

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461104

研究課題名(和文) 心臓微小低酸素領域における遺伝子発現・血管新生の3次元解析を応用した治療法の開発

研究課題名(英文) Dynamics of angiogenesis in ischemic areas of the infarcted heart

研究代表者

小林 光一 (Kobayashi, Koichi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20567010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の心臓における低酸素領域における新生血管発達のメカニズムや時相は明らかになっていない。血管新生の詳細を解明することで革新的な治療が可能になるものと考えられる。我々は左室心内膜から発達する新しい血液循環の仕組みを発見し、障害心筋を救うことができることを確認した。これらはVEGFシグナルに依存していた。さらに血管新生により心内膜側の残存心筋細胞を増加することで左室のリモデリングも抑制していた。一方、いわゆる虚血境界域と言われている領域では虚血心筋のほとんどすべてが12時間以内にアポトーシスに陥り、その後の治療によって治療に期待できる細胞は同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：The mechanism and timing for new vessel formation in the mammalian heart following hypoxia are unclear. Identifying targets that benefit from angiogenesis treatment is indispensable for the development of revolutionary therapies. Here, we describe a novel circulatory system wherein new vessels develop from the endocardium of the left ventricle to perfuse the hypoxic area and salvage damaged cardiomyocytes at 3-14 days after MI by activating vascular endothelial growth factor signaling. Moreover, enhanced angiogenesis increased cardiomyocyte survival along the endocardium in the ischemic zone and suppressed ventricular remodeling in infarcted hearts. In contrast, cardiomyocytes in the border zone's hypoxic area underwent apoptosis within 12 h of MI, and the border area that was amenable to treatment disappeared. These data indicate that the non-perfused area along the endocardium is a site of active angiogenesis and a promising target for MI treatment.

研究分野：虚血性心疾患

キーワード：血管新生 虚血 心筋梗塞 血管増殖因子 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞は現在においても突然死の大きな原因となっている。急性期治療に関しては AED の一般市民への教育、救急体制の充実、緊急カテーテル治療法の確立などにより患者の予後は劇的に改善の方向に向かっている。しかし、広範な梗塞に進展してしまった場合患者の ADL は制限され、リモデリングの進展により経時的に心予備能は低下していく。結果として左室補助循環、心移植を必要とすることになる。研究分野においては血管新生療法、細胞移植療法、遺伝子治療などの新規治療法が検討されているが未だ治療効果が検証された確固とした手法は存在しない。亜急性期から慢性期にかけて起きうる血管新生の存在が証明されていないこと、心筋梗塞の組織レベルでの詳細な進展過程が明らかにされていないこと、急性の再灌流療法の対象になる時間帯の後におけるリスク領域の同定ができていないことなどが新規治療の理論的な発展、応用を困難にさせていると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 心筋梗塞急性期から慢性期にかけて、組織の低酸素化、Apoptosis の誘導、結果として陥る組織壊死の過程を顕微鏡的に明らかにすること。
- (2) 低酸素化で誘導される血管新生の発生過程を顕微鏡的に明らかにすること。
- (3) 低酸素化の状態にある領域における遺伝子発現を明らかにすること。
- (4) 上記で明らかになったことの臨床的な応用の可能性を検討すること。

上記を明らかにすることで遺伝子治療、血管新生療法、細胞移植療法の治療対象となりうる顕微鏡的な領域、時相が明らかとなり新規治療の発展に寄与することができる。大局的な目標は新規治療の対象領域を明らかにすること。

3. 研究の方法

8 週 C57BL/6J マウスを挿管・人工呼吸器管理下で左冠動脈起始部を結紮することにより心筋梗塞の作成を行った。心筋梗塞作成後 3 時間、4 時間、6 時間、12 時間、24 時間、2 日、3 日、4 日、7 日、14 日、28 日と時間経過毎に組織評価、心エコー、遺伝子発現の評価を行った。また高酸素下による治療効果を確認するため 60% 酸素の環境に術後 4 日間心筋梗塞マウスをおいた。

さらに VEGF-VEGFR2 の血管新生シグナルの重要性を確認するために、血管内皮細胞においてのみタモキシフェンにより Cre が誘導され、同細胞においてのみ VEGF receptor-2 遺伝子活性が消失するマウスを利用した。これにより虚血心筋における血管新生が VEGF 依存的なものかどうか評価できる。

