

氏名	くろつ しょうた 黒津 祥太
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 4830 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	心臓発達及び心筋梗塞における血管形成を制御する Flk1・Flt1 の 時空間的な発現パターン解析—心血管再生医療への応用—
論文審査委員	(主査) 教授 金澤 秀子 (薬学博士) (副査) 准教授 齋藤 義正 (博士 (医学)) 准教授 松下 麻衣子 (博士 (医学))

## 論文内容の要旨

### 【表題】

心臓発達及び心筋梗塞における血管形成を制御する Flk1・Flt1 の時空間的な発現パターン解析—心血管再生医療への応用—

### 【背景】

心臓には高度にシステム化された血管網が存在する。心臓内の血管網は、左室から全身へ血液を送り出す上行大動脈の根元から発し、心臓の外側（心外膜側）から内側（心内膜側）へ貫入する冠血管（動脈）と、そこから分岐を繰り返し、末梢に血液を送る毛細血管から構成され、心筋へ酸素と栄養を供給する。心臓内血管網が正常に形成されることが、心筋の発達及び心臓のポンプ機能に必要である。近年、胎児期における冠血管形成の分子メカニズムが明らかにされたが、出生後や心筋梗塞後の冠血管形成がどのようなメカニズムで制御されるかは明らかにされていない。冠動脈疾患は心筋梗塞を引き起こし、心筋細胞が壊死するため、心機能が低下する。心筋梗塞後、梗塞巣では血管新生が観察されるが、血管新生が不十分な場合、心臓は回復せず線維化し、心破裂の可能性もある。したがって、生理学的及び病理学的条件下における冠血管形成の分子メカニズムを解明することが、心臓病に対する新たな治療ターゲットを提案する上で重要である。

冠血管は内側から血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞の 3 層からなる。一方、毛細血管や新生血管は血管内皮細胞のみで形成される。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は胎児期や心筋梗塞後に心筋層から産生され、血管内皮細胞の増殖、遊走、生存を司る。VEGF 受容体として Flk1 (VEGF 受容体-2) と

Flt1 (VEGF 受容体-1) が血管形成に重要であることが知られている。Flk1 シグナルは胎児期や心筋梗塞後の血管新生に関与し、血管出芽や分岐を引き起こす。一方、Flt1 は Flk1 の抑制因子として働くことで、血管形成を制御し、血管の機能を維持する。発生において、血管形成は Flk1 と Flt1 の双極性によって制御されている。Flk1 欠損マウスでは血管の形成不全によって E8.5~10.5 で胎生致死となる。一方、Flt1 欠損マウスでは Flk1 シグナルが過剰に活性化されることで、血管の過形成が起こり、E8.5~10.5 で胎生致死となる。したがって、VEGF シグナルにおける Flk1 と Flt1 のバランスが血管形成に重要であるが、免疫染色に適切な Flk1 と Flt1 の抗体がないため、生体内における発現パターンはこれまで明らかにされていない。

本研究では、最近開発された Flk1 と Flt1 のレポーターマウスを用いることで、出生後の心臓や心筋梗塞後の心臓における Flk1 と Flt1 の発現パターンを免疫組織学的に解析した。そして Flk1 は心臓内の血管内皮細胞に発現し、その発現は心外膜側に優位であること、また心筋梗塞急性期に一過性に活性化されることを見出した。一方、Flt1 は心臓の血管内皮細胞に全層性に発現し、また心筋梗塞急性期から慢性期にかけてその発現が維持されることを見出した。

#### 【方法・結果】

心臓における Flk1 の発現を検討するために、Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスを用いて解析した。このマウスはこれまで胎児や虚血性網膜症モデルにおいて内因性の Flk1 の発現を解析するために使用された。まず出生後の心臓における Flk1-GFP の発現を解析するために、出生後 1 日目の心臓を用いて免疫染色を行なった。その結果、Flk1-GFP は心房と心室に発現することがわかった。次に Flk1-GFP が発現する細胞種を調べた。心臓を構成する細胞は主に心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞の 4 種であり、それぞれに特異的なマーカー、cTnT (心筋細胞)、CD31 (血管内皮細胞)、 $\alpha$  SMA (血管平滑筋細胞)、Collagen 1 (線維芽細胞) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Flk1-GFP は CD31 陽性の冠血管及び毛細血管に発現することがわかった。一方、心筋細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞では Flk1-GFP の発現は認められなかった。興味深いことに、Flk1-GFP の発現は心内膜側に比べ、心外膜側の血管内皮細胞に強く発現することがわかった。この Flk1-GFP の心外膜側に優位な発現パターンは Flk1-LacZ ノックインマウスにおいても同様に観察された。

