

# Angiopoietin-1による心臓の組織恒常性維持の分子機構

大阪大学大学院医学系研究科・循環器内科学

中岡 良和

## 1. はじめに

冠動脈疾患での虚血時に見られる冠血管新生は、胎生期の冠血管発生と類似の分子機序が利用されると考えられる。よって、冠動脈疾患での新規治療法開発を考える際には、胎生期の冠血管発生を詳細に理解することが非常に重要である。胎生期E10.5までは、心筋細胞へと酸素や栄養物は受動的拡散で供給されるが(図1a)、心臓の成長により心室壁厚が肥厚するとともに冠血管ネットワークが形成され、冠血管を介した供給へ移行する。

最近、Red-Horseらは冠血管の起源と発生メカニズムに関して詳細な検討を行って画期的な報告をした(Red-Horse et al., 2010)。冠動脈も冠静脈とも冠血管の発生起源は右心房と接する静脈洞(sinus venosus)の静脈内皮細胞(図1a 水色)にあり、それが発芽(sprouting)して無血管状態の心室へ向かって遊走して、心室に進入する前に静脈内皮から脱分化し(図1b 灰色)、心室表層を走行する血管内皮は冠静脈へ再分化して(図1c-d 水色)、その一層内側へ侵入した血管内皮は冠動脈(図1c-d 赤色)へ再分化すると彼らは報告した。一方、この未分化内皮細胞(灰色)を心室へ遊走させ、動脈化・静脈化の分化を促す因子については全く不明であった(図1 青矢印)。

一方で、研究代表者らはレセプター型チロシンキナーゼのシグナル伝達で重要な機能を持つGabドッキングタンパク質の心血管系での機能を中心に解析を進めて来た。心筋細胞特異的Gabタンパク質(Gab1/Gab2)二重欠損(DKO)マウスの解析を行い、このマウスが心臓組織内での内皮細胞から心筋細胞へ伝達される「neuregulin-1(NRG-1)/ErbBシグナル」と心筋細胞から内皮細胞へ伝達される「Ang1/Tie2シグナル」からなるパラクラインシグナルネットワーク(図2)に破綻を来して拡張型心筋症を自然発症することを報告した(Nakaoka et al., 2007)。上記の研究結果を背景として、我々は心筋から分泌されるAng1の機能を明らかにする必要があると考えた。

心筋-内皮間相互作用は心機能維持、心臓発生で重要な役割をすることが知られているが、心筋から分泌されるAng1の役割は明らかではなかったため、本研究ではその機能解明を目的とした。

## 2. 方法

- (1) *Ang1<sup>fllox</sup>*マウスの作成と *a-MHC-Cre* トランスジェニックマウスの交配による心筋特異的Ang1欠損(Ang1CKO)マウスの作成  
Ang1第1エクソンをloxP配列で挟んだ *Ang1<sup>fllox</sup>*マウスと *a-MHC-Cre* トランスジェニックマウスを交配して心筋特異的Ang1欠損(Ang1CKO)マウスを作成した。In situ hybridizationとqRT-PCRを用いてノックアウトの確認とともに致死となる時期を調べた。

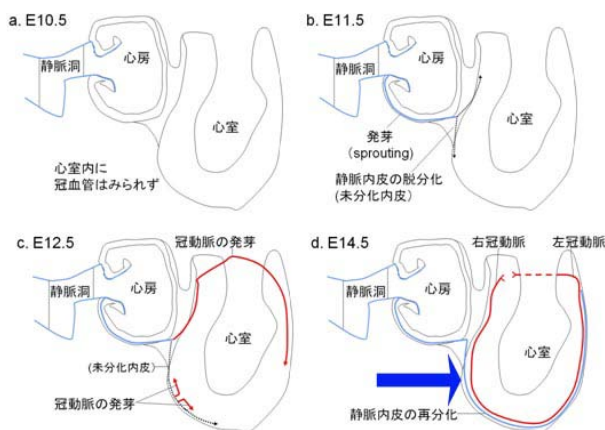
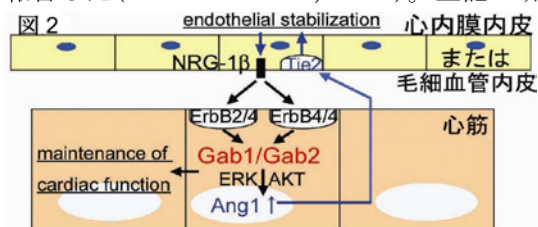


