

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790539
 研究課題名 (和文) PIGFによる心保護効果を応用した急性心筋梗塞に対する新規治療法の開発
 研究課題名 (英文) Novel treatment strategy for acute myocardial infarction with placental growth factor.
 研究代表者
 竹田 征治 (TAKEDA YUKIJI)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60398443

研究成果の概要：

PIGF (胎盤由来増殖因子) は、VEGF ファミリーに分類されるサイトカインであり、毛細血管新生作用だけでなく動脈新生作用も有している。我々は従来から継続している研究成績から、急性心筋梗塞に対する PIGF 投与が心機能および生命予後を改善する治療的応用が可能であるとの仮説をたてた。今回の検討では、分子生物学的手法を用いて PIGF およびその阻害蛋白である sFlt-1 (可溶性 Flt-1) のリコンビナント蛋白を作成して心筋梗塞モデル動物に投与することにより、1) PIGF の外因性投与が梗塞後の心機能および生命予後に及ぼす影響、2) 予後改善効果における PIGF の血管新生・動脈新生作用の寄与、3) 外因性 PIGF 投与が骨髄由来 Flt-1 陽性細胞の末梢血への遊走、および梗塞部心筋への homing に及ぼす影響、4) 骨髄由来 Flt-1 陽性細胞の心臓内で血管新生に対する関与、5) 外因性 sFlt-1 投与の単独あるいは PIGF との同時投与が心筋梗塞後の病態に及ぼす影響を検討した。本研究の成績から、急性心筋梗塞時に内因性に増加する PIGF は梗塞後の病態に治癒的に寄与すること、さらに外因性に PIGF を投与することによってその効果が増強されることが明らかとなった。PIGF が急性心筋梗塞の急性期の治療法の一つになる可能性が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学・心臓病態学

キーワード：腎不全、再生医学、心血管

1. 研究開始当初の背景

近年の心筋梗塞 (AMI) に対する早期再灌流療法の普及は、その死亡率と機能予後に大きな改善をもたらした。最近では、慢性期の予後を改善することを目的として、急性心

筋梗塞の再開通療法に追加して心機能を温存する追加的治療として細胞移植療法やサイトカイン療法など様々なものが試みられるようになってきているが、いまだ、効果が証明された治療法はない。Lundeらは急性心筋

梗塞患者に骨髄単核球を投与したが、明らかな効果は得られなかったと報告している【NEJM 355(12) 1199-1209】。その他にも効果があったとされる報告もあるが、その効果はわずかしら認められていない。また、VEGF-A(血管内皮増殖因子)は基礎実験においては非常に有効な血管新生因子と考えられているが、実際の臨床例での遺伝子あるいはリコンビナント蛋白を用いた血管新生誘導療法は十分な効果が証明されていない。われわれは従来から、VEGFファミリーに分類され血管新生作用だけでなく動脈新生作用も有するサイトカインであるPlGFに着目して研究を継続してきた【*J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(8):1559-67】。

PlGFはVEGF受容体-1(Flt-1)に特異的に結合すると考えられているが、虚血性心疾患や悪性腫瘍などの疾患状態における血管新生に寄与していると考えられている。Carmelietらによると、PlGFのホモ欠損マウスは生殖能力を含めて正常に発育することからPlGFの発生前における役割は小さいと考えられるが、出生後の病的状態における血管新生が明らかに傷害されている【*Nat Med* 2001, 7:575-583】。また、下肢虚血モデルではPlGFの局所投与が虚血部位において毛細血管だけでなく、動脈を含む側副血管の形成を促進することが認められ【*Circ Res* 2003, 996:49-60】、病的状態におけるPlGFの重要性が示唆された。さらに、PlGFはVEGFと異なり、壁細胞を有するより成熟した血管を多く新生する(arteriogenesis)と考えられており、VEGFに認められるような、浮腫、血管腫形成、低血圧などの副作用が少ないと考えられている【*Ann N Y Acad Sci* 2002;979:80-93】。

