

心筋梗塞時における炎症応答を制御する分子に関する研究

渡, 健治

<https://hdl.handle.net/2324/1654805>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

心筋梗塞時における炎症応答を制御する分子に関する研究

薬効安全性学分野 3PS13018Y 渡 健治

【序論】

心筋梗塞は冠動脈が閉塞することで生じる虚血性疾患の1つである。心筋梗塞時には、酸素や栄養が補給されていた心筋細胞が、冠動脈の閉塞によって大量に壊死する。壊死した細胞からは細胞内容物が漏出し、強い炎症応答が引き起こされる。従って、梗塞部位における貪食細胞による死細胞の速やかな貪食・除去は、心筋梗塞後の病態進行の抑制に大きく貢献している。心筋梗塞後にはマクロファージなどの血球系細胞が梗塞部位へ浸潤するため、これらの細胞のみが死細胞の除去を担うと考えられてきた。しかしながら、心筋梗塞時に生じる死細胞の除去を担う細胞が何であるか、そして、心筋梗塞時に死細胞がどのような分子メカニズムを介して貪食されるかについては、未だ不明な点が多く存在する。

心筋梗塞時には大量に死細胞が出現するため、マクロファージ以外にも死細胞の除去を担う細胞が存在する可能性が考えられた。そこで、心筋梗塞時に多く観察される筋線維芽細胞に着目した。筋線維芽細胞は、組織損傷時に常在性の線維芽細胞をはじめとした様々な細胞が分化することにより生じる細胞群である。筋線維芽細胞は、高いコラーゲンの産生能を有し、梗塞部位における線維化を担う主要な細胞として知られてきた。しかしながら、筋線維芽細胞が組織の線維化以外にどのような応答に関わるかについては、ほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、筋線維芽細胞が心筋梗塞時に死細胞を貪食する可能性について検討した。

【方法】

心筋梗塞モデルマウスの作製

8-10週齢の雄性 C57BL/6J 野生型 (WT) マウスと Milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFG-E8) ノックアウト (KO) マウスの左冠動脈前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルマウスとした。

マウス筋線維芽細胞を用いた死細胞の貪食の評価

マウス筋線維芽細胞は、心筋梗塞処置後3日目のマウス心臓より単離し、培養した。マウス胸腺より調製した胸腺細胞あるいは L929 細胞を CMFDA で蛍光標識し、その後、それぞれの細胞にアポトーシスあるいはネクロプトーシスを誘導した。それら死細胞を筋線維芽細胞と共培養させることで、死細胞の貪食を行わせた。その後、貪食されなかった死細胞を除去し、位相差顕微鏡による撮像を行い、貪食細胞による蛍光の取り込みを貪食能として評価した。

免疫組織染色

心筋梗塞処置後3日目のマウスより心臓を採取し、凍結切片を作製した。その後、各種タンパク質に対する抗体を反応させることで切片を染色し、共焦点顕微鏡による撮像を行った。

MFG-E8 タンパク質の精製および心筋内への投与

MFG-E8 タンパク質は分泌タンパク質であることから、MFG-E8 遺伝子の C 末端に Flag タグを付けて哺乳類培養細胞に過剰発現させ、培養上清から anti-Flag 抗体を用いて精製した。精製した MFG-E8 (160 ng/ μ L)は、マウスの左冠動脈前下行枝の結紮部の周辺2カ所に 29 x G 針付きシリンジで 10 μ L ずつ投与した。

【結果・考察】

筋線維芽細胞は梗塞部位に出現する死細胞を貪食する

筋線維芽細胞による死細胞の貪食を *ex vivo* で評価するために、心筋梗塞処置を施したマウス心臓から筋線維芽細胞を単離し、CMFDA で蛍光標識したアポトーシス胸腺細胞と共培養した。その結果、筋線維芽細胞においてアポトーシス細胞の取り込みが観察された (図 1A)。さらに、マウス線維芽細胞株

である L929 細胞にネクロプトーシスを誘導し、ネクロプトーシスを起こした細胞と筋線維芽細胞とを同様に共培養させたところ、筋線維芽細胞はネクロプトーシス細胞も貪食した (図 1B)。

Ex vivo で筋線維芽細胞が死細胞を貪食していたことから、次に、*in vivo* で筋線維芽細胞による死細胞の貪食を評価した。心筋梗塞処置後 3 日目の心臓から作製した凍結切片において TUNEL 染色によりアポトーシス細胞を蛍光標識し、マクロファージのマーカ分子である CD68