図1 冠動脈・冠静脈の発生のスキーム



(2) Ang1CKO マウスの表現型の解析

Ang1CKO マウスは胎生 E12.5-14.5 で致死を呈したため、その心臓の表現型を組織学的、免疫組織化学的 (CD31 に対する免疫染色) に解析を行った。

3. 研究成果

(1) Ang1CKO (*Ang1<sup>fllox/fllox</sup>; αMHC-Cre<sup>+</sup>*) マウスの Ang1 欠損の確認: In situ hybridization により Ang1 の E10.5 マウス胚での発現を検討すると、図 3A に示す様にコントロールの心臓で見られる Ang1 の発現は Ang1CKO マウスでは消失している、心臓での Ang1 発現レベルを qRT-PCR で定量すると Ang1CKO マウスでは Ang1 の発現量が約 90%低下していた (図 3B)。

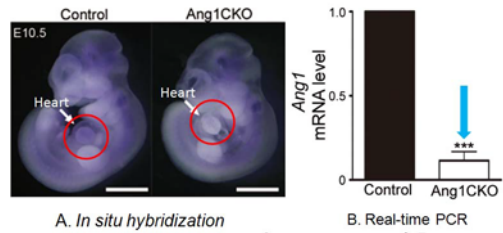


図3 Ang1CKOマウスでのKO確認

(2) Ang1CKO マウスの胎生致死の時期: Ang1CKO マウスは下記の表の如く、E12.5-14.5 で死亡することが明らかとなった。また、死亡個体は全身性の浮腫、皮下出血を伴っていた。

表 ♂ *Ang1<sup>+/fllox</sup>; αMHC-Cre* × ♀ *Ang1<sup>fllox/fllox</sup>*

| Age at sacrifice | No. of litters analyzed | Total no. | Ang1CKO (dead) | Ang1fllox/+αMHC-Cre | Control | Ang1fllox/+ |
|------------------|-------------------------|-----------|----------------|---------------------|---------|-------------|
| E11.5            | 62                      | 371       | 98(2)          | 88                  | 109     | 76          |
| E12.5            | 27                      | 191       | 41(11)         | 45                  | 53      | 52          |
| E13.0            | 49                      | 297       | 81(23)         | 69                  | 73      | 74          |
| E13.5            | 45                      | 282       | 69(31)         | 65                  | 75      | 73          |
| E14.0            | 13                      | 74        | 24(17)         | 18                  | 19      | 16          |
| E14.5            | 12                      | 70        | 14(14)         | 17                  | 16      | 16          |

(3) Ang1CKO マウス心臓の組織学的解析: Ang1CKO マウス心臓

の表現型を解析する目的で、HE 染色で組織解析を行ったところ、興味深いことに E13.5 では十分に心内膜-心筋肉柱間の接着が野生型では見られるのに対して、Ang1CKO マウスの心臓では接着が見られず浮いた状態となっていることが観察された (図 4)。また、緻密帯、肉柱の形成も Ang1CKO マウスでは野生型よりも遅滞していることが明らかとなった (図 4)。

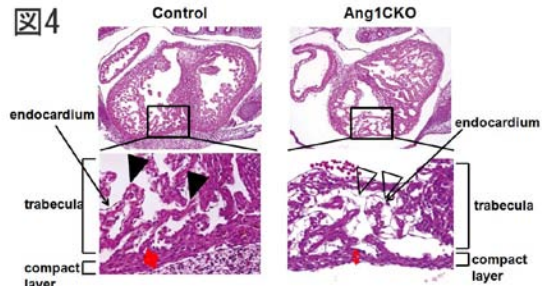


図4

(4) Ang1CKO マウス心臓の免疫組織化学による解析: 次に、内皮細胞に対する抗 CD31 抗体でホルマウント免疫染色を行って、冠血管形成について検討を行った。その結果、表層に野生型では観察される CD31 陽性の血管像が Ang1CKO マウスでは消失していることが明らかとなった (図 5)。

