九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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）

（様式９－３）

氏　　名	渡　健治
論　文　名	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
論文調査委員	主　査　黒瀬　等 副　査　津田　誠 副　査　小柳　悟 副　査　仲矢　道雄

論文審査の結果の要旨

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。

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、死細胞と共培養した。その結果、筋線維芽細胞においてアポトーシス細胞およびネクロプトーシス細胞の取り込みが観察された。さらに、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、筋線維芽細胞のマーカー分子である αSMA 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筋線維芽細胞が *in vivo* においても観察された。さらに、筋線維芽細胞がどの細胞を貪食するかを検討したところ、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。

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 αvβ5 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。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 日目の野生型（WT）マウスおよび MFG-E8 ノックアウト（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。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。

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。また、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-1βといった様々な炎症性サイトカインの発現量が有意に上昇していた。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ために死細胞が残存し、その結果、死細胞から内容物が漏出して、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 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、心機能を心エコー法、心カテーテル法、および心重量の測定により評価したところ、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。

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られる。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あ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が期待される。

これらのことから、申請者は博士（創薬科学）の学位を取得するにふさわしいと判断した。