

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893187

研究課題名(和文)冠動脈固有の側副血行路形成過程を理解するための基礎研究と種間の相同性の探索

研究課題名(英文)Basic research for the collaterogenesis in coronary circulation

研究代表者

有馬 勇一郎(Arima, Yuichiro)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60706414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：冠血管の固有の形態を評価するために、マウス冠循環を還流固定後放射線非透過樹脂を下行大動脈より注入し、マイクロX線CTにて撮影を行った。また、血流配分の変化を評価するために、心筋梗塞モデルにおいて冠動脈結紮直後と冠血管拡張後にそれぞれ血流依存的に冠血管内皮細胞を標識する手法を作出した。

つづいて種間の相同性を探索するため、有尾両生類の冠血管形態を解析した。アカハライモリでは心室領域よりも円錐部において潤沢な冠血管網を認めた。それらは直接冠静脈洞に流入しており、哺乳類と異なる走行をしていることが明らかとなった。以上の結果の一部は第78回、79回日本循環器学会で発表した。

研究成果の概要(英文)： We developed two techniques to visualize the coronary architecture. The micro X-ray CT enabled to understand whole architecture of the coronary vasculature. Bi-phasic endothelial labeling distinguished open and close coronary microcirculation in coronary ligated mice.

Furthermore, to understand the coronary homology between species, we analyze the anatomical characteristics in urodele amphibia. Compare to mammals, urodele coronary circulation are quite few on the surface of ventricle. However, conal region was covered by rich vascular network. And the drainage vessel connected to the sinus venosus. These findings were reported on the 78th and 79th Japanese cardiovascular society annual meeting.

研究分野：循環器内科学

キーワード：側副血行路

1. 研究開始当初の背景

側副血行路は主たる血行路における血流が阻害された状況下で、末梢の循環を担保するために形成される迂回路である。様々な循環障害を生じる疾患において形成されるが、特に循環器領域においても、閉塞性動脈硬化症や虚血性心疾患における側副血行路の形成は重要な働きを持ち、側副血行路の形成程度は予後に影響することが知られている。

近年、冠動脈・冠静脈の発生過程には複数の細胞群が関与することが報告されているが、これらの複数の細胞群が協調して冠循環を形成する過程は、他の臓器と比較して極めて複雑で、心臓固有の血管新生・形成機構である。

現在、側副血行路を評価するモデルは限られており、マウスにおいて冠動脈固有の冠動脈側副血行路の形成過程を評価する系自体がないため、下肢虚血モデルから推測する他選択肢がない現状である。

2. 研究の目的

冠動脈固有の側副血行路形成過程を理解するために、冠血管を評価するための実験系の開発し、システムを超えて保存された冠動脈の血管形成機構・側副血行路形成機構を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

- (1) マイクロ X 線 CT による評価法の作出
- (2) 二層性血管標識手法の作出
冠動脈を評価するための手法を、以下の方法で作出した。
- (3) 有尾両生類における冠血管網の評価
種の比較を行うために、アカハライモリとアホーロートルの二種類の有尾両生類を用いて、冠血管の形態を評価した。

4. 研究成果

- (1) マイクロ X 線 CT を用いた冠血管の可視化:
冠循環の形態を網羅的に評価するために、マイクロ X 線 CT をもちいた撮像を試みた。
生体マウスおよびモルモットを使用して深麻酔下に還流固定を行い、下行大動脈から逆行性にシリンジ外套を挿入した。つづいて放射線非透過シリコン樹脂を低圧下で注入し、樹脂の固化を確認したのちに心臓を摘出、

ホルマリン固定を行った。

摘出した心臓を熊本大学工学部内に設置しているマイクロ X 線 CT にて撮影し、画像解析ソフト(Fiji)を用いて、立体像を三次元構築した。

本手法により冠動脈・冠静脈を一様に撮像することに成功した(図 1)。今回の実験で使用したマイクロ X 線 CT の最大空間分解能は 4 μ m で、本手法により冠動脈の主幹部から第 3 分岐程度までの冠血管を可視化することが可能となった。

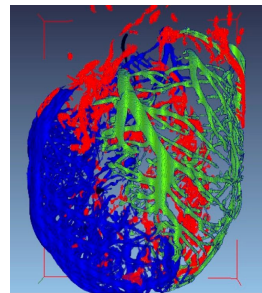


図 1: マイクロ X 線 CT で撮影したマウス冠血管。領域別に配色。

つづいて、マウスとモルモットの冠血管形態を比較したところ、モルモットの冠血管では、比較的大きな血管径での動脈-動脈吻合があることが確認された。

過去の研究において、左冠動脈結紮時の障害心筋は、モルモットにおいて著名に少なくなることが報告されている。今回の検討により、モルモットにおいてはマウスより大きな血管径での吻合が確認され、これらの吻合が血管の急性閉塞時に側副血行路の供給源となりうる可能性が示唆された。

