

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09238

研究課題名（和文）心内膜の線維化に着眼した心線維化メカニズムの解明とその治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cardiac fibrosis with a focus on endocardial fibrosis and development of its treatment

研究代表者

嶋田 正吾（Shimada, Shogo）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70812452

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：心内膜の線維化動物モデル作成のために、以下の動物実験の手術手技を新規に確立した。

ラット異所性心移植大動脈弁閉鎖不全モデル：ドナーラットの心臓を摘出したのち、大動脈弁閉鎖不全を導入し、レシピエントラットの腹部に移植するモデル。移植されたドナー心は大動脈弁閉鎖不全のため拡張し、心内膜に線維化を生じる。ラット・ウサギ異種異所性心移植モデル：幼弱ウサギをドナーとし、摘出した心臓を免疫不全ラットレシピエントの腹部に移植するモデル。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、免疫不全ラットを用いても異種移植モデルでの急性拒絶反応を回避することができないことが判明し、当初の目的である動物モデル作成には至らなかった。一方で、上記モデル作成への過程で再現性のあるラット異所性心移植大動脈弁閉鎖不全モデルを確立することができた。今後、心内膜の線維化メカニズムの解明やその治療法開発に役立つ成果と言える。

研究成果の概要（英文）：To create an animal model of endocardial fibrosis, the following surgical techniques for animal experiments were newly established.

(1) Rat heterotopic abdominal heart transplantation model with introducing aortic regurgitation in a donor heart: A donor rat heart is removed, aortic regurgitation is introduced, and then transplanted into the abdomen of the recipient rat. The transplanted donor heart is dilated due to aortic regurgitation, resulting in fibrosis of the endocardium.

(2) Rat-rabbit heterotopic heart transplantation model: A model in which a young rabbit is used as a donor and the removed heart is transplanted into the abdomen of an immunodeficient rat recipient.

研究分野：心臓外科

キーワード：心内膜線維弾性症 ラット異所性心移植 異種心移植

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患の一つである左心低形成症候群や先天性大動脈弁狭窄などに見られる心内膜線維弾性症(endocardial fibroelastosis: EFE)は、特殊なタイプの心線維化であり、心内膜が厚い弾性線維で覆われる。これは、胎児期から新生児期の左室の発育を阻害し、また左室拡張障害を来すことが知られている。現存する唯一の治療法は外科的切除であり、出生時比較的左室容量が保たれている一部の患児では、切除により左室が成長し両心室修復が可能になることが報告されている (Emani S et al. JACC 2012)。一方、多くの症例では、左室を体心室として使うのを諦め、右室型の単心室修復、あるいは心移植が治療法となっている。EFE 発症のメカニズムは長らく不明で、動物モデルの作成が望まれていたが、研究代表者および研究代表者が所属したボストン小児病院 del Nido 研究室のグループは、EFE 臨床例の胎児エコーの詳細な検討から左室形態に着目し、それを動物モデルで再現することで、EFE 動物モデルを確立した(Shimada S et al. Biomed Res Int 2015)。これにより幼若な左室に過大な圧容量負荷がかかることが、EFE 発生の原因となっていることを突き止めた。また、ヒト手術検体および動物モデルの解析から、EFE 発生メカニズムに、内皮間葉移行(endothelial-to-mesenchymal transition: endMT)が関与していることを見出してきた (Xu X et al. Circ Res 2015)。この EFE 動物モデルは、EFE 発生のメカニズムを明らかにする上では非常に有用であった一方、ドナー心が小さく、脆弱であるため、大動脈弁逆流量を調節できず、結果として生じる EFE 量を一定化させることが困難であるという弱点が存在した。

2. 研究の目的

上記 EFE 動物モデルの弱点を克服するために、サイズが大きく、大動脈弁に操作を加えやすい幼若ウサギをドナーとして用いる本研究の着想に至った。幼若ウサギのサイズ (日齢 3-5, 30-80g) およびウサギの近交系の入手が困難であることを考慮し、レシピエントとして免疫不全ラット(8-12 週齢, 200g)を使用することを着想した。本研究では、まずこの新規動物モデルの確立を目的とする。また、この動物モデルの再現性を確認したのち、endMT を引き起こす血行力学的因子の解析および、endMT 抑制薬の EFE 治療効果の判定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規動物モデルの作成