われわれは、急性心筋梗塞患者において血漿PlGF値が正常群に比して、有意に上昇しており、また、慢性期の心機能の改善度と有意に相関関係を有することを示してきた【*J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(8):1559-67】。さらに心筋梗塞モデルマウスを用いた動物実験モデルでは、梗塞巣の血管内皮細胞でPlGFが発現していることが証明された。これらのことから、内因性のPlGFが急性心筋梗塞の梗塞巣で発現し、血管新生、あるいは動脈新生により慢性期の予後を改善することが考えられた。しかし、依然として詳細な機序は解明されていない。さらにわれわれは、外因性のPlGF蛋白投与によっても心筋梗塞慢性期の予後改善効果を認めるかどうかにつき予備実験で検討した。急性心筋梗塞モデルマウスを用い、作成したリコンビナントヒトPlGF(rhPlGF)蛋白を持続腹腔内投与後に7日目の急性期と28日目の慢性期で検討すると、28日目の慢性期においてPBS群に比して52%生存率を改善した。さらに心エコー所見でもrhPlGF投与で慢性期のリモデリングが抑制されることが示されている。このことから、外因性のrhPlGF投与によっても慢性期の予後改善効果が得られることが考えられた。これらのことからPlGFが心筋梗塞に対して新しい有効な治療法になりうる可能性があ

ると考えられる。

2. 研究の目的

今回われわれは、PlGFを新規治療法として有用であるかどうかを検討するために、PlGFおよびその阻害蛋白であるsFlt-1(可溶性Flt-1)のリコンビナント蛋白を作成して心筋梗塞モデル動物に投与することにより、1) PlGFの外因性投与が梗塞後の心機能および生命予後に及ぼす影響、2) 予後改善効果におけるPlGFの血管新生・動脈新生作用の寄与、3) 外因性PlGF投与が骨髄由来Flt-1陽性細胞の末梢血への遊走、および梗塞部心筋へのhomingに及ぼす影響、4) 骨髄由来Flt-1陽性細胞の心臓内で血管新生に対する関与、5) 外因性sFlt-1投与の単独あるいはPlGFとの同時投与が心筋梗塞後の病態に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

I. リコンビナントヒトPlGF(rhPlGF)蛋白、可溶性Flt-1蛋白(rhsFlt-1)の作成

hPlGFおよびhsFlt-1蛋白遺伝子配列【*Oncogene* 1993; 8:925-931.】を組み込んだプラスミドを用いて、大腸菌発現系で蛋白を精製した。

II. 心筋梗塞モデルマウスの作成

心筋梗塞におけるrhPlGF, rhsFlt-1蛋白投与の効果を確認するために12週齢のC57BL/6マウスを用いて心筋梗塞モデルマウスを作成する。気管挿管を施行後、吸入麻酔下(イソフルラン)に左肋間開胸し、左冠動脈前下降枝を8-0絹糸にて結紮する。心筋梗塞作成7日後(急性期)、28日後(慢性期)に心臓、骨髄、末梢血をサンプルとして採取する。

III. オスモティックミニポンプを用いた蛋白の持続腹腔内投与

心筋梗塞作成マウスの皮下にrhPlGFおよびrhsFlt-1溶液を充填したオスモティックミニポンプを留置する。ポンプから延長したチューブを腹腔内に固定する。

IV. 心筋梗塞モデルを用いたPlGFによる心保護効果の解明

同マウスを用いて7日目、28日目にそれぞれ、1) TTC染色、マッソン染色による梗塞部面積の評価、2) 心エコーによる血行動態の評価、3) 免疫組織化学(抗CD31抗体、抗 α -SMA抗体、および抗CD68抗体)を用いた梗塞部における新生血管や浸潤細胞の検討、4) RT-PCRを用いた梗塞部における血管新生因子や線維化促進因子の発現の変化を検討する。

V. 心筋梗塞における骨髄単核球の影響の検討

① 骨髄移植モデルの作成

PlGFは骨髄中の単核球に遊走させると考えられている【*Nat Med* 2002;8:841-849】。骨髄細胞(単核球)の心筋梗塞における動態を検討するために、8週齢のGFPマウス骨髄細胞を大腿骨より採取し、12

