

学位論文題名

Physiological and Pathological Significance of Coronary
and Cerebral Capillary Morphometric Regulation
by Angiogenic Growth Factor VEGF

(血管増殖因子 VEGF による心・脳毛細血管構築制御機構の
生理学および病態生理学的意義)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

Vascular endothelial growth factor (VEGF)は、血管内皮細胞の発生分化、増殖においてその中心となる増殖因子であり、血管新生の調節に重要な働きを演じている。VEGF の受容体として、1型受容体である Flt-1 と、2型受容体である Flk-1/KDR が主たるものとして知られているが、Flk-1/KDR が内皮細胞の増殖に重要な役割を果たしており、一方 Flt-1 は VEGF をトラップしてその作用を打ち消す作用があると考えられているものの、Flt-1 を介した VEGF の作用にはまだ不明な点も多くあるようである。

閉経後女性へのホルモン補充療法(HRT)は、虚血性心疾患の発症予防への効果は疑問視されているものの心臓自体に対する保護作用については確信的な証拠が提供されており、また相矛盾する報告はあるが脳血管障害の発症を予防しその程度を軽減するとされている。そのような HRT による心臓や脳への保護効果の機序として、エストロゲンが VEGF 発現を誘発することから、VEGF を介した生理学的な血管新生の調節と関係した、冠および脳毛細血管構築の促進作用が可能性として考えられるかも知れない。そこで本研究の第一の目的は、体内エストロゲンレベルを卵巣摘除あるいは HRT により変化させた時、心臓および脳における毛細血管網の構造がどのように修飾されるか、そしてその時の VEGF およびその受容体の発現変化がどのように関わっているかを明らかにすることである。

現在、側副血行を発達させる目的で血管新生をターゲットとする治療が進んできており、糖尿病性神経症に対して VEGF が有効であることが報告されているが、その一方で糖尿病性網膜症は VEGF が増悪因子として働いていることが知られている。また糖尿病性腎症の病因として、VEGF の過剰発現が重要であることを示唆する報告もある。それ故、糖尿病心臓における冠血管の動・静脈のリモデリングにおいても VEGF が深く関わっている可能性がある。本研究の第二の目的は、VEGF による毛細血管構築制御機構が及ぼす病態生理学的意義を理解するため、糖尿病病態における心臓での毛細血管構築の変化と VEGF およびその受容体発現との関連を明らかにし、臨床的に糖尿病に併発する循環器病への有効性が報告されている、カルシウム拮抗薬とアンジオテンシン II(Ang II)タイプ 1 受容体拮抗薬の治療効果を検討することである。

【方法】

1) 実験動物:40 週齢の経産ラットを sham 手術群(腹部切開のみで縫合)、卵巣摘出群(腹部切開

後卵巣摘出し縫合)およびエストロゲン補充群(卵巣摘出後、皮下に包埋した浸透圧ミニポンプから17 β -estradiol 3 μ g/日を持続投与)に分け、4週後に大脳および心臓を摘出し切片標本を作成した。

また、糖尿病動物として、インスリン抵抗性糖尿病早期に相当する 20 週齢の雄性 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットを用い、対照として雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO)ラットを用いた。

- 2) 毛細血管密度を算出するなどの形態学的検討は、心臓においては動脈系と静脈系毛細血管を分別する二重染色法で、脳においては G4 レクチンで染色あるいは抗第 VIII 因子抗体を用いた蛍光染色法で行った。
- 3) VEGF とその受容体、そして他の標的分子の mRNA およびタンパクの発現は *in situ* hybridization および免疫組織学的技法により検討した。

【結果・考察】

経産ラットの冠血管(内径<100 μ m)にはエストロゲン受容体の 2 つのサブタイプ ER α および ER β が共に存在しており、ER β の mRNA およびタンパク発現のみが、卵巣摘除および ERT により強く影響された。卵巣摘除により動脈系毛細血管の減少と関係して冠毛細血管密度の低下が認められた。HRT は静脈系毛細血管を増加させ、冠毛細血管密度を正常レベルに回復させた。VEGF および flk-1/KDR の冠血管における発現は卵巣摘除後減少したが、HRT により正常化した。VEGF と flk-1/KDR は経産ラットで若年ラットより高発現であったが、これは経産ラットでの hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)のタンパク発現増加と関係していた。すなわち更年期女性に相当する経産ラットでの冠毛細血管網は VEGF を介した生理学的な血管新生によって調節されており、エストロゲン欠乏による冠血管での VEGF 発現の低下は閉経後女性での冠動脈疾患の発症の分子的病因として重視すべきであることが示唆された。

経産ラットの大脳皮質部における毛細血管密度も、卵巣摘除後に有意な減少を示した。ここでもまた、脳血管(内径<100 μ m)での VEGF と flk-1/KDR の mRNA およびタンパクの著明な減少と関係していた。脳血管における ER α および ER β の発現レベルは共に卵巣摘除により有意に減少していたが、この傾向は ER β でより劇的であった。卵巣摘除による上記の一連の変化は、HRT により完全に抑制された。したがって、VEGF は経産ラットでの生理学的な脳血管新生のための重要な調節分子であることが示唆された。VEGF はエストロゲンの血流保持機構を介した神経保護作用において、重要な役割を果たしていると考えられた。

