

167. 心筋梗塞修復メカニズムの解明と新規治療法の開発

白石 学

自治医科大学 医学部 総合医学第二講座

Key words : 心筋梗塞, 組織修復, 線維芽細胞, マクロファージ

緒 言

心臓再生医療における主たる目標は、心筋梗塞発症後にいかにして心筋細胞の修復を増強させ、心不全患者の心機能を維持することである。心筋梗塞による組織障害を最小限にとどめ、心線維芽細胞による適切な心臓修復を促進させることにより予後の改善を図ることが重要と考えられてきている。

近年、マクロファージは様々な臓器において、その組織修復や再生において重要な役割を果たしていることが報告されており¹⁾、このマクロファージによる線維芽細胞の制御機構が非常に注目されている。心筋梗塞モデルにおいてマクロファージ集積を選択的に抑制すると、線維芽細胞の組織修復能も同時に抑制されて心破裂が著しく増加し、心機能も低下することが知られている²⁾。しかし、このような修復機構が存在していながら、心筋梗塞では、梗塞後の心筋菲薄化やリモデリングにより心不全に陥る患者も少なくない。これらの知見から、心線維芽細胞による心筋組織修復機能も心筋梗塞に伴う炎症により障害を受けており、十分な組織修復が阻害されており、マクロファージがその救済に関与しているのではないかとこの着想に至った。

方法および結果

1. マウス心筋梗塞モデルにおける細胞障害の評価

心筋梗塞発症後のマウス (C57BL6/J) 心臓の組織切片を観察すると、心筋梗塞発症後7日目頃をピークにCD90⁺線維芽細胞が集積し、膠原線維の生成により梗塞領域の組織修復が行われていた。しかしながら、組織修復のために梗塞領域に集積した心線維芽細胞は障害を受け、アポトーシスを起こしていることを確認した (図1 左図)。線維芽細胞のアポトーシスを引き起こす原因として心筋梗塞後に生じる免疫応答による炎症が考えられた。そこで炎症性サイトカイン (TNF, IL-6) の遺伝子発現量を qRT-PCR で評価したところ、心筋梗塞発症後 28 日経過した慢性期においても炎症が続いていることが確認された (図1 右図)。

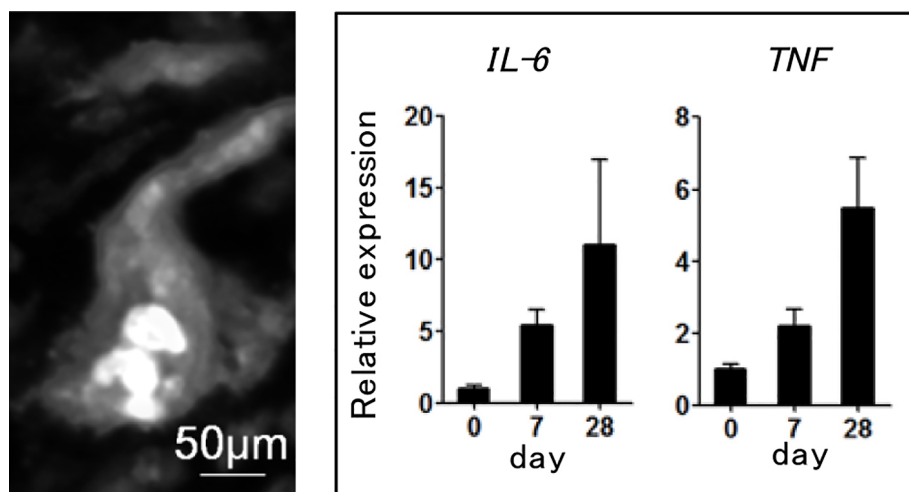


図1. 心筋梗塞領域の線維芽細胞及び心筋梗塞後の炎症性サイトカインの推移
 (左図)：心筋梗塞領域に集積する線維芽細胞がアポトーシスを起こしていることを免疫染色で確認した。
 (右図)：心筋梗塞発症後7日目、28日目と次第に炎症性サイトカイン (IL-6、TNF) の発現が増加していた。

2. 障害を受けた線維芽細胞の救済を担うマクロファージの分泌蛋白を特定

正常心筋及び心筋梗塞発症後のマウス心臓から F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺マクロファージを FACS で単離した。マイクロアレイ法によりマクロファージの遺伝子発現の違いを2群間で網羅的に解析し、心筋梗塞発症後のマクロファージで特異的に高発現する分泌蛋白遺伝子を選別した (図2)。

