

論文の内容の要旨

論文題目 心臓リモデリングにおける VEGF シグナルの役割

氏名 加藤 愛巳

血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor-A, 以下 VEGF)は血管内皮細胞増殖を促進する分泌因子として単離され、血管内皮細胞の発生、分化および増殖において中心的な役割を果たすことが知られている。VEGF は主に受容体型チロシンキナーゼである VEGF-Receptor 1(VEGF-R1, Fms-like tyrosine kinase 1, Flt1)、VEGF-R2(Fetal liver kinase 1, Flk-1)を介して細胞内にシグナルを伝えている。VEGF-R1, R2 は主に血管内皮細胞に発現するが、VEGF-R2 を介するシグナルの生理活性は VEGF-R1 に比して極めて高いと考えられており、実際に、VEGF-R2 欠損マウスでは血管発生が著しく障害され、胎生致死を引き起こす。

近年、腫瘍血管新生を標的とする治療アプローチにおいて VEGF を含む血管新生阻害薬を用いた治療が広く行われるようになってきた。悪性腫瘍 (以下、がん) 細胞の増殖には酸素、栄養素の供給が必要不可欠である。そのためのがん細胞は組織の増大に伴って新たな血管を構築し、血液の灌流を維持している。またがん組織の増大は基本的に急速であり、腫瘍組織内は容易に低酸素環境に陥る。低酸素環境は低酸素誘導型転写因子 (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 発現を誘導する。HIF-1 α は強力な VEGF 発現誘導因子であることが知られており、腫瘍組織内での VEGF 発現を誘導し、血管新生を惹起する。つまり VEGF は腫瘍内血管新生においても、中心的な役割を果たすと考えられている。そこで、腫瘍組織内の未熟な血管新生を阻害すべく、抗がん剤投与に VEGF 阻害薬を併用する治療が広く行われるようになった。

代表的な VEGF 阻害薬である Bevacizumab は、VEGF に対するモノクローナル抗体である。Bevacizumab は、従来の抗がん剤治療(Irinotecan, fluorouracil, leucovorin)に追加することで、転移性大腸癌症例における無増悪生存期間、奏効率、奏功期間のみならず、生存期間をも有意に延長した。現在、Bevacizumab は卵巣癌、悪性神経膠腫、再発・進行した大腸癌、非小細胞肺癌、子宮頸がん、乳癌に対して投与されている。

Bevacizumab 等の VEGF シグナル阻害薬は大腸癌、婦人科腫瘍の治療において日常的に用いられるようになってきている一方、現在それらの心血管系への副作用が数多く報告されている。Bevacizumab 投与に伴う最も多い心血管系の合併症は高血圧の発症であるが、併せて

尿蛋白、出血傾向、心機能低下および動静脈血栓症発症リスクの増大が指摘されている。またメタ解析において、National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) Grade 3 以上の心不全発症リスクが 4.74 倍(P=0.001)に増加していることが報告されている。このような VEGF シグナル阻害薬投与に伴う心血管系合併症は抗がん剤治療継続の障害となるだけでなく、心臓リモデリング・心不全を悪化させる原因となり、抗がん剤治療継続における大きな障害となっている。このような背景から、血管新生阻害薬投与下における心機能低下を予防、あるいは改善させる治療アプローチの創出が臨床的に強く求められている。

これまで VEGF は主に血管内皮細胞に作用し、VEGF-R2 受容体を介して血管新生プロセスを活性化することが報告されてきた。VEGF シグナル阻害薬(血管新生阻害薬)による心機能低下の病態機構として、一義的には心筋組織における血管構造の破綻、局所への灌流低下が想定されている。しかし最近、VEGF は血管内皮細胞以外の細胞にも作用し、細胞内シグナルを介してその活性制御に働くことが徐々に明らかになりつつある。例えば、モノサイト、マクロファージは VEGF-R1 を発現し、VEGF および PlGF シグナルを介して細胞遊走を惹起すると考えられている。また運動神経系の神経細胞においても VEGF-R2 受容体が発現し、神経細胞保護的に作用すること、更に VEGF シグナルの低下により筋萎縮性側索硬化症様の病態を発症することも報告されている。これらの知見は、VEGF が必ずしも血管内皮細胞のみを標的とするリガンドではなく、非血管内皮細胞の機能保持においても重要な役割を果たしていることを示している。