インスリン抵抗性糖尿病早期の OLETF ラットでは、対照(LETO ラット)に比較し、冠血管(内径<100 μ m)での VEGF と flk-1/KDR の mRNA およびタンパクレベルでの発現が顕著に増加していた。VEGF の発現レベルの増強は、増加した advanced glycation end products (AGEs)によって活性化された HIF-1 α の蓄積と強く関係していた。OLETF ラットでは、冠毛細血管密度の増加が認められたが、これは静脈系毛細血管の動脈化に起因していた。OLETF ラットでは、Ang II およびその type 1 受容体の冠血管での発現レベルが増加しており、この受容体拮抗薬である candesartan で治療することにより、上記変化は全て抑制された。またカルシウム拮抗薬である benidipine によっても優れた治療効果が得られた。すなわち、VEGF は、糖尿病早期より Ang II、AGEs、そして細胞内 Ca²⁺濃度上昇などによってその発現が誘導され、病的な冠毛細血管新生を起こすことにより、生理学的な冠血管退行現象が損なわれ、冠血管リモデリング形成の重要な要因となっていることが示唆された。

以上、本研究により、VEGF による毛細血管構築制御機構が、循環器病領域において、生理学的にもあるいは病態生理学的にも重要な意義を有していることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 頭

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Physiological and Pathological Significance of Coronary and Cerebral Capillary Morphometric Regulation by Angiogenic Growth Factor VEGF

(血管増殖因子 VEGF による心・脳毛細血管構築制御機構の
生理学および病態生理学的意義)

閉経後女性へのホルモン補充療法(HRT)は、心臓や脳への保護効果を有するが、その機序として、エストロゲンの VEGF 発現亢進作用による血管新生促進が考えられる。本研究では、体内エストロゲンレベルを卵巣摘除あるいは HRT により変化させた時、心臓および脳における毛細血管網の構造がどのように修飾されるか、またその際 VEGF およびその受容体の発現変化がどう関与するか検索した。

実験動物としては、40 週齢の経産ラット(コントロール群:Con)、卵巣摘出群(OVX)およびエストロゲン補充群(卵巣摘出後、浸透圧ミニポンプで 17 β -estradiol 3 μ g/日を持続投与:ERT)に分け、4 週後に大脳および心臓を摘出し切片標本を作成した。形態学的検討は、心臓では動脈系と静脈系毛細血管を分別する二重染色法を、脳では G4 レクチンで染色あるいは抗第 VIII 因子抗体を用いた蛍光染色法を行った。VEGF とその受容体、そして他の標的分子の mRNA およびタンパクの発現は *in situ hybridization* および免疫組織学的技法により検討した。

Con の冠血管にはエストロゲン受容体のサブタイプ ER α および ER β が共に存在しており、ER β の mRNA およびタンパク発現のみが、OVX および ERT により強く影響された。OVX では動脈系毛細血管の減少と冠毛細血管密度の低下が認められ、ERT は静脈系毛細血管を増加させ、冠毛細血管密度を回復させた。冠血管の VEGF および KDR の発現は OVX で減少したが、ERT で正常化した。VEGF と KDR は Con で若年ラットより高発現であったが、これは Con での hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) のタンパク発現増加と関係していた。すなわち更年期女性に相当する経産ラットでの冠毛細血管網は VEGF を介した生理学的な血管新生によって調節されており、エストロゲン欠乏による冠血管での VEGF 発現の低下は閉経後女性での冠動脈疾患の発症の分子的病因として重視すべきであることが示唆された。

Con の大脳皮質部における毛細血管密度も OVX で有意に減少し、脳血管の VEGF と KDR の mRNA およびタンパクの著明な減少を伴った。脳血管における ER α および ER β の発現レベルは共に OVX で有意に減少したが、これは ER β でより顕著であった。これらの変化 ERT により完全に抑制された。したがって、VEGF は経産ラットでの生理的な脳血管新生の重要な調節分子であり、エストロゲンの血流保持機構を介した神経保護作用において、重要な役割を果たしていると考えられ

た。

学位申請者サブリーナ・ジェズミンは、インスリン抵抗性糖尿病モデルである OLETF ラットと、対照の LETO ラットを用い、糖尿病における冠毛細血管新生とその制御における advanced glycation endproduct、アンジオテンシン II、VEGF/KDR 系の役割を明らかとし、2編の原著を発表したが、発表時間の関係で割愛した。以上、4編の原著に掲載された研究により、VEGF による毛細血管構築制御機構が、循環器病領域において、生理学的にもあるいは病態生理学的にも重要な意義を有することを明らかとした。

発表後、副査丸藤教授から、血中エストロゲン濃度と受容体との関係、エストロゲンの血管新生作用、さらに脳虚血とエストロゲンの効果について、副査吉岡教授から、卵巣摘出後のエストロゲン受容体減少の機序、エストロゲン受容体 $\alpha \cdot \beta$ の作用差、さらに HIF-1 と VEGF との関係について質問がなされた。また北島教授からは、最近の大規模臨床試験における HRT の結果と本実験結果との関係について質問がなされた。これらに対し申請者は、今回の実験成績と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。

審査員一同は、4編の原著をもとに thesis にまとめられたこれらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。