、1.5% agarose gelにて電気泳動した後、ナイロン膜にブロットし55°Cでハイブリダイゼーションを15時間行った後に、2xSSC/0.1%SDSで室温にて15分2回、0.1xSSC/0.1%SDSで60°Cにて15分で2回洗い、感光した。

### (7) in situ hybridization法

クリオスタットにて薄切した凍結切片をProteinase Kで37°C 30分処理し、0.2% glycine/PBSにて15分2回洗浄し、無水酢酸処理の後50°Cにて18時間ハイブリダイゼーションを行い、RNaseA処理後、2xSSCにて5分、1xSSCにて10分、53°Cにて0.5xSSCで15分2回洗浄し、現像後ヘマトキシリン・エオジン染色を施行した。

### (8) 免疫組織学的検索

免疫染色はAvidin-biotin-peroxidase complex(ABC)法により行った。一次抗体には、マクロファージを認識するCD68と、リンパ球を認識するLeucocyte common antigenと、内皮細胞を認識する抗第VIII因子関連抗原を用いた。

## 結果

### 1) RT-PCRの結果

非心疾患例についてはヒト右心房、左心室、僧帽弁、脳の各部位において陽性コントロールHT1080と同様の3種のバンドの増幅を認めた。3種のバンドは399bp, 327bp, 195bpとそれぞれVEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>のmRNAから期待される大きさと一致した。これらのバンドはSouthern blot analysisによりVEGFに特異的なバンドである事が示された。弁組織においてはVEGF<sub>121</sub> ≧ VEGF<sub>165</sub>の順にバンドを認め、VEGF<sub>189</sub>のバンドは認められなかったが、右心房と左心室ではVEGF<sub>165</sub> > VEGF<sub>189</sub> > VEGF<sub>121</sub>の順にPCR量の産物を認め、subtypeの発現に違いを認めた。VEGF<sub>206</sub>相当のバンドはいずれの症例においても認められなかった。

### 2) in situ hybridizationの結果

非心疾患例では、心筋細胞の細胞質にVEGF mRNAの発現を示すシグナルを認めた。心筋内小動脈ではシグナルを認めなかった。急性心筋梗塞例では、梗塞周辺部に存在する心筋内小動脈の血管平滑筋細胞及び単核細胞に著明なシグナルの増強を認め、またこの時期の単核細胞の浸潤は、肉芽組織内に毛細血管の著しい増生を認める時、心筋梗塞症例で最も著明であった。梗塞周囲の心筋細胞と健全部位の心筋細胞とを比較しシグナルの強さに差は認められなかった。陳旧性心筋梗塞症例では、梗塞部位は膠原線維で占められ、梗塞周囲の血管平滑筋細胞や心筋細胞でのシグナルの増強は認めなかった。

### 3) 免疫染色の結果

CD68にて急性心筋梗塞周辺部の単核細胞は陽性に染色され、これらは細胞の大きさと形態より主にマクロファージと推測された。また、この単核細胞の最も著明に認められた症例の肉芽組織中には抗

第VIII 因子関連抗原に陽性を示し毛細内皮細胞の増殖を盛んに認めた。

## 考察

VEGFには splicing の違いにより、アミノ酸数の異なる4種類の subtype の産生があり、VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub> は可溶性であるが VEGF<sub>189</sub>、VEGF<sub>206</sub> は非可溶性で細胞膜に結合しており、この性質のために組織内での各 subtype の機能が異なるとの報告がある。今回の RT-PCR を用いた検討により、僧帽弁では心筋や脳組織と subtype の発現様式に違いを認めた事から、弁組織においては心筋あるいは他の臓器とは異なる役割を持つ可能性が考えられた。VEGF<sub>206</sub> の発現が認められなかった事に関しては心臓における VEGF<sub>206</sub> の発現が量的に少ないと考えられた。

