

学位論文審査結果の要旨

氏名	中尾 恭久
審査委員	主査 泉谷 裕則 副査 茂木 正樹 副査 高田 秀実 副査 越智 博文 副査 松原 裕子

論文名 0リングを用いた横行大動脈縮窄 (OTAC) 圧負荷心肥大・心不全マウスモデルの開発

審査結果の要旨

【研究内容のまとめ】左室肥大は、慢性的な全身性高血圧に対応して起こり、高血圧の独立した危険因子である。慢性的な左室後負荷の上昇は、心不全の主要な原因の一つであり、高い罹患率と死亡率に関連している。したがって、心肥大に関する研究は、有害な心血管イベントを予防するために不可欠である。マウスの横行大動脈縮窄 (TAC) は、心臓圧負荷モデルとして広く用いられ、過去 20 年間心不全と心肥大のメカニズムを理解するための優れた実験法として用いられてきた。しかし、従来の縫合糸を用いた TAC は、手技の難しさから術者に大きく依存し、その手技の習得に膨大な時間を必要とし、しかも大動脈縮窄の程度が不安定であった。そのため、マウスを用いた心肥大を生じさせる簡便なモデルが求められていた。そこで本研究では、マウスの左室肥大と心不全を引き起こす心臓の圧負荷を生じるリングによる横行大動脈縮窄 (OTAC) 法の開発を目的とした。

雄の 9~10 週齢 (26.0±0.5g) C7BL/6J マウスを、偽手術 (Sham) 群、内径 0.50mm 0リング (OTAC0.50) または内径 0.45mm 0リング (OTAC0.45) による 2つの OTAC 手術群にランダムに割り付け、OTAC 手術を行った。処置後、4 週間および 8 週間までマウスの観察を行った。OTAC 処置を受けたマウスは、処置後早期 (48 時間後) に 6 群 (Sham、OTAC0.50、OTAC0.45 を 4 週間または 8 週間追跡) 各 14 匹 (合計 n=84) とした。マウスは、メドトミジン、ミダソラム、ブトルファノールの混合物を腹腔内投与して麻酔した。従来の TAC モデルと異なり、気管内挿管を施行せず手技を行った。胸骨近位部に 2~3mm の縦切開による胸骨切開を行い、大胸筋を

鈍的に剥離した。胸腺を左右に分けた避けた後、胸腺の後方に位置する横行大動脈を確認した。手技の再現性の向上のために、大動脈の直径を変える脂肪組織はできるだけ丁寧に剥離した。0リングを横行大動脈（腕頭動脈と左総頸動脈の間）に装着し、糸で固定した。切開部は6-0絹糸を用いて層を縫合した。Sham マウスは、0リングを挿入せずに同様の操作を行った。そして、心機能や心筋性状を心再コー図検査、組織重量の計測、組織学的解析、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）により遺伝子発現を検出し評価を行った。この動物実験は、愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。

Sham、OTAC0.50、OTAC0.45 の平均手術時間（開胸から閉胸まで）はそれぞれ 8.2 ± 0.3 分、 17.3 ± 0.5 分、 17.9 ± 0.6 分だった。また、麻酔から胸部閉鎖までの処置中の Sham、OTAC0.50、OTAC0.45 マウスの死亡率はそれぞれ 0% (0/28)、9.7% (3/31)、12.5% (4/32) であった。周術期死亡を除いた Sham 群および OTAC 手術群の Kaplan-Meier 生存曲線を解析では、OTAC0.45 群の死亡率は Sham 群および OTAC0.50 群と比較し有意に高かった。この遠隔期での推定死因は、左室収縮機能の低下とそれに伴う心不全と考えられた。OTAC による圧負荷は、全心臓の重量増加および左室重量/脛骨長の増加で表される左室肥大を促進することが示された。術後4週目の左室重量/脛骨長比は、Sham マウスと比較し OTAC0.50 では平均 1.4 倍、OTAC0.45 では 1.5 倍に有意に増加した。さらに、術後8週日には、OTAC 手術群の左室重量/脛骨長比は、Sham マウスと比較し、OTAC0.50 では平均 1.8 倍、OTAC0.45 では平均 2.1 倍と有意な増加を示した。さらに、OTAC による圧負荷は、肺重量の増加、すなわち心不全による肺うっ血を誘導した。心臓超音波法による心機能の生理学的評価では、術後1~8週で Sham 群と比較し、OTAC 両群で左室内径短縮率が低下していた。組織学的解析による評価では、心筋細胞の短軸長及び心筋細胞横断面積が、OTAC 両群で Sham 群よりも有意に増大していた。ピクロシリウスレッド染色で評価した左室の線維化は、Sham 群と比較して OTAC 両群で有意に増加していた。OTAC 群の左室における心不全、心肥大、および線維化のマーカーの遺伝子発現レベルを qRT-PCR 検査で測定した。Nppa、Nppb、Acta1、Colla1、Col3a1 の mRNA 発現量は両 OTAC 群で Sham 群と比較し有意に高かった。これらの結果は、組織学的所見との一貫性を示した。

本研究により、簡便で効率的かつ再現性の高い新規心肥大・心不全マウスモデルが開発された。このモデルは、心不全や心肥大マウスモデル作成のための手技習得時間の節約、手技簡略化に加え心肥大・心不全発症に関しての高い再現性を兼ね備えた病態モデルであり、今後の心肥大・心不全研究に多大な貢献をもたらすことが期待される。

【審査会のまとめ】

公開審査会は、令和5年1月27日に開催された。申請者は、研究発表を英語で明確に行い、本研究の背景や意義、limitation や今後の展望などについて述べた。発表後に審査委員らから以下の質疑があった。1) 従来法から本法への開発に至った経緯、2) Sham 群のコントロールとしての意義、3) 術後急性期に死亡したマウスの死因等の解析結果、4) 0リング除去の試みやその結果、5) 血管壁や組織の変化、6) 心不全の有無による検討、7) 心不全を発症する以前の急性期の遺伝子発現の検討、7) 今後の研究の課題や具体的な研究計画などについての質問がなされ、申請者はこれらに対して的確に応答した。

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。