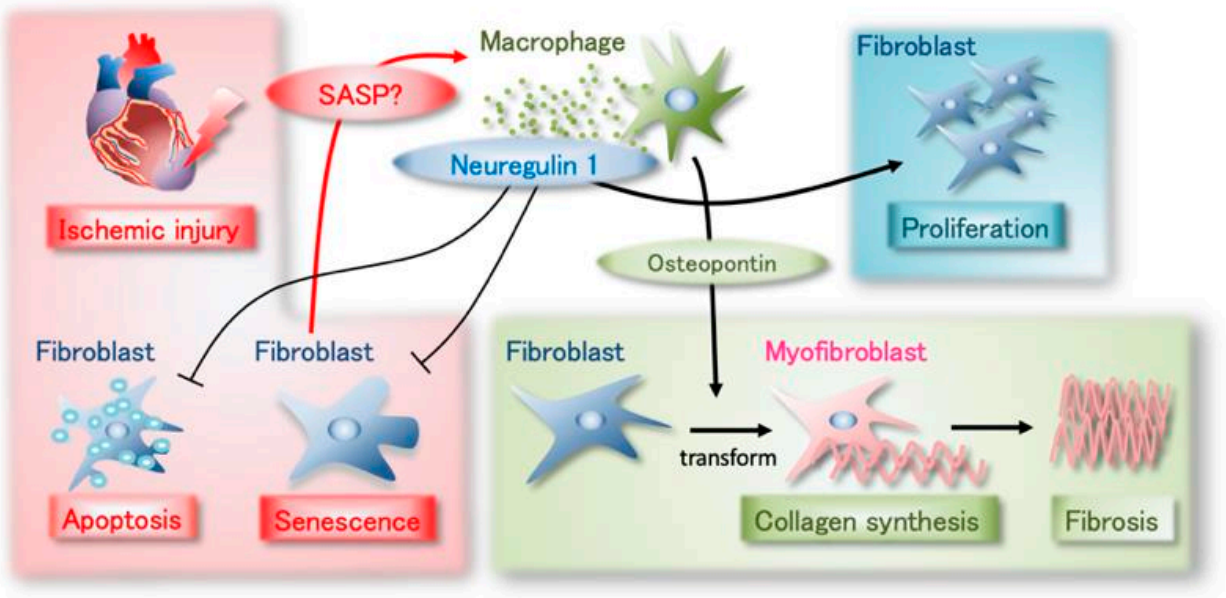
| 63　心筋梗塞後組織修復と心不全発症のメカニズムの解明 | 白石　学 |
|---|---|

**【目的】**近年、心筋梗塞の救命率は上昇したものの、心不全患者は増加傾向であり、死亡率も極めて高いことから、心不全の根本的な病因究明と新たな治療法の確立が急務である。本研究の目的は、心筋梗塞発症後の十分な組織修復の誘導と心機能確保のために、虚血侵襲から線維芽細胞を保護するための主要調節因子及びメカニズムを特定することである。心筋梗塞時に障害を受けた線維芽細胞の長期的予後に対する影響も少なく無いことが予想され、本研究によって得られる研究成果は、心筋梗塞後の心不全発症の病態解明と梗塞時に線維芽細胞のダメージを抑制することに焦点を当てた新たな切り口からの治療法開発の基盤になると期待され、心筋梗塞後の生命予後向上に重要な意義を有している。
**【方法】**虚血障害による線維芽細胞の老化やアポトーシスを制御する分子を同定する目的でマウス心臓からマクロファージを採取し、遺伝子発現の網羅的な解析を行った。線維芽細胞とマクロファージの共培養実験で同定した分泌タンパクの受容体をブロックする抗体を使用し、培養線維芽細胞の老化メカニズムの解析を行った。また、心筋梗塞モデルマウスに同定した分泌タンパクの受容体をブロックする抗体を投与し、生体内において線維芽細胞の老化進行が線維化に与える影響を解析した。
**【結果】**虚血障害による線維芽細胞の老化やアポトーシスを制御する分子としてマクロファージが分泌する Neuregulin1（Nrg1）を同定した。更に線維芽細胞の Nrg1 受容体をブロックすると線維芽細胞の老化が進行し、心筋梗塞領域のみならず遠隔領域にも過剰に線維化が亢進すること発見し、心不全発症メカニズムの一端を解明した。