(1) 組織評価

血液により還流されている血管を認識するためマウスを安楽死させる前にレクチンを還流させた。凍結標本とした後で免疫学的に染色を行った。また 10 mm Hg 低酸素領域の染色のため Hypoxyprobe を安楽死前に還流させた。死細胞には取り込まれることがないことから生存しているものの低酸素状態にある細胞を Hypoxyprobe により同定することが可能となる。Apoptosis のステップが活性化している細胞においては Caspase 酵素が働いている。いずれの Caspase 酵素の活性化も視覚化するため Poly-caspase FLICA SR-VAD-FMK reagent を利用した。成熟した血管は周皮細胞によって包まれるが NG-2 染色により同細胞を同定した。

染色された組織切片を共焦点顕微鏡にて観察した。染色された血管構造を立体的に評価するためには二光子顕微鏡を利用した。

(2) 心機能評価

吸入麻酔下にて心筋梗塞作成直前、直後、1 週から 4 週間までのタイムポイントで心エコーを施行し、左心室収縮能、左心室の拡張末期径などを計測した。

(3) 遺伝子発現評価

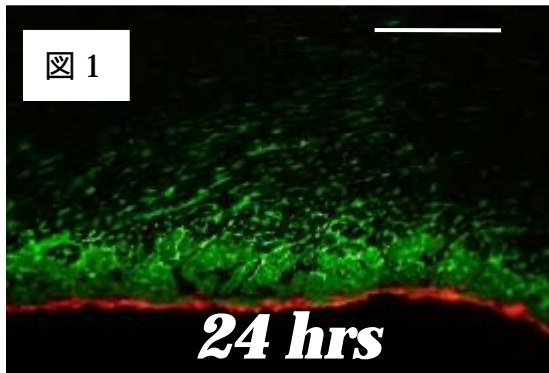
心筋梗塞作成 24 時間後の心臓サンプルから凍結標本を薄切し低酸素染色を行うことで、低酸素状態にはあるものの死には至っていない細胞によって構成されている心筋組織を同定した。常に連続切片を準備し、染色で確認された低酸素領域をレーザーマイクロダイセクションのシステムで回収した。その限定された領域から RNA を抽出し、RNA の増幅キットで処理した上でオーダーメイドによって作成した PCR アレイキットを使い分泌因子を中心に約 100 種類の遺伝子発現を評価した。対照は正常心筋組織の相当する領域を利用した。

(4) ヒトの病理標本での評価

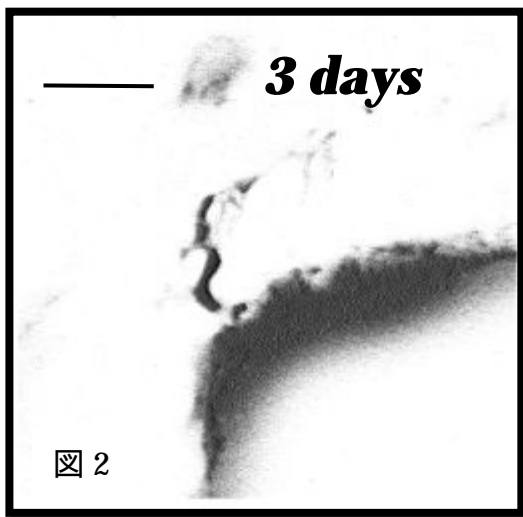
心筋梗塞の既往のある患者の心臓病理標本の 5 μ m 薄切をヘマトキシリン・エオジン染色することで、線維化領域、残存心筋を評価した。

4. 研究成果

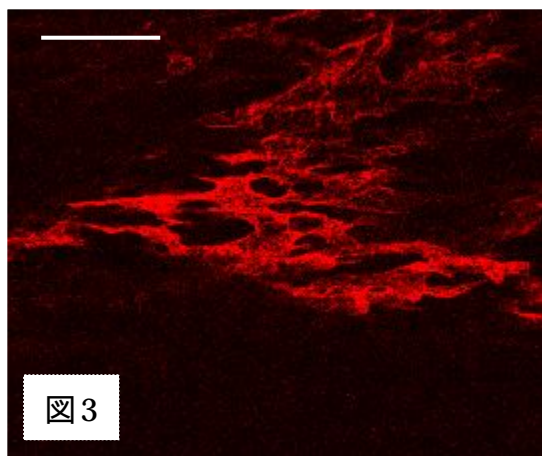
(1) 心筋梗塞を作成すると虚血領域(冠血流のない)は間もなく低酸素に陥り 3 時間経過したところから多くの細胞は Apoptosis に陥り 6 時間の間に死細胞となっていた。しかし左室内膜側の 70~100 μ m 程度の限られた領域のみ低酸素状態にあるものの Apoptosis に陥ることはなかった(図 1)。これは左室からの酸素拡散により Apoptosis もしくは Necrosis の状態に陥らなかったと考えられた。



