

# 心筋梗塞時における筋線維芽細胞の役割解明

九州大学大学院 薬学研究院 薬効安全性学分野

仲矢 道雄

## 1. はじめに 目的 背景

心筋梗塞は心臓に栄養や酸素を供給する冠動脈が詰まり、その先に血流が流れず、心臓の一部の筋肉が死んでしまう（壊死）病気である。心筋梗塞を含めた虚血性心疾患は、欧米では死因の第一位を占め、わが国でも、がんに次ぎ死因の第二位を占めている。さらに高齢化社会の到来に伴い、今後はますます患者数が増加するものと考えられる。このような事情から心筋梗塞に対する画期的、効果的な治療法の確立が早急に望まれている。

心筋梗塞時には、梗塞領域周辺において多くの壊死細胞が生じる。これら死細胞はマクロファージなどの貪食細胞によって速やかに除去される。この速やかな貪食は、死細胞からの内容物の流出による炎症反応を抑制するなど心筋梗塞時の病態形成に極めて重要な役割を果たしている。しかしながら、心筋梗塞時における死細胞貪食の分子メカニズムに関する研究は、これまで国内外においてほとんどなかった。私は以前より、アポトーシス細胞の貪食、除去に関する研究を行っている [Nakaya M et al., *JBC*, 2006; Nakaya M et al., *PNAS*, 2008; Nakaya M et al., *Nat Commun*, 2013]。

そこで我々は心筋梗塞 (Myocardial Infarction: MI) モデル処置 (左冠動脈前下後枝の結紮) 前後のマウス心臓を用いたマイクロアレイ解析により、処置後に発現が増加する貪食関連分子を調べた。その結果、Milk Fat Globule-EGF factor 8 (MFG-E8) という分子の発現量が処置後4日目をピークに顕著に上昇する事を見出した (正常時の心臓にMFG-E8は発現していない)。MFG-E8とは生体内のいくつかの組織マクロファージに発現し、細胞がアポトーシスを起こすと、その表面上に露出されるPhosphatidylserineと貪食細胞表面上のintegrin  $\alpha\beta3$ あるいは $\alpha\beta5$ との橋渡しをして、貪食を促進する分子である (Hanayama R et al., *Nature*, 2002)。

MI後の梗塞部位においては壊死した細胞によって炎症が引き起こされ、好中球やマクロファージなどがリクルートされてくる。一方で、壊死した細胞部は筋線維芽細胞という細胞によってコラーゲンなどが産生され、線維化されて補填される。この筋線維芽細胞は組織が正常な時にはほとんど存在せず、炎症が起こると初めて種々の細胞が分化することにより生じる。筋線維芽細胞は組織の線維化を担う事が知られているが、貪食能を持つことはこれまで報告されていない。そこで次に、MI後に現れるMFG-E8産生細胞を検討した所、意外なことに梗塞後の心臓においてMFG-E8を産生するのは好中球やマクロファージなどではなく、この筋線維芽細胞のみであった。MFG-E8は貪食促進分子である。そこで次に、このMFG-E8を産生する筋線維芽細胞がアポトーシス細胞を貪食するかについて検討した。その結果、筋線維芽細胞がアポトーシス細胞を効率よく貪食することを初めて見出した。

そこで本研究では、MFG-E8およびその産生細胞が心筋梗塞時における死細胞の貪食および梗塞後の心臓の病態にどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

心筋梗塞 (Myocardial Infarction: MI) モデルマウスの作成 : 8~10週齢のC57Bl/6雄性野生型 (WT) マウスとMFG-E8ノックアウト (KO) 雄性マウスの左冠動脈前下降枝を結紮した。

死亡率の評価 : カプランマイヤー法により評価を行った。また、死因が心破裂であることを確認した。

筋線維芽細胞の単離 : 心筋梗塞処置後3日目のマウスから心臓を摘出し、コラゲナーゼとトリプシンを用いて消化し、回収した細胞をプレートへまいた。その後、プレートへの接着を指標にして筋線維芽細胞を回収した。

