

氏名(本籍)	牛越博昭(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第1403号
学位授与日付	平成17年6月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating noncardiomyocytes
審査委員	(主査) 教授 藤原久義 (副査) 教授 竹村博文 教授 森田啓之

### 論文内容の要旨

ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子(Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor, HB-EGF)はEGFファミリーの一つである増殖因子である。その役割は血管平滑筋細胞や線維芽細胞, 角化細胞, 肝細胞の遊走効果や動脈硬化の発症, 心臓肥大の悪化である。一方皮膚の創傷治癒作用や肝臓, 小腸, 腎臓などの障害モデルに対する臓器保護作用も報告されている。さらに心血管系分野では心臓肥大のシグナルの中心的役割を担うこと, 心筋梗塞後に上昇すること, 弁形成に不可欠な因子で発生学的にも重要であることもわかってきている。そこで本研究の目的は, HB-EGFが心臓の障害モデルにおける役割, 治療因子としての可能性について, *in vitro*と*in vivo*の両方について検討し, 明らかにすることである。

#### 対象と方法

*in vitro*では新生マウスの心筋細胞および心線維芽細胞の初代培養を用いて, 2つの障害モデル, すなわちJo2抗体とアクチノマイシンDを用いたアポトーシス誘導モデルとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加する酸化ストレスモデルでのHB-EGFの保護効果をアデノウイルスベクターを用いて心筋細胞に同増殖因子を強制発現し, 検討した。コントロールとしてはLacZウイルスを用いた。また心線維芽細胞にHB-EGFを作用させ, 3日間培養し, 24時間ごとにその増殖をWST-8アッセイにて評価した。In vivoの実験では雄の日本白色ウサギの左冠動脈を30分間結紮し, 再灌流させる心筋梗塞モデルを作製し, 同時にHB-EGF及びLacZをエンコードしたアデノウイルスを各々1x10<sup>11</sup> particle, 虚血心筋周囲に直接心筋内投与し2, 4週間後, 心エコー記録後屠殺した。心臓を取り出して TTC染色とEvans blue染色にて虚血及びリスク領域の評価をおこない, その後7分割し, 10%ホルマリン固定し, HE染色, TUNEL染色, マッソントリクローム染色, 免疫組織学的染色を行い, 病理組織学的に検討した。

#### 結果

*in vitro*での2つの障害モデルにおいてHB-EGFの障害保護作用はみられなかった。しかし, HB-EGF導入細胞における有意な心筋細胞肥大が観察された。また心線維芽細胞の増殖がHB-EGF作用において促進された。心筋梗塞後のHB-EGF作用群は, 心エコー上心機能に差もなく, 梗塞面積の縮小も認められなかったが, 心臓肥大と心重量の増加がみられた。また繊維化面積の有意な拡大とボーダーゾーンの心筋細胞肥大が2, 4週間後ともに認められた。さらに梗塞領域内の病理学的検討において, 肉芽組織の増生, 増殖細胞の増加, 心線維芽細胞の増加が2, 4週後で見られ, マクロファージの増加は2週後のみにみられた。またHB-EGFの血管新生効果は, 2, 4週後もまたどの領域においても認められなかった。梗塞領域でのアポトーシスの検討ではHB-EGF群ではむしろTUNEL陽性細胞率が増加し, アポトーシスの亢進がみられた。蛍光TUNEL染色により, これらの細胞は心筋細胞でなく, 主にマクロファージであることが確認された。

## 考 察

本研究は、心臓障害モデルにおけるHB-EGFの治療の可能性について検討したが、HGFやVEGFなど他の増殖因子のような効果はみられなかった。その理由として、HB-EGFは心筋肥大をおこすが、本実験系においては血管新生の作用がみられなかったことと、心筋細胞に対して抗アポトーシス作用や抗酸化ストレス作用がみられなかったことに起因すると思われる。さらに興味深いことにHB-EGFは直接心筋細胞に作用するのみでなく、非心筋細胞に対しても作用し、線維化の亢進やマクロファージの遊走、心臓の線維芽細胞の増殖を促進することが明らかにされた。他の臓器でみられた保護作用が心臓においてみられなかったのは心筋細胞と非心筋細胞への異なった作用によると思われる。このことは、心筋梗塞後心機能の低下およびリモデリングの悪化がHB-EGFによって誘導され、逆にこの因子の阻害および制御が治療のターゲットとなると考えられた。

## 結 論

心筋梗塞後HB-EGF遺伝子治療は心筋細胞肥大、心重量の増大と共に、非心筋細胞の増殖を促進し、線維化やアポトーシスの亢進をきたした。これらの作用により最終的に心臓左室リモデリングを悪化させた。これらの知見は、心筋梗塞後リモデリングの病態解明につながると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 牛越博昭は、HB-EGFが心筋梗塞後の病態生理に関与することを明らかにした。この知見は、臨床応用可能な新しい心筋梗塞後の治療の開発につながるものであり、循環器病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating noncardiomyocytes

Laboratory Investigation 85, 862-873 (2005).