

### 33. 筋線維芽細胞の制御による心筋梗塞後の線維化抑制

黒瀬 等

九州大学 大学院薬学研究院 臨床医薬学講座 薬効安全性学分野

Key words : 心筋梗塞, 死細胞, 筋線維芽細胞, 貪食, MFG-E8

#### 緒 言

心筋梗塞は冠動脈の閉塞により生じる疾患である。心筋梗塞時には、壊死した細胞から内容物が漏出し、強い炎症応答が引き起こされる。したがって、梗塞部位における死細胞の貪食細胞による速やかな除去は、心筋梗塞後の病態に大きく関係する。これまで、心筋梗塞後に浸潤してきたマクロファージなどの血球系細胞が、死細胞の貪食を行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貪食を実行する血球系細胞以外の細胞の可能性、また死細胞が貪食されるメカニズムなど、未だ不明な点が多く残されている。

心筋梗塞時にマクロファージ以外の死細胞を貪食する細胞として、心筋梗塞時に出現する筋線維芽細胞に着目した。筋線維芽細胞は、組織が損傷されたとき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<sup>1)</sup>。本研究では、コラーゲン産生能をもち線維化を担う細胞として知られてきた筋線維芽細胞が心筋梗塞時に死細胞を貪食する可能性、およびその生理的意義について検討した<sup>2)</sup>。

#### 方 法

##### 1. 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 *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。

##### 2. 死細胞の貪食評価

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。L929 培養細胞あるいはマウスの胸腺細胞を CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetate) で蛍光標識し、ネクロプトーシスあるいはアポトーシスを誘導した。これら死細胞を筋線維芽細胞と共培養させ貪食を行わせた。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。

##### 3. 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染色し、共焦点顕微鏡により撮像した。

##### 4. 精製 MFG-E8 タンパク質の心筋内への投与

カルボキシル末端に Flag タグを付けた *MFG-E8* 遺伝子を HEK-293 細胞に過剰発現させ、培養上清から抗 Flag 抗体により精製した。精製した MFG-E8 (160 ng/ $\mu$ L) を結紮部の周辺 2 カ所に 29 x G 針付きシリンジで 10  $\mu$ L ずつ投与した。

## 結果

### 1. 筋線維芽細胞による死細胞の貪食

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すると、筋線維芽細胞によるアポトーシス細胞の取り込みが観察された。また、ネクローシスを誘導した L929 細胞も筋線維芽細胞により貪食された。次に、*in vivo* で筋線維芽細胞による死細胞の貪食能を評価した。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 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 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  $\alpha$ SMA と共染色した。マクロファージや筋線維芽細胞がアポトーシス細胞を取り込んでいる染色像が得られた。取り込まれたアポトーシス細胞の数を比較し、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 1)。

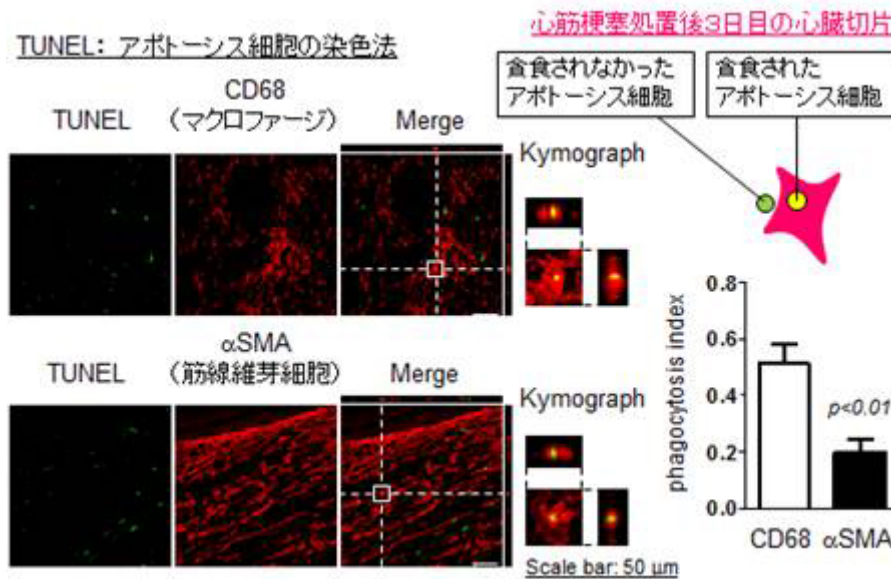


図 1. 筋線維芽細胞による死細胞の貪食

心筋梗塞後 3 日目の心臓より切片を作製し、アポトーシス細胞を表す TUNEL 染色とマクロファージのマーカ分子 (CD68) あるいは筋線維芽細胞のマーカ分子 ( $\alpha$ SMA) とを共染色した。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 (左図および中段の Kymograph)。CD68 陽性マクロファージおよび  $\alpha$ SMA 陽性筋線維芽細胞により取り込まれているアポトーシス細胞の数を定量したところ、筋線維芽細胞はマクロファージの約 5 分の 2 程度の貪食能を有することが明らかになった (右図、Mean  $\pm$  SEM で表示)。統計検定は Student's t-test により行った ( $p < 0.01$ )。

