

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第648号	氏名	吉良晋太郎
審査委員会委員	主査氏名	楠原久司	
	副査氏名	宮本伸二	
	副査氏名	正木孝幸	
論文題目 Role of Angiotensin-Like Protein 2 in Atrial Fibrosis Induced by Human Epicardial Adipose Tissue: Analysis Using Organo-Culture System (ヒト心外膜脂肪組織が引き起こす心房線維化における Angptl2 の役割：器官培養法による検討)			
論文掲載雑誌名 Heart Rhythm			
論文要旨 本研究は、先行研究で開胸手術を受けた心房細動患者の左心耳の Angiotensin-Like Protein 2 (Angptl2) と心房線維化との関連を見出したことを受けて、左心房の心外膜脂肪 (EAT) から分泌される Angptl2 が心房線維化を惹起するかどうかを器官培養法等に基づき検討している。 病理解剖が行われた9症例の左心房周囲の EAT と腹部皮下脂肪 (SAT) を採取し、conditioned medium (CM) を作成した。8週齢のラットから単離した左心房を器官ごと1週間培養し、CM、ヒト recombinant Angptl2 を心外膜側から滴下負荷、器官培養したラット左心房の線維化を経時的に評価。またヒト Angptl2 の線維化惹起効果およびその中和抗体の効果を、免疫組織化学的染色、PT-PCR、Western blot 法で評価した。CM 中の Angptl2 濃度を ELISA 法で測定した。さらに、新生仔ラット線維芽細胞を培養し、Angptl2 を投与し、western blot 法でタンパク発現を評価した。 1) EAT CM は、ラット左心房心外膜側に筋線維芽細胞の増加を伴いながら線維化を惹起し、この効果は SAT CM に比べ有意に顕著であった。2) EAT CM を負荷したラット心房の collagen 1a1、3a1、MCP-1 の mRNA の発現は、SAT CM を負荷したラット心房よりも有意に高かった。3) EAT CM 内の Angptl2 濃度は SAT 群よりも有意に高かった。4) 心房細動を有する患者の EAT CM は、有さない患者のそれより心房線維化惹起作用が有意に顕著であった。5) Angptl2 5ng/ml の負荷は Vehicle に比べて有意に心外膜側の線維化面積を増加させた。6) 抗 Angptl2 抗体は、Angptl2 による心房線維化を有意に減弱させた。7) 新生仔ラット線維芽細胞において、Angptl2 は、 α -SMA、TGF- β 、MCP-1 の発現を増加させ、ERK、I κ B α 、p38 MAPK のリン酸化の増加および NF- κ B の核内移行を増加させた。 EAT CM 中の Angptl2 濃度は SAT CM よりも有意に高く、Angptl2 は心外膜脂肪が引き起こす心房線維化の key factor の一つと考えられた。Angptl2 は新生仔ラット fibroblast において、 α -SMA、TGF- β 、MCP-1 の発現増加、ERK、I κ B α 、p38 MAPK のリン酸化、NF- κ B の核内移行を引き起こすことが確認されており、ヒト心外膜脂肪から分泌された Angptl2 は心房中の線維芽細胞に作用して、ERK のリン酸化、TGF- β 1 の発現増加を通じて、線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化させると考えられた。また、NF- κ B 経路の活性化を通じて MCP-1 等のサイトカインを産生し、炎症・線維化を惹起していると考えられたとしている。 本研究は、ヒト EAT が心房に線維化を惹起する過程を in-vitro で再現、Angptl2 がその線維化の病態に重要な役割を果たしていることを示し、また、心外膜脂肪中の Angptl2 が心房細動予防における新たな治療ターゲットに成り得ることを示唆するものであり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・論	第648号	氏名	吉良晋太郎
審査委員会委員	主査氏名	橋本 久司	
	副査氏名	宮本 伸二	
	副査氏名	正木 孝幸	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本論文の目的の中心は線維化のメカニズムであるが、線維化と心房細動の関連を説明せよ。 2. Angiopoietin-like-protein2 (Angptl2) を用いるに至った経緯は何か。他の物質も試したか。 3. 剖検体からは心臓全体から心外膜脂肪を採取したのか、それとも左心房周囲のみだったのか。 4. 心外膜脂肪からmediumを採取するときに心外膜脂肪（細胞）をどのように正確に50mgと計測したのか。また、このmediumには脂肪細胞内にある物質は含まれていず、分泌されたものだけが含まれていると考えてよいのか。 5. それぞれの実験で使用したラットのn数を示せ。 6. 組織変化を見る場合、同じラット心房の変化をみていったのか、それとも別のラットの心房を使い、別の日数のデータを取っていったのか。 7. 心臓周囲脂肪の量や分布の制御機構は一般にどのようになっているのか。肥満ややせで変化するなど体脂肪との相関があるのか。他どのような状況下で変化するのか説明せよ。 8. 今回の剖検症例の基礎疾患が膠原病や血液疾患など免疫疾患が多い印象もあるが、免疫疾患の心臓周囲脂肪から分泌される炎症性サイトカインに差はないのか。もし差があればそれが今回の結果に影響を及ぼした可能性はないのか。 9. 心臓の線維化はマッソン染色等で評価されているが、心臓の炎症の評価はどうなっているか。 10. Suppl. Figure 5のAからDのそれぞれの(c)のデータは(a), (b)のデータとは別のものなのか。 11. 線維芽細胞の分布と筋線維芽細胞の分布の時間的変化はどのようになっているか。 12. 使用した抗Angptl2抗体はモノクローナル抗体か。この抗体の接着する場所が心房筋に作用する場所と違った場合、この抗体はAngptl2をブロックできない可能性があるのか。言い換えると、抗Angptl2抗体でAngptl2の作用がブロックされたのでAngptl2が関係していると言えるが、もしブロックされなかったとしてもAngptl2が関係していないとは言えないのではないか。 13. 同様に関与が示唆されているAngiotensin IIやActivin AとAngptl2との関連を説明せよ。 14. この研究の結果を受けて、今後の治療へのフィードバックはどのようなものが考えられるか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 吉良 晋太郎

