

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16113

研究課題名（和文）心臓におけるVEGF-Aの役割を解明し新規心不全治療薬を開発する

研究課題名（英文）Elucidating the role of VEGF-A in heart failure

研究代表者

佐藤 達之（SATO, Tatsuyuki）

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10903495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：心不全は心臓の機能低下により生活の質を著しく低下させ、最終的には死亡に至ることもある重大な疾患である。心不全の病態には心筋虚血と低酸素が重要な役割を果たすことがこれまで報告されてきた。そのため、心臓病において心臓の血管新生を誘導する治療法の可能性が模索されてきたが、一貫した結果が得られていない。本研究では、この現状を打破するため、血管新生を強力に誘導するサイトカインである血管内皮細胞増殖因子（VEGF-A）の心臓における役割を詳細に明らかにすることを目指した。研究の結果、VEGF-Aは産生される細胞によりその役割が異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、心不全の病態においてVEGF-Aがどの細胞から産生されるかが心機能維持に重要である可能性を提示した点にある。これまで、VEGF-Aはどの細胞から産生された場合でも、その役割は同等だと考えられてきた。しかし本研究結果は、細胞種ごとの役割を示唆するものであり、新たな視点を提示するものである。社会的意義としては、心不全患者の予後改善に向けた新しい治療法の開発に貢献する可能性がある。本研究の結果は、長期的・最終的には、患者の生活の質向上や医療費削減に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Heart failure is a serious condition that significantly decreases the quality of life due to reduced cardiac function and can ultimately lead to death. It has been previously reported that myocardial ischemia and hypoxia play important roles in the pathology of heart failure. Therefore, the potential of therapies that induce cardiac angiogenesis in heart diseases has been explored, but the results have been inconsistent. This study aimed to elucidate the role of vascular endothelial growth factor (VEGF-A), a cytokine that strongly induces angiogenesis, in the heart more in detail. The results suggested that the function of VEGF-A may differ depending on the producing cell types.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全

1. 研究開始当初の背景

心不全は、心臓の収縮または拡張の機能が低下する致死性の疾患であり、特効薬はない。高齢化の進展や生活習慣病の増加に伴い、心不全患者の数は世界的に増加しており、心不全パンデミックの時代が到来している。心不全はその進行により患者の生活の質を著しく低下させ、最終的には死亡に至る場合もある。現在利用可能な治療法や薬剤は多岐にわたるが、心不全の予後は依然として不良であり、新たな治療アプローチの開発が急務である。

血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)は、心臓組織に張り巡らされている毛細血管網を維持し、また血管新生を強力に促進するサイトカインである。この VEGF-A を活性化させて心臓病を治療しようという試みがこれまでも多数行われてきた。しかし、一貫した効果はあげられておらず、その理由も不明である。

心臓では、特に心筋細胞の産生する VEGF-A が最も重要だと教科書的に説明されてきた(1)。しかし、心不全などの病態において、どの細胞の産生する VEGF-A が心機能維持に重要な役割を果たすのかは、これまで研究されてこなかった。本研究計画では、この点に着目して、下記の通りの研究を行なった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓病における VEGF-A の役割をより詳細に明らかにすることである。具体的には、マウス心臓病態モデルと複数の遺伝子改変マウスを用いて、どの細胞が産生する VEGF-A が心機能維持に必要なのかを明らかにすることを目指した。

また本研究を進める過程で、心筋細胞由来の VEGF-A は必ずしも心機能の維持において必須ではないということがわかった。既存のデータベースの解析や、他の方法を用いた検討で、心不全の心臓においては、マクロファージも VEGF-A を産生し、それが心機能維持に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

我々の研究室ではこれまで、心不全において心臓に存在するマクロファージが病態に重要な役割を果たすことを報告してきた(2,3)。マクロファージの HIF シグナルは、PDK1 を活性化し、ミトコンドリア呼吸を抑制して解糖系を活性化することで低酸素環境である心不全心にも浸潤し活性を維持することができている。また、そうして浸潤してきたマクロファージの一部は、オンコスタチン M といったサイトカインを分泌し、積極的に線維化を抑制していた。

心筋細胞由来の VEGF-A は必ずしも心機能の維持において必須ではないということ、また心不全の心臓においては、マクロファージも VEGF-A を産生するという結果は、マクロファージの分泌するサイトカインが心不全の病態に重要な役割を果たすとする上記の論文の結果と合致するものであった。そのため、本研究ではさらに、マクロファージ由来の VEGF-A が心臓病の病態にどのような役割を果たすかを検討した。

