

ニットの Cav3.1 と Cav3.2 の mRNA 発現が MCT 投与右心室に誘導されていることを確認し、さらに endostatin 投与が右心室単離心筋細胞の TTCC に由来する I_{CaT} 電流を有意に抑制していることをパッチクランプ法で明らかにした。さらに siRNA 法を用いて endostatin 発現を抑制することで、生存率が低下し、心エコーによる詳細な解析で右心室重量増加や右心機能低下の亢進することも見出した。組織学的には、MCT で肥大化した心筋細胞に加え、endostatin 発現抑制では心筋細胞の密度低下と間質細胞の浸潤・増生の傾向を観察した。右心室組織構造の顕著なりモデリングを見出している。PAH モデルラットで endostatin の効果を *in vivo* と *in vitro* の両方で明らかにしたこれらの知見より、本物質が TTCC 活性抑制を介して心保護的に働いている可能性を提示した。

続く第 2 章では PAH モデルラットの右心室における extracellular matrix proteins の発現動態を包括的に解析している。MCT 投与 2 wk 後の右心肥大期、及び 3 wk 後の右心不全発症期について 11 種類の extracellular matrix proteins mRNA 発現変化を RT-PCR により解析した。その結果、2 wk に増加し 3 wk には (やや) 低下する 6 種類 (SPARC, Hevin, TSP-1, TSP-2, TnC, OPN)、3wk 時も発現が亢進する 4 種類 (TSP-4, CCN1, CCN5, POSTN)、逆に一過的に減少する 1 種類 (TnN) を同定した。これらの発現動態のパターンから、心筋の肥大、並びに心機能低下に寄与する遺伝子群を推察している。蛋白質レベルでの検討、並びに個々の遺伝子産物の寄与については、第 4 章で重点的に解析した POSTN を除き、今後の課題として残されるが、発現動態についてのこれらの知見は PAH 誘発右心不全の発症・進展機構の解明において重要な基礎的情報であると判断される。

第 3 章では心不全の発症・進展における線維芽細胞の役割に焦点を置き、右心室線維芽細胞 (RVFb) の形質転換とその調節機構を検討してい

る。MCT 投与した RVFb では、1) 筋線維芽細胞マーカーの α SMA 及び collagen type I の発現減少、2) 細胞増殖と遊走の増加、3) MMP-9 の発現・分泌・酵素活性の亢進、4) 3 種類の蛋白質キナーゼ (CaMKII, JNK, ERK1/2) のリン酸化、5) Ca 動員機構 (SOCE) の亢進と Orai1 と STIM1 発現増加、が起きることを見出した。続いて4) の活性化の判明した酵素群の特異的阻害薬を用いて、MMP-9 活性化と細胞増殖、遊走能に及ぼす影響を検討し、MCT 投与に起因して RVFb に発動している細胞内シグナル経路の一端を明らかにした。この一連の結果から MCT-RVFb が細胞増殖、遊走能の亢進した炎症性形質を示すように転換していると結論付けている。

最後の第4章では、MCT 誘導性 PAH モデルラットの RVFb の iNOS 発現と NO 産生を亢進し、RVFb 由来 NO が心筋細胞の L 型 Ca チャネル (LTCC) 活性抑制を介して心収縮機能の障害に関わるとの仮説を検証している。この作業仮説において、第2章で発現増加の確認された蛋白質群の中から POSTN を選び、その組換え蛋白質の合成から始め、RVFb への効果の検討を関連付けて行っている。その結果、1) MCT 投与ラットの右心室心筋細胞における POSTN タンパク質発現と間質の線維芽細胞における iNOS タンパク質発現が有意な亢進と、2) MCT-RVFb では iNOS 発現が有意に亢進を示した。本実験での iNOS の Western blot と免疫組織学の結果には齟齬が生じているが、これは解決されていない。さらに POSTN 組換えタンパク質の投与は RVFb の iNOS 発現と NO 産生を亢進し、その培養上清は、H9c2 心筋芽細胞において LTCC を介した Ca^{2+} 流入を有意に抑制することを見出した。培養上清中の因子について生化学的同定には至っていないが、この効果は NOS 阻害薬の L-NAME で消失するという証拠を示した。これらの一連の結果から、PAH モデルラットの右心室において発現が亢進した

POSTN は、RVFb の iNOS 発現と NO 産生を亢進することで心筋細胞の LTCC 活性を抑制し、心収縮機能を障害する可能性が考えられると指摘した。

第 1 章の endostatin や第 4 章の POSTN についての作用機序、すなわち標的物質に関してはまだ推測の域を出ず、これら ECM 関連や matricellular proteins の標的物質の同定をもってさらに飛躍的に理解が進むと共に、作用効果の評価も信頼性が増すと思われる。しかし PAH のラットモデルに関して本研究で明らかにされた、関係する分子と分子間、並びに細胞間相互作用に関する数多くの知見は、ECM 関連タンパク質と心線維芽細胞の機能的意義、そして心臓の病態生理学の理解に大きく貢献すると考えられる。と同時に、それらを標的とした PAH 誘発右心不全の新規治療法の開発に大きなヒントを与えることが大いに期待される。

本論文では、遺伝子組み換えによる蛋白質の発現を含め、Western blot、quantitative RT-PCR、siRNA 法、等の分子レベルでの解析、細胞培養系や Boyden-chamber 法、パッチクランプ法による細胞レベルでの解析、さらに組織学、免疫組織化学での解析、個体レベルでの心機能、生存率までの解析を独りで遂行している。多様に深化してゆく生命科学の様々な実験技術をマスターし、それを基準的実験動物モデルに適用して心不全の病態発生・進展メカニズムをオーソドックスに解析していることは非常に高く評価される。

本博士論文を構成する各章は、すでに以下の原著論文として筆頭著者にて発表されている。

第 1 章 : Imoto K et al. Pflugers Arch 2016;468(7):1259-70. doi: 10.1007/s00424-016-1810-0.

(本論文は、2016 年 12 月にコスモバイオ学術論文賞を受賞)

第 2 章 : Imoto K et al. J Vet Med Sci 2017;79(6):1096-1102. doi:
10.1292/jvms.17-0053.

第 3 章 : Imoto K et al. Pflugers Arch 2018;470(9):1405-1417. doi:
10.1007/s00424-018-2158-4.

第 4 章 : Imoto K et al. Int J Mol Sci 2018;20(1). pii: E62. doi:
10.3390/ijms20010062.

学会においては、すでに国内学会で 8 報、国際学会で 2 報の発表を行っている。2018 年 4 月からは（～2020 年 3 月）、日本学術振興会特別研究員（DC2・農学）として採用され、「右心不全発症・進展における extracellular matrix proteins の役割解明」の研究課題に取り組んでいる。これらの業績は、同氏が論文作成能力、並びに研究プレゼンテーション能力を十分に有していることの証しであると判断される。

同氏は現在北里大学獣医学研究科博士課程 3 年生であるが、以上の総合的観点から、基礎獣医学における十分な研究業績と研究遂行能力、並びに学力を十分に有していると判断され、博士（獣医学）を授与するに相当すると審査員一同で判断した。