週齢C57BL/6マウスの尾静脈より静脈注射を行う。予備実験 (FACS解析) において1ヶ月後のマウス骨髄で90%以上の置換率を確認している。

② 心筋梗塞モデルマウスの作成

骨髄移植マウスに上記の方法で心筋梗塞を作成し、7日後と14日後のGFP陽性細胞数を検討する。さらに末梢血より単核球を比重遠心法により分離した後に抗Flt-1抗体を用いてFACS解析を行い、Flt-1陽性細胞の増加率を心筋梗塞モデルを用いてPIGF投与群とPBS投与群において比較する。さらに抗Flt-1抗体を用いてFACS sorting により細胞を単離し、同細胞よりmRNAを採取することで血管新生因子の遺伝子発現発現につき、RT-PCRを用いて検討する。

③ 心筋梗塞モデルマウスの心臓からの単核球の分離

心筋梗塞マウスの心臓を取り出した後に冠動脈よりコラゲナーゼで還流する。単細胞に分離できたら比重遠心法で単核球を分離した後に抗Flt-1抗体を用いてFlt-1陽性細胞を sorting する。これで得られた細胞は骨髄中からPIGFにより誘導された細胞と考えられる。得られた細胞からmRNAを採取し、末梢血と同様の検討を行う。

VI. Flt-1によるPIGFの拮抗作用の検討

PIGFは血管新生作用を有し虚血心を救済する作用を有する反面、炎症の持続が心抑制作用を有するという相反する作用も考えられており、PIGFの心保護作用を最大限発揮するためにはPIGFの投与時期は非常に重要であると考えられる。PIGFはFlt-1に結合し、血管新生作用を有すると考えられており、さらに可溶性Flt-1 (sFlt-1) によってその作用が拮抗されると考えられている。

そのためにrhPIGF投与数日後に、さらにsFlt-1を投与することでPIGFによる慢性期の炎症持続効果を抑えることは重要と考えられる。

① 心筋梗塞モデルマウスへのrhsFlt-1投与

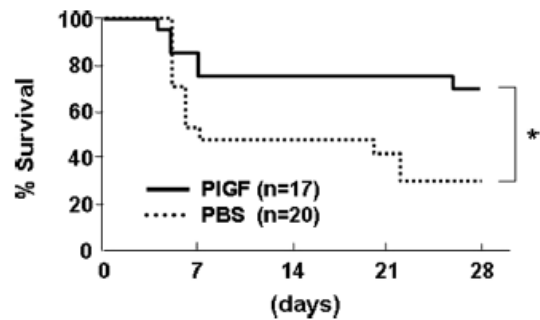
上記の方法を用いて心筋梗塞モデルを作成と同時にrhsFlt-1溶液を充填したオスモティックミニポンプをマウス皮下に留置する。7日後に心臓を採取し、1) TTC染色、マッソン染色による梗塞部面積の評価、2) 心エコーによる血行動態の評価、3) 免疫組織化学 (抗CD31抗体、抗 α -SMA抗体、および抗CD68抗体) を用いた梗塞部における新生血管や浸潤細胞の検討、4) RT-PCRを用いた梗塞部における血管新生因子や線維化促進因子の発現の変化、などにつき検討を予定している。

② sFlt-1投与によるPIGFの至適拮抗時期の特定

心筋梗塞モデルにrhPIGFを持続腹腔内投与し、3日後、7日後、14日後に、rhsFlt-1溶液を充填したオスモティックミニポンプをマウス皮下に再度、留置する。28日後に死亡率の改善度につき検討する。

