

## 86. 循環器疾患における転写因子 Runx2 の役割

中山 博之

Key words: 心筋梗塞, リモデリング, Runx2,  
筋線維芽細胞, マクロファージ

大阪大学 大学院薬学研究科  
臨床薬効解析学分野

### 緒 言

慢性心不全に代表される心血管疾患は、先進諸国において死亡原因の第一位を占める。中でも、心筋梗塞後に発症する慢性心不全は、梗塞後リモデリングと呼ばれる左心室内腔の拡大を伴い、予後が極めて不良である。心筋梗塞領域において心筋細胞は壊死に伴い減少/消失し、炎症細胞の浸潤が起こると同時に、新たに筋線維芽細胞が出現する。筋線維芽細胞は線維芽細胞の形態をとりつつ平滑筋アクチン遺伝子に代表される収縮タンパク質の遺伝子発現を特徴とする細胞集団である。筋線維芽細胞は皮膚などの創傷治癒時に重要な役割を果たす事が知られているが、正常心には存在せず心筋梗塞後に出現し collagen 等の細胞外マトリックス蛋白質等を分泌することにより、心筋壊死部の線維化や構造維持に寄与すると考えられている。しかしながら、心筋梗塞後期においては線維化を促進する事により病態の悪化に寄与するとの報告も多く、筋線維芽細胞の病態的意義の解明は、心筋梗塞後心不全の発症を予防していく上で重要である。Runx2 は、骨形成における主要な転写因子であり、その遺伝子欠失マウスは、新生仔期に頭蓋骨形成不全等により死亡する事が報告されている。日本で行われたヒト心不全臨床研究において、予後と相関する遺伝子多型の Runx2 による転写制御の関与が示唆されている<sup>1)</sup>。この事は、心疾患における骨転写因子 Runx2 の重要な役割を示唆しているが、その病態的意義は、未だ明らかではない。近年、骨芽細胞における主要転写因子として報告された Runx2 が血管平滑筋細胞に発現し石灰化形成に寄与する事が報告され<sup>2)</sup>、循環器領域におけるその役割が明らかになりつつある。かかる背景を鑑み我々は、心筋梗塞において Runx2 の発現を解析すると共に、その役割を明らかにすべく組織特異的 Runx2 欠損マウスを作製した。

### 方 法

#### 1. 心筋梗塞領域における Runx2 発現解析

- 1) C57B6 野生型マウスにおいて、左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作製した。心筋梗塞後の Runx2 の発現を、時間経過を追って realtime RT-PCR 法及びウェスタンブロットにより検討した。
- 2) 心筋梗塞後の Runx2 の筋線維芽細胞における発現を、抗 Runx2 抗体、抗 periostin 抗体及び抗  $\alpha$  SMA 抗体を用いた免疫染色により検討した。
- 3) 心筋梗塞後 Runx2 の免疫細胞における発現を、抗 Runx2 抗体と抗 F4/80 抗体を用いた免疫染色により検討した。
- 4) 心筋梗塞領域より浮遊細胞を調製し抗 F4/80 抗体を用いた FACS によりマクロファージを含む免疫細胞群を抽出した。ウェスタンブロットによりマウス心筋梗塞における抗 F4/80 陽性細胞群の Runx2 発現を検討した。

#### 2. 組織特異的 Runx2 欠損マウスの確立と筋線維芽細胞における Runx2 欠損モデルの作製

組織特異的遺伝子欠失を可能とする Runx2 flox マウスを独自に作製した。作製したマウスを用いて、組織特異的 Cre 発現マウスと交配を行い、組織特異的 Runx2 欠損マウスの作製を試みた。

## 結果および考察

### 1. 心筋梗塞領域における Runx2 発現細胞の同定

心筋梗塞における Runx2 の発現をマウス心筋梗塞モデルを用いて検討した。C57B6 野生型マウスにおける心筋梗塞作製 1 日後, 4 日後, 7 日後, 14 日後に心臓を摘出し, 心室筋より mRNA を抽出し, realtime RT-PCR 法により遺伝子発現の変化を検討した。その結果, 心筋梗塞領域 (infarct) 及び非心筋梗塞領域 (remote) のいずれの領域においても, 心筋梗塞後 7 日目においてピークを呈する Runx2 の遺伝子発現の著しい上昇を認めた (図 1)。