心筋梗塞における側副血行路形成には、複数の angiogenic factor の関与が考えられており、b-FGF などの存在が現在まで報告されているが、今回の in situ hybridization の結果において、VEGF mRNA の発現が急性心筋梗塞では梗塞壊死心筋周辺部の血管平滑筋細胞と単核細胞に認められた事より血管新生及び側副血行路の形成への VEGF の関与が考えられた。急性心筋梗塞において肉芽組織内に毛細血管の著しい増生を認める時期の症例で最も著明な VEGF mRNA のシグナルの増強を認めた事と、一方陳旧性心筋梗塞では単核細胞の浸潤は消失しており血管平滑筋細胞でのシグナルの増強も認めなかった事より、VEGF の発現は肉芽形成の生じる1-2週目頃までに最も盛んに行われ、その後は徐々に低下してくる可能性も推測された。

以上より VEGF もこれまでに報告されている各種の増殖因子に加え心筋梗塞における血管新生に関与していると考えられた。

## 結語

ヒト正常及び梗塞心における VEGF mRNA の発現とその局在を明らかにする為に RT-PCR、in situ hybridization 法を用いて検討し以下の結果を得た。

- 1) VEGF mRNA について RT-PCR を行い、非心疾患例の各心房・心室僧帽弁にてその存在を確認した。VEGF mRNA の subtype について検討したところ心筋組織と弁組織で subtype の発現様式が異なっていた。
- 2) 急性及び陳旧性心筋梗塞例における VEGF mRNA を、心筋梗塞周囲部と非梗塞部の心筋にて検討したが、いずれも非心疾患例と同様であり subtype の発現様式に変化はなかった。
- 3) VEGF mRNA の発現と局在について in situ hybridization 法にて検討したところ、非心疾患例では主に心筋細胞にその発現を認めた。一方、急性心筋梗塞例では、梗塞周囲の血管平滑筋細胞と単核細胞に VEGF mRNA の発現を認めた。心筋梗塞周囲部と非梗塞部の心筋細胞間での発現の差は認めなかった。

以上の結果よりヒト心臓において VEGF が生成される事が明らかになり、この遺伝子発現の心筋梗塞における修復過程への関与が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕  
副 査 教 授 小 山 富 康  
副 査 教 授 古 館 正 従

学 位 論 文 題 名

## ヒト正常及び心筋梗塞心における Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現と局在

Vascular endothelial growth factor(VEGF)は血管内皮増殖作用、血管新生作用、血管透過性亢進作用を有する増殖因子で、その発現は血管増生の著しいGlioblastomaなどの腫瘍細胞での報告はあるがヒト心臓でのVEGFの発現とその役割については未だ報告されていない。梗塞後の側副血行路の形成は虚血心筋の回復の為に重要な役割をはたすことが知られており、この血管新生については最近、梗塞部位におけるbasic fibroblast growth factor (b-FGF)等の増殖因子の関与も報告されているが、梗塞部位においては複数の異なるangiogenic factorが血管新生に関与している可能性が考えられる。本研究の目的はヒト正常心および心筋梗塞症例心におけるVEGFのm-RNAの発現とその局在を検討し、VEGFのヒト心臓における役割を明かにする事である。

対象は北海道大学医学部付属病院及び関連病院において剖検された、非心疾患症例7例と急性心筋梗塞症例4例及び陳旧性心筋梗塞症例4例の計15例であり、いずれも死後3時間以内に臓器が摘出された症例である。Southern blot analysisに用いたプローブは、Human VEGF<sub>189</sub> cDNAを含むプラスミドから930bpのインサートを切り出し、ランダムプライマー法により $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPでラベルした。in situ hybridizationに用いたプローブは、このインサートをT<sub>3</sub> / T<sub>7</sub> RNA polymeraseとuridine 5-d- [<sup>35</sup>S] thiotriphosphateでラベルし使用した。RT-PCRに用いたプライマーは、VEGFの各subtypeの検出のためエクソン5上とエクソン8上に2種のオリゴヌクレオチドプライマーを作製した。

