

## 論文の内容の要旨

氏名：李 准碩

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：New insights concerning histopathologic morphometry and transcriptomics to evaluate myocardial dysfunction in dogs with chronic heart failure  
(慢性心不全犬における分子生物学的心筋機能障害評価法の研究)

僧帽弁閉鎖不全症は、小型犬でうっ血性心不全を最も多く誘発する心臓病である。僧帽弁閉鎖不全症による慢性心不全の心機能評価は、治療計画を立てることと、予後を予測する上で非常に重要である。医学において心機能の評価は、心臓カテーテル検査ならびに心臓超音波検査によって行なわれるが、獣医学では心臓カテーテル検査は全身麻酔が必要となるため、ほとんど実施されていない。そのため、犬の心機能の評価は、もっぱら心臓超音波検査が用いられている。ところが僧帽弁閉鎖不全症においては、等容性収縮期に生じる僧帽弁の閉鎖不全によって左心室内の血液が大動脈より低圧の左心房へ逆流し、左心室内の容積が容易に減少するため、左心室の動きが過剰になる。この動きにより心臓超音波検査で心機能を表す指標が見かけで亢進してしまうため、心機能の低下を適切に評価することができないことがある。

一方で心臓バイオマーカーは、心筋細胞から放出される各種タンパク質を定量して、心筋細胞の状態を評価するものであり、心機能の指標としての有用性が検討されている。その中でナトリウム利尿ペプチドは心臓の容量負荷状態を反映するため、うっ血性心不全の指標となり予後評価にも用いられている。しかしながら、機能そのものを反映するバイオマーカーは見つかっておらず、不全心を的確に評価する方法は無い。本研究の目的は、慢性心不全における鋭敏で信頼できる心臓バイオマーカーを特定することであり、そのために病理組織学および分子生物学的アプローチによって心臓バイオマーカーの探索を行った。

### 第一章 僧帽弁閉鎖不全症の犬の生検組織による病理組織学的評価

本研究には体外循環下で僧帽弁再建術を行った犬の僧帽弁閉鎖不全症例 117 頭を対象とした。症例は、国際小動物心臓病委員会（ISACHC）の基準に従って Class I から III に分類した。開心術中に左心房と左心室と肺を生検し、病理組織学的検査に供した。病理組織は、半定量的スコアリングおよびコンピュータベースのデジタル化システムを使って心筋の脂肪組織への置換、空胞化、免疫細胞の浸潤、核周囲間隙の増大、核の拡大、心筋細胞の肥大、間質性線維化を評価し、肺組織においては、肺胞中隔の肥厚、心不全細胞、II 型肺胞細胞の過形成を定量した。これらの病理学的所見と臨床検査結果の関連性を分析した。

心不全細胞は Class III のみで有意に増加していたが ( $P < 0.0001$ )、他の病理学的変性はすべての Class で明らかに認められた。心筋変性は、左心室に比較して左心房で重度であったが、心筋細胞の肥大については左心室で顕著に認められた。重回帰分析により、左心室拡張期末期径は左心房の心

筋変化と有意な相関がみられた（心筋の脂肪組織への置換、 $P = 0.33$ 、 $R^2 = 0.584$ ；空胞化、 $P = 0.003$ 、 $R^2 = 0.588$ ）。間質性線維化の程度は、左心房と左心室の両方で、左心室駆出率と有意な負の相関が明らかとなった（左心房、 $P = 0.012$ 、 $R^2 = 0.231$ ；左心室、 $P = 0.036$ 、 $R^2 = 0.205$ ）。つまり、心臓超音波検査によって得られた検査結果は、一部の病理組織学的検査結果と相関したが、心筋の病理組織学的変化を完全に反映していないことが明らかとなった。

## 第二章 僧帽弁閉鎖不全症における末梢血中単核球における心臓バイオマーカーの探索

筋小胞体のカルシウム ATP アーゼ (*SERCA2 $\alpha$* ) とその制御タンパク質 (*PLN*、*HAX-1*) 等は心筋の収縮と弛緩の主な決定因子である。カルシウム ATP アーゼ濃度の低下は、心疾患における心機能不全の重要な因子となることが報告されている。これらの心筋特異的なタンパク質は、筋小胞体のカルシウム調節を司り、その遺伝子が末梢血中の単核球でも発現され、潜在的な心臓バイオマーカーとしての役割が示唆されている。最新の人医研究で拡張型心筋症において、末梢血中単核球の筋小胞体カルシウム ATP アーゼの発現量が有意に減少し、臨床検査により測定した心機能と相関関係がみられた。犬の僧帽弁閉鎖不全症でも単核球中のそれらの遺伝子発現量は減少していると報告されているが、心筋に対する単核球中の遺伝子発現量との関係は検証されていない。