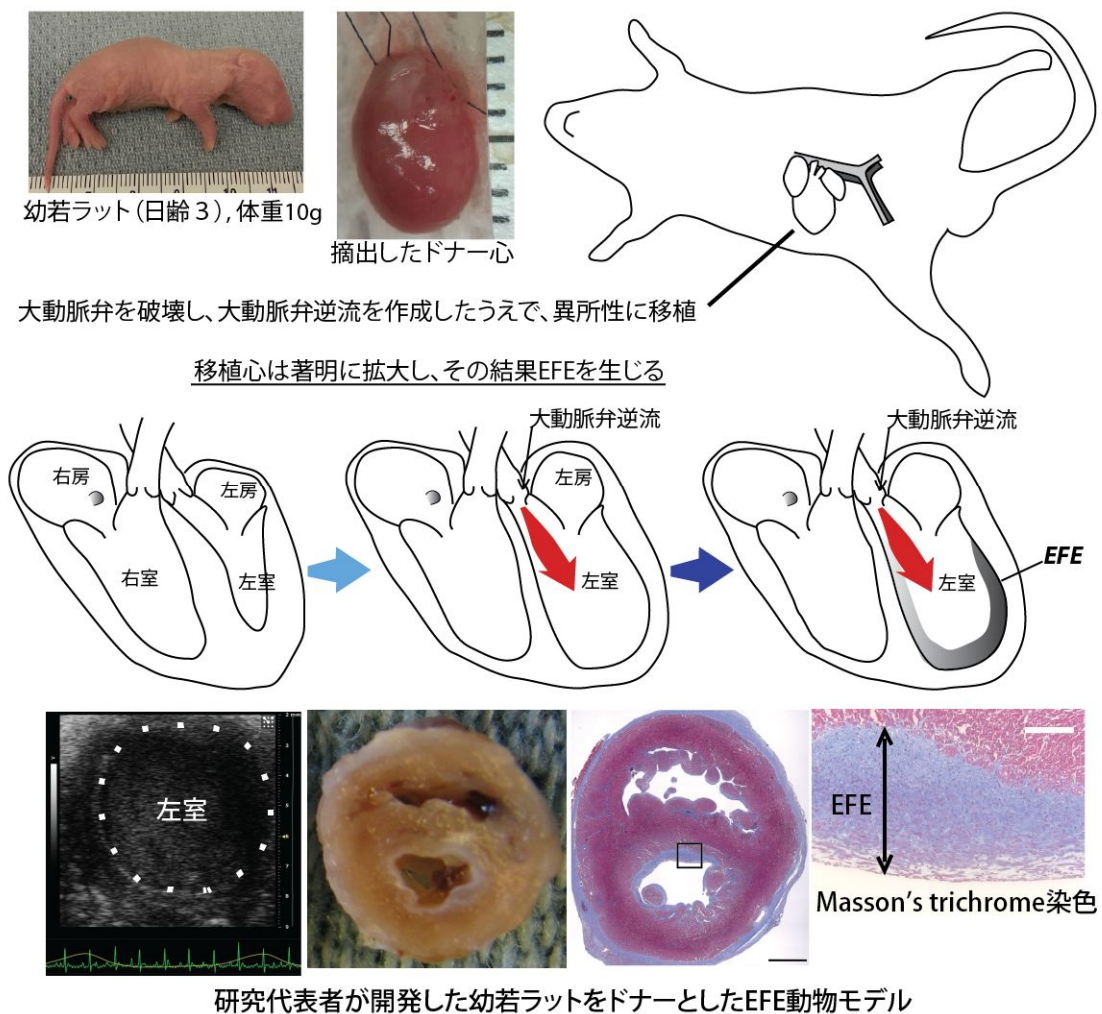
幼若ウサギ (ニュージーランドホワイト種、日齢 3-5) をドナーとして用い、心臓を摘出したのち、大動脈弁弁尖を顕微鏡下に切除する。大動脈弁は 3 尖あり、切除する弁尖数を調節することで、移植後に生じる大動脈弁逆流の程度をコントロールすることができる。この幼若ウサギ心を免疫不全ラット (T 細胞機能欠如ラット) の腹部に異所性異種心移植する。大動脈弁逆流のために、移植した心臓は圧容量負荷を受け拡大する。術後は小動物用エコーを用いて、移植心の左室サイズ、心機能、大動脈弁逆流の程度を評価する。移植 2 週間後に移植心を摘出し、組織学的に EFE を評価する。大動脈弁弁尖の切除量により大動脈弁逆流の程度が規定され、これが左室拡大の程度および EFE の形成量と相関することが予測される。大動脈弁弁尖切除量を標準化、最適化し、EFE 量が統一された EFE 動物モデルの作成を目指す。免疫不全ラットを用いることで、異種移植に伴う拒絶の影響を抑えることが可能となる。

(2) 血行力学的解析

del Nido 研究室の共同研究者らの予備実験で、endMT のトリガーとなる血行力学的因子として心内皮細胞が静的過伸展を受けることが重要であることがわかってきた。上述した動物モデル確立ののち、実際の移植心の左室内圧測定や、画像的検索（心エコーでの心内膜の strain 測定、心臓 MRI）を通して、endMT を引き起こす血行力学的な因子をさらに明らかにしていく。

(3) EFE 治療薬の検討

endMT は心臓の発生期に房室弁および中隔形成の中心をなす現象であることがわかっており、発生学の研究からそのシグナル伝達経路が明らかとなっている。endMT を抑制する化学物質は複数知られており入手可能である。これら候補物質を上記動物モデルに適用し、EFE 治療効果を判定する。