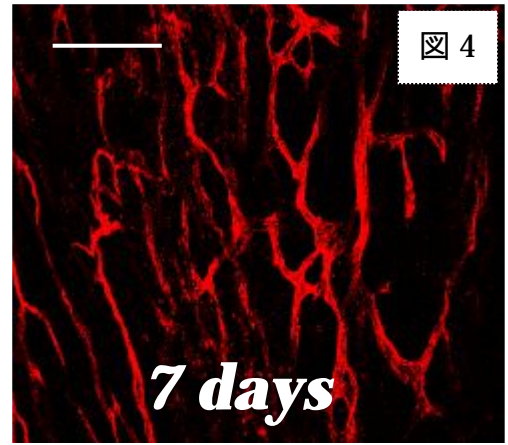
3 日目になると左室心内膜より微小血管が発生し始めることが明らかとなった (図 2)。



左室心内膜から発生し始めた血管を詳細に観察すると非常に多様な血管の形状を示していることが明らかとなった。極めて細い Channel のみを持つ血管から、管腔構造というよりも平面に一部くびれが存在しているだけの袋に近いような構造の部分も認められた (図 3)。

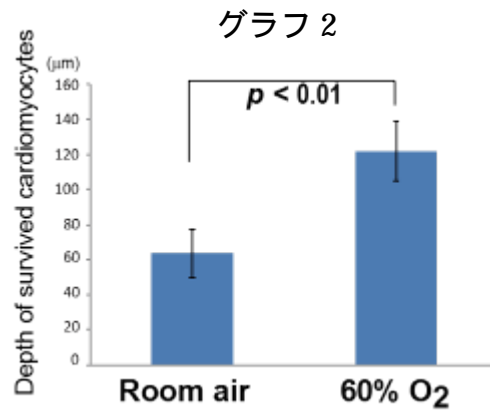
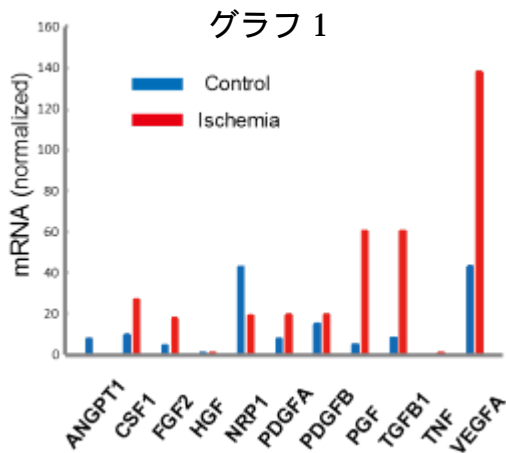


そこで新生した血管の血管径の分散を各タイムポイントで評価を行った。経時的に血管径の変化を観察すると 3 日目から 14 日目にかけて血管径の分散が低下し、平均血管径も低下していく過程が観察された。血管径のばらつきは存在しているものの 7 日目ではすべて管腔構造の結合によって形成されるようになり (図 4)、3 日目の新生血管に比較して合理的な血液運搬が可能であろうと推測される形状となっていた。これは発生学における血管発生とその後のリモデリングの過程と全く同じものであると考えられた。



また 3、4 日目では内皮細胞だけで構成されていた新生血管は 7 日目には NG-2 で染色される周囲細胞 (壁細胞) によって被包化されていることが明らかとなった。これは左室心内膜から発生した新生血管が血管リモデリングを通して成熟していったことを示している。このような左室心内膜からの血管の発生、発達により 3 日目まで確認されていた低酸素領域は次第に消失していった。