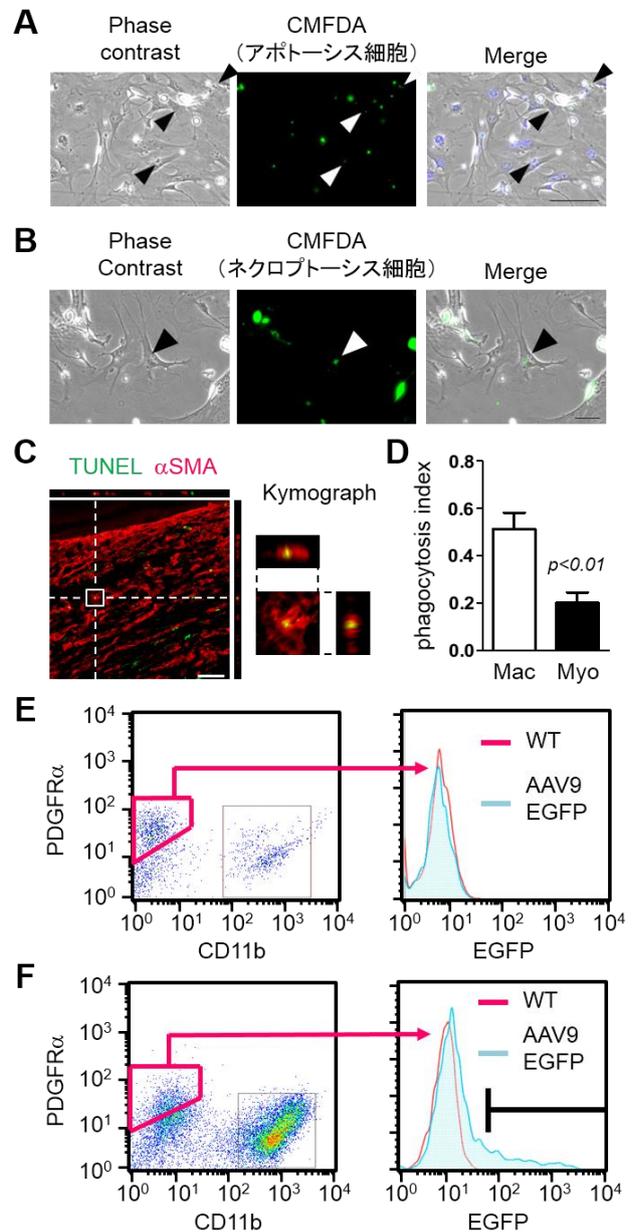
もしくは筋線維芽細胞のマーカ分子である α SMA と共染色したところ、アポトーシス細胞を取り込んでいるマクロファージおよび筋線維芽細胞が観察された (図 1C)。

そこで、マクロファージあるいは筋線維芽細胞によって取り込まれているアポトーシス細胞の数を比較したところ、筋線維芽細胞はマクロファージの 5 分の 2 程度の貪食能を有することが明らかになった (図 1D)。

さらに、筋線維芽細胞がどの細胞を貪食するかを明らかにするために、心筋細胞特異的プロモーターである cardiac troponin T (cTnT) のプロモーターの下流に EGFP の配列を組み込んだアデノ随伴ウイルス

を作製し、これを WT マウスに感染させ、心筋細胞のみを蛍光標識した。実際、フローサイトメーターを用いて EGFP の発現を調べたところ、正常なマウス心臓の線維芽細胞においては EGFP の発現が一切検出されなかった (図 1E)。

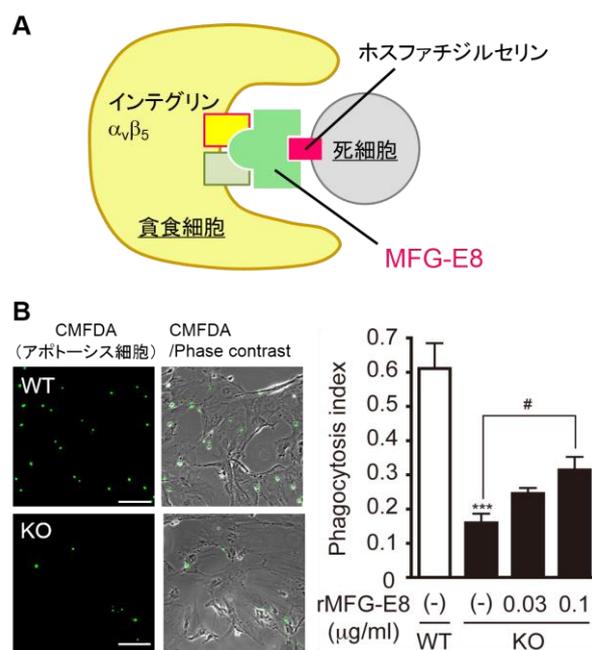
その一方で、心筋梗塞処置を施したマウス心臓の線維芽細胞においては EGFP の発現が認められた (図 1F)。以上の結果から、筋線維芽細胞は心筋梗塞時において壊死した心筋細胞を貪食することが明らかになった。



