

令和 5年 1月

上栴仁志 学位論文審査要旨

主査 初 沢 清 隆
副主査 竹 内 隆
同 難 波 範 行

主論文

Cryo-injury procedure-induced cardiac regeneration shows unique gene expression profiles in the newt *Pleurodeles waltl*

(凍結損傷によって引き起こされるイペリアトゲイモリの心臓再生過程にみられる特徴的な遺伝子発現の解析)

(著者：上栴仁志、生田裕美、井川武、鈴木誠、客野瑞月、岩田唯、田澤一朗、荻野肇、佐藤幸夫、竹内隆、難波範行、林利憲)

令和4年 Developmental Dynamics 251巻 864～876頁

参考論文

1. 当院における川崎病患者に対する3rd line治療としてのステロイドパルス療法の有効性の検討

(著者：上栴仁志、坂田晋史、上田善之、清水敬太、山崎隼太郎、美野陽一、難波範行)

令和3年 鳥取医学雑誌 49巻 20頁～24頁

学位論文要約

Cryo-injury procedure-induced cardiac regeneration shows unique gene expression profiles in the newt *Pleurodeles waltl*

(凍結損傷によって引き起こされるイベリアトゲイモリの心臓再生過程にみられる特徴的な遺伝子発現の解析)

哺乳類の心臓は基本的に再生能力を持たない。しかし、イモリやゼブラフィッシュなど一部の脊椎動物は、心臓を再生させる能力をもつ。動物種間における再生能力の違いを理解するためには、マウス、ゼブラフィッシュ、イモリなどの動物で比較研究を行う必要がある。心臓の凍結損傷はヒト心筋梗塞の病態の実験モデルとして適しており、マウスやゼブラフィッシュでは心臓凍結損傷は一般的な実験モデルとなっている。一方、これまでイモリでは心臓の凍結損傷モデルは確立されてこなかった。そこで本研究では、イベリアトゲイモリの心室に凍結損傷を与えて、その後の再生を誘発する方法を開発した。次に、凍結損傷後の心臓再生の過程を解析した。さらにこれまでにイモリで広く行われてきた心室切除モデルと凍結損傷モデルにおいて、心室損傷後の遺伝子発現のパターンをRNAシーケンスによって解析した。

方法

成体のイベリアトゲイモリに対して、麻酔をした後に心臓を露出させ、液体窒素で冷却したプローブを接触させて凍結損傷を行った。心室切断の場合は、心室の遠位部分を1/3程度切除した。傷口を縫合した後、各観察時期になるまで飼育を行い、心臓の観察および摘出、標本作成を行った。コントロールとしては非手術の個体を用いて比較を行った。形態学的・組織学的な評価としてH-E染色および、Micro CTによる解析を行った。凍結損傷後の心筋組織における細胞増殖パターンを理解するために、S期の細胞を5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) で標識したのち、クリック反応によるEdUの検出と免疫染色を行った。さらに、心室試料から抽出したRNAに対して、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析を行った。

結果

心室凍結モデルでは、処置後にイモリの異常行動は確認されず、生存率は術後1週間で

99%であった。凍結損傷後の心室は胸側の半分以上が変性していた。凍結損傷領域は処置後2週間までは大きな変化は認められなかったが、処置後4週間から損傷領域が縮小しはじめ、最終的に小さな瘢痕が残った。損傷領域の縮小後は、心室の収縮も良好で機能の回復が示唆された。組織像の観察からは、処置後1週間では損傷領域の心筋組織は抗心臓アクチン抗体による免疫組織学的染色によって染色されなかったことから、心筋組織の変性（壊死）が心室内腔に達していたこと確認できた。処置後4週間以降は、損傷部位の壁の厚さが増しており、領域の周辺部位から正常心筋組織の回復を認めた。処置後8週ではさらに心筋組織の回復を認め、瘢痕が縮小していた。心筋細胞の増殖を示すEdU陽性の心筋細胞は主に損傷部の周辺で検出された。コントロールでは少数しか増殖心筋細胞は観察されなかったが、凍結損傷後では処置後1～4週間の間に損傷部周辺での心筋細胞の増殖が確認された。遺伝子発現パターンの比較からは、凍結損傷後には1881の、心室切除後には4625の転写産物で発現量の変化が確認された。このうち1656の転写産物が、心室切断モデルと凍結損傷モデルで共通に変化していた。さらに、2つのモデルで2倍以上の変化を示した1656の転写産物に対して、遺伝子オントロジー(GO)分析を実施した結果、創傷治癒、細胞分裂、筋肉増、免疫系に関連する遺伝子が多く検出された。

考 察

心室凍結損傷モデルは処置に伴う出血がほとんどなく、処置後の高い生存率からも、心室切断モデルに比べて動物への侵襲が少ないと考えられる。また、心室切除後と同様に、心筋細胞の増殖を伴う回復が見られたことから、心臓再生モデルとして適していると考えられる。凍結損傷モデルと心室切断モデルでは、回復過程で発現する遺伝子が異なることを示したが、両方のモデルで共通して発現レベルが変化した遺伝子は、再生の調節に関与している可能性が高いと言える。今回、心臓再生の形態的な変化はmicro CTによる組織像の観察により行われたが、機能の評価には適しておらず、今後心エコー検査などを組み合わせることでより詳細な解析が行われることを期待する。

結 論

本研究において確立したイベリアトゲイモリにおける心室凍結損傷モデルは、マウスをはじめとする他の心臓再生モデルとの比較解析が可能であり、有用な実験系と言える。これを用いて心臓再生のメカニズムを解明することが期待される。