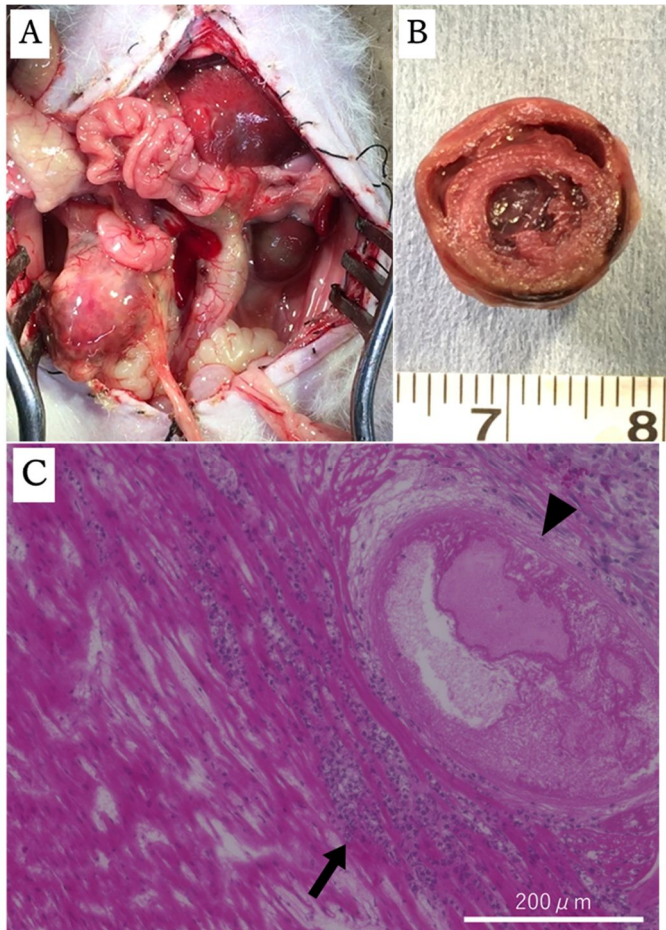


4. 研究成果

上述した新規 EFE 動物モデル作成のために、以下の順で動物実験の手術手技を確立した。

- (1) ラット異所性心移植モデル：従来から報告されている確立された動物モデルで、ドナー心を受容体ラットの腹部に異所性移植する。
- (2) ラット異所性心移植大動脈弁閉鎖不全モデル：ドナーラットの心臓を摘出したのち、大動脈弁閉鎖不全を導入し、受容体ラットの腹部に移植するモデル。移植されたドナー心は大動脈弁閉鎖不全のため拡張し、心内膜に線維化を生じる。再現性が高い手術方法（特にドナー心に大動脈弁閉鎖不全を安定して作成する方法）を考案し、論文報告した。

- (3) 免疫不全ラットをレシピエントとしたラット異所性心移植モデル：免疫不全ラットは通常のラットと比較して、麻酔や疼痛に対し脆弱で、再現性のあるモデルを確立するために、麻酔法の修正や、術後疼痛管理、栄養管理を工夫する必要があった。これまで免疫不全ラットをレシピエントとして用いたモデルの報告がほとんどなく、まずは通常ラットをドナーとしたモデルを確立した。
- (4) ラット・ウサギ異種異所性心移植モデル：幼弱ウサギをドナーとし、摘出した心臓を免疫不全ラットレシピエントの腹部に移植するモデルを作成した。移植したドナーラット心はすべて1病日には拍動を認めなくなり、摘出した心臓（下図 A, B）には急性拒絶の病理像（下図 C）が確認された。当初の仮説として、免疫不全ラットを用いることで異種移植の拒絶を抑えることが可能だと考えていたが、拒絶の制御ができないことが判明した。新規 EFE 動物モデル作成には、さらに幼若ウサギの心臓に大動脈弁閉鎖不全を導入する必要があるが、拒絶を抑えることができないため、本モデルでは目的とした動物モデル作成が不可能であることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuji Shigeto, Shimada Shogo, Ono Minoru	4. 巻 196
2. 論文標題 Modified Heterotopic Abdominal Heart Transplantation and a Novel Aortic Regurgitation Model in Rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/64813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻 重人、嶋田 正吾、小野 稔
2. 発表標題 腹部異所性心移植を用いたウサギからラットへの異種移植における免疫応答
3. 学会等名 第59回日本移植学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻重人、嶋田正吾、小野稔
2. 発表標題 Modified Heterotopic Abdominal Heart Transplantation and Novel Aortic Regurgitation Model in Rats
3. 学会等名 第53回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野 稔 (Ono Minoru) (40270871)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平田 康隆 (Hirata Yasutaka) (70562601)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	小前 兵衛 (Komaе Hyoe) (50788883)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関