

海馬ニューロン由来 VEGF が誘導する血管網が神経系の発達と維持に果たす役割

岡部圭介^{1,2)}, 田井育江¹⁾, 久保田義顕¹⁾

1) 慶應義塾大学 医学部 解剖学

2) 慶應義塾大学 医学部 形成外科学

【研究の背景】

脳は活動に伴って全身の約 4 分の 1 ものエネルギーを消費し、またエネルギーの蓄積ができないため、多くの血流を必要とする組織である。脳血管の異常は容易に脳組織の損傷につながるため、脳血管系の発達および維持は精緻なメカニズムによる制御を受けている。過去の研究から、ニューロンやアストロサイトより分泌される Vascular endothelial growth factor (以下、VEGF) が、脳血管の発生においてその中心的役割を担う分子の一つであることが示唆されているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。hGfap-Cre マウスは、網膜組織においてアストロサイト特異的なコンディショナルノックアウトマウスとして用いられることが多い^{1,2)} が、今回本マウスの脳を観察したところ、Cre がアストロサイトではなく特定のニューロンに限定して発現することを見出した。本マウスを用いてニューロン特異的に VEGF を欠損させることにより、これまで不明であった生体内におけるニューロン由来 VEGF の役割について新規の知見が得られると考えられた。

【目 的】

本研究では、遺伝子改変マウスの表現型解析を通して、生体内においてニューロン由来の VEGF が如何にして中枢神経系の発生および恒常性維持に寄与するのかについて検討するために実験を行った。

【方 法】

これまでに樹立した各種マウス、および今回新たに樹立した遺伝子改変マウスを用いて実験を行った。脳切片の作成においては、冷却した PBS でマウスを環流後に PFA で固定、凍結して 50 μ m の厚さで切片を作成した。免疫染色は各種抗体と反応後、共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus 社) で観察した。

【結 果】

① hGfap-Cre による VEGF コンディショナルノックアウトマウスの表現型:

hGfap-Cre による VEGF コンディショナルノックアウトマウス (*hGfap-Cre⁺Vegfa^{flax/flax}* マウス) を解析したところ、生後 2 週目ごろから対照群と比較して有意に体重が少なく、また同時期よりふらつき、四肢の麻痺などの神経症状を呈した。さらに生後 4 週目ごろになると神経症状が増悪し、生後 1 か月程度でほぼ全例が死に至ることが分かった。

② hGfap-Cre による VEGF コンディショナルノックアウトマウスの脳組織所見:

上記の表現型から脳の異常が示唆されたため、脳の組織学的解析を行った。コンディショナルノックアウトマウスの脳は、対照と比較して明らかに矮小であり、特に海馬と頭頂葉は痕跡的であった。同部においては NeuN 陽性のニューロンの配列が不整で、また CD31 陽性の血管内皮は明らかに低形成で疎らであった。

③ hGfap-Cre の発現:

hGfap-Cre の発現部位を明らかにするべく、その indicator マウス (*hGfap-Cre⁺CAG-LSL-GFP* マウス) を用いて組織学的

解析を行ったところ、その発現は萎縮の著明であった海馬および頭頂葉のニューロンに限定していることが分かった。以上から、*hGfap-Cre⁺Vegfa^{flox/flox}* マウスは、海馬および頭頂葉の特定のニューロン(アストロサイトではなく)由来の VEGF を欠くマウスであることが明らかとなった。

④ VEGF 受容体の発現部位:

次に、VEGF 受容体の発現部位を調べるべく、*Vegfr2-BAC-GFP⁺Vegfr1-BAC-DsRed⁺* マウス^{3,4)} の脳を組織学的に観察したところ、VEGF 受容体-1、VEGF 受容体-2 いずれも CD31 陽性の血管内皮細胞に限局しており、ニューロンやアストロサイトでの発現は全く認められなかった。

⑤ ニューロンにおける VEGF 受容体は不可欠か:

過去の研究では、ニューロン由来の VEGF は、ニューロン自身に発現する VEGF 受容体を介して autocrine や paracrine の様式で神経栄養的に作用すると報告されている。そこで、上記 Cre line を用いて、海馬および頭頂葉のニューロン由来の VEGF 受容体を欠損するダブルコンディショナルノックアウトマウス(*hGfap-Cre⁺Vegfr1^{flox/flox}Vegfr2^{flox/flox}* マウス)を作成し解析した。しかし、その生存率、体重、神経学的所見、組織学的所見は正常であり、明らかな異常を認めなかった。

【考 察】

脳全体におけるニューロン由来の VEGF が欠損すると神経系の発達が著しく障害され、マウスでは新生仔期に死亡することが知られているが⁵⁾、そのメカニズムについては不明な点が多い。生体外培養系では VEGF が神経栄養因子としてはたらく、ニューロンの成熟を促す作用が知られているため、生体内でも同様に直接神経に作用するものと想定されていた。しかし、本研究結果からは、ニューロン由来の VEGF は神経自体に作用することなく、血管内皮に存在する VEGF 受容体に作用して血管ネットワークの形成を促し、二次的に神経系の発生に寄与することが示された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

中枢神経系の発達においては、ニューロン由来の VEGF が血管形成および神経系組織の形成に不可欠であることが示された。臨床的にも、発生段階の脳においては VEGF による血管形成・血管新生を阻害するような病態、薬剤の使用などは、中枢神経系の発達および維持に重大な障害をもたらすことが唆される。また、脳梗塞や虚血再灌流障害のモデルを本研究で用いたマウスに適用することによって、脳梗塞治療に関する有益な情報が得られる可能性があると考えられる。

【参考・引用文献】

1. Scott, A., Powner, M.B., Gandhi, P., Clarkin, C., Gutmann, D.H., Johnson, R.S., Ferrara, N. and Fruttiger, M. (2010). Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature. *PLoS One* 5, e11863.
2. Weidemann, A., Krohne, T.U., Aguilar, E., Kurihara, T., Takeda, N., Dorrell, M.I., Simon, M.C., Haase, V.H., Friedlander, M. and Johnson, R.S. (2010). Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *Glia* 58, 1177-85.
3. Ishitobi, H., Matsumoto, K., Azami, T., Itoh, F., Itoh, S., Takahashi, S. and Ema, M. (2010). Flk1-GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp. Anim.* 59, 615-22.
4. Okabe, K., Kobayashi, S., Yamada, T., Kurihara, T., Tai-Nagara, I., Miyamoto, T., Mukoyama, Y.S., Sato, T.N., Suda, T., Ema, M. and Kubota, Y. (2014). Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* 159, 584-96.
5. Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquerol, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., Wagner, E.F., Betsholtz, C. and Nagy, A. (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* 262, 225-41.