次に Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスを用い、出生後 1 日目の心臓を解析した。その結果、Flt1-DsRed は Flk1-GFP と同様に心房と心室で発現することがわかった。また心臓を構成する種々の細胞のマーカーを用いて免疫染色を行った結果、

Flt1-DsRed は CD31 陽性の冠血管及び毛細血管で発現し、心筋細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞では発現しないことがわかった。以上の結果から、出生後 1 日目のマウスにおいて Flk1 と Flt1 は異なる発現パターンを示すことがわかった。

Flk1 と Flt1 の経時的な発現パターンを比較するために、Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスと Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスを交配することで、Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスを作製した。まず出生後 1 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの心臓を解析した結果、Flk1-GFP は心外膜側に優位に局在し、Flt1-DsRed は心臓全体に分布するという特徴的な発現パターンを示すことがわかった。次に個々の冠血管を詳細に調べたところ、出生後 1 日目の冠血管では Flk1 と Flt1 は共に強く発現することがわかった。一方、出生後 6~8 週目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの心臓を解析した結果、Flk1-GFP は心外膜側の毛細血管に発現し、Flt1-DsRed は心臓全体の冠血管と毛細血管に発現することがわかった。しかしながら、出生後 1 日目と比べ、成体の心臓では Flk1-GFP の発現が低下することがわかった。一方で Flt1-DsRed は全層性に発現し、成体においてもその発現レベルは高かった。次に個々の冠血管を詳細に調べたところ、Flt1-DsRed は血管径の大小を問わず発現したが、Flk1-GFP は発現が低下し、冠血管ではほとんど発現しなかった。以上の結果から、Flk1 は幼若で血管新生の活発な冠血管でのみ発現する一方、Flt1 は血管の成熟度や心臓の部位を問わず発現することがわかった。

これまでの結果から、生理的条件下での心臓発達において Flk1 と Flt1 の発現パターンが時空間的に異なることを示した。次に疾患における血管形成及び Flk1 と Flt1 の発現パターンを解析するために、出生後 6~8 週目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、心筋梗塞後 3 日目、7 日目、30 日目の心臓を経時的に解析した。心筋梗塞後 3 日目、結紮直下の心筋層ではほとんどの細胞が壊死し、DAPI で染色されない無細胞領域が観察されたが、心外膜下及び心内膜下の一部では血管内皮細胞が生存していた。その後、血管新生が起こり、心筋梗塞後 7 日目には、毛細血管の増加と冠血管の形成を認めた。これらの新生血管は Flk1 と Flt1 を共に強く発現し、興味深いことに、心外膜側から梗塞巣へ伸長することがわかった。この血管新生とともに梗塞巣の無細胞領域は縮小した。この結果から、心筋梗塞急性期では冠血管において Flk1 が再活性化し、出生後に見られたような心外膜側からの血管新生を促進することがわかった。心筋梗塞後 30 日目には心室壁が薄くなり、梗塞巣は線維化巣に置換された。この時血管新生は収束し、増加した新生血管の多くは消

失した。残存した血管では Flk1 の発現が低下し、Flt1 の発現のみが認められ、血管が成熟していた。一方、遠隔領域の血管における Flk1 と Flt1 の発現に変化はなかった。以上の結果から、Flk1 は一過性に再活性化することで急性期における血管再生を促進し、Flt1 は恒常的に発現することで慢性期における血管の維持に寄与することがわかった。

#### 【考察】

心臓の機能を維持する上で、冠血管形成は心臓発生及び心臓疾患において重要である。これまで血管形成における VEGF の役割は広範囲に渡って研究されてきたが、その受容体である Flk1 と Flt1 の発現パターンや機能は解析されていない。その理由は、免疫染色に適切な Flk1 と Flt1 の抗体が存在しないためである。本研究では Flk1 及び Flt1 のレポーターマウスを使用することによって、心血管における時空間的な発現パターンの解析に成功し、Flk1 が心外膜側に優位に発現し、Flt1 は全層性に発現するという特徴的な発現パターンを見出した。さらに心筋梗塞を引き起こすと、Flk1 の発現が低下した成体の冠血管においても Flk1 の発現が一過性に上昇し、血管新生が促進されることがわかった。一方、Flt1 は急性期から慢性期にかけて新生血管に強く発現することで、血管の機能を維持することがわかった。この研究成果は、出生後と心筋梗塞後の血管新生において Flk1 と Flt1 が時空間的に異なる発現パターンを示すことを解明した最初の研究である。

出生後、心筋細胞の増殖と肥大が起こり、心機能が向上する。その過程で冠血管は心筋へ酸素と栄養を供給するために発達するが、どのようなシグナルが出生後の血管新生を制御するかは明らかにされていなかった。出生後 1 日目の心臓において、Flk1 は冠血管に強く発現したが、成体の血管新生が休止した冠血管ではその発現が低下していた。一方、Flt1 は出生後に心臓全体の血管内皮細胞で発現し、この発現パターンは成体においても維持された。以上の結果から Flk1 は血管新生に関与し、Flt1 は血管の成熟と機能の維持に関与すると考えられる。以上のように、冠血管発生の制御のためには Flk1 と Flt1 のバランスが重要であることが示唆された。

