

博士（工 学） 齊 藤 直

学 位 論 文 題 名

心筋梗塞後のリモデリング心におけるアポトーシスの
発現動態およびその抑制による
心血管系動態変化に関する研究

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

心筋梗塞が起こると梗塞部位の心筋細胞壊死による心機能低下を補うために、心筋細胞肥大や心室壁の菲薄化、心室拡大などを特徴とする心室リモデリングが生じることが知られている。さらに、これまでの研究において、心室リモデリング時に心筋細胞でアポトーシスが起こる可能性が示唆されてきた。しかしながら、心室リモデリングとアポトーシス発現の連関についての詳細は完全には解明されていない。アポトーシスは様々なシグナル伝達因子によって制御されて細胞死へと至るため、薬品投与などにより人為的にある程度制御することができる。したがって、心室リモデリング時におけるアポトーシスの発現動態やその役割を解明することは、リモデリング心に対する治療や病状悪化の抑止という点で大いなる貢献が期待できる。本研究は、心室リモデリング時に慢性的な心筋細胞アポトーシスが存在し、それが心室リモデリングさらには心機能に多大な影響を及ぼしている可能性があるという説を基にして、心室リモデリング時におけるアポトーシス発現動態の解明およびアポトーシスと心血管系動態との連関の解明を行なったものである。

第1章では臨床的なデータを示しながら本研究を行なった目的を述べている。第2章では、本研究の基礎を成す虚血性心疾患、心室リモデリング、アポトーシスの発生メカニズムや特徴などに言及し、さらに、心室リモデリング時におけるアポトーシスと心機能に関して最近行なわれている研究を紹介して、本研究における現在の研究背景を明らかにしている。

第3章では、本研究の実験モデルとして用いたラット心筋梗塞モデルの作製手順を紹介し、心筋梗塞モデル作製手技における注意点などを著者の観点から述べている。また、本研究における心筋梗塞モデルが心室リモデリングを誘発しているか否かを確かめた実験結果を述べている。心室リモデリングの確認は心重量の変化と形態学的解析によって求めた。この実験により、心肥大、心室壁の菲薄化および心室拡大という心室リモデリングの特徴を示す結果が得られ、本研究における心筋梗塞モデルが心室リモデリングを誘発することが確認された。

第4章では、本研究のリモデリング心におけるアポトーシス発現動態の解析について述べている。アポトーシスの発現動態解析には、アポトーシスの特徴の一つである核DNAの規則的な断片化を検出するTUNEL染色法と、アポトーシスを実行するシグナル伝達因子である活性化Caspase-3を検出する免疫染色法を用いた。また、アポトーシスに陥った細胞が心筋細胞であるか否かを確認するために、細胞の各組織を異色染色するMasson-Goldner染色を行なった。その結果より、心室リモデリング時にアポトーシスが梗塞領域と梗塞境界領域に発現して心筋細胞を死滅させ、左心室壁の菲薄化、左心室の拡大を促進して心室リモデリングを進めている可能性が示唆された。

第5章では、アポトーシスシグナル伝達因子活性を阻害することにより心室リモデリング時のアポトーシスを抑制し、それが臨床的に重要なパラメータである心血管系動態にどのような影響を及ぼすかを時系列的に解析した結果について述べている。対象としたアポトーシスシグナル伝達因子はCaspase-3とCalpainであり、各々の活性阻害剤を投与することによる心血管系機能への影響を

解析した。阻害剤投与は冠動脈結紮直後に行ない、経時的に心拍数、血圧、および血流速度を非侵襲的に測定して比較検討した。その結果、阻害剤を投与しなかったグループは、血圧は低いまま、心拍数は高いまま結紮手術後 14 日目まで維持されていたが、阻害剤を投与したグループは、血圧、心拍数ともに結紮手術後 4 日目～7 日目付近から冠動脈結紮を行なっていない Sham グループの値まで回復する傾向が認められた。これらの結果より、Caspase-3 あるいは Calpain の活性阻害剤投与によって心血管系機能が改善される可能性が示唆された。