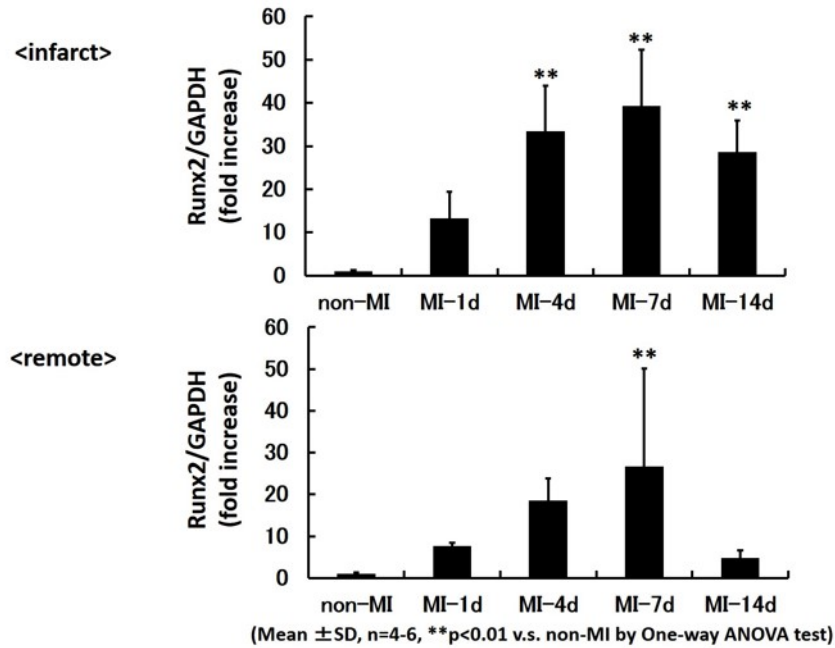


図 1. 心筋梗塞後の Runx2 の遺伝子発現変化。

心筋梗塞作製後 1, 4, 7, 14 日後の Runx2 の発現を, realtime RT-PCR により解析した。

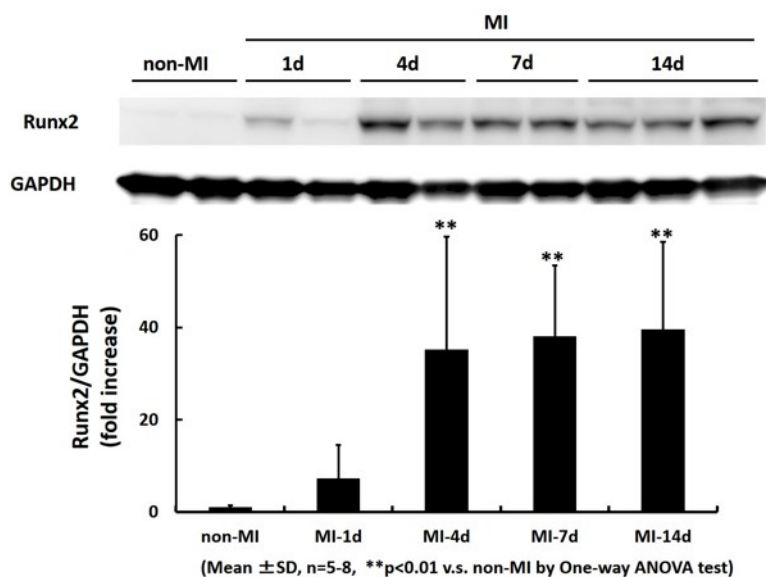


図2. 心筋梗塞後のRunx2のタンパク質発現変化.

心筋梗塞 (MI) 後1, 4, 7, 14日後及び非心筋梗塞心 (non-MI) における Runx2 のタンパク質発現をウェスタンブロットにより解析した.

