

(第3号様式)

学 位 論 文 要 旨

氏 名 浪口謙治

論 文 名

心臓細動脈由来の筋線維芽細胞は心臓癒着形成を促進する

学位論文要旨

目的:心臓手術後は心臓と心膜に癒着が起こるため、心臓再手術時の心嚢内癒着剥離は、心筋組織損傷や出血などのリスクを伴う。心臓手術件数の増加とともに心臓再手術症例が増加し、術後心嚢内癒着は臨床上的重要な問題である。そのため、人工心膜シートや癒着防止剤を用いた癒着予防法の開発が進められてきた。しかし、現行手法の効果は限定的であり、心嚢内癒着の分子メカニズムの解明とその制御法の開発は今なお課題となっている。最近我々は、心臓手術後に起こるヒト心嚢内癒着を模倣したモデルマウスを樹立した。本研究では、このモデルマウスを用いて、これまで全く明らかにされてこなかった心嚢内癒着形成過程を経時的に可視化し、分子から細胞・組織レベルでのメカニズムを解き明かすことを目的とした。

方法:全ての動物実験は愛媛大学動物実験倫理委員会の承認のもとで行なった(承認番号 05-RO-7-1, 05-RO-4)。遺伝子組換え生物の使用に際しては、遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行なった(M18-1)。C57BL/6 (B6) マウスに対して、全身麻酔下で開腹後、タルク溶液 (2.5 mg / g) 300 μ L を横隔膜面より心嚢腔に注入することで心臓癒着形成を誘導した。癒着強度は、容易に剥離可能な場合を **Grade 1**、部分的に剥離可能な場合を **Grade 2**、全体的に剥離困難である場合を **Grade 3** として定量評価した。癒着誘導直後から7日目までの各タイムポイントにおいて、胸郭を採取・固定し、矢状断組織標本作製した。組織構造についてはヘマトキシリンエオジン染色 (HE 染色)、膠原線維についてはマッソントリクローム染色 (MT 染色) にて可視化した。また、細胞レベルでの経時変化を明らかにするため、各種細胞特異的に発現するマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。さらに、癒着形成前後における血管内皮細胞の局在変化を追跡するため、タモキシフェンを投与した Rosa26EGFP; Cdh5-cre/ERT2 マウスを用いた。癒着形成過程における遺伝子発現変化は、次世代シーケンサーMiSeqを用いた RNA-Seq にて解析した。

結果: HE 染色の結果、癒着誘導4日目において心嚢腔に多数の細胞浸潤を認めた。それらの細胞周囲には MT 染色にて青色で着色される膠原線維の産生が認められ、

氏名 浪口謙治

その後 7 日目にかけて有意に増加した。この組織学的変化は、癒着スコアの増加と完全に相関していたことから、本マウスモデルにおいて強固な癒着形成に伴う線維化が起こるタイムポイントは 4 日目であることが分かった。一方、4 日目以前では、心外膜損傷（誘導 3 時間目）、赤血球の血管外漏出（誘導 1 日目）好中球の集積（誘導 2 日目）、などの急性炎症や出血に関する多段階病態変化が観察された。次に、線維化の鍵となる α smooth muscle actin (α SMA)陽性筋線維芽細胞に焦点を当て、癒着形成過程における局在変化を観察したところ、誘導 4 日目以降において心臓組織内の細動脈を構成する平滑筋細胞が心嚢内へと遊走する様子が観察され、その細胞数は 7 日目にかけて有意に増加した。この時、心臓細動脈は、筋線維芽細胞に被覆され、血流を維持した状態で心嚢内に伸長しており、このような現象はヒト心臓癒着組織でも同様に認められた。その後、血管平滑筋細胞は癒着組織中では血管から逸脱し、無秩序に遊走していた。緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識された血管内皮細胞の追跡実験から、癒着誘導前後で GFP と α SMA の共発現を認めなかったことから、血管内皮細胞は筋線維芽細胞と独立して心嚢内へ遊走することが分かった。さらに、RNA-Seq データを基にしたシグナルパスウェイ解析の結果、癒着誘導過程の心臓組織では、細胞増殖、サイトカイン、タンパク質分解シグナルに関わる遺伝子群の濃縮が認められた。そこで、細胞増殖マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体を用いた免疫組織化学染色を実施したところ、心臓細動脈を構成する血管平滑筋細胞では増殖が認められなかったものの、心臓から癒着組織へと伸長する血管および癒着組織内で無秩序に遊走する筋線維芽細胞において、多数の PCNA 陽性細胞が認められた。また、血管新生誘導前の癒着誘導 2 日目では、損傷した心外膜周囲に多数の matrix metalloproteinase-9 陽性の好中球が集積しており、心嚢内で起こる心臓細動脈由来の血管新生の誘導や組織リモデリングに重要な役割を担うことが示唆された。

結論：心臓細動脈由来の血管平滑筋細胞が、心嚢腔へリクルートされ、心嚢内で増殖および膠原線維産生を起こすことで癒着形成を促進させることが示唆された。

キーワード（3～5）	血管新生
	マウスモデル
	心嚢内癒着
	線維化