(2) 虚血誘導後 24 時間後に心内膜に沿って Apoptosis に陥っていない状態で低酸素染色が陽性である限られた領域 (70 - 100 μm) が認められた。同部位は極めて特殊な領域であり同領域が血管発生、血管新生を強力に誘導しているものと予測された。血管発生・新生のメカニズムの検証のため同部位のみをサンプルとして回収した上で、遺伝子発現を RT-PCR で評価した。血管新生に必要なと考えられている様々な分泌因子の発現が促進され、一方で Angiopoietin-1 のように血管新生の初期に抑制されると報告されているものは予測された動態を示していた。様々な因子が検討されたが、刺激・誘導された因子の中でも血管新生に最も重要な働きをすると考えられている VEGF は強い発現の誘導を受けていた (グラフ 1)。



(3) 上記のデータから心内膜からの血管新生には VEGF-VEGF receptor2 のシグナルが必須であると予測し、血管内皮細胞特異的に VEGFR2 を阻害することによる血管新生の影響を観察した。タモキシフェンを投与して新生血管の VEGFR2 を抑制すると心筋梗塞 5 日目の心内膜からの新生血管は著明に抑制されていた。心内膜からの血管新生は VEGF-VEGFR2 依存的なものであることが示された (図 5)

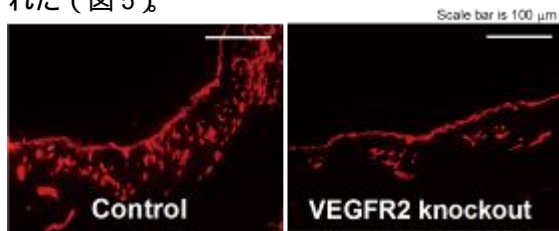
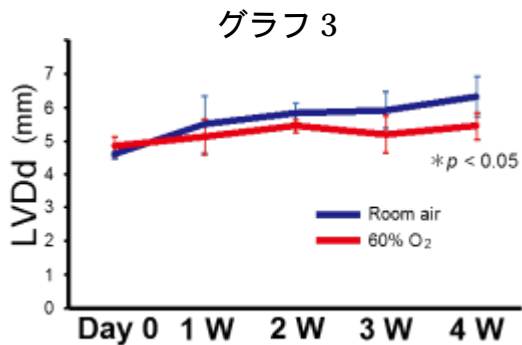


図 5

(5) ヒトの心筋梗塞の病理標本において梗塞領域を観察すると心内膜に沿った領域で 70 - 100 μm 程度の残存心筋の細胞層が認められた (図 7)。これはマウスの心筋梗塞の結果と同じであり、人においても左室からの酸素拡散によって左室に沿った領域で心筋細胞が生存しており、マウスと同様に心内膜から血管新生が起きているものと考えられた。

(4) ここまでの観察結果から心内膜に沿った領域は左室の高い酸素分圧をもった血液からの酸素拡散により生存していると考えられ、虚血 3 日目以降は心内膜からの血管新生によって低酸素状態から離脱するものと考えられた。そこで急性期から 4 日間吸入酸素濃度を上昇させ左室からの酸素拡散距離を延長させることで心内膜側の残存心筋が増加すると考えられた。60%酸素の環境にて梗塞マウスを 4 日間飼育すると 28 日後の心内膜側の残存心筋は著明に増加しており (図 6、グラフ 2)。心エコー検査でも慢性期における左室拡大 (左室リモデリング) も有意に抑制されていた (グラフ 3)。

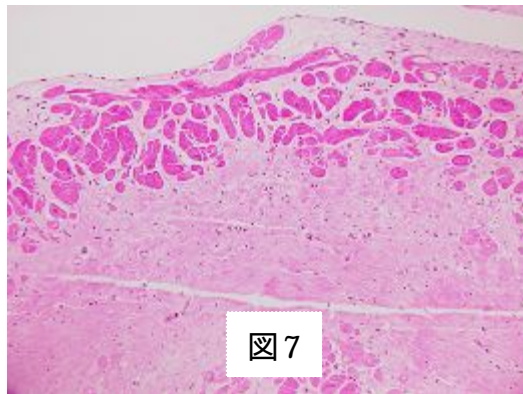


図 7

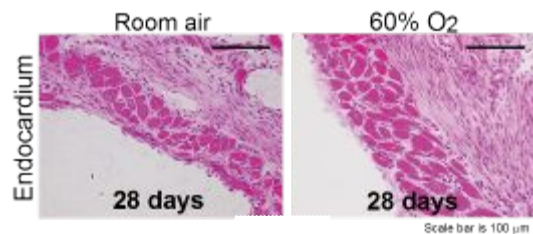


図 6

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 光一 (KOBAYASHI, Koichi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20567010