

## 学位論文審査結果の要旨

氏 名	浪 口 謙 治
審 査 委 員	主査 北澤 莊平 副査 池田 俊太郎 副査 岩波 純 副査 中城 公一 副査 亀井 義明

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

### 審査結果の要旨

#### 【背景と目的】

心臓手術後に生じる心臓と心膜との癒着は、心臓再手術時の心嚢内癒着剥離に際して、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、術後心嚢内癒着の分子メカニズムの解明とその制御法の開発が緊急の課題となっている。申請者等の研究室では、心臓手術後に起こるヒト心嚢内癒着を模倣するモデルマウスの樹立に成功しており、本研究は、このモデルマウスを用いて、これまで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、そのメカニズムを解き明かすことを目的としている。

#### 【材料と方法】

C57BL/6 (B6)マウスに対して、全身麻酔下で開腹後、タルク溶液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 **Grade1**、部分的に剥離可能な場合を **Grade2**、全体的に剥離困難である場合を **Grade3** 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、胸郭矢状断組織標本を作製した。組織構造についてはヘマトキシリンエオジン染色、膠原線維についてはマッソントリクローム染色にて可視化した。各種細胞時異的に免疫組織化学染色を実施し、細胞レベルでの経時的变化を観察した。血管内皮細胞の局在を追跡するため、**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、RNA-Seqにて包括的に解析した。これら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-R0-7-1, 05-R0-4）。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）。

#### 【結果と考察】

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、その周囲に膠原線維の産生が認められ、7 日目にかけてこれらは有意に増加した。癒着形成過程における  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$  SMA) 陽性筋線維芽細胞局在を観察したところ、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の血管から逸脱し、無秩序に遊走していた。血管内皮細胞の追跡実験では、GFP と  $\alpha$  SMA の共発現を認めず、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明らかとなった。RNA-Seq による解析の結果、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。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用いた免疫組織化学染色では、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。

公開審査会は、令和 3 年 8 月 2 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の様な質問がなされた。

1) 心嚢腔癒着モデルマウスの詳細、2) 筋線維芽細胞マーカーの詳細、3) 臨床応用への展望、4) モデルマウスとヒト術後癒着との相違点、5) TGF- $\alpha$  smad 系の関与の可能性について、6) 今回得られた結果が、他の肉芽形成癒着と異なり、心嚢癒着に特異的なところはどのような点であったのか等について質問がなされた。

申請者は、これらの質問に対して適切に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。