

主論文の要旨

**Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker
Meflin in Cardiac Tissue Repair and the Development
of Diastolic Dysfunction**

間葉系幹細胞マーカーMeflinの
心臓修復・拡張障害型心不全進行における役割

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)

原 昭壽

【緒言】

線維化は細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) 構成タンパク質の過度な蓄積と定義され、ECM が正常組織に置き換わると臓器の硬化・機能不全の原因となる。一方で、線維化は組織の修復においては不可欠かつ重要な生体内現象である。筋線維芽細胞 (myofibroblast: MF) は、ECM 構成タンパク質を多量に産生し、TGF- β などの線維化促進性のサイトカインを分泌することで組織修復、そして線維化における主要な役割を担っている。MF のもう一つの特徴として、収縮性タンパク質である α -SMA を持ち、障害組織の収縮・硬度をコントロールしている。今までの研究において、MF は組織線維芽細胞 (resident fibroblast)、間葉系幹細胞 (mesenchymal stromal cell: MSC)、心外膜細胞など様々な細胞から分化したものであると報告されている。しかし、これらの起源細胞が MF に変化する分子メカニズムについては不明な点が多い。

心不全は全世界における主要な死亡原因である。心筋の収縮力低下や心筋梗塞による心筋の喪失によってもたらされる収縮機能不全は、心不全の原因として広く知られており研究されてきた。このため収縮不全型心不全の予後は劇的に改善してきたと言える。さらに近年、心臓の拡張機能不全がもう一つの心不全の原因として注目されている。拡張障害型心不全は、今まで収縮機能の指標とされてきた駆出率 (ejection fraction: EF) の低下を伴わないことから、駆出率の保たれた心不全 (heart failure with preserved ejection fraction: HFpEF) と呼ばれている。HFpEF を持つ患者では加齢・高血圧・虚血性心疾患・糖尿病などの代謝性疾患が背景にあり、心臓組織の線維化・硬化が認められることがわかっているが、その具体的な分子メカニズムは明らかでない。

当研究室は以前に、GPI アンカー型細胞膜タンパク質 Meflin (遺伝子名 ISLR) が MSC に発現していることを発見した。さらに Meflin が MSC の未分化性を維持する機能を持ち、Meflin の喪失が MSC の骨や軟骨への分化を促進することを報告した。今回我々は Meflin の未分化性維持機能に着目し、Meflin が MF への分化を抑制すると仮説を立てた。心臓における Meflin の発現と、心不全増悪における Meflin の関わりについて検証を行った。

【方法】

間葉系細胞株 C3H10T1/2 にレトロウイルスを用いて Meflin 強制発現/抑制細胞を作成した。それらの細胞における MF に関連する線維化促進性遺伝子を定量 PCR 法により調べた。免疫蛍光法を用いて、MF への分化を組織学的に観察・定量を行った。Meflin の生化学的機能を調べるため、免疫沈降法で結合タンパク質の同定、下流シグナルの観察を行った。In vivo において、心臓疾患モデルとして冠動脈結紮による心筋梗塞モデル、大動脈結紮による心不全モデルを作成した。また、Meflin プロモーター支配下に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Meflin-ZsGreen-Cre-DTR: Meflin-ZDC) を作成し、レポーターマウス (Rosa26-loxP-stop-loxP-tdTomato: LSL-tdTomato) と掛け合わせることで Meflin 陽性細胞が病的環境においてどのような細胞に分化するかを観察した。Meflin ノックアウトマウス (Meflin-KO) と野生型マウス (WT) で各病態モデル

を作成し、予後観察・組織学的評価・MRIを用いた形態的評価・心室内カテーテルによる生理学的評価・分子間力顕微鏡での物理学的指標の評価を行った。

【結果】

MSCのMFへの変化と、Meflinとの関わりを調べるため、間葉系細胞株C3H10T1/2に“TGF- β 刺激”や“硬い基質での培養”によるMF分化刺激を加え遺伝子解析を行った。その結果、MFへの分化を示す α -SMAの上昇を認めた一方でMeflin発現が著明に減少した。Meflinを強制発現させた細胞では線維化促進性遺伝子(α -SMA, S100a4, Colla1など)が有意に抑制された一方、shRNAを用いたMeflin発現抑制によってこれらの遺伝子の発現が増加した(Figure 1A-C)。Meflin抑制細胞の形態を観察すると、MFの特徴である扁平化した細胞質、 α -SMAの発現が認められた(Figure 1D, E)。これらの結果はMeflinがMFへの分化に抑制的作用を持つことを示すものであった。