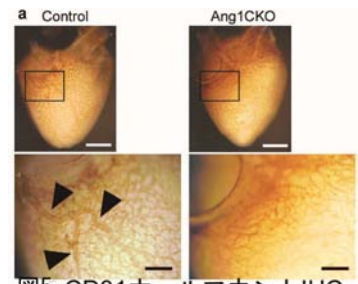
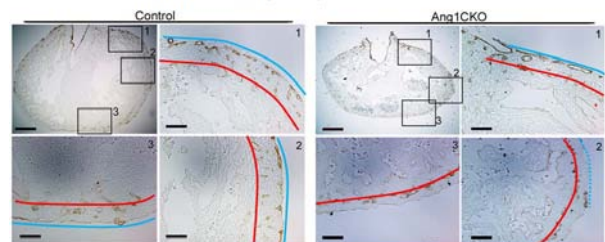


図5 CD31ホルマウントIHC

これらのサンプルを切片化して検討すると、興味深いことに2層の CD31 陽性冠血管の外側の冠静脈と

考えられる血管が Ang1CKO マウスでは特異的に欠損していることが明らかとなった (図 6 青矢印部分)。一方、内側の CD31 陽性血管は冠動脈と考えられたため、インクを用いた冠動脈造影実験を行ったが、冠動脈の形成に野生型と Ang1CKO マウスの間で差は見られなかった。以上より、心筋から分泌される Ang1 は冠血管形成、特に冠静脈の形成に必須の役割を担うことが示唆された。

図6 Section IHC: CD31(E14.0)



次に静脈内皮特異的に *lacZ* 遺伝子を発現する *EphB4-lacZ* ノックインマウスと Ang1CKO マウスとを交配して、X-gal 染色により静脈の有無を検討した。興味深いこ

とに、心外膜直下の LacZ 陽性血管が野生型 (control) では見られるが、Ang1CKO マウスでは欠損すること (図 7; 矢頭部分が心外膜直下の冠静脈に相当。RA, RV の心内膜部分でも EphB4 は発現する。) を見出した。

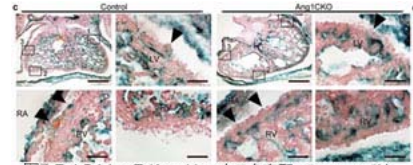


図 7 EphB4-LacZ-Knockinマウスを交配。Controlでは青色(LacZ)陽性静脈(矢頭)があるがAng1CKOではない

#### 4. 考察とまとめ

Ang1 conventional ノックアウト (Ang1KO) マウスの解析から、Ang1 は内皮細胞に主に発現するその受容体 Tie2 との結合を介して新生血管の成熟安定化に関わるほか、胎生期の肉柱形成に必須の機能を持つと報告されていた (Suri et al., 1996)。

我々は独自に Ang1<sup>flox</sup> マウスを作成して心筋特異的 Ang1 欠損 (Ang1CKO) マウスを作製・解析して、上述の如く新たに Ang1 は発生期の心臓で冠静脈形成に必須であることを明らかにした。これまで静脈形成を促進する増殖因子シグナルは全く同定されておらず、Ang1 が静脈分化とそのネットワーク形成に必須だという概念は非常に独創性に富む成果である (Arita, Nakaoka et al. 投稿中)。

これまで血管新生療法を実験的に行う場合に、VEGF に加えて Ang1 と同時投与することで虚血性疾患の治療を行うと、VEGF 単独治療よりも良好な成績が得られるとされており、主にその効果は Ang1 の血管成熟化作用によると考えられていた (Tao et al., 2011)。単純に血管透過性を調整することで VEGF の作用を緩衝するだけでなく、Ang1 は成体の臓器特異的な動・静脈特異化においても重要な役割を担うことも想像される。よって、今後は胎生期のみならず成体での血管新生時の動静脈特異化でどのような役割を果たすかを明らかにする必要があると考える。

#### 5. 参考文献

- Nakaoka, Y., Nishida, K., Narimatsu, M., Kamiya, A., Minami, T., Sawa, H., Okawa, K., Fujio, Y., Koyama, T., Maeda, M., *et al.* (2007). Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling. *The Journal of clinical investigation* *117*, 1771-1781.
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I. L., and Krasnow, M. A. (2010). Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* *464*, 549-553.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* *87*, 1171-1180.
- Tao, Z., Chen, B., Tan, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhu, T., Cao, K., Yang, Z., Kan, Y.W., and Su, H. (2011). Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 2064-2069.