心筋梗塞における線維芽細胞の老化・アポトーシスの制御機構と線維化の関係



# 63. 心筋梗塞後組織修復と心不全発症のメカニズムの解明

白石　学

自治医科大学 総合医学第二講座 心臓血管外科

Key words：心筋梗塞，細胞老化，アポトーシス，線維化

## 緒　言

近年、心筋梗塞の救命率は上昇したものの、心不全患者は増加傾向であり、死亡率も極めて高いことから、心不全の根本的な病因究明と新たな治療法の確立が急務である。本研究の目的は、心筋梗塞発症後の十分な組織修復の誘導と心機能確保のために、虚血侵襲から線維芽細胞を保護するための主要調節因子及びメカニズムを特定することであり、その線維芽細胞救済機構を利用した心不全予防の為の新規細胞移植治療法を開発することである。心筋梗塞時に障害を受けた線維芽細胞の長期的予後に対する影響も少なく無いことが予想され、本研究によって得られる研究成果は、心筋梗塞後の心不全発症の病態解明と梗塞時に線維芽細胞のダメージを抑制することに焦点を当てた新たな切り口からの治療法開発の基盤になると期待され、心筋梗塞後の生命予後向上に重要な意義を有している。

心筋梗塞発症の後、心破裂や心不全に至るには脆弱な組織修復が深く関わっている。組織修復能の改善により正常な収縮能や形態を再建することが可能となれば、心臓再生医療を展開できる。しかしながら、不完全な組織修復から心不全に陥る分子メカニズムは未だ解明されていない。我々は、本研究で虚血障害による線維芽細胞の老化やアポトーシスを制御する分子としてマクロファージが分泌する Neuregulin1（Nrg1）を同定した。更に線維芽細胞の Nrg1 受容体をブロックすると線維芽細胞の老化が進行し、心筋梗塞領域のみならず遠隔領域にも過剰に線維化が亢進することを発見し、心不全発症メカニズムの一端を解明した。

## 方　法

Nrg1 の受容体抗体を心筋梗塞モデル動物に投与し、線維芽細胞の細胞死・老化制御に Nrg1 が関与していることを *in vivo* で証明する目的で、組織学的検査により心筋梗塞領域・線維化の程度の評価を行った。更に蛍光活性化セルソーティング法により心臓から線維芽細胞を収集し、RNA 抽出の後に qRT-PCR 法により炎症・細胞老化に関連する遺伝子発現を評価し、Nrg1 による線維芽細胞に対する細胞死・細胞老化制御作用を明らかにした。次に *in vitro* で M2 マクロファージが分泌する Nrg1 が線維芽細胞の細胞死・細胞老化制御及び組織修復に関与するシグナル伝達経路を明らかにする目的で線維芽細胞とマクロファージの共培養実験を行い、Nrg1 を介した線維芽細胞の細胞死・細胞老化制御に関わるシグナル伝達経路を Western Blot 法及び qRT-PCR 法を用いて評価を行った。

## 結果および考察

### 1. 心筋梗塞発症時の線維芽細胞の細胞老化、アポトーシスの進行と関連遺伝子発現の変化

8 週齢 C57BL/6J マウスを全身麻酔下に左前下行枝を結紮して心筋梗塞を作製し、心筋梗塞発症前、発症後 7、14、28 日目の解析を行った。infarct 領域に集積する線維芽細胞がアポトーシス（Caspase3$^{+}$）を起こすと同時に SA-β-Galactosidase 染色陽性を示し細胞老化の進行も観察された（図 1）。また、同時に心臓切片の qRT-PCR による遺伝子発現解析でも、細胞老化関連遺伝子 *SA-βgal*、*p16*、*p53*、*p21* の発現が有意に増加しており、心筋梗塞後の線維芽細胞の細胞死・細胞老化の進行を確認した。同時に、個体の発生や成長、維持に重要な役割を担う Nrg1 の遺伝子発現上