最後に、第 6 章で全章を通しての結論を述べている。

学位論文審査の要旨

主査 教授 河原剛一
副査 教授 三田村好矩
副査 教授 狩野猛
副査 教授 山本克之

学位論文題名

心筋梗塞後のリモデリング心におけるアポトーシスの 発現動態およびその抑制による 心血管系動態変化に関する研究

近年、心筋梗塞後の心室リモデリングに関する研究が盛んに行なわれており、心室リモデリング時に心筋細胞アポトーシスが起こる可能性が示唆されてきた。しかしながら、心室リモデリングとアポトーシス発現の連関についての詳細は未だ解明されていない。アポトーシスは様々なシグナル伝達因子によって制御されて細胞死へと至るため、薬品投与などにより人為的にある程度制御することができる。したがって、心室リモデリング時におけるアポトーシスの発現動態やその役割を解明することは、リモデリング心に対する治療や病態悪化の抑止という点で多大な貢献が期待できる。

本論文は、このような現状にある心筋梗塞後の心室リモデリングとアポトーシス発現の連関について、ラットによる心筋梗塞由来リモデリング心を用いて、心室リモデリング時におけるアポトーシス発現動態の解明およびアポトーシス抑制と心血管系動態変化との連関の解明を目的として実験、解析を行ない、機能的、病態生理学的意義について論じたものであり、論文は5章から構成されている。

まず、第1章では臨床的なデータを交えながら心疾患の現状を示して本研究の目的、意義を論じている。また、論文構成も記述している。

第2章では本研究の基盤となる虚血性心疾患、心室リモデリング、アポトーシスの発生メカニズムや特徴などの既存の知見を示して、本研究の背景や現状をまとめている。さらに心室リモデリング時におけるアポトーシスと心機能に関して最近行なわれている研究を紹介し、本研究の位置付けを明確にしている。

第3章では、本研究の実験モデルとして用いたラット心筋梗塞モデルについて手技・手順を詳しく紹介している。また、ラット心筋梗塞モデルに対して時系列的に心重量の変化と形態学的変化を解析し、本研究におけるラット心筋梗塞モデルが心室リモデリングを誘発することを明らかにしている。

第4章では、本研究のリモデリング心におけるアポトーシス発現動態の解析について論じている。アポトーシス発現動態を解析するために、TUNEL染色法によって核DNAの規則的断片化の検出を行ない、さらにアポトーシス実行因子でありアポトーシスシグナル伝達経路の最終共通因子とされている活性化Caspase-3を免疫染色法により検出している。その結果から、心室リモデリン

グ時に心筋細胞アポトーシスが梗塞領域と梗塞境界領域に発現して、心室壁の菲薄化、心室拡大を促進しているという新知見を得ている。

第5章では、アポトーシスシグナル伝達因子の活性を阻害することによって心室リモデリング時のアポトーシスを抑制して、このアポトーシス抑制が心血管系動態にどのような影響を及ぼすかを時系列的に解析した結果について述べている。活性を阻害する因子として Caspase-3 と Calpain を対象としている。これらの活性阻害剤を心筋梗塞開始時に投与して心拍数、血圧、血流速度を測定した結果より、心室リモデリング時におけるアポトーシス抑制によって心血管系機能が改善される可能性を示している。

最後に第6章では、本研究で得られた知見を結論としてまとめ、総括している。

これを要するに、著者は心筋梗塞後の心室リモデリングについて、心室リモデリングにおける心筋細胞アポトーシスの発現動態に関する新たな知見を得ると共に、アポトーシス抑制と心血管系動態変化との関連性を明らかにしたものであり、生体・生理工学および病態生理学の発展に対して貢献するところ大なるものがある。よって、著者は北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。