

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17340

研究課題名(和文) ファロー四徴症ラットモデルを用いた大動脈壁血管変性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Evaluation of the mechanism of aortic wall change in rat model of tetralogy of Fallot

研究代表者

関 満 (Seki, Mitsuru)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20822357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9を使った遺伝子変異によりファロー四徴症動物モデルであるHey2ノックアウトラットの作出を行ない、F0で多数のHey2 del/delラットを得ることができた。得られたHey2 del/delラットの心内奇形の表現型確認を行なったが、新生仔期の心臓の評価はCT検査やスライド切片では正確な構造評価が難しく、組織透明化及び組織三次元染色技術に着目してライトシート顕微鏡システムを立ち上げた。現在、本システムを用いて、三次元で心内構造を可視化できるように染色方法を検討しており、得られたラットモデルの評価を行なっていく。その上で大動脈組織の組織学的変性の有無を確認する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファロー四徴症患者における大動脈血管壁の変性は多因子が病態形成に関与している。動物モデルを用いた血管変性のメカニズム解明はこれらの患者の管理や治療に活かすことができる。一方で、先天性心疾患の動物モデルは確立されているとは言えない状況である。本研究ではファロー四徴症のラットモデルを新規に作出している。今度、本研究を応用し、さらにより大きな動物での疾患モデルを作成することができれば、血管機能のみならず、心機能、分子生物学的な検討が行うことができる。先天性心疾患の動物モデルの確立は内科的治療、心臓カテーテル治療、心臓手術への応用が期待され、先天性心疾患患者の予後向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We generated Hey2 knockout rats, an animal model of tetralogy of Fallot using CRISPR/Cas9, and obtained Hey2 del/del rats at F0. We tried to confirm the phenotype of cardiac malformations in the Hey2 del/del rats, but accurate structural evaluation of the neonatal heart was difficult by CT examination or slide sectioning, therefore, we focused on tissue transparency and three-dimensional tissue staining technology and installed a light sheet microscopy system. Currently, we are examining staining methods to visualize cardiac structures in three dimensions using this system. We will confirm the histological change of the aortic tissue in this rat model.

研究分野：小児循環器

キーワード：ファロー四徴症 大動脈拡大 先天性心疾患動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

ファロー四徴症は小児期に根治手術が必要となる先天性心疾患の一つである。出生 1000 人に対して 10.6 人(約 1%)の頻度で発症する先天性心疾患において、ファロー四徴症はその 11.3% を占め、心室中隔欠損症に次いで多い。本疾患では外科的根治術後であっても進行性の上行大動脈拡大を約 15%に認め、それに伴う大動脈弁閉鎖不全や大動脈瘤、動脈解離が報告されており、致命的となりうる。大動脈壁は組織学的に中膜嚢胞性壊死所見を認め、これは血管弾性低下と血管硬度上昇をもたらす。この血管コンプライアンス低下は大動脈弁閉鎖不全を増悪させるのみならず、心室収縮能、拡張能、冠動脈灌流を悪化させるため長期予後に大きく関わると考えられる。一般的に大動脈壁の組織学的変化、大動脈の拡張をもたらす要因として、高血圧、加齢、遺伝子異常などが指摘されているが、ファロー四徴症においては肺動脈狭窄の程度が強いほど大動脈壁硬度が高く、拡大の程度も強い。これは体血流増加、つまり大動脈への容量負荷と関連している。さらに、この大動脈壁の組織学的変性は新生児期から成人までにおいて報告されており、生後早期からすでに大動脈壁異常を認める事実は内因性因子の関与を強く示唆している。大動脈拡大をきたす Marfan 症候群では Fibrillin-1、TGFB1、TGFB2 といった TGF-シグナリングを調整する因子に関する遺伝子異常が大動脈壁組織変化をもたらすことが明らかとなっており、ファロー四徴症も同様のメカニズムが関与していることが想定される。