アポトーシス細胞の調製と貪食実験 : 4週齢のC57Bl/6 WTマウスから胸腺細胞を回収し、CMFDAを用

いて蛍光標識後、Dexamethasone (10 $\mu$ M)の処理 (5時間) によってアポトーシスを誘導した。その後、スライドガラスにまいた筋線維芽細胞に調製したアポトーシス細胞を貪食させ、取り込まれなかったアポトーシス細胞を洗浄除去した後、顕微鏡下で蛍光の取り込みを評価した。

MI処置後の心臓における線維化あるいはアポトーシス細胞の評価：心筋梗塞処置後3日目の心臓切片をcollagen type I/IIIを認識するピクロシリウスレッドあるいはTUNEL法によって染色し、梗塞部位におけるコラーゲン蓄積量あるいはアポトーシス細胞量を定量した。

MI処置後の心臓あるいはアポトーシス細胞を貪食した筋線維芽細胞における炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン量の評価：心筋梗塞処置後3日目の心臓あるいはアポトーシス細胞を貪食させた筋線維芽細胞からRNAを回収して、IL-6等の炎症に関わる遺伝子あるいはTGF- $\beta$ 等の抗炎症性遺伝子の発現変化を定量的RT-PCR法を用いて評価した。

### 3. 結果 研究成果

#### (1) 心筋梗塞モデル処置後のMFG-E8KOマウスの異常解析。

申請者らはこれまでにWTマウスとMFG-E8 ノックアウト (KO) マウスに心筋梗塞処置を施すと、処置後の生存率がMFG-E8 KOマウスでは著しく低下すること《WTマウス (N=36) ;71. 4%、MFG-E8-KO マウス (N=36) ;26. 3%》を見出していた。実際、ピクロシリウスレッド染色によって心筋梗塞後の心臓の線維化を評価した所、MFG-E8KOマウスにおいて心臓の線維化の顕著な低下が認められ、この線維化の顕著な減少が心破裂を引き越し、MI後の生存率の低下へと導くと考えられた。これらの結果から、MFG-E8はMI後の心臓に対して保護的に働く分子であると考えられた。

WTマウスから単離した筋線維芽細胞が貪食能を保持していた事から、WTマウス、MFG-E8KOマウスから筋線維芽細胞を単離し、その貪食能を比較した。その結果、MFG-E8KOマウス由来の筋線維芽細胞の貪食能は、野生型マウス由来の筋線維芽細胞の貪食能に比べ、顕著に低下していた。しかも、その低下した貪食能は、MFG-E8タンパク質を貪食実験系に添加する事により、量依存的に回復した。この実験結果に対応し、筋線維芽細胞はMFG-E8と結合するintegrin $\alpha$ v $\beta$ 5を発現していた。これらの結果から、筋線維芽細胞はMFG-E8をオートクライン的に産生し、死細胞を貪食する事が明らかとなった。

心筋梗塞発生直後から梗塞部周辺においては

「細胞の壊死 $\Rightarrow$ 壊死細胞の内容物流出等による炎症の発生 $\Rightarrow$ 免疫細胞の浸潤 $\Rightarrow$ 筋線維芽細胞による梗塞部の線維化」など様々なイベントが秩序だてて次々に起こる。

一方で我々は、MFG-E8の発現量がMI処置後2-4日目にピークを迎えることを見出している。そこで、MFG-E8KOマウスとWTマウスにMI処置を施し、処置後3日目の心臓を摘出し、MFG-E8の欠損による梗塞後の病態変化を評価した。

まず、TUNEL染色によって心筋梗塞後の心臓におけるアポトーシス細胞の量を評価した所、WTマウスに比べ、MFG-E8KOマウスにおいてTUNEL陽性の細胞数が増加していた。この結果から、MFG-E8KOマウスにおいてはアポトーシス細胞が貪食されずに残存していると考えられた。そこで次に、心筋梗塞処置後3日目の梗塞部位における炎症の程度を比較した所、WTマウスに比べ、MFG-E8KOマウスにおいては、炎症が増悪していた。これらの結果から、MFG-E8KOマウスにおいては、貪食が不十分なため、死細胞が残存し、それら細胞から内容物が流出して、過剰な炎症を誘導するものと考えられた。