上記知見を基に、私は本研究において VEGF シグナルが心筋細胞に直接作用し、心筋保護効果を発揮しているとの仮説を立てた。この仮説検証を通じて心筋細胞における VEGF シグナルの直接的作用の分子機構を解明するのみならず、血管新生阻害薬投与下における心機能回復治療実現に向けた分子標的を同定することを目指す。

本研究では、まず単離した培養心筋細胞を用いて、VEGF が直接的に心筋細胞へ作用すること、細胞内 MAP キナーゼシグナルを活性化すると共に、ANP を含む心肥大関連遺伝子発現を誘導することを示した。さらに成獣マウスより心筋組織を構成する心筋細胞、血管内皮細胞、心臓線維芽細胞をそれぞれ単離し、qPCR 法を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、心筋細胞において VEGF-R2 が発現していることを確認した。また、心筋細胞における心房性利尿ペプチド (Atrial natriuretic peptide, ANP) 発現誘導に VEGF シグナルが必須であることも判明した。これら *in vitro* 培養細胞での実験結果を *in vivo* レベルで検証すべく、私は心筋細胞特異的 VEGF-R2 欠損マウス(以下、VEGF-R2 欠損マウス)を樹立した。

成熟した心筋細胞で発現する α ミオシン重鎖 (α myosin heavy chain) プロモーター下に *cre* リコンビナーゼを発現するマウスを使用した。VEGF-R2 欠損マウスでは発生、成育、体重増加において特に明らかな異常を認めず、また心機能も正常であった。これらの知見は、成

獣心筋細胞における VEGF シグナルが個体発生、発育および安静時の心機能保持において必須では無いことを示していた。

次に VEGF-R2 欠損マウスを用いて、高血圧、心室後負荷誘導型の心肥大・心不全病態モデルとして知られている TAC モデルを用いた解析を行った。TAC 負荷前において心筋細胞特異的 VEGF-R2 欠損マウスの心機能はコントロールマウスと同等であったが、TAC 負荷 2 週間後より VEGF-R2 欠損マウスの心機能は急激に低下した。これらのことより心筋細胞 VEGF シグナルは安静時の心機能保持に必須ではないが、後負荷増大後の心機能保持において重要な役割を果たすことが示された。そこで、VEGF-R2 欠損マウスにおいて後負荷増大後に心機能が低下する機序として 2 つの可能性を考えた。一つは、急性期の代償的心肥大を阻害することで、心機能低下を惹起したという可能性と もう一つは圧負荷時の心筋保護作用ペプチド ANP 発現誘導を低下させることで心機能低下を惹起したという可能性である。本研究において VEGF-R2 欠損マウスでは TAC1 週間後の心重量、心肥大が有意に減少していた。このことは、肥大が阻害されるという前者の可能性を支持する所見である。一方圧負荷後の心筋組織において、ANP 発現は VEGF-R2 欠損マウスで低下しておらず、むしろ増加していた。これは VEGF-R2 欠損マウスにおける心機能低下が原因になっている可能性がある。今後、ANP の分解酵素である Neutral Endopeptidase(NEP)阻害薬を投与するなど ANP シグナルを補充することで後者の可能性について検証できると考えられる。

本研究により、VEGF 阻害薬が血管内皮細胞のみならず心筋細胞に直接的に作用して心機能を低下していることが明らかになった。VEGF 阻害薬の抗がん剤治療効果を保ちつつ、その副作用である心機能低下を減弱させることを想定した場合、心筋細胞における VEGF の直接作用は非常に有力な治療標的になると考えられる。