3. 研究の方法

- (1) タモキシフェン誘導型心筋細胞特異的 *Vegfa* ノックアウトマウス: 心筋細胞由来の VEGF-A を胎生期から欠損させる *Myh6-Cre Vegfa^{lox/lox}* では、先天的な心臓の発生異常をきたし、生後間もなく死亡してしまう 1)。そこで本研究では、生後任意のタイミングで心筋細胞の VEGF-A を欠損させるモデルを使用するため、*Myh6-MerCreMer Vegfa^{lox/lox}* を利用した。このマウスは、タモキシフェンを投与すると、細胞質中の MerCreMer タンパクが核に移行し、loxP サイトで DNA を切断する。その結果、タモキシフェンを打ったタイミングそれ以後で心筋細胞由来の VEGF-A が欠損するマウスを使用することが可能となる。
- (2) 心不全モデル: 病態モデルとしては、心不全モデルとして広く用いられている横行大動脈縮窄モデル (Transverse aortic constriction: 以下 TAC) を利用した。このモデルでは、麻酔下にマウスの胸骨を正中切開し、25-27G の針を加工したスパーサー毎横行大動脈を結紮した。その後、スパーサーを除去することで、ちょうど 25-27G 相当の狭窄を作り出した。心不全モデル作成後の評価のために、まず *in vivo* 機能評価として心エコーを行なった。さらに病理学的な解析として、心筋細胞肥大、線維化、血管密度の評価を行なった。
- (3) マクロファージの単離と解析: 心不全モデルを作成したマウス心臓から、マクロファージを単離した。具体的には、コラゲナーゼを含む溶液を用いて心臓を処理し、さらに機械的破碎を組み合わせて、一細胞懸濁液を作成した。ここからセルソーターを用いて、マクロファージを単離し、解析した。
- (4) マクロファージ特異的 *Vegfa* ノックアウトマウス: 心不全においてマクロファージの分泌する VEGF-A の果たす役割を明らかにするため、マクロファージ特異的 VEGF-A 欠

損マウスを利用した。このマウスを用いて、上記2と同様に、心不全モデルを作成して、その表現型を解析した。

4. 研究成果

まず心不全を誘導していない通常状態で、タモキシフェンをタモキシフェン誘導型心筋細胞特異的 *Vegfa* ノックアウトマウスに投与し、心機能が変化するか確認した。すると、短期の間では、明らかな心機能の低下は認めなかった。また一定期間後に心臓を採取し、ユフィックス固定液で固定したのち、パラフィンに包埋し病理切片を作成した。その切片をもとに病理学的に評価したが、明らかな変化は認めなかった。

続いてこのマウスに心不全を誘導した。あらかじめ野生型マウスで複数の強度の TAC を行い、致死率が高すぎず、かつ心不全が誘導される強度を確認した。続いてその強度の TAC を、タモキシフェン誘導型心筋細胞特異的 *Vegfa* ノックアウトマウスに適用した。すると短期の間では、明らかな心機能の低下は認めなかった。また上記と同様に病理学的な評価を行なったが、明らかな変化は認めなかった。血管密度についても評価したが、明らかな低下は認めなかった。

これらの結果を受けて、心臓内で VEGF-A を産生する他の細胞を探索した。いくつかの解析を行い、マクロファージが心不全の心臓内で VEGF-A を産生する可能性を見出した。そこで実際にマクロファージを単離し解析した結果、確かに心不全モデルマウスの心臓内のマクロファージが *Vegfa* を発現していた。

マクロファージ特異的 *Vegfa* ノックアウトマウスに対して同様に TAC モデルを作成した。すると、コントロールマウスに比べてノックアウトマウスで心機能が低下した。さらに、上記と同様に病理学的に解析を行い、血管密度が低下する所見を得た。これらの結果はすなわち、マクロファージ由来の VEGF-A が心不全の心臓において血管密度と心機能の維持に重要な役割を果たしていることを示唆する。

これらの実験データから、心不全においては、心筋細胞由来の VEGF-A よりも、マクロファージ由来の VEGF-A が心機能維持と血管新生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。本研究結果から、心臓における VEGF-A の新たな側面が明らかになった。VEGF-A を心不全治療に臨床応用するには、本研究結果も考慮し、有効に血管内皮細胞に作用させる方法を考えることが重要である可能性が示唆された。

- (1) Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, VanBruggen N, Bunting S, Ruiz-Lozano P, et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 8;98(10):5780-5.
- (2) Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, et al. HIF-1 -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. Nat Commun. 2016 May 18;7:11635.
- (3) Abe H, Takeda N, Isagawa T, Semba H, Nishimura S, Morioka MS, et al. Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. Nat Commun. 2019 Jun 27;10(1):1-10.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------