[図 1] (A and B) *Ex vivo* における筋線維芽細胞によるアポトーシス細胞 (A) およびネクロプトーシス細胞 (B) の貪食 (C) *In vivo* における筋線維芽細胞によるアポトーシス細胞の貪食 (D) マクロファージ (Mac) および筋線維芽細胞 (Myo) における死細胞の貪食能 (E and F) cTnT-EGFP を組み込んだアデノ随伴ウイルスを感染させたマウス心臓の線維芽細胞における EGFP の発現量 (E) 正常マウス心臓から単離した細胞における解析結果 (F) 心筋梗塞処置後 3 日目の心臓から単離した細胞における解析結果

筋線維芽細胞は MFG-E8 を介して死細胞を貪食する

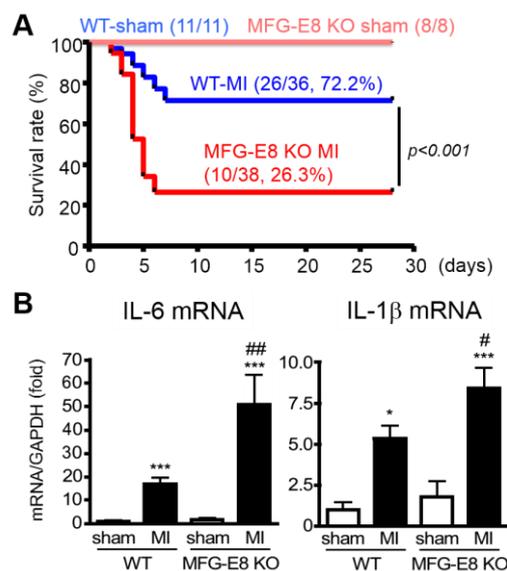
次に、筋線維芽細胞による死細胞の貪食を促進する分子を明らかにしようとした。死細胞の貪食に関わることが報告されている様々な分子の発現量を心筋梗塞処置後 3 日目の心臓で調べたところ、MFG-E8 および MFG-E8 の受容体であるインテグリン $\alpha_v\beta_5$ の発現量が、梗塞部位において上昇していることを見出した。MFG-E8 は、死細胞の表面に提示されているホスファチジルセリンと貪食細胞表面に発現しているインテグリン $\alpha_v\beta_5$ とを橋渡しすることで、貪食細胞による死細胞の貪食を促進する分子である (図 2A)。以上のことから、筋線維芽細胞が MFG-E8 依存的に死細胞を貪食している可能性が考えられた。そこでこの可能性を検証するために、心筋梗塞処置後 3 日目の WT マウスおよび MFG-E8 KO マウスの心臓から筋線維芽細胞を単離し、アポトーシス細胞の貪食能を比較した。その結果、MFG-E8 KO マウス由来の筋線維芽細胞において貪食能が顕著に低下していることを見出した (図 2B)。さらに、この貪食能の低下は、MFG-E8 タンパク質を処置することで有意に改善した (図 2B)。



[図 2] (A) MFG-E8 を介した死細胞の貪食メカニズム (B) WT および MFG-E8 KO マウス由来の筋線維芽細胞におけるアポトーシス細胞の貪食能の比較
***: $p < 0.001$ vs WT, #: $p < 0.05$

MFG-E8 は心筋梗塞後の病態に対し保護的に働く

心筋梗塞時における MFG-E8 の役割を明らかにするため、MFG-E8 KO マウスに心筋梗塞処置を施し、その病態を WT マウスと比較した。まず、心筋梗塞処置後 28 日目までの生存率を調べたところ、MFG-E8 KO マウスは WT マウスに比べて、生存率が顕著に低下していた (図 3A)。このことから、MFG-E8 は心筋梗塞後の病態に対して保護的に働く分子であると考えられた。生存率の顕著な低下は心筋梗塞処置後 3-5 日目に観察されたことから、心筋梗塞後 3 日目における病態を比較することにした。梗塞処置後 3 日目の心臓切片に対して TUNEL 染色を行い、アポトーシス細胞の数を調べたところ、アポトーシス細胞数は WT マウスに比べて MFG-E8 KO マウスの心臓切片において有意に増加していた。さらに、心筋梗塞処置後 3 日目の WT マウスおよび MFG-E8 KO マウスの心臓において炎症性サイトカインの発現量をリアルタイム RT-PCR 法により調べたところ、MFG-E8 KO マウスにおいて IL-6 や IL-1 β といった様々な炎症性サイトカ

