

氏 名（本籍）	た だ ひろ こ 多 田 博 子
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 2 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Deficiency of Erythropoietin Receptor Gene in Non-hematopoietic Lineage Accelerates Cardio- myocyte Death and Deteriorates Left Ven- tricular Remodeling After Myocardial Ischemia and Reperfusion （非血球系特異的エリスロポエチンレセプター欠 損マウスでは心虚血再灌流後の残存心筋の細胞死 が促進され梗塞後心室リモデリングが悪化する）

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教 授 白 土 邦 男 教 授 田 林 暁 一
	教 授 帯 刀 益 夫

論文内容要旨

背景

エリスロポエチン (EPO) は赤芽球前駆細胞に作用し赤血球の分化・増殖に働くホルモンである。その働きは本来血球系でのみ作用すると考えられていたが、EPO 受容体 (EpoR) は血球以外の細胞、例えばニューロンや網膜などの神経系の細胞、胎盤などの血管内皮細胞さらに心筋において発現が報告され、近年、血球系以外での働きが注目を集めている。特に脳や心臓の虚血動物モデルで EPO の投与によりアポトーシスが抑制され梗塞範囲が縮小することから EPO が虚血に対して保護作用を持つと考えられるようになった。しかし造血系以外の細胞の EPO-EpoR を介したシグナルがその保護効果においてどのような役割を担っているかまだ明らかではない。

目的

血球系に特異的に EpoR が発現するように遺伝子操作した EpoR のノックアウトマウス (transgene-rescued EpoR null mutant mice ; RESCUE) を用いて EPO-EpoR シグナルが虚血再灌流後の残存心筋の生死や心室リモデリングに対しどのように働いているのか検討した。

方法

①動物：EPO および EpoR のノックアウトマウスは胎児肝での赤血球産生障害による致死的貧血のため胎生期に死亡する。そこで赤血球系のマスター遺伝子である GATA-1 のプロモーターに EpoR の cDNA をつなげた遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと EpoR のヘテロタイプノックアウトマウスを掛け合わせていくことで得られる血球系にのみ EpoR を発現した transgene-rescued EpoR null mutant mice (RESCUE) を用いた。このマウスは致死的な貧血を起こすことなく正常に発育・繁殖し、解析に用いることができる。

②マウス心虚血再灌流モデル：8~12 週齢の雄マウス (RESCUE, Wild-type (BDF-1)) を麻醉下に開胸後左冠動脈を 30 分間結紮、その後再灌流し心虚血再灌流モデルを作成した。

(i) 梗塞範囲の同定：虚血再灌流 24 時間後に TTC (triphenyltetrazolium chloride) 染色を用いて梗塞範囲を同定、面積を計測した。

(ii) 心筋アポトーシスの評価：虚血再灌流 6 時間後に TUNEL 染色を行い、左室自由壁の虚血領域の中から 9 視野を選び TUNEL 陽性細胞数を計測した。また虚血再灌流 24 時間後の心筋を用いて DNA ladder 法にてアポトーシスの有無を確認した。

(iii) 血漿 EPO 濃度：虚血再灌流後 1, 6, 24, 48 時間の時点でそれぞれ採血し血漿中の EPO 濃度を測定した。

(iv) 心機能評価：虚血再灌流 3 週間後に経胸壁心エコーにて心機能を評価した。

結 果

Baseline：Wild Type との間に体重・心重量・心拍数・収縮期血圧および組織所見において差はなかった。また心エコー所見（左室拡張末期径・左室短縮率）にも差は認めなかった。ヘマトクリット値はほぼ同じであったが血漿 EPO 濃度は RESCUE で有意に高値であった。 $(43.1 \pm 8.0$ vs 22.5 ± 9.4 mlU/ml, $P < 0.01$)

虚血再灌流モデル：虚血再灌流 24 時間後の時点で RESCUE/虚血再灌流 (MI) 群は WILD/MI 群に比較して有意に梗塞範囲 (%Area at risk) の拡大を認めた。 $(54 \pm 11$ vs $41 \pm 10\%$, $P < 0.01$) TUNEL 染色では TUNEL-陽性心筋の数は RESCUE/MI 群において有意に増加していた。 $(30.7 \pm 6.3\%$ vs 24.2 ± 6.0 , $n=6$, for each, $P < 0.05$)