昇を infarct 領域でみとめ、その受容体（ErbB2/4）の発現を線維芽細胞上で確認した。次に正常心臓および心筋梗塞発症の心臓から FACS で $CD11b^{+}F480^{+}CD206^{+}$M2 型マクロファージを採取し、遺伝子発現を Micro-array で網羅的に解析したところ、心筋梗塞発症後の M2 型マクロファージで有意に遺伝子発現量が増加する extracellular ligand として Nrg1 を同定した。

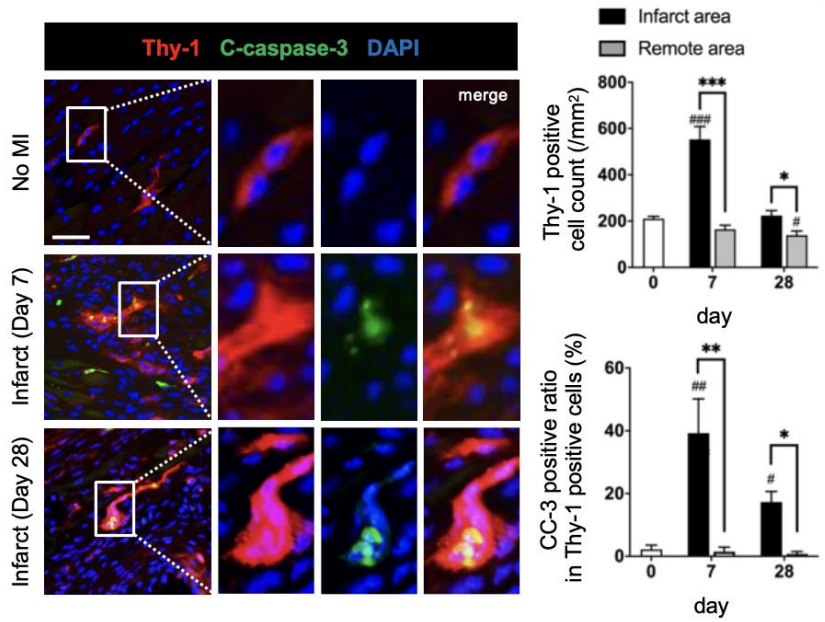



図 1. infarct 領域に集積する線維芽細胞のアポトーシス

心筋梗塞発症後 7 日目には梗塞領域に線維芽細胞が集積し、その内約 40%が Cleaved caspase 3 陽性を示していた。Scale bars: 100 $\mu$m. Data represent the mean±SEM ($n$=4). *$P$<0.05, **$P$<0.01, ***$P$<0.005 versus the remote area; $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.005 versus the no-MI heart (1-way ANOVA).

