The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart
Author(s)	有田, 陽
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/50486
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	有田　陽
論文題名 Title	Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. （心筋由来のアンジオポイエチン1は心臓発生における冠静脈形成に必須である）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

生活習慣の欧米化により本邦でも虚血性心疾患は増加傾向で、特に心不全を合併する心筋梗塞症例が増加している。その予後を改善するには、梗塞後の冠血管新生を効率的に進める新規治療法の開発が必要で、そのためには冠血管の形成過程とその制御機構の詳細な解明が必要である。アンジオポイエチン1(Ang1)は増殖因子の１つで心筋細胞、壁細胞などから分泌され、血管成熟化と心臓形成に必須であることが知られる。冠血管内皮の発生起源の１つとされる静脈洞(Sinus venosus)から心臓内へ冠内皮細胞を遊走・形成させる分子機構はこれまで不明であった。そこで我々は心筋から分泌されるAng1の冠血管形成における役割を解明して、冠動脈・冠静脈の特異化に焦点をあてた新規の冠血管新生治療法の開発に道を拓くことを目的として研究を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

*Ang1flox*マウスを作製し、*α-MHC-Cre*トランスジェニック（*TG*）マウスと交配して、心筋特異的Ang1欠損(*Ang1*$^{flox/flox}$*α-MHC-Cre-TG*; Ang1CKO)マウスを作製した。Ang1CKOマウスはE12.5～E14.5で胎生致死を呈した。Ang1CKOマウスは内皮細胞マーカーのCD31で免疫染色を行うと、胎生期心臓で見られる2層の冠血管のうち心臓表面直下を走行するCD31陽性内皮が欠損して、心筋層内のCD31陽性内皮は野生型と同様に検出された。その欠損するCD31陽性血管内皮が動脈・静脈内皮の何れかを明らかにするため、静脈マーカーのEphB4陽性細胞でlacZを発現する*EphB4-taulacZ*ノックインマウスと交配したところEphB4陽性冠静脈がAng1CKOマウスでは欠損していた。もう一つの静脈マーカーのAPJで免疫染色を行うとAPJ陽性冠静脈がAng1CKOマウスでは欠損していた。逆に動脈マーカーであるEphrinB2陽性細胞でlacZを発現する*EphrinB2-taulacZ*ノックインマウスと交配したところ、EphrinB2陽性冠動脈内皮は野生型と同様に検出されて異常はなかった。また冠血管造影でも両者に差はなかった。Ang1CKOマウスで欠損する冠静脈の起源を検討するために、Organ culture実験を行った。E10.5で静脈洞+心房を*Tie2-lacZ*ノックインマウスから取り出し、一方で同じE10.5の野生型あるいはAng1CKOマウスの心室+心外膜を取り出して接着させてから3日間器官培養すると、野生型の心室にはTie2陽性内皮細胞が進入していたが、Ang1CKOマウス心室にはその進入は見られなかった。静脈洞は胎生期のみに認められ、下大静脈と右心房の間にある管腔状の血管組織であるが、従来は分化した静脈内皮細胞のみで構成されると考えられていたがAPJに着目すると、静脈洞内皮はコントロール（野生型）でもAng1CKOマウスでも両者ともにAPJ陽性細胞とAPJ陰性細胞の不均一な細胞集団で構成されることが判明した。また、冠静脈の遊走過程で常にAPJ陰性細胞が先行して心房、心室内に進入することが明らかとなった。さらに、心室内に進入した血管内皮細胞の増殖能を抗リン酸化ヒストンH3抗体(pHH3)の免疫染色により検討すると、コントロールに比してAng1CKOでは低下していた。以上より、Ang1が静脈分化、未分化内皮の遊走に関与することが予想されたため、未分化なES細胞由来Flk1陽性内皮前駆細胞による実験を行った。この細胞はVEGFとcAMP添加で動脈内皮化することが知られるが、この条件にAng1を添加すると、動脈化は抑制され逆に静脈化に関与する転写因子COUP-TFII, APJの発現が誘導された。

〔総　括(Conclusion)〕

Ang1CKOマウスは冠静脈の形成不全を認めるが冠動脈は形成されていた。また静脈洞には未分化な血管内皮細胞が存在し、心室のAng1は静脈洞より未分化な血管内皮細胞を心室内に遊走させ増殖を促しさらには静脈化を促進させることが明らかになった。以上より心筋由来のAng1は心臓発生における冠静脈形成に必須の因子であることが明らかになった。この研究から、冠静脈と冠動脈のそれぞれの形成過程でのAng1の役割が詳細に解明され、将来にはAng1経路の制御による心筋梗塞後の冠血管新生療法の開発への発展も期待できる。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　有田　陽

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副　査	大阪大学教授	高島 成二
	副　査	大阪大学教授	熊ノ郷 淳

論文審査の結果の要旨

冠血管新生を効率的に進める新規治療法の開発には冠血管の形成過程とその制御機構の解明が必要である。これまで冠動脈については、心筋細胞が分泌する血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF）の作用により心内膜内皮が発芽して形成されることは報告されていたが、冠静脈形成のメカニズムは明らかではなかった。今回、申請者らは心筋細胞が分泌する血管新生因子の１つであるangiopoietin-1(Ang1)を、心筋特異的に欠損するマウスを作成したところ、このマウスの冠動脈の形成は正常で、冠静脈が特異的に欠損して胎生致死であることを見出した。さらに、冠血管内細胞のひとつの起源と知られている胎生期のマウスの心臓に隣接する静脈洞(Sinus venosus)には静脈として分化した内皮細胞のみが存在すると考えられていたが、申請者らは静脈洞には分化した静脈内皮細胞と未分化内皮細胞の２種類の細胞が存在していることを見出した。またさらに、特に静脈洞の未分化内皮細胞がAng1の作用で心房・心室へ進入・遊走し、心筋の分泌するAng1の作用で静脈内皮に分化・増殖することで冠静脈が形成されることを胎生期のマウスの心臓の器官培養実験およびマウスES細胞由来未分化血管内皮前駆細胞を用いた分化誘導実験により明らかにした。このことから、胎生期の心臓では冠静脈は冠動脈と全く異なる起源とメカニズムで形成されることが初めて明らかとなった。

これまで既に解明されていた胎生期の心臓での冠動脈の形成メカニズムに加えて、本研究により冠静脈の形成メカニズムが明らかとなったことで、今後、これらのメカニズムを応用することにより成体の虚血性心疾患に対する新しい血管新生療法の開発に繋がることが期待される。本研究成果の医学・医療における社会的意義は大きく学位の授与に値すると考えられる。