

論文の内容の要旨

論文題目

Semaphorin3E-PlexinD1 signaling is important for coronary vessel formation.

(Semaphorin3E-PlexinD1 シグナルは冠血管形成に重要である。)

氏名 丸山 和晃

序文

近年、細胞系譜追跡技術の発展に伴い冠動脈内皮細胞の起源が次々に明らかにされている。すなわち、心外膜前駆細胞 (PEO)、静脈洞 (SV)、心内膜、比較的最近発見された大動脈外膜下血管 (ASV) が冠動脈内皮の由来として考えられている。しかしながら多種の冠動脈内皮前駆細胞がどのように協調し、冠動脈入口部や末梢血管網を形成するのかはよくわかっていない。我々は、軸索ガイダンス分子である Semaohorin3E (sema3E) と受容体である PlexinD1 (PlexD1) が冠動脈発生に重要であることを発見した。Sema3E、PlexD1 KO マウスは入口部高位起始、入口部数的異常、冠動脈走行異常などの様々な冠動脈異常を呈した。これらのノックアウトマウスでは胎生期において大動脈周囲に発達したリンパ管マーカーである Prox1 を発現する異常血管網を認め、ASVs の異常発達が示唆された。Sema3E は胎生早期には大血管平滑筋層に、胎生後期には冠血管内皮に発現する。相応し、PlexD1 は ASVs に発現する。こうした知見は Sema3E-PlexD1 シグナルが冠動脈入口部形成や末梢血管網と入口部の正常な連結に関与し、Sema3E-PlexD1 シグナルが正常冠動脈発生に重要であることを示唆する。

これらの結果から、より詳細な冠動脈発生過程の解明や、有効な心筋梗塞に対する治療法が開発される可能性がある。

結果

これまで *PlexD1* KO マウスにおいて冠動脈が高位起始する事が分かっていた。しかしながらリガンドとして同定されている *Sema3A*、*Sema3C* KO マウスでは冠動脈奇形が認められない事が分かっていた。そこで我々は残るリガンドである *Sema3E* KO マウスと *PlexD1* KO マウスを詳細に解析した。*PlexD1* KO を解析すると、これまでに報告のあった冠動脈高位起始以外にも多数の冠血管奇形を認めた。心臓 whole PECAM 免疫染色を行うと、総動脈遺残心を取り囲むように発達する ASVs やコントロールでは存在しない冠血管構造を認めた。*Sema3E* KO マウスにおいても同様に大動脈上に本来存在しない冠血管構造や冠動脈の分枝異常を認めた。これまで *Sema3E*-*PlexD1* シグナルの役割は *in vitro* の系を使った実験により VEGF 作用の阻害とされていたが、生体内における役割は不明であった。そこで我々は *Sema3E* KO マウスの皮膚切片を免疫染色し血管構造を確認した。*Sema3E* KO マウスでは皮膚血管構造のパターニングが激しく乱れ、真皮層における Ki67 活性が増加していた。さらに共焦点顕微鏡を用い *Sema3E*、*PlexD1* KO マウスの冠動脈を詳細に検証すると、*Sema3E*、*PlexD1* KO マウスとも著明に冠動脈数が増加していた。これまでのデータより、*Sema3E*-*PlexD1* KO マウスでは大動脈周囲の血管である ASVs の異常と冠動脈入口部の異常を呈する事が確認された。近年の研究では胎生 E11.5 で心臓流出路上に出現した ASVs が発生過程とともに大動脈壁を貫き冠動脈の入口部を決定するとされる。そこで我々は ASVs の発生過程と入口部の発生過程を詳細に観察した。ASVs は流出路上に E11.5 で確認され、発生が進むにつれ大動脈基部を複数箇所貫いた。E15.0 では ASVs のリモデリングが進展し、PECAM 陽性の ASVs はあまり目立たなくなった一方で、心内膜、静脈洞、PEO 由来の Coronary vessel (CVs) が網目状構造を形成し大動脈基部を複数貫いていた。その後 CVs 由来の血管網がリモデリングされ E16.5 で成熟型の 2 本の冠動脈が形成される。以上より冠動脈の発生には 2 つのリモデリングの過程が必要であると考えられた。一つ目は胎生早期の ASVs のリモデリング、二つ目は E15.0-E15.5 付近で起こる CVs のリモデリングである。

次に我々は、*PlexD1* の発現パターンを確認した。*PlexD1* は広く内皮細胞に発現する事が知られているが、ASVs においても同様に強い発現が認められた。また、*Sema3E*-cre マウスを用いた実験により *Sema3E* の発現領域を推定した。

