

慢性炎症期筋線維芽細胞の性質解明とその治療応用への基盤構築

仲矢道雄

九州大学大学院薬学研究院 疾患制御学分野

【研究の背景】

組織の線維化は、コラーゲン等を産生する筋線維芽細胞によって実行される。最近、心筋梗塞後の心臓において急性炎症期から慢性炎症期に移行すると、これまで最終分化型と考えられていた筋線維芽細胞がさらに分化し、COMP 等の骨や軟骨の分化に関連する蛋白質を発現するようになることが明らかになった。すなわち、「筋線維芽細胞」は、「急性炎症期」と「慢性炎症期」とで分けて考える必要があり、「線維芽細胞」→「急性炎症期筋線維芽細胞」→「慢性炎症期筋線維芽細胞」という新しい枠組みで筋線維芽細胞の分化を理解する必要が出てきた。

【目 的】

上記の背景の中、申請者は、「A」(特許申請準備中のため)という分泌蛋白質が、慢性炎症期になると筋線維芽細胞に高発現するようになり、慢性炎症期筋線維芽細胞のコラーゲン産生能を促進する可能性を見出した。そこで本研究では、「A」を切り口に慢性炎症期筋線維芽細胞の性質を解明し、新規の抗線維化薬開発の礎を築く。

【方 法】

心筋梗塞モデルマウスの作製

心筋梗塞(Myocardial infarction: MI)モデルマウスは、心臓の冠動脈左前下行枝を結紮することで作製した。

ノックアウト(KO)マウスの作製

GONAD 法¹⁾を用いてマウスの受精卵に CRISPR-cas9 とガイド RNA を導入し、「A」の Exon1 内に終止コドン配列を挿入し、「A」KO マウスを作成した。

【結 果】

(1) 分泌タンパク質「A」は線維化した慢性炎症期の心臓において筋線維芽細胞に特異的に発現する

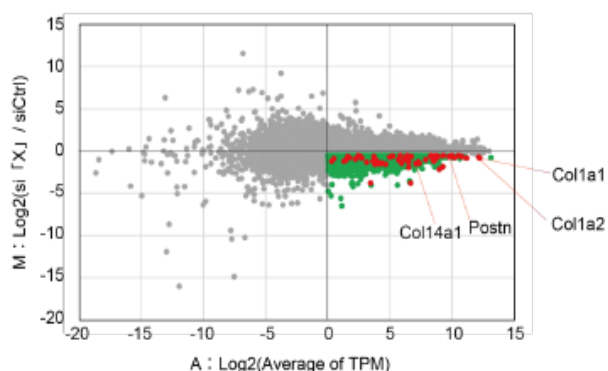
「A」の発現細胞を明らかにすべく、線維化したマウス心臓切片において in situ hybridization を用いた「A」mRNA の検出と、心筋細胞、白血球細胞、内皮細胞のマーカー分子(TNNI3, CD45, CD31)に対する抗体を用いた免疫染色あるいは、慢性炎症期の筋線維芽細胞のマーカー分子である Comp mRNA の検出を同時に行うことにより検討した。その結果、「A」は Comp 陽性の細胞においてのみ観察された。また、「A」のシグナルはコントロール群の心臓においては認められなかった。これらの結果から、「A」は線維化した慢性炎症期の心臓の筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなった。

(2) 「A」は心臓の筋線維芽細胞において線維化因子の発現を促進する

MI 処置後のマウス心臓から分取した筋線維芽細胞において siRNA を用いて「A」をノックダウンし、RNA-sequence を行った。得られた遺伝子の発現量データで MA Plot を作成した。そして、「A」のノックダウンによって発現量が減少した遺伝子($M \leq -0.5, A > 0$)を 2611 個同定し、これら遺伝子群に対して DAVID を用いた Gene Ontology 解析を行った。その結果、Postn

や Col1a1, Col1a2, Col14a1 をはじめとした、多くの細胞外マトリックスタンパク質の mRNA が「A」ノックダウンによって有意に減少した(図1)。

この RNA-seq の結果を確かめるため、RT-qPCR を行ったところ、RNA-seq の結果と一致して筋線維芽細胞のマーカー分子である Postn や Col1a1, Col1a2, Col14a1 の発現量が「A」のノックダウンにより有意に抑制された。これらの結果から、「A」は線維化関連因子の産生を促進する分子であると考えられた。



(3) 「A」KO マウスの取得

CRISPR-cas9 とガイド RNA を導入した受精卵から産まれたマウスと野生型マウスを交配し、片側のアレルに目的の終止コドンノックイン配列を保持するマウスを得た。そこでこの得られたヘテロマウス同士の交配を行い、「A」KO マウス(終止コドン配列の KI ホモマウス)を作成した。産仔マウスからゲノム DNA を抽出し、PCR をかけて配列の長さを検出したところ、野生型マウス、ヘテロマウス、「A」KO マウスの 3 種類のマウスが得られた。その後さらに、「A」KO マウスのゲノム DNA の配列を sequence 解析したところ、「A」の Exon1 内に終止コドン配列が KI されていることが確認できた。

〔図 1〕マウス心臓筋線維芽細胞における「A」の siRNA 処置による各種遺伝子の mRNA の発現量変化

【考 察】

本研究により、「A」は慢性炎症期の線維化心臓において慢性炎症期筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかになった。そしてさらに、「A」がコラーゲンなどの線維化因子の発現を増加させる分子であることも明らかにした。今後は、「A」がコラーゲンなどの線維化因子の発現を増加させる分子メカニズム、さらには「A」欠損マウスを用いて生体内における「A」の線維化への寄与を検討する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

分泌蛋白質である「A」は、正常時のマウス心臓には全く発現せず、線維化した心臓の慢性炎症期筋線維芽細胞に特異的に発現する。従って「A」は、未だ決定的な治療薬の無い線維化治療薬創出の格好の創薬標的分子となりうる。今後、「A」KO マウスで心筋梗塞後あるいは心肥大時の線維化が有意に減弱するかを検討し、創薬に繋げたいと考えている。

【参考・引用文献】

- (1) Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K, Gurumurthy CB. i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* 19(1):25. 2018