(2) 二層性血管標識手法の作出

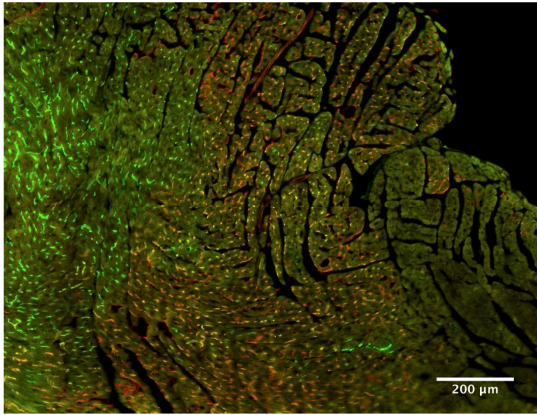
血流存在・非存在状態の血管を区別するために、in vivo にて血流依存的に血管を標識した後で、最大限の血管拡張を行ったのちにもう一度染色する二層性血管標識手法の作出を試みた。

生体マウスの心筋梗塞モデルを用いて、冠動脈結紮作出後に尾静脈より FITC 標識レクチンを投与し、30 分間経過したのちに血管拡張薬を還流してから心臓を摘出し、切片を TRITC 標識レクチンで染色して評価した。

心筋梗塞の壊死部と生存部の境界領域において、TRITC でのみ標識される内皮細胞軍を確認した(図 2)。本領域は in vivo では血流が途絶していたが、最大限の血管拡張により血流が再開した血管網であり、心筋梗塞時の

血管拡張により再疎通が見込める領域と考えることができる。

図 2: 二層性血管標識手法による冠血管の層別化。マウス左冠動脈結紮直後(FITC:緑)と血管拡張後(TRITC:赤)でそれぞれ血管内皮細胞を標識した。梗塞部と正常心筋の境界部において、血管拡張後においてのみ標識される領域を認める。



(3)有尾両生類における冠血管網の評価

アカハライモリとアホーロートルに対して蛍光標識アルブミンを経血管的に投与し、還流後蛍光顕微鏡にて評価した。

心室領域においては表面を走行する血管は確認できず、哺乳類とは異なり血管網が非常に乏しいことが明らかとなった。それに対して、円錐部表面は非常に密に血管網が及んでおり、それらは心室を介さず直接静脈洞に還流していることが明らかとなった(図 3)。



図 3:アカハライモリの冠循環。FITC 標識アルブミンにて血管を可視化、流出路円錐部に

おいて、密な血管網を認め(左下)、直接静脈洞に還流している(右下: 矢印)。

考察

近年冠血管は複数の細胞により構成されていることが明らかとなっている。その一部は静脈洞内皮細胞に起源を有するとされており(Red-Horse et al., Nature 2011)、今回の観察で確認された動脈円錐部から冠静脈洞に通じる血管は、それらに相同な血管である可能性が示唆された(図 4)。

また、有尾両生類の心室表面には冠循環がなく、これは大きく哺乳類と異なっている。原因の一つとして、両生類の心室壁は哺乳類と比較して非常に薄く、そのため心内膜細胞から直接の酸素を得ている可能性が示唆された。近年哺乳類においては心内膜細胞由来の冠動脈内皮細胞が注目されており、心筋の緻密化により心内膜細胞が冠動脈内皮細胞に形質転換すると報告されている(Wu et al., Cell 2012)。しかし本研究では両生類においてはすでに冠血管と同等の機能を、心内膜細胞が有している可能性が示唆された。

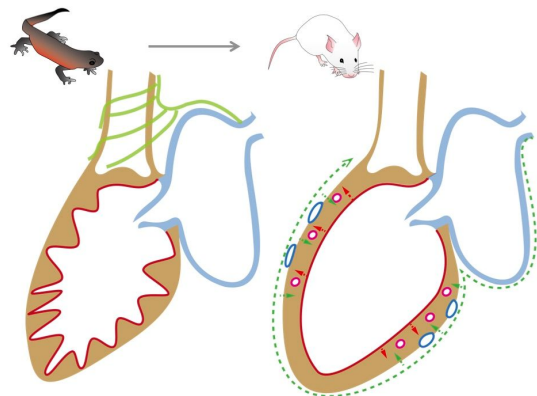


図 4:両生類とマウス冠循環の違い。アカハライモリの冠循環は動脈円錐部において密な血管網を構成し、その後直接静脈洞に還流する(緑実線)。マウス冠血管の一部は、胎生期に静脈洞内皮細胞から生じることが知られている(緑破線)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

有馬勇一郎 Slow Growth in Fetal Life as the Risk of *Non-Congenital Heart Diseases* in Adult、第79回日本循環器学会学術集会 平成27年4月25日、大阪
有馬勇一郎 In Vivo Imaging of the Coronary Circulation of the Amphibia、第78回日本循環器学会学術集会 平成26年3月22日、東京

有馬勇一郎 Comparative Anatomy of the Coronary Circulation among Rodent Species、The 18th International Vascular Biology Meeting, 平成26年4月14日、京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumadai-junnai.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

有馬 勇一郎 (ARIMA Yuichiro)

熊本大学医学部循環器内科・特任助教

研究者番号：60706414