**2. マクロファージによる細胞老化、アポトーシス制御機構**

Nrg1 の線維芽細胞に対する直接作用を明らかにするために Boyden-chamber を用いた *in vitro* の共培養実験を行った。マクロファージは骨髄単核球から分化誘導した細胞（Bone marrow derived macrophages : BMDMs）を使用した。正常心筋線維芽細胞群（Control 群）、過酸化水素水（$H_2O_2$）で細胞障害を与えた心筋線維芽細胞群（$H_2O_2$群）、$H_2O_2$群に BMDMs を共培養した群（$H_2O_2$＋BMDMs 群）、$H_2O_2$＋BMDMs 群に ErbB4 receptor blocker を加えた群（$H_2O_2$＋BMDMs＋ErbB4 Ab 群）、$H_2O_2$群に recombinant Neuregulin 1（re-Nrg1）を加えた群（$H_2O_2$＋Nrg1 群）、正常心筋線維芽細胞に re-Nrg1 を加えた群（Nrg1 群）の計 6 群を作製し、線維芽細胞に対する BMDMs から分泌される Nrg1 の作用を検証した。各群の線維芽細胞を位相差顕微鏡（形態による細胞老化の評価）、SA-$\beta$-gal 染色（細胞老化の評価）（図 2）、Cleaved caspase 3 染色（アポトーシスの評価）、Ki-67 染色（細胞の分裂能の評価）で評価を行った。$H_2O_2$処理による障害により細胞死・細胞老化が進行した培養線維芽細胞は、共培養した BMDMs から分泌される Nrg1 の作用による抗細胞老化、抗アポトーシスおよび細胞分裂促進が観察された。また、$\alpha$SMA、Collagen I, III の発現を評価し、培養線維芽細胞の活性化や膠原線維産生にはマクロファージの存在が必要であることを明らかにした。次に培養線維芽細胞 6 群の PI3K, Akt のリン酸化タンパク質を評価し、Nrg1 による PI3K - Akt シグナル伝達経路の活性化を確認した（図 3）。また、心筋虚血により線維芽細胞が受ける細胞障害により進行する細胞老化・細胞周期停止・アポトーシスへのシグナル伝達経路及びこれらを抑制する Nrg1 - ErbB - PI3K - Akt シグナル伝達経路の遺伝子発現量を qRT-PCR で定量した。$H_2O_2$により細胞周期の減速、細胞老化・アポトーシスの進行を示した線維芽細胞は、マクロファージとの共培養により Nrg1 - PI3K - Akt シグナル伝達経路を介して細胞周期の促進及び、細胞老化・アポトーシスの抑制が観察された。

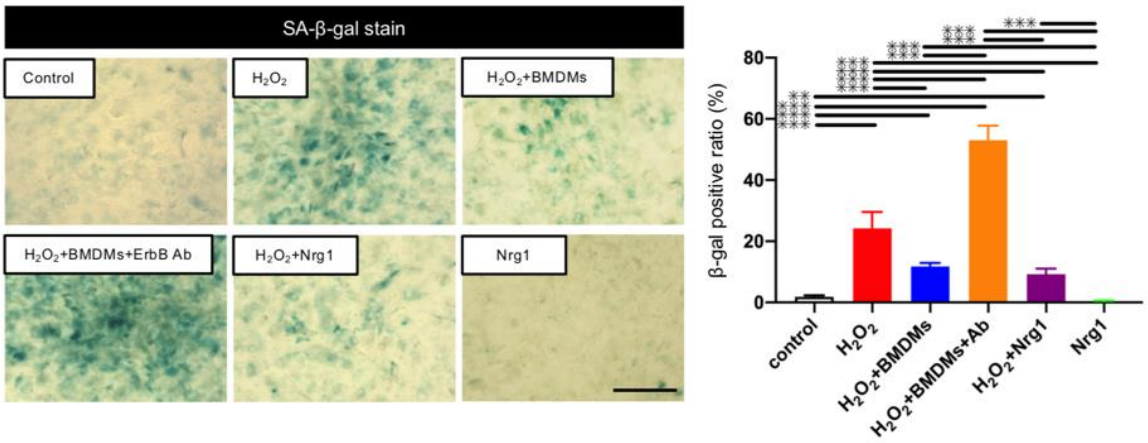



図 2. 培養線維芽細胞の細胞老化

$H_2O_2$により細胞老化の進行を示した線維芽細胞は、マクロファージとの共培養により細胞老化の抑制が観察された。Scale bars: 100 μm. Data represent the mean ± SEM ($n$=4). #$P$<0.05 versus control, *$P$<0.05 versus $H_2O_2$, ‡$P$<0.05 versus $H_2O_2$+BMDMs, ♭$P$<0.05 versus $H_2O_2$+BMDMs+Ab, §$P$<0.05 versus $H_2O_2$+Nrg1 (1-way ANOVA).

