

氏 名	花 戸 貴 司
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 8 4 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	Developmental Defects of Coronary Vasculature in Rat Embryos Administered Bis-diamine (ビスダイアミン投与ラット胎仔における冠血管形成不全)
審 査 委 員	主 査 教 授 木 村 隆 英 副 査 教 授 村 上 節 副 査 教 授 宇 田 川 潤

論文内容要旨

*整理番号	388	(ふりがな) 氏名	はなと たかし 花戸 貴司
学位論文題目	<p style="text-align: center;">Developmental Defects of Coronary Vasculature in Rat Embryos Administered Bis-diamine (ビスダイアミン投与ラット胎仔における冠血管形成不全)</p>		
<p>論文要旨:</p> <p>【目的】先天性心疾患、特に円錐動脈幹の分割異常により発生するファロー四徴症などは冠動脈の異常を合併する頻度が高いことが臨床的に知られている。円錐動脈幹奇形に冠動脈の発生異常が生じる機序を明らかにするため、円錐動脈幹奇形の動物モデルである Bis-diamine 投与ラット胎仔を用い、冠動脈の発生過程について形態的、組織学的に検討した。</p> <p>【方法】10 週齢の Wister 系母ラットを用いた。膣スミアで妊娠を確認した日の正午を妊娠 0.5 日 (ED0.5) と定義した。ED10.5 に 1%アラビアゴム溶液に溶解した Bis-diamine 200mg を経口投与し、ED14.5、15.5、16.5、17.5、20.5 に全身麻酔下に胎仔を摘出した。ED20.5 の母ラット 10 匹から摘出した胎仔 52 匹を全身麻酔下に開胸した後、上行大動脈にインディアインクを注入した。注入後ただちに心臓を摘出し、拡大鏡下に心奇形の有無と種類を確認した後、インクの灌流を追跡することで冠動脈の走行を観察した。ED14.5、15.5、16.5、17.5 に、各々母ラット 4 匹から 3 匹ずつ合計 12 匹の胎仔を摘出し、カルノア溶液で固定後、パラフィン包埋し連続切片を作成、血管内皮細胞接着因子である Vascular Cell Adhesion Molecule - 1 (VCAM-1) の心臓における発現について抗 VCAM-1 抗体を用いて ABC 法により免疫組織染色を行った。未処置ラットから妊娠の同じ時期に摘出した胎仔(コントロール群)についても同様に形態的な観察と免疫組織染色を行い、両者を比較検討した。</p> <p>【結果】コントロール群では円錐動脈幹奇形及び冠動脈の異常は認めなかった。一方、Bis-diamine 投与群では 52 匹中 48 匹(92%)に心奇形を認め、そのすべてに左冠動脈の無形成あるいは低形成を認めた。組織学的検討において、コントロール群では ED15.5 に動脈幹周囲に VCAM-1 陽性の血管内皮がみられ、冠動脈原基の発生が確認できた。心室周囲では、ED14.5 に心外膜に、ED15.5 には心外膜と心筋との間に形成された網目状の組織に VCAM-1 の発現がみられ、さらに ED16.5 には心筋に接近した心外膜から心筋内に連続する VCAM-1 陽性の細胞群がみられた。ED17.5 には心筋内に明らかな血管内皮が確認できた。Bis-diamine 投与群では、ED17.5 でも動脈幹周囲に明らかな冠動脈原基の形成は見られず、心外膜と心筋の間の網目状組織は粗で心筋内に血管内皮の形成は確認できなかった。</p>			