Sema3E は ASVs, CVs とともに発現が認められたが、リネージトレースの結果、Sema3E を発現した細胞は成熟した冠動脈内皮へは寄与していなかった。さらに Sema3E の発現細胞を調べるため Sema3Ecre と R26ReYFP レポーターマウスを交配させたマウスの大動脈基部細胞を FACS によりソートし、GFP 陽性細胞をシングルセル遺伝子発現解析した。解析の結果 GFP 陽性細胞は大きく 3 つの群に分類できる事がわかった。一つ目は *Myh6*, *myl2*, *myl4* や *TBX20* といった心筋マーカーを発現するグループ、二つ目は *MCAM*, *Tagln* を発現する平滑筋と考えられるグループ、三つ目は *Ptprb*, *PECAM*, *Vvw*, *PlexD1*, *CD144* といった内皮細胞マーカーを発現するグループである。さらに相関解析を行ったところ、*Sema3E* の発現は *Prox1* や *VEGFR3* といったリンパ管マーカーと発現相関があることがわかった。また *Prox1*, *VEGFR3* 発現が *Sema3E* 発現と相関があることもわかった。

心臓において、当初はニワトリ胚を用いた実験から、また最近ではマウス胚を用いた実験により ASVs が *Prox1* を発現している事が報告されていた。こうした知見に基づき我々は ASVs の発生をさらに詳細に解析した。*Prox1*, *VEGFR3*, *PECAM* を用いた免疫染色により ASVs の発生を詳細に解析しところ、E9.5 において鰓弓内部に *Prox1* 陽性の細胞塊を認めた。E10.5 になるとこの細胞塊は *VEGFR3* を発現し、数を増し鰓弓の腹側から遊走し E12.5 で網目状構造を形成し、大動脈を覆った。E16.5 では太く、成熟したリンパ管を形成していた。これまでの心臓リンパ管に関する報告では、心臓背側の静脈洞よりリンパ管網が発生し、大動脈を覆うと記載されていたが、*Prox1* 陽性細胞には頭側と尾側より由来する細胞集団があるという事が確認された。鰓弓の中心部には二次心臓予定領域に寄与する細胞群があることが知られている。そこで、二次心臓予定領域のマーカーである *Isl1* と *Prox1* の共染を行い、これらのマーカーの発現を確認すると、大部分が共染する事を見出した。したがって、ASV は静脈由来の細胞だけではなく二次心臓予定領域の細胞群にも由来する可能性が示唆された。

さらに ASVs と冠動脈発生の関係を考えると、E12.5 において ASVs と大動脈壁の結合部位は *Prox1* や *VEGFR3* の発現を失っている事や E14.5 においても ASVs と冠動脈に結合があり、後にこうした結合が消失するということがわかった。

Sema3E-*PlexD1* KO マウスにおいて ASVs の発生を観察すると、E17.5 では ASVs の著明な増生が確認された。また *PlexD1* KO マウスでも同様であっ

た。以上の結果から冠動脈発生に Sema3E-PlexD1 シグナルが関与する可能性が示唆された。

考察

以上の実験結果より我々は Sema3E-PlexD1 シグナルが冠動脈発生と心臓リンパ管発生に重要であると考えた。Sema3E, PlexD1 KO は共に様々な冠動脈奇形と心臓リンパ管の増生を示した。我々のデータは冠動脈発生に二つのリモデリングの過程が重要である事を示唆している。1つ目は胎生早期に大動脈や冠動脈に結合していた ASVs が動脈系との結合を失い心臓リンパ管を形成する事。2つ目は複数の未成熟な冠動脈が成熟し、2本の成熟した冠動脈を形成する事である。Sema3E-PlexD1 シグナルはこの両方のリモデリングの過程に作用している可能性がある。PlexD1 と Sema3E は ASVs と CVs 共に発現しているが成熟した冠動脈入口部には発現が認められない。Sema3E-PlexD1 シグナルが内皮細胞に対し反発性、抑制性の作用を示す事を考慮すると幼弱な冠血管構造が、Sema3E-PlexD1 シグナルにより淘汰された可能性がある。

我々の結果は Sema3E-PlexD1 シグナルが ASVs のリモデリングに寄与する事を示唆している。Sema3E-PlexD1 シグナルが作用する事で ASVs が成熟したりリンパ管構造を形成し、冠動脈入口部も同時にリモデリングされうる。冠動脈形成に関与するシグナルのさらなる理解により、より有効な冠血管構造の再生や心臓修復に役立つ治療法を開発できる可能性がある。