

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713007

研究課題名(和文) 心筋梗塞時に現れる筋線維芽細胞による死細胞貪食メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of engulfment by cardiac myofibroblast in myocardial infarction

研究代表者

仲矢 道雄 (Michio, Nakaya)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80464387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：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。しかしながら、これら死細胞の貪食についての分子メカニズムは、これまでほとんどわかっていなかった。本研究により、コラーゲンを産生し、組織の線維化を担う筋線維芽細胞が、線維化のみならず、死んだ細胞の貪食をも担うことが明らかとなった。そしてこの貪食は、MFG-E8という分子を介して行われていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：After myocardial infarction occurs, many cardiomyocytes receiving blood supply from occluded blood vessels die. However, the molecular mechanisms underlying engulfment of dead cells in myocardial infarction still remain largely unknown. We found that cardiac myofibroblasts that have been known to exert fibrosis engulf the dead cells in myocardial infarction. We also revealed that engulfment by cardiac myofibroblasts depends on MFG-E8.

研究分野：分子生物学、薬理学

キーワード：筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

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い。申請者は以前より、アポトーシス細胞の貪食、除去に関する研究を行っていた [Nakaya M et al., *JBC*, 2006; Nakaya M et al., *PNAS*, 2008; Nakaya M et al.]。

そこで申請者は、心筋梗塞モデル処置(左冠状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、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 $\alpha\beta3$ 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) (図 1)。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。そして、死細胞の貪食などをターゲットにした新しい心筋梗塞治療法創出の礎を築く事を目指した。

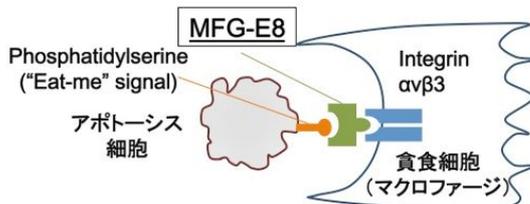


図 1 MFG-E8 はアポトーシス細胞と貪食細胞の橋渡しをして貪食を促進する

2. 研究の目的

上記の結果に加え、申請者らはこれまでに野生型(WT)マウスとMFG-E8 ノックアウト(KO)マウスに心筋梗塞(Myocardial Infarction: MI)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を見出している。この結果から、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。次にMI後に現れるMFG-E8産生細胞を調べた。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。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一部のみであった。MFG-E8は貪食促進分子である。そこで次に、このMFG-E8陽性の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、このMFG-E8陽性筋線維芽細胞がMFG-E8を介して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。

以上の結果を基に、本研究では、主として以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) MFG-E8を産生する筋線維芽細胞が貪食作用などを通じて梗塞部位の炎症および線維化にどのように関与するのかをマウス個体レベルで明らかにする。

MI処置後のWTマウスとMFG-E8KOマウスの病態の違いを詳細に比較検討し、それら病態の違いとMFG-E8欠損による筋線維芽細胞の貪食異常がどのように結びつくのかを精査する。

(2) どの種の細胞がどのようにしてMFG-E8を産生する筋線維芽細胞に分化するのかを明らかにする。

心筋梗塞時に現れる筋線維芽細胞の由来は現在、内皮間葉転換細胞、上皮間葉転換細胞、周皮細胞、骨髄由来細胞、あるいは常在性の線維芽細胞の5種であると考えられている。しかし、現在、それぞれの細胞から筋線維芽細胞へ分化するメカニズム、および起源の異なる筋線維芽細胞間の性質の違いはほとんど明らかでない。そこで、本研究では独自に見出したMFG-E8を産生する筋線維芽細胞サブセットに焦点を絞り、どの種の細胞がどのようにしてMFG-E8陽性筋線維芽細胞に分化するのかを明らかにする。

(3) 心筋梗塞後の心臓に対してMFG-E8

を投与し、梗塞後の病態が改善するかについての検討。

3. 研究の方法

(1) 心筋梗塞モデル処置後の MFG-E8KO マウスの異常解析。

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 壊死細胞の内容物流出等による炎症の発生 免疫細胞の浸潤 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。

MFG-E8KO マウスと WT マウスに MI 処置を施し、MFG-E8 の発現量がピークを迎える、処置後 4 日目前後を中心に MFG-E8 の欠損による梗塞後の病態変化を評価した。その際は特に 細胞死 (TUNEL 染色による)

梗塞領域の増減 (ヘマトキシリン・エオシン染色法による) 好中球、マクロファージなどの浸潤に伴う線維化関連分子、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現量の増減 (リアルタイム RT-PCR 法による) 梗塞部位での線維化 (ピクロシリウス染色法による) に焦点を当てて解析を行った。

また、MFG-E8 の欠損による梗塞後の心臓の形態的、機能的变化を心エコー法、心カテーテルによる左心室内圧測定法により評価した。

(2) どの種の細胞が MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞に分化するかについての解析。