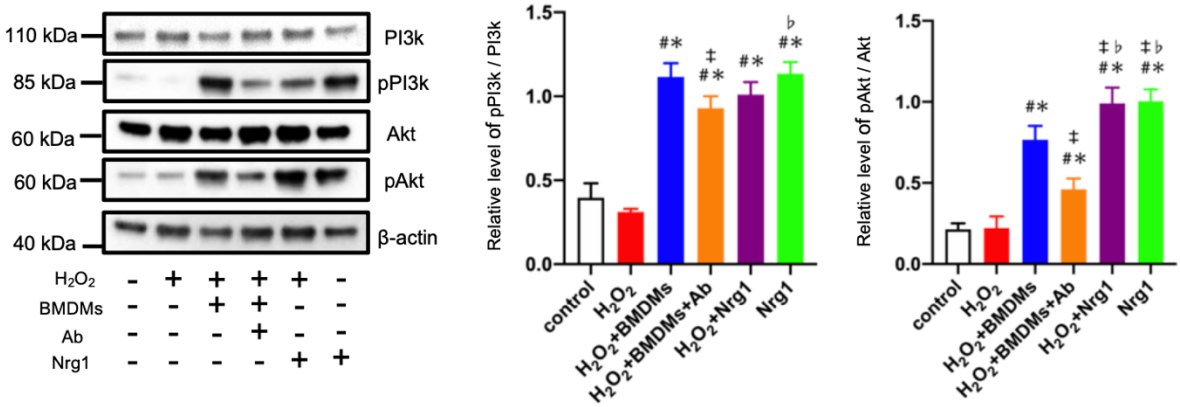



図 3. Nrg1 - ErbB - PI3K-Akt シグナル伝達経路の活性制御機構

$H_2O_2$により細胞周期の減速、細胞老化・アポトーシスの進行を示した線維芽細胞は、マクロファージとの共培養により Nrg1 - PI3K - Akt シグナル伝達経路を介して細胞周期の促進及び、細胞老化・アポトーシスの抑制が観察された。Data represent the mean±SEM ($N$=4). #$P$<0.05 versus control, *$P$<0.05 versus $H_2O_2$, ‡$P$<0.05 versus $H_2O_2$+BMDMs, ♭$P$<0.05 versus $H_2O_2$+BMDMs+Ab, §$P$<0.05 versus $H_2O_2$+Nrg1 (1-way ANOVA).

### 3. Trastuzumab 投与による線維芽細胞老化の進行

心筋梗塞発症時に生体内で Nrg1 の作用を明らかにするため、Trastuzumab（抗 ErbB2 抗体）を用いた。Trastuzumab 投与群（Trastuzumab 群）と PBS 投与のコントロール群（Control 群）を作製し比較検討を行った。Trastuzumab 群で infarct 領域のみならず remote 領域においても有意なアポトーシス・細胞老化関連の発現上昇がみられた（図 4）。infarct 領域における膠原線維の沈着量及び線維化関連遺伝子（*αSMA*、*Col1a1*、*Col3a1*）の発現は Trastuzumab 群で有意に増加していた。過剰な線維化進行は、Trastuzumab 投与により Nrg1 による抗細胞老化機序が阻害されることで、心筋梗塞など不可逆的な障害が生じた際に線維芽細胞老化が進行し、炎症性サイトカインの産生増加から M2 型マクロファージの集積が増加することが原因と考えられた。M2 型マクロファージから分泌される Osteopontin により線維芽細胞の活性化から膠原線維産生が増強されることは、我々の以前の研究内で明らかにしている［1］。

