

主論文の要旨

Akt-dependent Girdin phosphorylation regulates repair processes after acute myocardial infarction

〔 Akt 依存性の Girdin のリン酸化は急性心筋梗塞後の
治癒過程を制御する 〕

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

(指導 : 室原 豊明 教授)

早野 真司

【緒言】

心筋梗塞の生命予後は過去 20 年で治療法の進歩により改善した。しかしながら依然として主たる死因の一つである。特に、心破裂に代表される合併症はいまだ予後不良因子である。炎症反応や未熟な組織治癒過程に起因する梗塞組織の脆弱性は心破裂につながる。梗塞組織では心臓線維芽細胞が心臓筋線維芽細胞に分化し、 α -smooth muscle actin(α SMA)を発現し、細胞外基質を分泌することにより、心筋梗塞組織の強度を上げる。phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)-Akt 経路は細胞の生存、増殖や成長の制御において重要である。Girdin はセリン 1416 において Akt によってリン酸化され、Girdin のリン酸化が細胞膜とアクチン細胞骨格の相互作用し内皮細胞や血管平滑筋細胞といった種々の細胞で増殖や移動に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では Girdin のリン酸化が心筋梗塞後の治癒過程で果たす役割について遺伝子改変マウス及び心臓線維芽細胞を用いて検討を行った。

【対象及び方法】

「Girdin 欠損マウス」及び「機能的リン酸化部位であるセリンをアラニンに置換した Girdin knockin マウス(Girdin SA マウス)」を用いて心臓における Girdin の役割について検討した。siRNA を用いて Girdin を knockdown したヒト心臓線維芽細胞、および Girdin SA マウスより単離した心臓線維芽細胞を用いて、Girdin とそのリン酸化が細胞の遊走能と増殖能に及ぼす影響を検討した。遊走能を Boyden Chamber assay で、増殖能を MTS assay を用いて評価した。さらに、心筋梗塞モデルを用いて、Girdin のリン酸化が心臓筋線維芽細胞に与える影響、心筋梗塞組織の線維化、生命予後に関して検討を行った。

【結果】

Girdin 欠損マウスには nLacZ がレポーター遺伝子として組み込まれており(Fig. 1A)、この欠損マウスの心臓を用いた X-gal 染色により、Girdin の局在を検討した。Girdin は心筋細胞には認められず、心筋細胞間に存在する細胞に発現していることが確認された(Fig. 1B)。アンジオテンシン II 負荷により WT マウスでは Girdin のリン酸化レベルが上昇した(Fig. 2A)。蛍光免疫組織染色によりリン酸化 Girdin と α SMA 陽性細胞の共局在を確認した。リン酸化 Girdin は CD31 陽性細胞や CD45 陽性細胞とは共局在せず、一部のリン酸化 Girdin 陽性細胞は CD31 陽性細胞に接していた。これらのことより、Girdin は心臓筋線維芽細胞に発現し、リン酸化されていると考えられた(Fig. 2B)。次にヒト心臓線維芽細胞をアンジオテンシン II により刺激したところ、Girdin のリン酸化レベルが上昇した(Fig. 2C)。心臓線維芽細胞の遊走能及び増殖能に Girdin が与える影響について検討した。siRNA を用いて Girdin を knockdown したヒト心臓線維芽細胞ではコントロールに比較して遊走能及び増殖能が抑制された(Fig. 3B、3C)。Girdin SA マウスより単離した心臓線維芽細胞においても遊走能及び増殖能が抑制された(Fig. 3B、3C)。WT マウス心筋梗塞モデルでは心筋梗塞後 4 日で

Girdin のリン酸化レベルが上昇しており、リン酸化 Girdin は α SMA 陽性細胞と共存を示した(Fig. 4A、B)。心筋梗塞の境界領域と梗塞領域において α SMA 陽性細胞におけるリン酸化 Girdin 陽性の比率は心筋梗塞後 4 日で最も高値を示した(Fig. 4C)。心筋梗塞後 4 日及び 7 日の境界領域と梗塞領域について蛍光免疫染色により検討した。Girdin SA マウスでは WT マウスに比較して心臓筋線維芽細胞の数が抑制された(Fig. 5A、B)。Ki-67 を指標として α SMA 陽性細胞の増殖能を検討したところ、Girdin SA マウスでは増殖能が抑制された(Fig. 5C、D)。Picrosirius red 染色により心筋梗塞後の心臓線維化を評価したところ、Girdin SA マウスでは WT マウスに比べて Picrosirius red 染色陽性の面積が抑制され、Collagen type I α 1、Collagen type III α 1 の mRNA 発現レベルも抑制された(Fig. 6A、B、C)。Girdin SA マウスでは心筋梗塞後心臓破裂の発生率が高く、予後は WT マウスに比較して有意に不良であった(Fig. 6D)。

【考察】

Girdin は心臓線維芽細胞に発現しリン酸化されることが確認された。Girdin のリン酸化は心臓線維芽細胞の増殖及び遊走能の制御を介して、心筋梗塞後の組織修復に必要なコラーゲン産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。Girdin SA マウスでは心筋梗塞後の心臓破裂が高頻度で発生し生命予後が不良であり、Girdin リン酸化の阻害による不十分な組織修復が不良な生命予後につながると考えられた。Girdin は肝線維化、血管損傷後の新生内膜形成、腎障害に関与していると報告されている。心臓での Girdin の発現について初めての報告であり、心臓線維芽細胞に発現していることは間葉系細胞に発現している点で肝臓や腎臓と同様である。近年、心臓筋線維芽細胞はコラーゲンなどの細胞外基質を産生し、傷害を受けた心臓の組織修復に関与していると報告されている。種々の液性因子刺激による心臓線維芽細胞の増殖・遊走に Akt が関与することが知られているが、心筋梗塞後の心臓線維芽細胞における Akt の役割は十分に解明されていない。本研究では Akt による Girdin リン酸化が心臓線維芽細胞の増殖と遊走を制御していることを明らかにした。

【結語】

Girdin の Akt によるリン酸化が、心臓線維芽細胞の増殖と遊走を制御し、心筋梗塞後の組織修復に重要な役割を果たしていることが示された。Girdin のリン酸化部位を変異させることにより心臓組織のコラーゲン量が不足し組織の脆弱性が増し、心破裂の増加することが示された。