血管新生と血管の成熟は心筋梗塞後の治癒過程において重要である。VEGF は心筋梗塞後、数時間の内に発現が上昇し、一過性に血管新生を促進することが報告されている。梗塞巣が治癒するにつれて、新生血管は血管平滑筋などの細胞に覆われるが、これらの細胞に被覆されない新生血管はアポトーシスを引き起こす。一方、被覆された新生血管では新生能力が低下するものの、成熟が進む。梗塞巣の治癒過程に関する報告は多いが、梗塞巣での血管新生がどのような分子メカニズムで制御されるかはこれまでほとんど

明らかにされていない。本研究で私は、心筋梗塞後 3 日目から 7 日目にかけて、梗塞巣の血管内皮細胞で Flk1 の発現が一過性に上昇することで、血管新生が活性化されることを見出した。一方、Flt1 は心筋梗塞後 3 日目の急性期から 30 日目の慢性期まで残存血管及び新生血管に強く発現することがわかった。興味深いことに、この心筋梗塞後の時空間的な Flk1 と Flt1 の発現パターンは、出生後の血管形成における発現パターンを再現していた。

#### 【結論】

Flk1 と Flt1 は出生後及び心筋梗塞後の血管形成において異なる発現パターンを示した。この研究成果は心臓の血管新生、成熟における Flk1 と Flt1 の重要性を示唆するものである。本研究によって解明された心血管形成の分子メカニズムを基に、世界的な医療上の問題となっている虚血性心疾患に対する新たな治療法の礎を築くことができる。

## 論文審査結果の要旨

博士論文発表会は、平成 30 年 2 月 24 日（土）に、慶應義塾大学薬学部 1 号館マルチメディア講堂において、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。25 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

申請者は、心臓における血管形成に重要な役割を担っている血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の出生後の成長過程及び、心筋梗塞後の変動に関して時間的・空間的に解析を加え、心臓における血管形成のメカニズムに新たな知見をもたらそうとするものである。

これまで、VEGF 受容体である Flk1 及び Flt1 の 2 種類のタンパク質が血管新生において重要な役割を担っていることが考えられてきた。しかし、これら受容体タンパク質に対する使用可能な抗体がなかったため、その生体内における発現パターンの解析は行なわれてこなかった。申請者は Flk1 及び Flt1 の発現により、それぞれ蛍光を発する遺伝子改変マウスを用いることにより、この領域において新規な知見を得た。すなわち、出生後発達過程にておいては血管新生を増強する Flk1 と、その機能を抑制する Flt1 の発現の時間的・空間的パターンが異なることを明らかにした。

さらに、心筋梗塞を生じさせたマウスにおいて、心筋梗塞後の心臓における上記 Flk1 及び Flt1 の時間的・空間的発現パターンを解析した。その結果、これまで全く明らかにされていなかった病態時における血管新生のメカニズムに関して新たな解釈を提唱した。

適切な抗体がなかったため、これまで他のタンパク質のような免疫染色法を用いた解析ができなかった VEGF 受容体の生体内における時間的・空間的動きをはじめて明らかにした研究として評価できる。さらに、発生学的検討だけではなく、病態モデルに関しても詳細な検討を加えており、心筋梗塞後の心筋及び血管消滅と、血管再生の時間的・空間的解析に成功した。これは、単なる病理学的研究にとどまらず、心筋梗塞治療における新たな創薬ターゲットとしての VEGF 受容体の動態を明らかにした研究として大きく評価できる。これらの結果は、査読付き英文学術誌に掲載されている（論文目録参照）。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で博士（薬科学）の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが全員一致で決定された。

## 論文目録

### 1. 主論文に関する原著論文

Kurotsu S, Osakabe R, Isomi M, Tamura F, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Tani H, Nara K, Kubota Y, Ema M, Fukuda K, Suzuki T, Ieda M.

Distinct expression patterns of Flk1 and Flt1 in the coronary vascular system during development and after myocardial infarction.

Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan 1;495(1):884-891. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.094. Epub 2017 Nov 20.

### 2. 参考論文（申請者が著者である、主論文に関する原著論文以外の論文）

Kurotsu S, Suzuki T, Ieda M.

Direct Reprogramming, Epigenetics, and Cardiac Regeneration.

J Card Fail. 2017 Jul;23(7):552-557. doi: 10.1016/j.cardfail.2017.05.009. Epub 2017 May 18. Review.