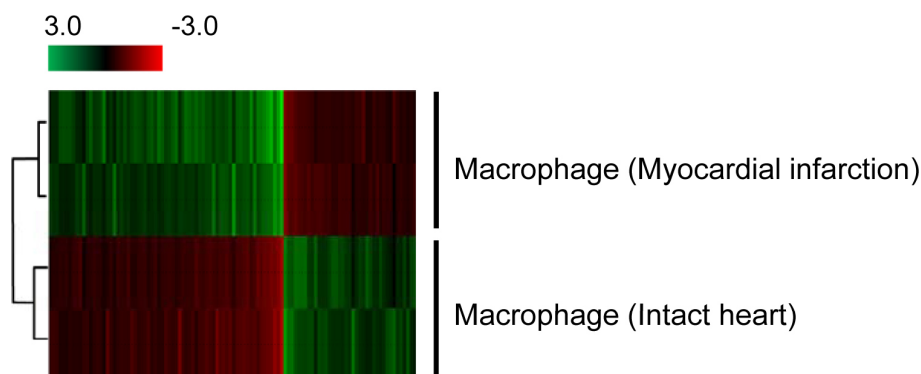


図2. マイクロアレイ法によるマクロファージの遺伝子発現の解析
 マイクロアレイ法により正常心臓及び心筋梗塞心臓のマクロファージの遺伝子発現の違いを2群間で網羅的に解析した。

さらにマイクロアレイ法により得られたデータをバイオインフォマティクス解析し、マクロファージの心筋線維芽細胞の組織修復分子メカニズム及びシグナル伝達経路に關与する遺伝子の特定を行った (図3)。

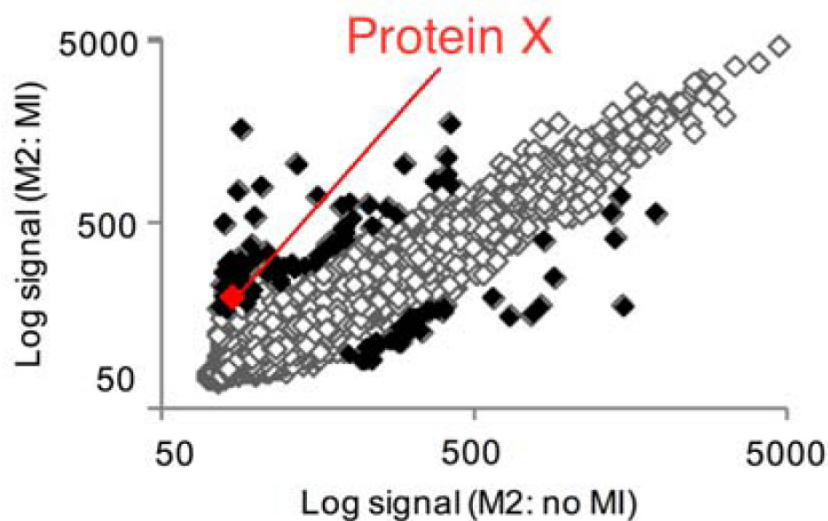


図3. バイオインフォマティクス解析

マクロファージの心筋線維芽細胞の組織修復分子メカニズム及びシグナル伝達経路に関与する遺伝子の特定を行った。

またその遺伝子がコードするタンパク質 (Protein X) のレセプターが心筋線維芽細胞に発現していることを心臓組織切片の蛍光免疫染色で確認した (図4)。



図4. 心筋線維芽細胞の蛍光免疫染色

タンパク質 (Protein X) のレセプターが CD90+心筋線維芽細胞に発現していることを心臓組織切片の蛍光免疫染色で確認した。

3. *In vitro* でマクロファージによる線維芽細胞救済を評価

心筋梗塞発症後は慢性期においても心臓内では持続的に炎症が増悪し、これに伴い障害を受けた線維芽細胞が心筋梗塞領域においてアポトーシスを起こしていることを確認した。そこで本研究の仮説であるマクロファージが線維芽細胞のアポトーシス制御・組織修復に関与することを証明するため、*in vitro* での実験を計画した。正常心筋から線維芽細胞を回収し、1. 健常な線維芽細胞、2. 過酸化水素水を使用し DNA 障害を与えた線維芽細胞、3. マクロファージと共培養し DNA 障害を与えた線維芽細胞、4. マクロファージと共培養し DNA 障害を与えた線維芽細胞に実験2で特定したタンパク質 (Protein X) のレセプターに対する抗体を加えた4群を作製した (図5)。