さらに、心筋細胞特異的プロモーターである cardiac troponin T (cTnT) の下流に EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) 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を選択的に蛍光標識した。フローサイトメーターを用いて EGFP の蛍光を調べたところ、正常なマウス心臓の筋線維芽細胞には EGFP の蛍光は検出されなかった。一方、心筋梗塞処置を施したマウス心臓の筋線維芽細胞には EGFP の蛍光が認められた。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。

### 2. 筋線維芽細胞の MFG-E8 を介した死細胞の貪食

死細胞の貪食に関わ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  $\alpha v \beta 5$  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。したがって、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、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ところ、*MFG-E8* KO マウス由来の筋線維芽細胞では貪食能が顕著に低下していた。しかし、低下した貪食能は、MFG-E8 タンパク質の添加により改善した。

### 3. 心筋梗塞後の病態に対する MFG-E8 の保護的作用

WT マウスおよび *MFG-E8* KO マウスに心筋梗塞処置を行い、病態を比較した。心筋梗塞処置後の *MFG-E8* KO マウスの生存率は、WT マウスより顕著に低下していた。これは、MFG-E8 が心筋梗塞後の病態に対し保護的に働いていることを示していた。生存率の顕著な低下が観察される心筋梗塞後 3 日目における病態を比較した。はじめに心臓切片の TUNEL 染色を行い、アポトーシス細胞数を調べたところ、*MFG-E8* KO マウスのアポトーシス細胞数が WT マウスに比べて増加していた。さらに、炎症性サイトカインの mRNA 量を調べたところ、*MFG-E8* KO マウスでは IL-6 や IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカイン量が上昇していた。したがって、MFG-E8 の欠損が死細胞の増加をもたらし、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していると考えられた。

### 4. MFG-E8 タンパク質の心臓への投与による心機能の改善

精製した MFG-E8 タンパク質を心筋梗塞処置直後の梗塞部位周辺に投与し、処置後 2 週目、6 週目、8 週目、および 10 週目の心機能を心エコー法により測定した。MFG-E8 を投与すると、心筋梗塞後の心機能の悪化が抑制された。また、心筋梗塞処置後 10 週目に心カテーテル法により心機能を測定したところ、MFG-E8 投与により心臓の収縮能および拡張能の改善が観察された (図 2)。

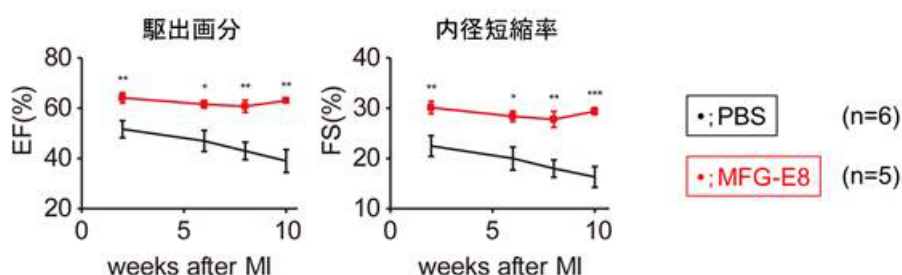


図 2. MFG-E8 投与による心筋梗塞後の心機能改善

心筋梗塞後、結紮部に精製 MFG-E8 を投与した。2、4、6、8、10 週目の心機能を心エコーにて測定した値を Mean  $\pm$  SEM で表示した。統計検定は Student's t-test により行った。  
\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Nakaya et al., J Clin Invest 2017 より一部改変。

これらの結果から、MFG-E8 投与は心筋梗塞後の病態を改善することが明らかになった。

## 考 察

心筋梗塞時にコラーゲンを産生し線維化のみに働くと考えられていた筋線維芽細胞は、死細胞を貪食 (除去) することで炎症を抑制することが明らかになった。また、筋線維芽細胞の貪食を仲介する MFG-E8 の投与は心機能の改善をもたらしたことから、死細胞の貪食を促進する低分子化合物が、心筋梗塞に対する新たな治療薬になる可能性も示した。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野の仲矢道雄准教授および長坂明臣助教、東京医科大学分子病理学講座の黒田雅彦教授、仲矢武彦博士、京都大学大学院医学研究科分子生体統御学講座医化学分野の長田重一教授である。

## 文 献

- 1) Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res.* 2016;118(6):1021-40. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
- 2) Nakaya M, Watari K, Tajima M, Nakaya T, Matsuda S, Ohara H, Nishihara H, Yamaguchi H, Hashimoto A, Nishida M, Nagasaka A, Horii Y, Ono H, Iribe G, Inoue R, Tsuda M, Inoue K, Tanaka A, Kuroda M, Nagata S, Kurose H. Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2017;127(1):383-401. doi: 10.1172/JCI83822.