非心疾患例は、右心房、左心室、僧帽弁と脳の組織を、また心筋梗塞例は予め連続面のパラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン染色にて梗塞周囲部分と対側健常部分を区別した各心筋組織を、acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform法に基いて行った。RT-PCRはヘキサランダムプライマーを用いて常法に従って行った。RT-PCRの結果を確認するためPCRの増幅産物10  $\mu$ lを、電気泳動した後、ナイロン膜にブロットしSouthern blot analysisを施行した。in situ hybridizationは、クリオスタットにて薄切した凍結切片をProteinase Kで37°C 30分処理し、50°Cにて18時間ハイブリダイゼーションを行い施行した。免疫染色はAvidin-biotin-

peroxidase complex(ABC)法により行った。

その結果、RT-PCRでは、非心疾患例についてはヒト右心房、左心室、僧帽弁、脳の各部位において陽性コントロールHT1080と同様の3種のバンドの増幅を認めた。3種のバンドは、それぞれVEGF<sub>189</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>121</sub>のmRNAから期待される大きさと一致した。これらのバンドはSouthern blot analysisによりVEGFに特異的なバンドである事が示された。弁組織においてはVEGF<sub>121</sub>  $\geq$  VEGF<sub>165</sub>の順にバンドを認め、VEGF<sub>189</sub>のバンドは認められなかったが、右心房と左心室ではVEGF<sub>165</sub> > VEGF<sub>189</sub> > VEGF<sub>121</sub>の順にPCR量の産物を認め、subtypeの発現に違いを認めた。VEGF<sub>206</sub>相当のバンドはいずれの症例においても認められなかった。in situ hybridizationでは、非心疾患例では、心筋細胞の細胞質にVEGF mRNAの発現を示すシグナルを認めた。心筋内小動脈ではシグナルを認めなかった。急性心筋梗塞例では、梗塞周辺部に存在する心筋内の血管平滑筋細胞及び単核細胞に著明なシグナルの増強を認めた。またこの単核細胞の浸潤の程度は、肉芽組織内に毛細血管の著しい増生を認める時期の症例で最も著明であった。梗塞周囲の心筋細胞と健常部位の心筋細胞とを比較しシグナルの強さに差は認めなかった。陳旧性心筋梗塞症例では、梗塞部位は膠原線維で占められ、浸潤細胞は消失しており、梗塞周囲の心筋細胞や血管平滑筋細胞でのシグナルの増強は認めなかった。免疫染色では、CD68にて急性心筋梗塞周辺部の単核細胞は陽性に染色され、これらの細胞の大きさと形態より、主にマクロファージと推測された。以上よりVEGFもこれまでに報告されている各種の増殖因子に加えて、ヒト急性心筋梗塞における血管新生や側副血行路形成への関与が示唆され、また陳旧性心筋梗塞症例では発現を認めなかった事から、この増殖因子が梗塞経過中に梗塞周辺部において一過性の発現の増加を示す可能性が考えられた。

口頭発表の審査会において、小山富康教授より剖検症例におけるmRNAの非変性の証明、b-FGFとの細胞増殖における関係、脳と心臓でのVEGF mRNA量の比較、正常脳や肺におけるVEGFの役割について、古舘正徳教授より、99mTcピロリン酸心筋シンチにおける急性期の陽性像との関係、glioblastoma multiformeとcapillary hemangioblastomaでのVEGF mRNAの発現の比較について、菅野盛夫教授より、VEGF産生の刺激物質、単核細胞の詳細とMφの可能性、VEGFの心肥大との関係についての質問がなされた。これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後、行われた小山、古舘両審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、ヒト心臓においてVEGFの発現とその局在を初めてmRNAレベルで検討し非心疾患例においては心房・心室・弁組織にVEGF mRNAを認め、一方、急性心筋梗塞例においては梗塞部周辺にVEGF mRNAの発現の著明な増加を認めたことより、急性心筋梗塞後の血管新生及び側副血行路の形成にVEGFが強く関与している可能性を明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ学位授与に値する。