さらに、心筋梗塞領域における Runx2 の蛋白質発現を、同様に検討した。その結果、心筋梗塞作製後4日目より、明確かつ有意な Runx2 の蛋白質の発現上昇を認め、かかる発現上昇は心筋梗塞後14日目まで持続した (図2)。以上の結果より、マウス急性心筋梗塞心において、Runx2 の発現が上昇する事が明らかとなった。

次に、Runx2 の発現上昇の細胞由来を検討した。心筋梗塞後4日目の心臓において抗 Runx2 抗体を用いて免疫染色を施行したところ、梗塞領域において Runx2 陽性の細胞が多数認められた (図3)。これらの Runx2 陽性細胞は、心筋細胞のマーカである  $\alpha$ -actinin による染色像とは一致せず、染色された細胞群が、非心筋細胞である事が示唆された (図3)。

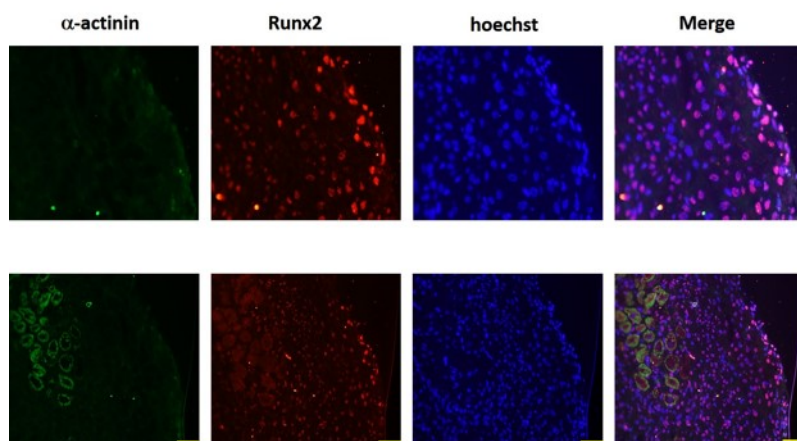


図3. 心筋梗塞後 Runx2 は心筋細胞に発現しない.

心筋梗塞巣において Runx2 陽性細胞が多数観察されたが、心筋細胞のマーカである  $\alpha$ -actinin の発現細胞とは一致しなかった。Scale bars: 50  $\mu$  m.

続いて、Runx2 の発現細胞が、筋線維芽細胞であるかどうかを検討した。筋線維芽細胞は、線維芽細胞の形質を維持しながら、 $\alpha$  SMA の発現を呈する事が特徴とされている。心筋梗塞領域において、抗  $\alpha$  SMA 抗体を用いて、免疫

染色を施行したところ、 $\alpha$  SMA 陽性の細胞群が観察された。かかる組織において、抗 Runx2 抗体を用いた二重染色を施行した。その結果、Runx2 発現細胞の一部の細胞質が、 $\alpha$  SMA 陽性像を呈し、少なくとも Runx2 発現細胞の一部が、筋線維芽細胞である可能性が示唆された（図4）。また、筋線維芽細胞と Runx2 発現細胞の関連を筋線維芽細胞の特異的遺伝子の一つである periostin の発現により検討した。心筋梗塞作製4日後の心筋切片を抗 periostin 抗体を用いて染色し、多数の periostin 陽性像を呈する細胞群を観察した。これらの細胞群と Runx2 陽性細胞群の関係を二重染色により検討したところ、Runx2 陽性細胞と periostin 陽性細胞は一致し、Runx2 の発現が筋線維芽細胞、特に筋線維芽細胞において行われている可能性が明らかとなった。