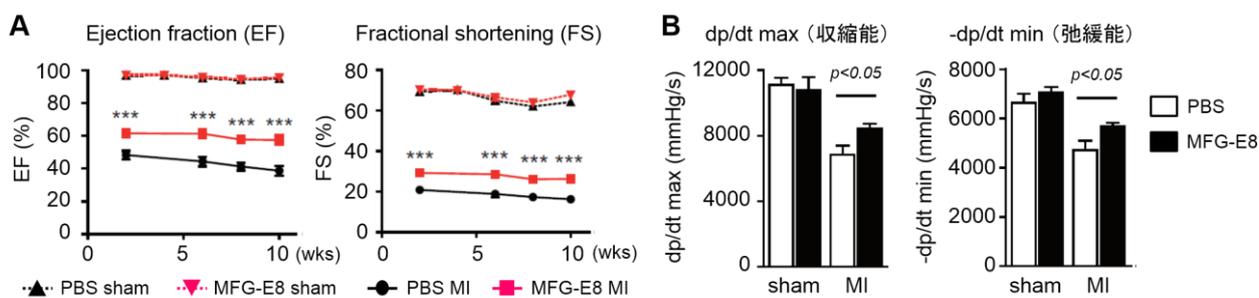


[図 3] (A) 心筋梗塞後の生存率の比較 (B) 心筋梗塞処置後 3 日目における炎症性サイトカインの発現量の比較
MI: Myocardial infarction. *: $p < 0.05$ vs WT-sham ***: $p < 0.001$ vs WT-sham, #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$

インの発現量が有意に上昇していた (図 3B)。以上の結果から、MFG-E8 を欠損すると心筋梗塞後の死細胞の貪食が速やかに行われないうえに死細胞が残存し、その結果、死細胞から内容物が流出して、炎症応答が増悪し、心筋梗塞後の病態が悪化すると考えられた。

MFG-E8 タンパク質を心筋梗塞処置後の心臓に投与することで心筋梗塞後の心機能が改善される

MFG-E8 は心筋梗塞後の病態に対して保護的に働く分子であることが明らかになった。MFG-E8 は分泌タンパク質であることから生体内への投与が可能である。そこで、心筋梗塞後の心臓に MFG-E8 を投与することにより、心筋梗塞後の病態が改善する可能性を検討した。精製した MFG-E8 タンパク質を心筋梗塞処置直後のマウス心臓の梗塞部位周辺に心筋内投与し、心筋梗塞処置後 2 週目、6 週目、8 週目、および 10 週目において心機能を心エコー法により形態学的に測定したところ、MFG-E8 投与により心筋梗塞後の心機能の悪化が有意に改善していた (図 4A)。また、心筋梗塞処置後 10 週目においては、心カテーテル法により血行動態学的に心機能を測定したところ、MFG-E8 投与により梗塞処置による心臓の収縮能および拡張能の低下の程度が改善された (図 4B)。さらに、心筋梗塞処置後 10 週目における心臓の重量を測定したところ、MFG-E8 投与により心重量が有意に低下していた。以上の結果から、MFG-E8 投与により心筋梗塞後の病態が改善することが明らかになった。



【図 4】 (A) 心エコー法による心機能の計測 ***: $p < 0.001$ vs PBS MI. (B) 心カテーテル法による心機能の計測

【まとめ】

本研究では、これまで組織の線維化のみを担うと考えられてきた筋線維芽細胞が、心筋梗塞時に生じる死細胞の貪食を担うことを初めて明らかにした。さらに、この筋線維芽細胞による死細胞の貪食が、MFG-E8 に依存していることも見出した。これまで、心筋梗塞時に生じる死細胞の貪食を担う細胞は、梗塞部位へ浸潤してくるマクロファージなどの血球系細胞のみであると考えられてきた。そのような背景から、本研究は、血球系細胞以外の細胞が心筋梗塞時の死細胞の貪食・除去に大きく貢献することを見出した、意義深い研究であると考えている。さらに、MFG-E8 を局所投与することにより、心筋梗塞後の心臓病態が改善することも見出した。これまで臨床において死細胞の除去に焦点を当てた治療法は存在しない。従って、本研究で得られた成果が、心筋梗塞のみならず様々な虚血性疾患の新規治療法の開発に繋がることを期待する。

【主な発表論文】

1. **Watari K**, Nakaya M, ..., Kurose H., *PLoS One* (2013) 8:e68351
2. **Watari K**, Nakaya M, Kurose H., *J Mol Signal* (2014) 9:1
3. **渡 健治**, 大場 悠生, 仲矢 道雄. 日本応用酵素協会誌 (2014) 49:29-36
4. Ohba Y, Nakaya M, **Watari K**, Nagasaka A, Kurose H., *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 461:307-13