上述のように多因子が本病態形成に関与しているが、これらの要因の中で内因性の大動脈壁組織学的異常は限られた臨床検体による組織学的解析と血管硬度測定による間接的分析によるものであるため推測の域を出ない。また、先天性心疾患の動物モデルは確立されておらず、血管機能のみならず、心機能、分子生物学的な検討が不十分である背景がある。先天性心疾患の動物モデルの確立は内科的治療、心臓カテーテル治療、心臓手術への応用が期待され、先天性心疾患患者の予後向上につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではファロー四徴症における大動脈拡大の要因の一つである胎生期あるいは乳児期早期から存在する内因性因子を解明するために、先天性心疾患ラットモデルを用いて血管の組織学的変化、血管特性を胎仔期より解析することで本病態を解明するとともに、大動脈拡大の発症、進行のメカニズムを明らかにすることを目的とする。また、新しいファロー四徴症モデルを作製・解析することでファロー四徴症における大動脈壁の変性は胎生期あるいは新生児期から存在し、その血管硬度も上昇しているのか、さらに大動脈壁の変性のメカニズムを明らかにすることにより、ファロー四徴症における進行性大動脈拡大の発症機序を解明し、将来的には本症において適切な管理、治療介入により予後を改善するための基礎となる。さらに、新規の先天性心疾患の動物モデルの確立は他の大動物でのモデル作成に応用されうるため、本研究が将来的に先天性心疾患患者の内科的治療、心臓カテーテル治療、心臓手術などの検討に活用されることが期待される。

### 3. 研究の方法

先天性心疾患の動物モデルにおいては、Hey2 遺伝子のノックアウトマウスがファロー四徴症と同様の心臓構造異常を示すとの報告がなされている (Donovan et al, *Current Biology* 2002)。研究協力者である魚崎英毅はすでにファロー四徴症のマウスモデルを作製しており、この技術をもとに Hey2 遺伝子変異によるファロー四徴症ラットモデルを作製する。まず、CRISPR/Cas9 を使った遺伝子変異による Hey2 ノックアウトラットを作出する。Hey2 はホモノックアウトでファロー四徴症の表現型を呈するため、Hey2 del/+ラットを導入し、Wistar ラットと交配し、Hey2 del/+ラットを繁殖、Hey2 del/+ラット同士を交配することで、Hey2 del/del ラットを得る。得られたマウスの表現型の確認を行い、作出されたノックアウトラットの心形態観察を行い、心内奇形の診断を行う。マウスでは体格が小さすぎるため血管の評価には限界がある。得られたラットモデルを用いることで、マウスモデルでは解析が困難であった大動脈血管壁硬度、組織学的変性の有無を評価する。

得られたラットモデルの評価は CT 検査や心臓切片を作成して行い、表現型の確認の上、血管の評価を行う。Fallot 四徴症ラットモデルが作出されているかどうかは重要であるため、心内奇形の評価が難しい場合は評価方法の検討を行う。得られた Fallot 四徴症マウスから胎生期、新生仔期、離乳期における大動脈組織を摘出する。得られた組織は H-E 染色、Elastica van Gieson 染色により血管壁の組織学的変性の有無を確認する。Fallot 四徴症の大動脈拡大に関わる中膜病変形成に TGF- $\beta$  の異常が関与していると考えられており、TGF- $\beta$  シグナリング活性化の有無を免疫染色、ウェスタンブロットティング、PCR を用いて確認する。

### 4. 研究成果

まず、CRISPR/Cas9 を使った遺伝子変異による Hey2 ノックアウトラットの作出を試みた。ゲノム編集により Hey2 Ex1 のみをノックアウトした胚、Hey2 Ex1 及び Ex3 をノックアウトした胚を作成し、レシピエントラットに胚移植した。Hey2 Ex1 のノックアウトでは deletion は認めなかったが、Hey2 Ex1 及び Ex3 のノックアウトラットでは deletion を確認することができ、F0 で多数の Hey2 del/del ラットを得ることができた。

次に得られた Hey2 del/del ラットの心内奇形の表現型確認を行なった。しかしながら、新生仔期の心臓の評価は CT 検査やスライド切片では正確な構造評価が難しかった。評価法を模索しているところで、順天堂大学の洲崎悦生先生の研究室で行われている組織透明化及び組織三次元染色技術の応用に着目した。本技術は心臓組織では十分に活用されていないが、先天性の心内奇形の表現型や心内構造の確認について組織透明化技術を用いて三次元で把握することができればより正確な評価が行うことができると考えた。そこで、ABIS の先端バイオイメージング支援に応募し、その採択を受けて、ライトシート顕微鏡システムを立ち上げた。現在、本システムを用いて、三次元で心内構造を可視化できるよう染色方法を試行錯誤している状況である。現時点で良好な染色プロトコールが確立できていないが、今後も本研究を継続し、得られた先天性心疾患ラットモデルの評価を行なっていく。

その上で、胎生期、新生仔期、離乳期における大動脈組織の組織学的変性の有無を確認する。Fallot 四徴症の大動脈拡大に関わる中膜病変形成に TGF- $\beta$  の異常が関与していると考えられており、TGF- $\beta$  シグナリング活性化を含めた病態解明を行なっていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	魚崎 英毅  (Uosaki Hideki)		
研究協力者	洲崎 悦生  (Suzaki Etsuo)		

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