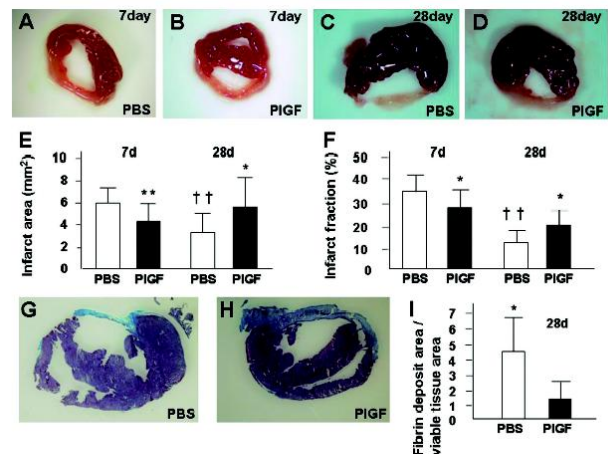
4. 研究成果

I. リコンビナントPIGFが心筋梗塞モデルマウスの予後に及ぼす影響



梗塞作成前1日目から3日間の持続投与により、手術後28日目の生命予後は、rhPIGF投与マウスがPBS群に比して52%の改善が得られた。

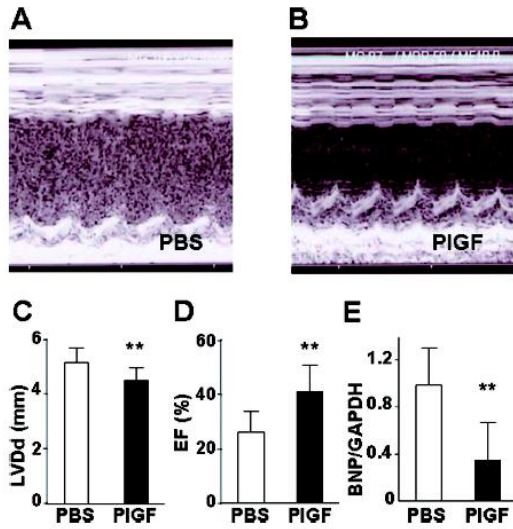
II. リコンビナントPIGFが梗塞範囲に及ぼす影響



第7病日のTTC染色では、心筋梗塞面積およびinfarct fractionはrhPIGF投与群でPBS投与群に比して有意に小さかった。(infarct area: 4.25 ± 2.04 mm² vs 5.95 ± 1.54 mm², $P < 0.01$; infarct fraction: $26.46 \pm 1.59\%$ vs $33.70 \pm 0.52\%$, $P < 0.05$)

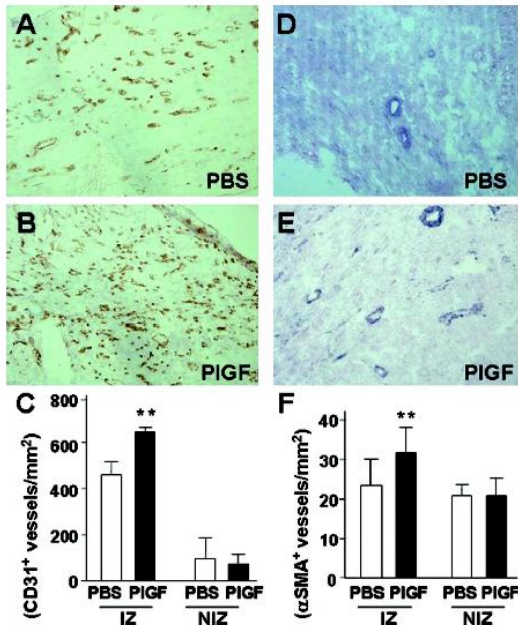
さらに第28病日の慢性期では、両群で日梗塞部の代償性肥大を認め、梗塞面積とinfarct fractionはrhPIGF群でPBS群に比して有意に大きかった。(infarct area: 5.58 ± 2.76 mm² vs 3.37 ± 2.00 mm², $P < 0.01$; infarct fraction: $18.86 \pm 0.76\%$ vs $11.25 \pm 0.22\%$, $P < 0.01$)