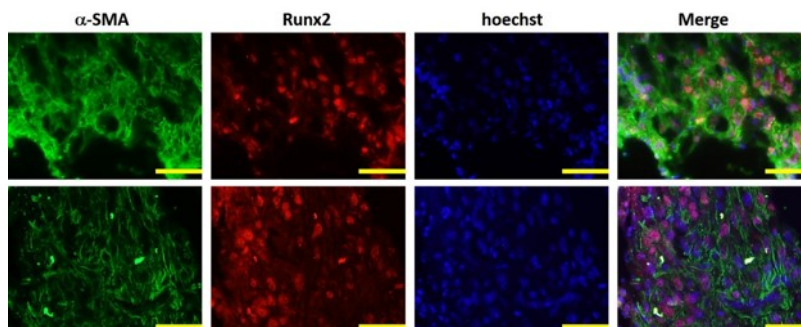


図4. 心筋梗塞後 Runx2 の筋線維芽細胞における発現。

心筋梗塞4日後において、Runx2 陽性細胞の細胞質において、筋線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現が観察された。Scale bars: 50  $\mu$ m.

一方、心筋梗塞組織において梗塞後1週間以内に多数の免疫細胞の浸潤が生じる事が報告されている。心筋梗塞における非心筋細胞の Runx2 発現細胞を検討する上で、梗塞作製後1週間前後に出現することが知られているマクロファージにおける Runx2 の発現を検討した。まず、心筋梗塞後4日目の組織においてマクロファージのマーカーである F4/80 の発現細胞を抗 F4/80 抗体を用いた免疫染色により評価したところ、梗塞領域において多数の F4/80 の陽性細胞が認められた。かかる細胞の Runx2 発現について免疫二重染色により検討したところ、心筋梗塞領域において F4/80 陽性・Runx2 陽性の細胞群を多数認め、マクロファージにおける Runx2 発現の可能性が示唆された。一方、一部の領域においては、F4/80 陰性、Runx2 陽性の細胞群が観察され、マクロファージ以外における Runx2 発現細胞も存在する事が示唆された。さらに、心筋梗塞心より FACS を用いてマクロファージを単離し、マクロファージにおける Runx2 の発現をウェスタンブロットにより解析した。その結果、マクロファージにおける Runx2 の明確な発現が認められ、Runx2 がマクロファージにおいて発現する事が明らかとなった。

以上の如く、本研究において、心筋梗塞において Runx2 の著しい発現上昇が認められる事が明らかとなり、さらにその発現細胞が、心筋細胞ではなく、筋線維芽細胞とマクロファージであることが明らかとなった。

## 2. 組織特異的 Runx2 欠損マウス の確立と筋線維芽細胞における Runx2 欠損モデルの作製

筋線維芽細胞の Cre recombinase (Cre) 発現マウスを用いた筋線維芽細胞選択的 Runx2 欠損マウスの作製と解析を試みた。Priostin-Cre 過剰発現マウス（インディアナ大学より供与）、並びに  $\alpha$  SMA-Cre 過剰発現マウス（Jackson Laboratory より購入）との交配により、筋線維芽細胞特異的 Runx2 欠損マウスの作製を進めた。また、マクロファージにおいて Cre recombinase を発現する LysM-Cre 過剰発現マウスと Runx2 flox マウスの交配により、マクロファージ特異的 Runx2 欠損マウスを作製した。今後、これらの遺伝子改変マウスにより、急性心筋梗塞時の筋線維芽細胞及びマクロファージにおける Runx2 発現の病態的意義が解明されることが期待される。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学臨床薬効解析学分野の熊谷渉平および柳瀬絵美子である。最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Okamoto, H., Hori, M., Matsuzaki, M., Tsutsui, H., Yamazaki, T., Nagai, R., Yoshikawa, T., Fujio, Y., Nonen, S., Azuma, J., Izumi, T., Ohashi, Y. & Kitabatake, A. : J-CHF Investigators.: Minimal dose for effective clinical outcome and predictive factors for responsiveness to carvedilol: Japanese chronic heart failure (J-CHF) study. *Int. J. Cardiol.*, **164** : 238-244, 2013.
- 2) Byon, C. H., Sun, Y., Chen, J., Yuan, K., Mao, X., Heath, J. M., Anderson, P. G., Tintut, Y., Demer, L. L., Wang, D. & Chen, Y. : Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31** : 1387-1396, 2011.