#### (2) 筋線維芽細胞が貪食後に抗炎症性の性質を帯びるかについての検討。

マクロファージはアポトーシス細胞を貪食するとTGF- $\beta$ などの抗炎症性サイトカインを放出し、逆にIL-6やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生しにくくなる。この性質はアポトーシス細胞が多く生じる、種々の炎症環境下での炎症の収束に大きく貢献している。筋線維芽細胞はマクロファージと同様、効率的にアポトーシス細胞を貪食し、かつ種々のサイトカインの産生能を持つ。そこで、この筋線維芽細胞がマクロファージと同様、貪食によって抗炎症性の性質を獲得し、梗塞領域の炎症収束に寄与するかについて検討した。具体的には、MI処置を施した心臓から筋線維芽細胞を単離し、その細胞にアポトーシス細胞を加えて貪食させ、炎症性 (IL-6) ・抗炎症性サイトカイン (TGF- $\beta$ ) の産生量をリアルタイムRT-PCR法により測定した。その結果、筋線維芽細胞はアポトーシス細胞を貪食すると、IL-6の産生量が減少し、逆にTGF- $\beta$ の産生量が増加することを見出した。すなわち、筋線維芽細胞もマクロファージと同様、アポトーシス細胞を貪食する事によって、抗炎症性の性質を獲得する事が明らかとなった。

#### 4. 考察 まとめ

本研究によって、MFG-E8が心筋梗塞後の死細胞を除去することで、心筋梗塞に対し保護的に働く重要な因子であることが明らかとなった。また、心筋梗塞時に出現する筋線維芽細胞が死細胞の食食能を持つことを初めて見出した。さらに、筋線維芽細胞がマクロファージと同様に死細胞を食食する事によって、抗炎症性の性質を帯びる事を見出した。すなわち、筋線維芽細胞はこれまで考えられていた以上に組織損傷部において炎症を沈静化する役割を担うと考えられる。

今後、筋線維芽細胞と損傷部にリクルートされてくるマクロファージが損傷部における死細胞の食食にそれぞれどれくらい貢献しているのかについて比較検討したいと考えている。また、MFG-E8が分泌タンパク質である事から、その投与によって心筋梗塞後の病態が改善するかについても検討していきたいと考えている。

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深謝申し上げます。

#### 5. 発表論文、参考文献

##### 【発表論文】

1. Riris Jenie, Motoki Nishimura, Mika Fujino, **Michio Nakaya**, Norikazu Mizuno, Kenji Tago, Hitoshi Kurose & Hiroshi Itoh.  
Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: Involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal  
*Genes to Cells* 18, 1095-1106 (2013)
2. Kenji Watari, **Michio Nakaya**, & Hitoshi Kurose.  
Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases.  
*J. Mol. Signal.* 9, 1-9 (2014)

##### 【参考文献】

3. **Michio Nakaya**, Mitsuru Tajima, Hidetaka Kosako, Takeo Nakaya, Akiko Hashimoto, Kenji Watari, Hiroaki Nishihara, Mina Ohba, Shiori Komiya, Naoki Tani, Motohiro Nishida, Hisaaki Taniguchi, Yoji Sato, Mitsuru Matsumoto, Makoto Tsuda, Masahiko Kuroda, Kazuhide Inoue & Hitoshi Kurose  
GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance.  
*Nat. Commun.* 4, 1532 (2013)
4. **Michio Nakaya**, Masahiro Kitano, Michiyuki Matsuda, & Shigekazu Nagata.  
Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9198-9203 (2008)
5. **Michio Nakaya**, Masato Tanaka, Yasutaka Okabe, Rikinari Hanayama, & Shigekazu Nagata.  
Opposite effects of rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages.  
*J. Biol. Chem.* 281, 8836-8842 (2006)
6. Rikinari Hanayama, Masato Tanaka, Keiko Miwa, Azusa Shinohara, Akihiro Iwamatsu, & Shigekazu Nagata.  
Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.  
*Nature* 417, 182-187 (2002)