心筋梗塞時に現れる、MFG-E8 陽性筋線維芽細胞の起源が現在、報告されている 5 種 (骨髄由来細胞、上皮間葉転換細胞、内皮間葉転換細胞、常在性の筋線維芽細胞、周皮細胞) のうちのどれかについて検討した。骨髄由来細胞に起源するか否かの検討には、骨髄移植実験 (放射線照射により、移植される側のマウスの造血幹細胞を破壊し、静脈注射によりドナーマウスの造血幹細胞を注入して移植する。) を用いた。MFG-E8KO マウスに WT マウスの骨髄を移植した骨髄移植マウスを作成し、そのマウスに MI 処置を施して、MFG-E8 陽性筋線維芽細胞が出現するかを免疫染色により検討した。また、逆に WT マウスに MFG-E8KO マウスの骨髄を移植したマウスを作成し、同様の実験を行う。内皮間葉転換細胞由来、上皮間葉転換細胞の筋線維芽細胞は、それぞれ CD31, Wt-1 の発現によって特徴づけられる。そこで、CD31 あるいは Wt-1 と MFG-E8 の共染色を行い、内皮間葉転換細胞あるいは上皮間葉転換細胞由来か否かを検討した。常在性の筋線維芽細胞は、現在、特徴的なマーカー分子がない。従って、上記の可能性が消えた場合は、常在性の筋線維芽細胞由来と考えた。

(3) 心筋梗塞後の心臓に対して MFG-E8 を投与し、梗塞後の病態が改善するかについての検討。

MI 処置後のマウス心臓に哺乳類培養細胞を用いて精製した MFG-E8 を梗塞領域周辺の心臓に対して直接投与し、処置後の心機能、生存率が改善されるかを検討した。

(4) ヒトの心筋梗塞病態へのフィードバック実験。

心筋梗塞患者の心臓切片を anti-human MFG-E8 抗体および anti-human alphaSMA 抗体を用いて免疫染色した。

4. 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。

MI 後 3 日目の心臓を調べると、WT マウスと比較して MFG-E8 KO マウスの心臓では線維化が不十分であるため、左室自由壁が薄く、心破裂を起こしやすい状態であった。

また、MI 後 3 日目の MFG-E8 KO マウスの心臓の梗塞部位周辺においては、WT マウスに比べより多くの TUNEL 陽性細胞が観察された。すなわち、MFG-E8KO マウスの心臓では梗塞後に死細胞がうまく貪食されずに心臓に多く残存していることが明らかとなった。

死細胞の貪食が適切に行われない場合、細胞内物質の漏出などにより炎症が惹起されることが知られている。そこで、MI 後 3 日目の心臓の梗塞部位を摘出し、種々の炎症性サイトカインの mRNA 量を測定した。その結果、WT マウスと比較して MFG-E8 KO マウスでは炎症性サイトカインの顕著な発現上昇が確認された。この結果から、MFG-E8 はアポトーシス細胞の貪食を促進することにより、梗塞部位の炎症を抑制していると考えられた。

また、MFG-E8 KO マウスにおいては、MI 処置後 28 日目の心臓の形態的、機能的悪化が有意に改善されていた。

(2) どの種の細胞が MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞に分化するかについての解析。

骨髄移植実験、CD31, Wt-1 を用いた免疫染色実験を行った結果、一部の内皮間葉転換由来の筋線維芽細胞が、MFG-E8 陽性であることが明らかとなった。そこで、その割合を FACS を用いて詳しく評価した所、約 20% の MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞が内皮間葉転換由来であると考えられた。一方で、骨髄由来細胞、上皮間葉転換細胞は、MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞の起源ではないと考えられた。以上の結果から、MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞の約 80% は、常在性の筋線維芽細胞由来であると考えられた。

(3) 心筋梗塞後の心臓に対して MFG-E8 を投与し、梗塞後の病態が改善するかについての検討。

心筋梗塞処置後の心臓に MFG-E8 を投与した所、心筋梗塞後のアポトーシス細胞の残存数が減少し、その結果、梗塞領域における炎

症の程度が弱まった。さらに梗塞処置後の心臓の形態、機能も有意な改善が認められた。以上の結果から、MFG-E8 は、心筋梗塞の新規治療標的分子になると考えられた。

(4) ヒトの心筋梗塞病態へのフィードバック実験。

心筋梗塞を罹患した患者さんの心臓切片を anti-human MFG-E8 抗体および anti-human alphaSMA 抗体を用いて免疫染色した所、MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞が観察された。従って、MFG-E8 陽性の筋線維芽細胞はヒトの心筋梗塞病態とも密接に関連すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

《英文論文(査読あり)>(*は Corresponding Author)》

1. Yuki Ohba, *Michio Nakaya, Kenji Watari, Akiomi Nagasaka, & Hitoshi Kurose. GRK6 phosphorylates I B at Ser³²/Ser³⁶ and enhances TNF- α -induced inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461, 307-313 (2015)
2. Ayaka Tobo, 他 11 名, Satoshi Shuto, Michio Nakaya (14 番目), Hitoshi Kurose, Koichi Sato, & Fumikazu Okajima. Characterization of Imidazopyridine Compounds as Negative Allosteric Modulators of Proton-Sensing GPR4 in Extracellular Acidification-Induced Responses. *PLoS One* 10(6): e0129334. (2015)
3. Michio Nakaya, 他 9 名, 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. Kenji Watari#, Michio Nakaya#, Motohiro Nishida, Kyeong-Man Kim & Hitoshi Kurose. β -arrestin2 in infiltrated macrophages inhibits excessive inflammation after myocardial infarction. *PLoS One* 8(7): e68351. (2013) (#: Equally contributed)
5. Riris Jenie, 他 2 名, Michio Nakaya (4

番目), 他 2 名, 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)

6. Islam A.A.E-H. Ibrahim, Michio Nakaya, & Hitoshi Kurose Ezrin, Radixin, and Moesin Phosphorylation in NIH3T3 Cells Revealed Angiotensin II Type 1 Receptor Cell-Type-Dependent Biased Signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 122, 1-9 (2013)
7. Noriko Makita#, Yoji Kabasawa#, 他 3 名, Michio Nakaya (6 番目), 他 4 名 & Taroh Iiri Attenuated desensitization of α -adrenergic receptor by water-soluble N-nitrosamines that induce S-nitrosylation without NO release. *Circ. Res.* 112, 327-334 (2013)

《英文総説(査読あり)》

8. Akiomi Nagasaka#, Yuki Ohba#, Hitoshi Kurose, & *Michio Nakaya Novel functions of GRK6 in macrophages by phosphorylating the non-GPCRs substrates. *Macrophage* 2, e1021 (2015) (#: Equally contributed)
9. Kenji Watari, Michio Nakaya, & Hitoshi Kurose. Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. *J. Mol. Signal.* 9, 1-9 (2014)

[学会発表](計 7 件)

《招待講演》

10. 仲矢道雄、黒瀬等「心筋梗塞時におけるロイコトリエン B4 受容体の役割解明」**第 88 回日本薬理学会** (シンポジウム)(オーガナイザー), 2015 年 3 月
11. 仲矢道雄、黒瀬等「死細胞の貪食と心筋梗塞」**日本薬学会第 134 年会**(シンポジウム), 2014 年 3 月
12. 仲矢道雄「アポトーシス細胞の貪食の分子メカニズムに関する研究」**日本薬学会第 134 年会**(日本薬学会奨励賞受賞講演), 2014 年 3 月

13. **仲矢道雄**「アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の関与」
第 87 回日本薬理学会年会（シンポジウム）, 2014 年 3 月

14. **仲矢道雄**「アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の関与」
徳島大学疾患酵素学研究センター「酵素学研究拠点」シンポジウム, 2014 年 2 月

15. **仲矢道雄**「死細胞の貪食と心筋梗塞」
第 23 回日本循環薬理学会（シンポジウム）, 2013 年 12 月

16. **仲矢道雄**「死細胞の貪食と心筋梗塞」
生体機能と創薬シンポジウム（日本薬学会薬理系部会主催）, 2013 年 8 月

〔図書〕(計 3 件)

17. 大場悠生、**仲矢道雄**「G タンパク質共役型受容体キナーゼの生理機能」
生化学 87、No.5 (2015), 612-616

18. **仲矢道雄**「アポトーシス細胞の貪食の分子メカニズムに関する研究」
YAKUGAKU ZASSHI vol.135、No.8 (2015), 949-954

19. **仲矢道雄**、黒瀬等「生体内で死んだ細胞の除去を促進する新たな分子の同定～アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の役割～」
日本薬理学会雑誌 vol.145、No.1 (2015), 14-20

〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：心筋障害治療用薬剤組成物、心筋障害予防用薬剤組成物、心不全治療用薬剤組成物、心不全予防用薬剤組成物、心筋障害又は心不全を治療又は予防する方法、MFG-E8、MFG-E8 の使用、及び心筋障害又は心不全を治療又は予防する化合物のスクリーニング方法
発明者：**仲矢道雄**、黒瀬等、黒田雅彦
権利者：**仲矢道雄**、黒瀬等、黒田雅彦
種類：
番号：PCT/ JP2014/ 072028
出願年月日：2014/08/22
国内外の別：国際

〔その他〕
ホームページ等

<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

仲矢道雄 (NAKAYA MICHIO)
九州大学・薬学研究院・准教授
研究者番号：80464387