

主論文の要約

**Cardiomyocytes capture stem cell-derived,
anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated
endocytosis in acute myocardial infarction**

急性心筋梗塞において、抗アポトーシス作用を有する
幹細胞由来 microRNA-214 はクラスリン依存性
エンドサイトーシスを介して心筋細胞に取り込まれる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

江口 駿介

【背景】

近年、喫煙、脂質異常症及び高血圧などの心血管疾患における危険因子がより厳密に治療されてきたことで、心筋梗塞の発生率は減少傾向にある。しかしながら、虚血性心疾患を含む心血管疾患は世界中で依然として主な死亡原因である。そのような状況下で、細胞治療は心不全及び急性心筋梗塞を改善させる治療法として注目されてきており、急性心筋梗塞に対する細胞移植の効果が多くの早期臨床試験で研究されている。骨髄細胞が細胞治療源として用いられることが多いが、その有効性については議論の余地が多く、間葉系幹細胞が細胞治療に用いられることが増えてきている。間葉系幹細胞は、細胞保護及び血管新生に関与する可能性がある様々なサイトカイン、ケモカイン及び成長因子を産生及び分泌することが知られている。間葉系幹細胞はそれらのパラクリン因子をエクソソームや微小小胞体などの細胞外小胞中に分泌し、心機能を改善させる。内皮細胞、心臓線維芽細胞及び移植細胞に由来する細胞外小胞は細胞間コミュニケーションの重要な媒介物質と考えられているが、心筋細胞が細胞外小胞を取り込む機序は明らかにされていない。本論文では、間葉系幹細胞の1つである *adipose-derived regenerative cells* (ADRCs, 脂肪由来再生細胞) を用いて、幹細胞由来の細胞外小胞が心筋細胞へ取り込まれる機序を検討した。

【結果】

ADRC は虚血誘発性心機能障害を改善させる (Figure 1)

ADRC の培養液を培養心筋細胞に加えることにより、低酸素下での心筋細胞の損傷が抑制された。次に左前下行枝の結紮によるマウス心筋梗塞モデルに ADRC を心筋内注入した。コントロール群と比較して、ADRC 投与群では2日後の梗塞範囲、左室短縮率、BNP 値及び ANP 値に有意な改善を認めた。また、ADRC 投与群では生存率も改善し、急性期死亡の主な原因である心破裂がコントロール群よりも少なかった。アポトーシスへの効果を評価するために、心筋組織の TUNEL 染色を行ったところ、心筋梗塞作成1日後及び2日後の虚血領域の TUNEL 陽性細胞の割合は ADRC 投与群で有意に減少していた。

ADRC 関連 microRNA-214 は虚血誘発性心筋アポトーシスを抑制する (Figure 2)

心筋細胞、骨髄単核球細胞及び ADRC において、35 個の抗アポトーシス作用を有する分泌型 microRNA の発現量を測定したところ、microRNA-214 が ADRC 中で最も多く発現していた。ADRC の培養液を培養心筋細胞に加えることにより、心筋細胞内での microRNA-214 の発現量が有意に増加した。心筋梗塞作成1日後及び2日後の心筋組織においても、ADRC 投与群で microRNA-214 の発現量が有意に増加した。

培養心筋細胞において microRNA-214 を過剰発現させたところ、低酸素誘発性アポトーシスが有意に改善した。microRNA-214 の阻害薬を用いた実験では、ADRC の心筋保護効果（梗塞範囲、左室短縮率及び TUNEL 陽性細胞の割合）が抑制された。心筋梗塞作成2日後には ADRC 投与群において、アポトーシスと関連ある *Bcl2l1l* と *Slc8a1*

の増加が抑制されたが、microRNA-214 の阻害薬で処理した ADRC を投与した群ではその抑制効果が有意に減弱した。

低酸素条件下において心筋細胞でのクラスリン依存性エンドサイトーシスは亢進する (Figure 3)

細胞外小胞の心筋細胞への取り込みを検討するために、蛍光色素 (PKH67) で標識した ADRC 由来の細胞外小胞を加えて心筋細胞を培養する実験を行った。低酸素条件下において心筋細胞中の標識細胞外小胞の増加を認めた。4 種類のエンドサイトーシス阻害薬 (クロプロマジン、アミロライド、サイトカラシン D 及びゲニステイン) を使用したところ、クラスリン依存性エンドサイトーシスを抑制するクロプロマジンを投与した群では ADRC の低酸素下での培養心筋細胞の損傷抑制効果が有意に減弱した。クロプロマジンの投与により、標識細胞外小胞の取り込み及び microRNA-214 の取り込みの両方が減少した。クラスリン依存性エンドサイトーシスを別の機序で抑制する Dynasore を用いた実験においても、クロプロマジンと同様に、ADRC の低酸素下での培養心筋細胞の損傷抑制効果が有意に減弱した。

心筋梗塞急性期には心筋細胞でのクラスリン依存性エンドサイトーシスが亢進する (Figure 4)

心筋梗塞作成 1 日後及び 2 日後の心筋組織において、クラスリン依存性エンドサイトーシスを制御する Adaptor protein-2 (AP2) のリン酸化亢進を認めた。細胞外小胞の心筋細胞への取り込みを in vivo で確認するために、マウス心筋梗塞モデルにクロプロマジン溶液で希釈した ADRC を心筋内投与した。クロプロマジンを用いた群では通常の ADRC 投与群と比較して、標識細胞外小胞の取り込みが有意に減少した。また、クロプロマジンを用いることで TUNEL 陽性細胞の割合が増加し、生存率が有意に低下した。

【考察】

今回我々は、ADRC から分泌された細胞外小胞中の microRNA-214 が急性心筋梗塞によって誘発される心破裂を抑制すること、心筋細胞におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスが細胞内への microRNA の輸送において重要な役割を果たしていることを明らかにした。損傷心筋細胞ではクラスリン依存性エンドサイトーシスが活性化し、正常心筋細胞よりも細胞外小胞の取り込みが亢進している可能性があり、ADRC 由来の細胞外小胞が、損傷心筋細胞に microRNA を優先的に運搬するための有用な治療となり得ると考えられた。

【結論】

心筋細胞においてクラスリン依存性エンドサイトーシスが、抗アポトーシス作用を有する分泌型 microRNA の取り込みに重要な役割を果たしていることが示唆された。