(備考)1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字

程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

【考察】

○Bis-diamine 投与ラット胎仔における動脈幹周囲の冠動脈原基の発生異常について

冠動脈の発生について、鶏胚の神経堤細胞を焼灼すると単冠動脈や開口部の異常をきたすことから神経堤細胞が動脈幹周囲の冠動脈原基の発生に関与するという報告がある (Hood and Rosenquist; Anat Rec 1992, Poelman et al; Circ Res 1993)。Bis-diamine は動脈幹中隔の形成に関与する神経堤細胞の動脈幹への移動を妨げることで動脈幹分割に異常をきたすこと (Fujino et al; Cong Anom 1999) が示されているが、今回の研究では Bis-diamine 投与により神経堤細胞の影響が冠動脈の発生異常に結びついていることを直接支持する根拠を得ることはできなかった。最近、コネキシン 43 のノックアウトマウスで心外膜の異常に冠動脈の起始異常や分枝異常が伴うことが報告された (Li et al; Development 2002, Walker et al; Dev Biol 2005) が、Kise らの研究 (Kise et al.; BDRA 2005) で、この動物モデルでもコネキシン 43 の発現が ED13.5 から抑制されていることが示されている。今回の研究で動脈幹周囲に VCAM-1 陽性細胞の出現が見られなかったことから、心外膜から冠動脈原基となる血管内皮細胞の形成が抑制され、数的に不十分なことが原因となっていると考えられた。ただ、冠動脈の異常は常に円錐動脈幹奇形に伴っていることから、動脈幹分割異常が二次的に冠動脈原基と開口部の位置関係に影響を与えている可能性はあると推測される。

○心外膜と抹消側冠動脈の発生異常について

以前の研究 (Mikawa et al Proc Natl Acad Sci USA 1992) で心外膜前駆組織 (proepicardial organ: PEO) の細胞が心外膜に分化する一方、一部の細胞が心筋との間で間葉細胞に形質転換し、心筋内に入り込んで血管内皮となり、原子毛細血管網を形成することが報告されている。今回の研究で、Bis-diamine が心外膜の正常な発生を阻害すると同時に心筋内の血管内皮の形成異常をきたすことが明らかにされた。この機序について、VCAM-1 遺伝子のノックアウトマウスでは心外膜の正常な形成がみられず、冠動脈にも異常を生じることから、VCAM-1 が極めて重要な役割を演じていることが示されている (Kwee et al; Development 1995)。しかし、今回の研究では Bis-diamine 投与ラットでも VCAM-1 の発現が見られていることから、Bis-diamine は VCAM-1 の発現を抑制するのではなく、PEO の細胞の移動に直接影響を与えていることが示唆された。これは心室周囲の冠動脈の発生だけでなく、大動脈周囲の冠動脈発生にも影響している可能性が高く、Bis-diamine は PEO の細胞の正常な発生を阻害することで冠動脈の異常をきたすと考えられた。

しかし、この研究には大きな限界がある。まず第一に、心臓の形態と VCAM-1 の発現のみしか観察されていないため、冠動脈発生において直接関与する細胞が同定できていないことである。PEO や神経堤細胞を標識するマーカーが開発されれば、さらに詳細な検討がなされるであろう。また、細胞移動や血管発生に関与する他の接着分子の発現をみることでそれらが互いにどの様に関与しているかも明らかになると思われる。次に、なぜ左冠動脈のみが無形成や低形成になるのかが不明のままである。今後の課題である。

【結論】 Bis-diamine が円錐動脈幹奇形とそれに伴う冠動脈の異常を惹起する機序として、PEO 由来の細胞の心臓への移動と分化を直接阻害することで心外膜とその一部が形質転換して形成される間葉細胞および冠動脈の内皮の形成を阻害することが考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	388	氏名	花戸 貴司
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>先天性心疾患，特に円錐動脈幹の分割異常により発生するファロー四徴症などは冠動脈の異常を合併する頻度が高いことが知られている。円錐動脈幹奇形に冠動脈の発生異常が合併して生じる機序を明らかにするため、ラットにビスダイアミンを投与し、その胎仔の冠動脈の発生過程を、形態的、組織学的に検討し、以下の点を明らかにした。</p> <p>(1) コントロール群では円錐動脈幹奇形及び冠動脈の異常は認めなかったが、ビスダイアミン投与群ではその 92% に心奇形を認め、そのすべてに左冠動脈の無形成あるいは低形成を認めた。</p> <p>(2) 血管内皮細胞接着因子 VCAM-1 の心臓における発現を免疫組織学的に検討した結果、ビスダイアミンが心外膜の正常な発生を阻害すると同時に心筋内の血管内皮の形成異常をきたすことが明らかになった。</p> <p>(3) ビスダイアミンが円錐動脈幹奇形とそれに伴う冠動脈の異常を惹起する機序として、心外膜前駆組織 PEO 由来の細胞の心筋への進入と原始血管の形成を直接阻害することによって、冠血管網の形成を阻害することが推定された。</p> <p>本論文は、円錐動脈幹奇形に冠動脈の発生異常が合併して生じる機序について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 543 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 9 月 5 日)</p>			