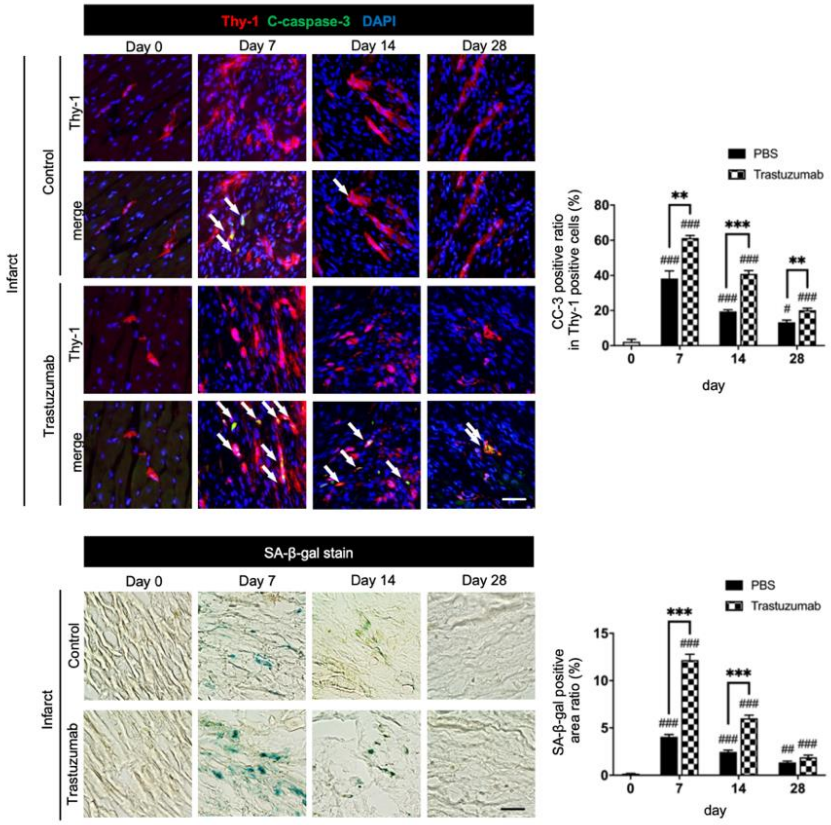



図 4. Trastuzumab 投与による線維芽細胞老化の進行

上図）Trastuzumab 群で infarct 領域において、線維芽細胞の有意なアポトーシスの発現上昇がみられた。Scale bars：100 $\mu$ m.

下図）Trastuzumab 群で infarct 領域において有意な老化細胞集積がみられた。 Scale bars：20 $\mu$ m. Data represent the mean±SEM ($N$=4). *$P$<0.05, **$P$<0.01, ***$P$<0.005 versus each group; $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.005 versus the non-MI heart (1-way ANOVA).

本研究では虚血障害による線維芽細胞の老化やアポトーシスを制御する分子としてマクロファージが分泌するNrg1を同定した。更に線維芽細胞のNrg1受容体をブロックすると線維芽細胞の老化が進行し、心筋梗塞領域のみならず遠隔領域にも過剰に線維化が亢進することを*in vitro*、*in vivo*の実験で明らかにした。慢性心不全の病態に対する心臓線維芽細胞の異常性の果たす重要な役割を考慮すると［2］、梗塞時にダメージを受けた線維芽細胞の長期的予後に対する影響も少なく無いことが予想される。Nrg1による細胞老化やアポトーシスの制御機構の一端が本研究で明らかとなり、今後心不全予後に対する新たな戦略に繋がる可能性がある。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である、英国ロンドン大学クイーンメアリー校ウィリアムハーベイ研究所の鈴木憲教授には、研究の分析や考察の方法など、細部にわたるご指導を頂きました。ここに感謝いたします。

## 文　献


1) 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. Epub 2016 May 3. PMID: 27140396; PMCID: PMC4887176.

2) Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. Nature. 2008 Dec 18;456(7224):980-4. doi: 10.1038/nature07511. Epub 2008 Nov 30. PMID: 19043405.