III. リコンビナントPIGFが心筋梗塞モデルマウスの心機能に及ぼす影響



第7病日に実施した心エコー検査では、rhPIGF 群で PBS 群に比して、左室内径が有意に小さく、左室収縮能が有意に高値を示した。

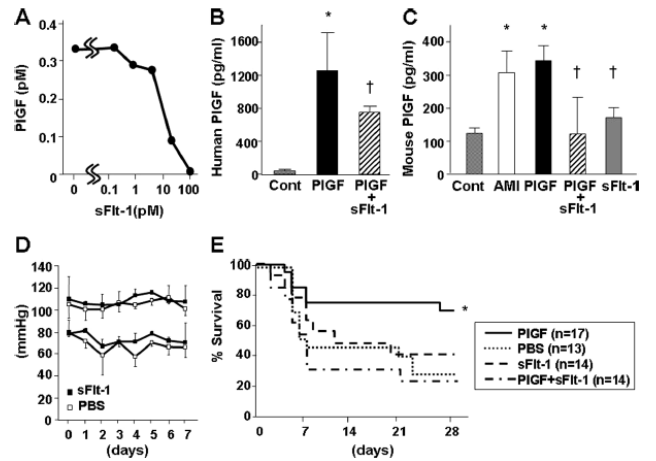
IV. リコンビナント P1GF が心筋梗塞モデルマウスの血管新生及ぼす影響



第7病日に採取した梗塞境界部での血管新生を毛細血管 (CD31) と動脈新生 (αSMA) を検討した。rhPIGF 群で PBS 群に比して、梗塞境界部における毛細血管の新生および動脈新生の幸甚が認められた。一方、非梗塞部では両群間に差は認めなかった。

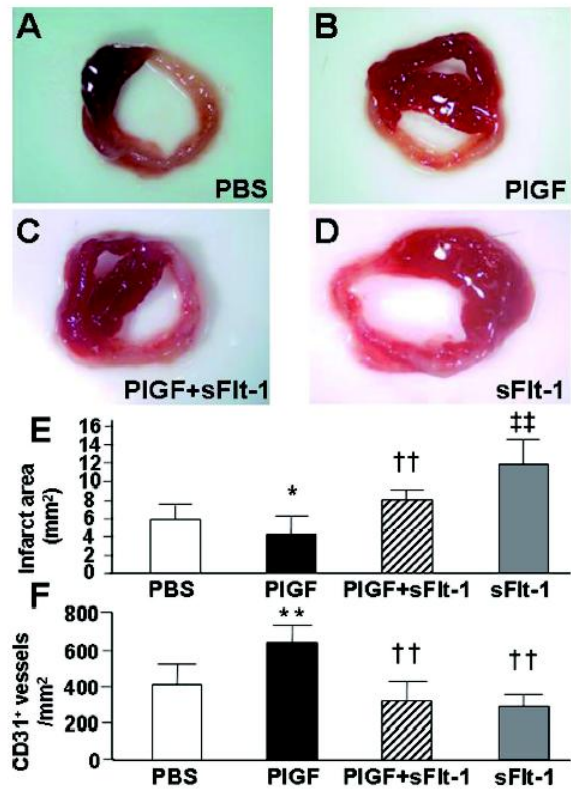
V. リコンビナント P1GF とリコンビナント sFLT-1 の同時投与が心筋梗塞モデルマウス

の影響に及ぼす影響



rhFlt-1 の投与は、心筋梗塞マウスの血行動態に影響を及ぼさなかった。rhFlt-1 の単独投与は、心筋梗塞マウスの生命予後に影響を及ぼさなかったが、両蛋白の同時投与では、rhPIGF 単独投与時に認められた予後改善効果は相殺されていた。

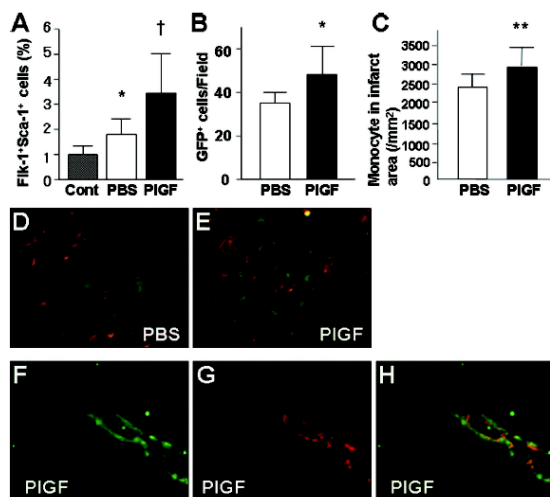
VI. リコンビナント P1GF とリコンビナント sFLT-1 の同時投与が心筋梗塞範囲および血管新生に及ぼす影響



心筋梗塞面積は、対照群に比して rhPIGF

投与群で有意に減少, rhsFlt-1 投与群で有意に増大した。また, CD31 陽性細胞で検討した梗塞境界部での血管新生は, rhPlGF 投与群で有意に増大, rhsFlt-1 投与群で有意に減少した。