論 文 題 目

Role of Angiotensin-Like Protein 2 in Atrial Fibrosis Induced by Human Epicardial Adipose Tissue: Analysis Using Organo-Culture System

(ヒト心外膜脂肪組織が引き起こす心房線維化における Angptl2 の役割：器官培養法による検討)

要 旨

諸言

心外膜脂肪が心房細動の発症および進行に密接に関連するという報告が相次いでいる。たとえば、CT/MRI で測定した心外膜脂肪の量が多いほど心房細動の新規発症が多いとする知見が確立されている。以前、我々は以前、開胸手術を受けた心房細動患者の左心耳を解析し、心外膜脂肪中のいわゆる悪玉 cytokines/chemokines の含量が心房線維化と正相関することを報告した。その中で、心外膜脂肪中の Angptl2(Angiotensin-Like Protein 2)の含量が多いほど心房線維化が進行していることを見出した。

目的

左心房の心外膜脂肪から分泌される Angptl2 が真に心房線維化を惹起するか、器官培養法を用いて検討した。

方法

大分大学医学部附属病院で病理解剖が行われた9症例の左心房周囲の心外膜脂肪 (EAT) および腹部皮下脂肪 (SAT) を速やかに採取し、conditioned medium を作成した。8週齢のラットから単離した左心房を器官ごと1週間培養し、conditioned medium、ヒト recombinant Angptl2 を1日1滴、心外膜側から滴下負荷した。器官培養したラット左心房の線維化を経時的に評価した。またヒト recombinant Angptl2 の線維化惹起効果およびその中和抗体の効果を、免疫組織化学的染色、PT-PCR、Western blot 法で評価した。Conditioned medium 中の Angptl2 濃度を ELISA 法を用いて測定した。さらに、新生仔ラット fibroblast を培養し、Angptl2 1ng/ml を投与し、western blot 法でタンパク発現を評価した。

結果

1) EAT conditioned medium は5~7日目にかけてラット左心房心外膜側に myofibroblast の増加を伴いながら線維化を惹起した。この効果は SAT conditioned medium に比べ顕著であった ($40.6 \pm 3.3\%$ vs. $18.2 \pm 1.3\%$, $P < 0.01$)。2) EAT conditioned medium を負荷したラット心房の collagen 1a1, 3a1, MCP-1 の遺伝子発現量は、SAT conditioned medium を負荷したラット心房よりも多かった (1.7 vs 4.4 $P < 0.05$, 1.4 vs 3.1 , $P < 0.01$, 2.0 vs 8.5 , $P < 0.01$)。3) Conditioned medium 内の Angptl2 濃度は EAT 群において SAT 群よりも有意に高かった (1.90 ± 0.27 vs. 0.78 ± 0.24 ng/mL, $P < 0.01$)。4) 心房細動を有する患者の EAT は、心房細動を有さない患者の EAT よりも心房線維化惹起作用が顕著であった ($52.5 \pm 3.8\%$ vs. $34.6 \pm 1.5\%$, $P < 0.01$)。4) Recombinant Angptl2 5ng/ml の負荷は Vehicle に比し、有意に心外膜側の線維化面積を増加させた ($35.4 \pm 3.9\%$ vs $20.7 \pm 2.4\%$, $P < 0.05$)。5) 抗 Angptl2 抗体は Angptl2 によって惹起される心房線維化を減弱させた (23.9 ± 2.0 vs. $34.6 \pm 2.3\%$, $P < 0.05$)。6) 新生仔ラット fibroblast において、Angptl2 は、 α -SMA、TGF- β 、MCP-1 の発現を増加させ、ERK、I κ B α 、p38 MAPK のリン酸化の増加および NF- κ B の核内移行を増加させた。

考察

本研究において、器官培養法を用い、ヒト心外膜脂肪から作成された conditioned medium がラット

心房に炎症・線維化を引き起こすことを証明した。EAT conditioned medium 中の Angptl2 濃度は SAT conditioned medium よりも有意に高く、recombinant Angptl2 がラット心房に炎症・線維化を引き起こすことを考慮すると、Angptl2 は心外膜脂肪が引き起こす心房線維化の key factor の一つと考えられた。Angptl2 は新生仔ラット fibroblast において、 α -SMA, TGF- β , MCP-1 の発現増加、ERK、I κ B α 、p38 MAPK のリン酸化、NF- κ B の核内移行を引き起こすことが確認されており、ヒト心外膜脂肪から分泌された Angptl2 は paracrine effect によって、心房中の fibroblast に作用して、ERK のリン酸化、TGF- β 1 の発現増加を通じて、fibroblast を myofibroblast へと活性化させると考えられた。また、I κ B のリン酸化、NF- κ B の核内移行といった NF- κ B 経路の活性化を通じて、MCP-1 等のサイトカインを産生し、炎症・線維化を惹起していると考えられた。

結語

器官培養法によって、ヒト EAT が心房に線維化を惹起する過程を再現できた。EAT 中の Angptl2 は線維化を顕著に惹起し、その中和抗体が線維化を抑制できたことから、心外膜脂肪中の Angptl2 は心房細胞予防における新たな治療ターゲットに成り得ることが示唆された。