

論文の内容の要旨

論文題目

Functional analysis of retinoic acid in cardiac postnatal maturation and regeneration.

(生後心臓成熟と心臓再生におけるレチノイン酸の機能解析)

氏名 伊藤 航平

1. 序論

心臓は個体の生存にとって重要な臓器である。胎生期の心臓発生過程における小さな異常は心臓の形態形成異常と機能不全を引き起こし致死となる例が多く見られることから、その発生は精密かつ複雑に制御されていることがわかる。そして出生後も心成熟という過程を経て成体の心臓となり、さらに成体では病的な状態に応答して修復・再生といった現象が起こることがわかっている。

複雑な心臓発生過程を制御する因子はこれまでに多く報告されているが、その中でも重要な因子としてレチノイン酸が挙げられる。レチノイン酸の主要な合成酵素をコードする *Raldh2* の変異体では心室壁の菲薄化が観察されることからレチノイン酸は発生初期の心筋細胞の増殖にとって重要であると考えられている。しかしながらこの *Raldh2* の変異体は胎生致死となるために新生児期などの発生後期、そして成体における修復・再生におけるレチノイン酸の役割は十分に明らかとなっていない。また、レチノイン酸が心筋細胞の増殖を介して心臓の初期発生に対し機能することから、発生期と同様に心筋の増殖が重要な生後の心成熟や再生にも機能する可能性が考えられる。これらの背景

から、本研究ではマウス新生児期の心成熟あるいは魚類の心臓再生をモデルとして、レチノイン酸の心成熟と再生における役割を解析することでその重要性を明らかにすることを旨とした。

2. 結果

第1章：魚類心臓再生とレチノイン酸

一般に魚類のような下等脊椎動物では組織の再生能力が高いと言われており、特にゼブラフィッシュでは心臓に損傷を受けても回復し、組織が元通りに復元することが報告されている。筆者は未だ報告されていなかったメダカの心臓損傷に対する応答を解析したところ、ゼブラフィッシュの心臓では観察される線維化組織の吸収、心筋細胞の増殖、そして血管新生が損傷後のメダカ心臓ではみられず、一方で強固な ECM 形成に関わるタンパク質である periostin の損傷部での長期間の局在がみられたことから、これまでの一般的な認識に反しメダカの心臓では哺乳類等と同様に再生が起こらないことが明らかとなった。そしてゼブラフィッシュとの比較解析から、心外膜細胞では *Raldh2* の発現が双方の心臓で観察されたにも関わらず、心筋細胞に隣接する心内膜細胞において *Raldh2* の発現が行われないということが明らかになった。このことから心臓再生能力の可否と心内膜細胞におけるレチノイン酸の産生には相関があることが示唆された。先行研究によりゼブラフィッシュにおいてレチノイン酸シグナルの阻害を行うと心筋細胞増殖が阻害され、心臓再生が阻害されることが報告されていることからこの結果はその研究を裏打ちする結果となった。

第2章：新生児マウス心筋細胞の細胞増殖から細胞肥大への転換におけるレチノイン酸

哺乳類の心臓では生後すぐに酸化ストレス等の影響により、心筋細胞の細胞周期に抑制がかかり、細胞増殖できる心筋細胞の割合が劇的に減少していくことが知られている。しかしながら生後体のサイズが大きくなるにつれて心臓も大きくならなければならず、そのため個々の心筋細胞は細胞増殖の代わりに細胞肥大を行うことで心臓全体のサイズを大きくしていくことが知られている。こうした心筋細胞の増殖と肥大の転換は生後すぐから2週間程度までの間に起こるが、この転換の制御がどのような要素によって行われているかは明らかでない。筆者はこの増殖／肥大転換期において定量的 PCR によりレチノイン酸合成酵素 *Raldh2*、さらにレチノイン酸受容体 *RARB* が新生児期の心臓で一過的に発現上昇し（生後7日がピーク）、その後減少することを発見した。レチノイン酸の合成酵素活性をもつ細胞を検出する技術により、酵素活性の点でも生後同様の挙動を示すことが明らかとなり、定量的 PCR の結果を裏付けた。さらに免疫組織染色により *Raldh2* を発現しているのは心筋細胞の近傍に存在する Vimentin 陽性の線維芽細胞であることがわかった。生理活性をもつ All-Trans 型レチノイン酸を新生児期のマウスに腹腔投与したところ、心臓での心筋細胞の増殖数の増大とともに心臓の重量も増加した。これらの結果から、レチノイン酸が新生児期

の心筋の増殖を制御する能力があることが示唆され、新生児期の心成熟における心筋細胞増殖の減少を抑制していることが予想された。

3. 結論・考察

本研究により、レチノイン酸が胎生期のみならず出生後の心臓成熟や再生時においても心筋細胞の増殖を刺激することで機能を果たしていることが示された。さらにそのレチノイン酸を産生しているのは心筋近傍に存在する線維芽細胞や心内皮細胞であることもわかった。これらのことはレチノイン酸が心臓にとって生涯重要な生理活性物質であり、それはすなわち同時にレチノイン酸を産生する非心筋細胞群が心臓の形成から修復まで多岐にわたり重要な役割を行っていることを示している。しかしながら生後心臓成熟において、心筋の増殖能力が失われていく中でなぜ一過的に発現して増殖を維持する方向に働きかけるのか、それがその後の心機能に対してどのように関わるのかは未だ不明である。さらに、レチノイン酸を産生する線維芽細胞や心内皮細胞がどのように心筋増殖を誘導するのか、これも明らかではない。*In vitro*において、レチノイン酸そのものに心筋細胞肥大抑制能力はあるものの、心筋増殖誘導能力はないことが報告されているため、線維芽細胞・心内皮細胞においてオートクライン的な機構で増殖因子等を介することで間接的に心筋細胞へ増殖刺激を与えている可能性があり、具体的な因子に関しては後の詳細な解析が待たれる。