氏　　名	加藤　秀之
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博乙第　2832　号
学位授与年月	平成　29 年　4 月　30 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Pathophysiology of ″upstream″ pulmonary veins in pulmonary vein stenosis; with emphasis on the potential role of endothelial-mesenchymal transition（肺静脈狭窄成立過程における endothelial-mesenchymal transition 現象の関与の可能性）
主　　査	筑波大学教授　　増本 幸二　博士（医学）
副　　査	筑波大学教授　　堀米 仁志　博士（医学）
副　　査	筑波大学教授　　柳沢 裕美　博士（医学）
副　　査	筑波大学准教授　　上杉 憲子　博士（医学）

論文の内容の要旨

加藤秀之氏の博士学位論文は、現在の治療法では治療戦略に苦慮している肺静脈狭窄という病態の成立過程において、最近その存在が言われている endothelial-mesenchymal transition 現象の関与の可能性について検討したものである。その要旨は以下の通りである。

（目的）

肺静脈狭窄は先天的にも後天的（特に肺静脈還流異常症の術後）にも起こりうる稀な病態である。治療手段として手術やカテーテル的拡張術が行われているが、その高い再発率のため予後は必ずしも良好ではない。特に左房肺静脈接合部のみならず遠位肺静脈に多発性に狭窄病変が出現した場合には有効な治療手段はなく、悪性の経過をたどる。肺静脈狭窄の発現メカニズムは未だ解明されていないが、近年肺高血圧症における血管リモデリングや心血管の線維性変化に endothelial-mesenchymal transition (EndMT)という現象が関与している可能性が示されている。EndMT とは、内皮性の形質をもつ細胞がその形質を間葉系に転換し遊走性や浸潤能を獲得する現象・過程をさすものである。本研究で著者は、肺静脈狭窄成立過程での遠位の肺静脈の組織変化のメカニズムを解明するため、動物を用いて肺静脈狭窄モデルを作成し、狭窄部よりも遠位での肺静脈の組織変化に EndMT が関わっているとの仮説を立て、それを検証することを目的としている。

（対象と方法）

対象は生後間もないヨークシャー豚 18 頭であり、著者は既存の方法を用いて肺静脈狭窄モデルを作成し、Banded、Sham、Stent の 3 つの群に分け検討した。肺静脈狭窄モデルは段階的手術で左房肺静脈接合部に絹性バンドを全周性に置くことにより作成している。具体的には、生後 1 週目に左第４肋間開胸で左肺静脈と豚特有の存在である共通下肺静脈幹にバンドを置き、その１週間後右開胸で右上肺静脈と右中肺静脈にそれぞれバンドを置き、肺静脈狭窄モデルとした（Banded 群, n = 6）。Sham 群(n = 6)では同様の開胸操作を行ったが、バンドは置かずに手術を終えている。Stent 群（n = 6）では Banded 群と同じ手術を行った後、術後 3 週目に右中肺静脈狭窄部のみに stent を挿入し拡張を行った。いずれの群も術後 3 週目と 6 週目に心臓超音波検査を行い、術後 7 週目に内頚静脈から Swan-Ganz カテーテルを挿入して血行動態を測定した後、心肺組織を採取している。特に肺静脈狭窄部から 3cm 上流の遠位肺静脈を採取し、バンド狭窄部から離れた肺静脈にどのような組織変化が起こるのかを観察している。採取した組織については免疫組織学的検査、顕微鏡的検査、High-Content Imaging を実施し、EndMT を示すマーカーの発現を分析した。さらに著者は、臨床例での検討も行っている。具体的には実臨床において繰り返す肺静脈狭窄症を患った生後 2 年以内の患児 3 名の肺静脈組織について、同様の組織学的検査を行った。

（結果）

著者は、Banded 群はいずれの個体にも肺高血圧、右室圧上昇を認め、病理学的には遠位肺静脈内膜の肥厚を認め、右室壁では筋細胞の有意な肥厚とコラーゲンの蓄積を認めた、としている。Banded 群の遠位肺静脈には、EndMT を示唆する TGF-β1 と Smad の発現の亢進、内皮性マーカーである CD31、vWF、VE-Cadherin の消失、さらには間葉系マーカーである fibronectin、α-SMA の増加も認めている。これらの変化は、肺静脈狭窄症を来した患児の肺静脈にも同様の所見が示された。また著者は、Banded 群の遠位肺静脈の同一内皮細胞内に内皮性マーカーと間葉系マーカーの同時発現も認めている。さらに著者は、Banded 群の肺静脈内皮細胞、患者から採取した肺静脈内皮細胞および Human umbilical vein endothelial cells（HUVEC）を培養し TGF-β1 で刺激した実験も行い、いずれの細胞でも同様に fibronectin、α-SMA マーカー発現の亢進を認めている。肺静脈ステントによるひとつの肺静脈狭窄の解除は Banded 群と比べて血行動態、肺高血圧、右室圧上昇に変化をもたらさなかったが、そのステント留置部の上流の肺静脈で内皮性マーカーの CD31 や vWF の再発現と fibronectin、α-SMA マーカー発現の亢進を認めている。

（考察）

著者は、Banded 群 に認められた血行動態、右室心筋の肥厚、遠位肺静脈の内膜肥厚などの所見は、臨床の肺静脈狭窄症で認められる所見に一致し、豚肺静脈モデルの病態の再現性を示した、としている。また、その遠位肺静脈で見られた TGF-β1 と Smad の発現の亢進、内皮性マーカーの消失と間葉系マーカーの増加、そして同一内皮細胞内での内皮性マーカーと間葉系マーカーの同時発現は EndMT という現象が肺静脈狭窄よりも上流の肺静脈の細胞で生じていることを示唆するものであった。各種肺静脈内皮細胞が TGF-β1 による刺激で豚肺静脈狭窄モデルと同様に fibronectin、α-SMA マーカー発現の亢進が認められた所見は、臨床で見られる肺静脈狭窄の組織学的変化をこの動物モデルが再現していることを

示し、またTGF-β1による刺激で肺静脈内皮細胞自体が間葉系の形質に転換することが示唆されている。ステント留置された遠位の肺静脈で内皮性マーカーが再出現した所見はEndMTの逆行性の変化、すなわちmesenchymal-endothelial transitionというプロセスの進行を示唆している可能性があり、上記の研究の結果からは、著者は肺静脈狭窄の上流の血管内皮が可逆性の変化を来す可能性を示しているものと考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究論文では、生後間もない豚を用いた肺静脈狭窄モデルを作成し、実際の臨床上の肺静脈狭窄の病態を再現し、その上流の肺静脈の組織学的変化も同等に再現している。著者が検討した組織マーカーの変化から、肺静脈狭窄の成立メカニズムにはEndMTが関与していることが示唆され、肺静脈狭窄の上流の内皮が可逆性の変化を取りうる可能性も示されていると推測される。これらのことから、本研究論文は、EndMTの関与という観点からの難治性の肺静脈狭窄症に対する新たな治療法確立の糸口となり得るものと考えられ、非常に有意義な臨床へとつながる研究成果と思われ、審査委員一同、博士学位論文として申し分のない内容であると結論した。

平成29年2月27日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。