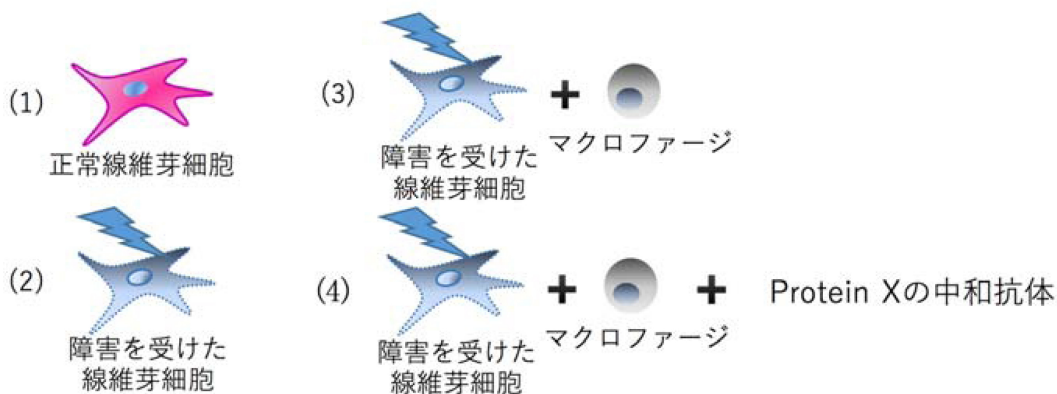


図5. *In vitro*でマクロファージによる線維芽細胞救済を評価

1) 健全な線維芽細胞、2) 過酸化水素水を使用しDNA障害を与えた線維芽細胞、3) マクロファージと共培養しDNA障害を与えた線維芽細胞、4) マクロファージと共培養したDNA障害を与えた線維芽細胞に実験2で特定したタンパク質 (Protein X) の中和抗体を加えた群の4群を作製し、線維芽細胞のアポトーシス、遊走、細胞分裂及び活性化を免疫染色で評価した。

線維芽細胞のアポトーシス、遊走、細胞分裂及び活性化を免疫染色で評価した。その結果、マクロファージと共培養した群においては線維芽細胞のアポトーシス抑制、遊走能増加、細胞分裂の増加及び活性化が確認され、さらに抗体を加えた群ではマクロファージによるこれらの効果が抑制された。

さらに各グループの線維芽細胞からRNAを抽出し、アポトーシス制御・組織修復に関連する遺伝子の発現量を測定し、マクロファージが障害を受けた線維芽細胞の制御に関わることを証明した。コントロール群と比較してマクロファージとDNA障害を受けた線維芽細胞を共培養した群ではアポトーシス・老化関連遺伝子の発現が低下することを確認した (図6)。

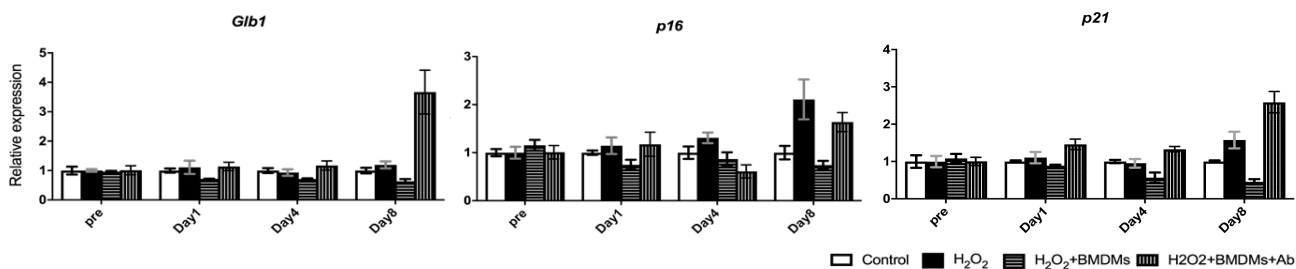


図6. 線維芽細胞のアポトーシス制御・組織修復に関連する遺伝子の発現量を測定

コントロール群と比較してマクロファージとDNA障害を受けた線維芽細胞を共培養した群ではアポトーシス (*G1b1*)・老化関連遺伝子 (*p16*, *p21*) の発現が低下することを確認した。

考 察

本研究では、心筋梗塞発症後に遷延する炎症反応により組織修復のために集積する線維芽細胞が障害を受けアポトーシスを起こし、十分な組織修復が阻害されている可能性が示唆された。またマクロファージが障害を受けた線維芽細胞の救済に参与する可能性が考えられた。今後は、さらなる心筋梗塞後の組織修復メカニズムの解明と新規治療法の研究が必要である。最後に、本研究にご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) Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):593-604. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- 2) Shiraishi M, Shintani Y, Shintani Y, Ishida H, Saba R, Yamaguchi A, Adachi H, Yashiro K, Suzuki K. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Invest*. 2016 Jun 1;126(6):2151-66. doi: 10.1172/JCI85782.