本研究では、犬の僧帽弁閉鎖不全症例 ( $n=129$ ) から生検した左心室の組織と末梢血中単核球を用い、*SERCA2 $\alpha$* 、*PLN* および *HAX-1* の遺伝子発現量を評価した。これらの遺伝子の発現量は、心不全の重症度の悪化にともなって徐々に減少した。重回帰分析により、特に僧帽弁閉鎖不全による容量過負荷が強くなるにしたがって、心筋での *SERCA2 $\alpha$*  と *PLN* の発現量が有意に減少した (*SERCA2 $\alpha$* 、 $P = 0.0251$ 、 $R^2 = 0.524$ ；*PLN*、 $P = 0.012$ 、 $R^2 = 0.530$ )。心筋と単核球からの遺伝子発現量に有意な差があったが ( $P < 0.0001$ )、一次回帰分析で心筋と単核球の発現量には有意な相関が認められた ( $P < 0.0001$ ；*SERCA2 $\alpha$* 、 $r = 0.7425$ 、 $R^2 = 0.5513$ ；*PLN*、 $r = 0.7720$ 、 $R^2 = 0.5959$ ；*HAX-1*、 $r = 0.6598$ 、 $R^2 = 0.4353$ )。単核球における *SERCA2 $\alpha$*  と *PLN* の発現量は、すべての Class において正常群 ( $n=33$ ) と有意な差があった。さらに、受信者動作特性曲線分析 (Receiver-operating characteristic analysis, ROC) で単核球中の *SERCA2 $\alpha$* 、*PLN* および *HAX-1* 遺伝子の発現量は、高い曲線下面積 (AUC) 値を示した ( $P < 0.0001$ ；*SERCA2 $\alpha$* 、 $AUC = 0.9212$ ；*PLN*、 $AUC = 0.8936$ ；*HAX-1*、 $AUC = 0.8797$ )。このことから、単核球中の *SERCA2 $\alpha$* 、*PLN* および *HAX-1* の発現量を測定することにより、心筋での発現量の変化を推測可能なことが示された。

## 第三章 各種心疾患における末梢血中単核球における心臓バイオマーカーの検証

僧帽弁閉鎖不全における末梢血中単核球で心筋特異的遺伝子の発現が心筋の運動負荷の状態を反映することが判明したが、心臓病の進行におけるある一時点での血流力学的負荷が遺伝子発現量の変化を生み出すと結論を下すには十分ではない。さらに、研究対象とした僧帽弁閉鎖不全の集団において、併発疾患、加齢、個々の薬物治療等の血流力学的変化を引き起こす様々な交絡因子があったため、これらの影響を除去することは出来ない。そこで、心筋に血流力学的負荷を起こす先天性心疾患に対して、整復手術を実施することで負荷を解除し、前後の遺伝子発現量の変化を検討した。

動脈管開存症 (PDA; n=8) と肺動脈狭窄症 (PS; n=5) と正常ビーグル犬 (正常群、n=24) で、単核球の標的遺伝子の発現量を測定した。すべての症例は、手術前に薬物治療を受けた履歴が無く、他の全身的な併発疾患も無いことが確認された。整復手術前と手術 1 週間後に *SERCA2 $\alpha$*  と *PLN* の発現量を評価した。手術前の遺伝子発現量は、PDA と PS の両方で正常群よりも有意に低値を示し ( $P < 0.01$ )、ROC 分析結果で *SERCA2 $\alpha$*  と *PLN* の AUC 値が高値を示した。また、手術後の発現量は手術前と比較して有意に増加した ( $P < 0.01$ )。したがって、*SERCA2 $\alpha$*  と *PLN* の遺伝子発現量は、心筋に対する血流学的負荷の変化を表していることが判明した。

## 総括

本研究は、犬の心不全の新しいバイオマーカーとして筋小胞体のカルシウム調節に関連するタンパク質である *SERCA2 $\alpha$* 、*PLN* および *HAX-1* に着目し、それらの有用性を検証したものである。

僧帽弁閉鎖不全症においては、臨床的に最も初期の病期 (Class I) においてさえも病理組織学的に心筋の変性が認められた。また、左心房と左心室との間には病理学的変性の差が認められた。特に左心房の線維化の程度は左心室拡張末期径と相関が認められた。また、心臓超音波検査における心機能の指標として用いられる左心室駆出率は左心房および左心室の線維化と逆相関し、心筋障害の程度と心機能の指標は相反する結果となった。以上のことより、心臓超音波検査は病理組織学的検査結果を反映していないことがあり、心筋障害と心機能の評価法として不十分であることが示された。

筋小胞体のカルシウム ATP アーゼとその制御たんぱく質等は心筋の収縮機能と弛緩機能の主な決定因子であり、心疾患におけるこのタンパク質の濃度低下が心機能不全の重要な因子となることが報告されている。僧帽弁閉鎖不全症においては、*SERCA2 $\alpha$* 、*PLN*、*HAX-1* の遺伝子発現量は、心筋と末梢血中単核球との間には有意な差があったが、心筋と単核球の遺伝子発現量はともに心不全の重症度分類と相関した。これらのことから単核球における遺伝子発現量を定量化することで心筋における遺伝子発現量を推察することができ、それによって心機能不全が評価できると考えられる。

本実験で使用した僧帽弁閉鎖不全症の犬は、老齢かつ併発疾患が存在することがあり、さらには、薬物治療も行われていた。したがって、*SERCA2 $\alpha$* 、*PLN*、*HAX-1* の遺伝子発現量がこれらの因子によって修飾されている可能性があった。このことから、若齢で心臓病のみを発症し、薬物治療を行っていない犬において僧帽弁閉鎖不全症と同じ知見が得られるか検証する必要がある。そこで若齢で無治療の動脈管開存症と肺動脈狭窄症の犬を対象として単核球の *SERCA2 $\alpha$*  および *PLN* の遺伝子発現量を測定した。両疾患の *SERCA2 $\alpha$*  ならびに *PLN* の遺伝子発現量は、正常犬と比較して低値を示し、整復手術後には正常犬の値に回復する傾向が認められた。

本研究の結果から、心筋および単核球の *SERCA2 $\alpha$*  ならびに *PLN* の遺伝子発現量は、心機能不全の程度を表すバイオマーカーとして有用であることが判明した。特に、単核球から心筋と相関する遺伝子発現量が測れることは、臨床検査上の簡便性から大いに活用されることが期待される。したがって、本研究成果は日常臨床において心臓病による心機能不全を評価する上で非常に有用と考えられる。