虚血再灌流後の血漿 EPO 濃度は WILD/MI 群で有意に上昇し再灌流後 24 時間でピークとなり 48 時間後には元のレベルに戻っていた。一方, RESCUE/MI 群やそれぞれの SHAM 群では同様の Epo の一過性の上昇は認められなかった。

虚血再灌流 3 週間後では RESCUE/MI 群 WILD/MI 群間に生存率に差を認めなかった。 $(60\%$ vs $64\%)$ また両群とも SHAM 群に死亡例は認めなかった。3 週間後における体重・心拍数・ヘマトクリット値に差は認めなかったが, RESCUE/MI 群の心臓は著しく拡大し壁は被薄化し心体重比は有意に増加していた。 $(5.5 \pm 0.7$ vs 4.7 ± 0.5 mg/g $P < 0.05$) 心エコー所見では RESCUE/MI 群の左室拡張末期径は著しく拡大し $(5.2 \pm 0.6$ vs 4.4 ± 0.8 mm, $p < 0.01$), また左室短縮率 (FS) は WILD/MI 群に比較して有意に低下していた $(21.5 \pm 7.0$ vs $14.8 \pm 2.6\%$, $p < 0.01$)。

結 論

以上より血球系以外の細胞における EpoR を介した EPO シグナルが欠如した場合, 虚血再灌流後の残存心筋の細胞死が促進され梗塞後心室リモデリングが悪化する可能性が示唆された。以上のことから EpoR を介したシグナルが虚血再灌流後の心室リモデリングにおいて重要な役割をもつと考えられる。

審査結果の要旨

エリスロポエチン（EPO）は赤血球の分化・増殖に働くホルモンであり血球系でのみ作用すると考えられていた。近年、血球以外の細胞における EPO 受容体（EpoR）の発現が報告され、EPO の血球系以外での働きが注目を集めるようになってきた。特に脳や心臓の虚血動物モデルにおいて、EPO の投与によりアポトーシスが抑制され梗塞範囲が縮小することから、EPO が虚血に対して保護作用を有すると考えられるようになった。しかし、血球系以外の細胞の EPO-EpoR を介したシグナルが、EPO の虚血組織保護効果においてどのような役割を担っているかは、明らかではない。

EpoR のノックアウトマウスは胎生致死であるため、今までは EpoR 欠損マウスの解析を行うことはできなかった。本研究は、血球系にのみ特異的に EpoR が発現するように遺伝子操作した EpoR のノックアウトマウス（transgene-rescued EpoR null mutant mice ; RESCUE）を用いて、EPO-EpoR シグナルが虚血再灌流後の残存心筋の生死や心室リモデリングに対しどのように働いているのか検討した非常にユニークなものである。

虚血再灌流 24 時間後の梗塞範囲の評価（TTC 染色）を行ったところ、虚血再灌流した RESCUE（RESCUE/MI）群では、WILD/MI 群に比較して有意に梗塞範囲の増大を認めた。また、心筋の apoptosis の評価を行ったところ、両群の虚血領域でのみ DNA の断片化が観察され（DNA laddering）、さらに虚血領域内の TUNEL-陽性心筋細胞は、RESCUE/MI 群で有意に増加していた。虚血再灌流後の血漿 EPO 濃度は WILD/MI 群で一過性に有意な上昇が観察されたが、RESCUE/MI 群やそれぞれの SHAM 群では変化は認められなかった。

虚血再灌流後 3 週間の観察では、RESCUE/MI 群と WILD/MI 群間に生存率に差を認めなかったが、RESCUE/MI 群では心臓は有意に拡大、心重量/体重比は増加していた。心エコー所見では、RESCUE/MI 群で左室拡張末期径は有意に拡大し、左室短縮率（FS）も WILD/MI 群に比較して有意に低下していた。以上より血球系以外の細胞における EpoR を介した EPO シグナルが欠如した場合、虚血再灌流後の残存心筋の細胞死が促進され、梗塞後心室リモデリングが増悪する可能性が初めて示された。この点において、本研究は極めて独創的であり、血球系以外の細胞における EPO-EpoR を介したシグナルの重要性を示す新たなエビデンスを呈示したと言える。本研究は、虚血再灌流時の心筋保護を目指した EPO の臨床応用の可能性を示したという点においても優れた研究であると言える。以上から、学位論文に十分値するものとする。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。