In situ hybridization法でマウス正常心におけるMeflin mRNAを観察すると、線維芽細胞、ペリサイト、心内膜・心外膜細胞の一部に発現を認めた(Figure 2A-D)。マウス心筋梗塞モデルの梗塞領域を組織学的に観察すると、14日後の梗塞域においてMeflin陽性細胞が増殖していることが観察された。レポーターマウス(Meflin-ZDC; LSL-tdTomato)に心筋梗塞や慢性心不全を作成した個体で観察を行うと、tdTomato陽性細胞が線維化領域において α -SMA陽性細胞に変化したことが確認された(Figure 3A-G)。これらの結果は線維化領域において、Meflin陽性細胞がMFに分化することを示すものであった。

組織修復におけるMeflinの機能を観察するため、Meflin-KOマウスに心筋梗塞を発症させ、観察を行った。予後観察を行うと、心筋梗塞発症3日以内に有意に心破裂を起こして死亡することがわかった。組織的観察を行うと、心外膜領域のI型Collagen発現が有意に減少しており、心破裂のメカニズムとして、梗塞後の組織修復機能が障害されていることが示唆された(Figure 4A-E)。

次に、慢性線維化におけるMeflinの機能を観察するため、Meflin-KOマウスに大動脈結紮による慢性心不全を作成し観察を行った。その結果、Meflin-KOマウスでは有意に心重量が増加しており、予後不良であった。組織学的観察ではMeflin-KOにおいて細網線維が有意に増加しており、線維化促進が示唆された(Figure 5A-H)。MRIでの機能解析を行うとMeflin-KOマウスは左室壁の肥厚・左室の狭小化が観察され、ヒトにおける拡張障害型心不全の特徴と類似していた(Figure 6A-B)。また、分子間力顕微鏡での心臓組織の弾性解析では、Meflin-KOマウスの不全心において左室壁が有意に硬化していた。さらに心室内カテーテル検査での血行動態測定により、Meflin-KOマウスの拡張能低下が認められた(Figure 6C-E)。これらの結果は、Meflin機能不全による間質線維化が拡張障害の原因となることを示唆するものであった。

Meflinの分子生化学的な機能を調べるため、過去のデータベースを参照し、結合タンパク質の候補として抗線維化作用の報告があるBMP7に着目した。免疫沈降法により、MeflinとBMP7の相互作用が確認された。さらにMeflin陽性細胞にBMP7を作用

させたところ、BMP7 シグナルの下流である Smad1/5 リン酸化や転写因子 Id2/3 の発現が有意に増強した(Figure 7A-I)。この結果により、Meflin の抗線維化作用・未分化性維持のメカニズムに BMP7 が関わっていることが示唆された。

【考察】

本研究は MSC のマーカーとして報告された Meflin が心臓線維芽細胞にも発現しており、組織修復や線維化の抑制に強く関わっていることを報告した。興味深い点としては、Meflin-KO マウスの表現型が HFpEF と類似しており、その HFpEF 発症に関わる因子である加齢や低酸素によって Meflin 発現が抑制されることである(Figure 8A-D)。HFpEF は病因や診断法、治療法など未だ解決されていない問題が多い。HFpEF は様々な疾患を包括する概念であるが、間質線維化に関わる病態の一部を明らかにしたと言える。

BMP7 シグナルは TGF- β シグナルに対する拮抗作用が知られており、抗線維化性サイトカインとして知られる。理論上は BMP7 シグナルの増幅作用が抗線維化に繋がることが推測されるが、今回は BMP7 シグナル作用の In vivo における効果は検討されていない。また、TGF- β と BMP7 の関係も多くの研究にも関わらず未だ不明な点が多い。Meflin が BMP7 シグナルを増強する詳細なメカニズムも含め、さらなる研究が望まれる。

本研究は観察研究であり、In vivo レベルで Meflin 発現誘導の介入効果を示したものではない。しかしながら、Meflin 発現を誘導する薬剤の開発など心不全治療の新しいターゲットに関する新しい知見を示した。また、線維化は心不全だけでなく多くの疾患に関わる生体现象であることから、多くの疾患の治療開発への可能性が期待される。

【結語】

Meflin は線維芽細胞の筋線維芽細胞分化に抑制的な役割を持ち、その機能抑制は組織修復障害や拡張障害型心不全の進展に密接に関わっている。