VII. リコンビナント PlGF が心筋梗塞モデルマウスでの骨髄細胞の誘導に及ぼす影響



末梢血中マウス血管内皮前駆細胞 EPCs (Flk-1+Sca-1+ cells)数は rhPlGF 投与群で, 対照群に比して有意に増加していた。さらに梗塞心筋領域における骨髄由来細胞数も rhPlGF 投与群で有意に増加していた。血管内皮細胞に分化した骨髄由来細胞は, rhPlGF 群で心筋組織中で認められたが, その数は非常に少なかった。

まとめ

外因性に投与した rhPlGF が心筋梗塞モデルマウスにおける梗塞領域の減少, 血管新生の亢進の機序を介して, 慢性期の生命予後を改善する可能性が示唆される。さらに, rhPlGF での血管新生作用は毛細血管のみならず, 血管平滑筋細胞を伴う動脈新生を伴っており, 梗塞障害心筋への機能的血管増勢による血流改善および心機能の改善がもたらされたと考えられる。

以上の成績から, rhPlGF が急性心筋梗塞の急性期の治療法の一つになる可能性があり, 今後大動物での検討を進展させ, 臨床応用の実施が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Takeda Y, Uemura S, Saito Y, (and 15 authors). Treatment with Recombinant Placental Growth Factor (PlGF) Enhances both Angiogenesis and Arteriogenesis and Improves Survival after Myocardial Infarction. PlGF therapy in acute myocardial infarction. *Circ J*, 2009 (in press). (査読有)

② Somekawa S, Uemura S, Takeda Y, Saito Y, (and 9 authors). Regulation of aldosterone and cortisol production by the transcriptional repressor neuron restrictive silencer factor. *Endocrinology*, 2009 (in press) (査読有)

③ Horii M, Uemura S, Takeda Y, Saito Y, (and 8 authors). Acute myocardial infarction as a systemic prothrombotic condition evidenced by increased von Willebrand factor protein over ADAMTS13 activity in coronary and systemic circulation. *Heart Vessel* 23(5):301-307, 2008. (査読有)

④ Zhang Q, Saito Y, Takeda Y, Uemura S, (and 6 authors). The specific mineralocorticoid receptor blocker eplerenone attenuates left ventricular remodeling in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Hypertens Res* 31(6):1251-6, 2008. (査読有)

⑤ Kawata H, Uemura S, Takeda Y, Saito Y, (and 7 authors). Ultrasound accelerates thrombolysis of acutely induced platelet-rich thrombi similar to those in acute myocardial infarction. *Circ J* 71(10):1643-8, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① Saito Y, Uemura S, Takeda Y, (and 7 authors). Soluble Flt-1 is a novel biomarker for the development of severe atherosclerosis in renal dysfunction.

Symposium 1. Biomarkers, genetic polymorphism, and risk estimation. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 20-22 (Osaka, Japan).

②Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Saito Y, (and 12 authors). Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1: Decreased Levels Promote Atherosclerosis in Renal Dysfunction while Exogenous Administration Reduces Atherosclerosis Progression. Late-Breaking Basic Science - American Heart Association Scientific Session 2008 November 8-12 (New Orleans, USA).

③Takeda Y, Uemura S, Saito Y, , (and 13 authors). Angiogenesis, but not vasculogenesis, plays major role in placental growth factor (PlGF) mediated improvement of cardiac function after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Session 2007. November 4-7 (Orlando, USA).

④Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Saito Y, (and 8 authors). Plasma Level of Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt-1) as a Predictive Marker of Acute Severe Heart Failure in Patients with Acute Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Session 2007. November 4-7 (Orlando, USA).

〔図書〕 (計 1 件)

① 上村史朗, 竹田征治, 川田啓之, 斎藤能彦. 血管病のモデル-3. 心筋梗塞. 連載 血管病モデルシリーズ. 血管医学 9 (1) : 73-78, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件) ○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.naramed-u.ac.jp/~lint/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 征治 (TAKEDA YUKIJI)

奈良県立医科大学医学部・助教

研究者番号 : 60398443

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし