

心肥大時における MFG-E8 の役割解明

仲矢道雄

九州大学大学院薬学研究院 薬効安全性学分野

【研究の背景】

心肥大とは、高血圧などの圧負荷が原因となって心筋が肥大する疾患である。心肥大を起こした心臓では、過度なストレスによって多くの死細胞が生じ、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漏出による炎症を抑制するなど、心疾患時の病態形成に重要な役割を果たしている。しかしながら、心肥大時に生じる死細胞が、どのような分子メカニズムで除去されるかについては、未だほとんど明らかではない。

【目 的】

上記のような研究動向の中、申請者は、心肥大時の死細胞の貪食に Milk fat globule EGF factor-8 (MFG-E8) という分子が関与する可能性を見出した。MFG-E8 は死細胞の表面に露出される phosphatidylserine と貪食細胞表面のインテグリン $\alpha v \beta 3$ の両方に結合し、死細胞の貪食を促進する分子である¹⁾。そこで本研究では、心肥大時における MFG-E8 の役割を明らかにし、死細胞の貪食を切り口にした新規の心筋梗塞治療法開発の礎を築くことを目的とした。

【方 法】

圧負荷誘導性心肥大モデルマウスの作製

6-8 週齢の雄性 C57BL/6J 野生型 (WT) マウスと MFG-E8 ノックアウト (KO) マウスの心臓の横行大動脈を狭窄 (Transverse Aortic Constriction: TAC) することによって作成した。

免疫組織染色法による MFG-E8 発現細胞の同定

TAC 処置後 1 週目のマウスより心臓を採取し凍結切片を作成した。その後、各種一次抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡で蛍光シグナルを観察し、撮像した。

心機能パラメーターの評価

TAC 処置後 9 週目における心機能を心エコー法により評価した。

【結 果】

まず、心肥大時における MFG-E8 の発現量の変化を経時的に調べるため、TAC 処置後の WT マウスの心臓を用いて Western blotting を行った。その結果、MFG-E8 の発現量が処置後 1 週目をピークとして、偽処置群 (sham) に比べて有意に上昇することを見出した。そこで次に、MFG-E8 の産生細胞を明らかにするため、TAC 処置後 1 週目の心臓凍結切片を用いて免疫組織染色を行った。その結果、MFG-E8 は他臓器においてはマクロファージ等の免疫担当細胞に発現することが報告されていたが、心肥大時の心臓においては、マクロファージではなく、コラーゲン等を産生し、組織の線維化を担う筋線維芽細胞 (α SMA 陽性) が MFG-E8 を発現していることを見出した。

筋線維芽細胞が MFG-E8 を発現していたことから、筋線維芽細胞が貪食細胞として働く可能性が考えられた。しかしながら、これまで筋線維芽細胞が死細胞を貪食するという報告はない。そこで、心肥大時の心臓から筋線維芽細胞を単離し、そ

の貪食能を評価したところ、筋線維芽細胞が効率良くアポトーシス細胞を貪食することを見出した。一方、MFG-E8 KO マウス由来の筋線維芽細胞では WT マウス由来のものと比較して貪食能が顕著に低下していた。実際、TAC 処置を施した心臓切片におけるアポトーシス細胞を TUNEL 染色法によって検出したところ、MFG-E8 KO マウスの心臓では WT マウスと比較してアポトーシス細胞が貪食されずに残存していた。以上の結果から、心肥大時に筋線維芽細胞が MFG-E8 依存的にアポトーシス細胞を貪食することが示唆された。貪食されずに残存したアポトーシス細胞は、二次的なネクロシスをおこし、細胞内容物が漏出して炎症を引き起こす。そこで、TAC 処置後 1 週目の心臓における炎症性サイトカイン (TNF- α) や線維化関連因子 (CTGF) の発現量を RT-PCR 法によって測定したところ、それらの発現量が MFG-E8KO マウスにおいて有意に増加していた。さらに、MFG-E8 の欠損が心肥大時の心臓の機能に与える影響を、TAC 処置後 9 週目において心エコー法により評価したところ、心臓の収縮能を示す左内径短絡率 (Fractional Shortening) が WT マウスと比較して MFG-E8 KO マウスにおいては有意に低下していた。これら結果に対応し、TAC 処置後 9 週目における MFG-E8 KO マウスの生存率は、WT マウスに比べ顕著に低下していた (9 週目の生存率: WT マウス; 91.7%、MFG-E8 KO マウス; 38.5%)。以上の結果から MFG-E8 を欠損することで、心肥大時の炎症と線維化が亢進し、心機能が悪化することが明らかとなった。

【考 察】

本研究によって、心肥大時に出現する筋線維芽細胞が自ら分泌する MFG-E8 を用いて死細胞の貪食除去を担うことにより、病態時の炎症応答や線維化を抑制し、心保護的に働くことが示唆された。また、本研究成果によって、これまで組織の線維化のみを担うとされてきた筋線維芽細胞が、死細胞の貪食除去の役割も担うことも明らかとなった。今後は、心肥大時の筋線維芽細胞による死細胞の貪食が、マクロファージ等の貪食細胞による貪食も加えた全体の貪食のうち、どの程度寄与しているかを明らかにしたいと考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

MFG-E8 は、心肥大時の心臓に保護的に働く分泌タンパク質である。そこで、心肥大治療への応用を目指し、TAC 処置後に、精製した MFG-E8 蛋白質を投与、もしくはアデノ随伴ウイルスを用いて心臓特異的に MFG-E8 を発現させ、心肥大の病態が改善されるかについて検討を行っていく予定である。

【参考・引用文献】

- 1) Hanayama R, et al. *Nature* (2002), 412:182-187