

称号及び氏名 博士（獣医学） 古賀 真昭

学位授与の日付 平成31年2月28日

論文名 マクロファージと筋線維芽細胞の特性に基づいた
ラット心筋線維化の病理発生に関する研究

論文審査委員 主査 山手 丈至
副査 杉浦 喜久弥
副査 岡田 利也

論文要旨

緒言

心臓は、血液循環の主要な動力源として、収縮および弛緩を規則正しく繰り返すことにより全身に血液を送り出すという重要な機能を担っている。この機能が低下し、全身の臓器や組織の需要に見合う十分な血液量を拍出できない状態を心不全という。高齢化社会に伴い心不全の患者数は年々増加している。その症状として、労作時呼吸困難、息切れ、尿量減少、四肢の浮腫等が現れることから、生活の質的低下（Quality of Life ; QOLの低下）が生じ、日常生活が障害される。また、重篤な場合は突然死の可能性もある危険な病態である。心不全の原因としては心筋梗塞、狭心症、心筋症、弁膜症などの心臓疾患が挙げられ、これらの疾患による機械的ストレス、心筋虚血、炎症などによる直接的な心筋傷害により心筋線維化が引き起こされる。心筋線維化は心筋組織の硬度の上昇や心収縮の統合性の障害などを導き、その結果心臓の拡張および収縮機能の低下をもたらすことで心不全を惹起する。現在のところ、心不全に対する治療法としては異常な弁膜切除などの外科的手術や薬物投与による心機能を改善する方法が行われているが、心筋線維化を直接ターゲットとした治療法は確立されていない。

線維化の病理発生機序は、一般的には次のように考えられている。すなわち、傷害組織に反応するマクロファージなどの炎症細胞から TGF- β などの線維原性因子が放出され、こ

これらの因子が筋線維芽細胞を誘導し、その筋線維芽細胞からコラーゲンなどの細胞外基質が過剰に産生されることで線維化が進行する。この一連の機序の中で最も重要な働きをするのがマクロファージと筋線維芽細胞である。傷害部位に出現するマクロファージは、機能的に CD68 を発現する M1 型と CD163 を発現する M2 型に分極化される。M1 型は高い貪食活性を有するが、起炎因子を産生することで炎症を惹起し、組織傷害を助長する。一方、M2 型は炎症抑制、線維化および組織修復に関与する。しかし、これらのマクロファージの特性は、傷害の程度や経過により異なると考えられている。筋線維芽細胞は α -平滑筋アクチン (α -SMA) を発現する特徴があるが、その形成過程では α -SMA 以外にも vimentin や desmin などの細胞骨格を発現する。しかし、その発現パターンは傷害後の病期や臓器間で異なるとされている。さらに、筋線維芽細胞の由来については既存の線維芽細胞の他に未分化間葉系細胞が考えられているが、その詳細は明らかになっていない。

本研究では、心筋線維化に関わるマクロファージの特性と筋線維芽細胞の由来および細胞特性を主に免疫組織化学的手法を用いて解析し、心筋に生じる線維化の病理発生機序の一端を解明することを目的とした。線維化はリモデリングであるが、モデリング状態のマクロファージの基礎データを得るために、第 1 章では、ラットの心臓発生過程におけるマクロファージの特性を解析した。第 2 章および第 3 章では、心筋傷害を誘発するイソプロテレノールを投与して作製したラット心筋線維化モデルを用いて、それぞれマクロファージおよび筋線維芽細胞の細胞性状を解析した。

第 1 章 ラットの心臓発生過程におけるマクロファージの特性解析

第 1 節 マクロファージの動態および分布

胎齢 18、20 日、生後 1、3、6、10、15、20 日齢および 7 週齢の F344 ラットの心臓を採取し、CD68、CD163、MHC クラス II および CD204 に対する免疫染色を実施した。各抗原を発現するマクロファージは生後増加したが、特に、CD68 発現マクロファージは生後一過性に増加し、CD163 および MHC クラス II 発現マクロファージは成体に至るまで増加し続ける特徴があった。また、CD204 発現マクロファージは、他の抗原を発現するマクロファージと異なり胎生期にすでに出現していた。なお、心臓（右心室壁、心室中隔、左心室壁）におけるこれら抗原を発現するマクロファージの分布に偏りは認められなかった。

第 2 節 マクロファージの M1 型/M2 型分極化に基づいた特性

第 1 節の解析において CD68 発現マクロファージが最も多く認められた生後 10 日齢のサンプルを用いて二重免疫蛍光染色を実施した。10 日齢の心臓のマクロファージのほとんどは CD68 (M1 型) および CD163 (M2 型) を共発現し、M1 型/M2 型の分極化は認められなかった。また、MHC クラス II 発現マクロファージの約 40%と CD204 発現マクロファージの約 50%は M1 型にも M2 型にも分極化を示さず、それぞれの抗原を独自に発現するマクロファージが存在することが分かった。

第 2 章 イソプロテレノール誘発心筋線維化モデルラットにおけるマクロファージの特性解析

第 1 節 イソプロテレノール誘発心筋線維化の病態

7 週齢の SD ラットにイソプロテレノール (10 mg/kg) を単回皮下投与し、投与後 8 時間、

1、3、5、7、14、21、28日に心臓を採取し、HE染色およびマッソントリクローム染色を実施し線維化の病態について評価した。投与後1日より炎症細胞の浸潤および水腫がみられ、投与後3日にはその程度がさらに強くなった。その後、投与後7日からは線維化が見られ始め、投与後14日に最も高度となり、投与後28日にかけて線維化部位の細胞成分が減少し癒痕化した。

第2節 心筋線維化の病期ごとに出現するマクロファージの特性

傷害部位に出現するマクロファージについてその特性をCD68、CD163、MHCクラスII、CD204、Iba-1およびガレクチン-3 (Gal-3) に対する免疫染色を実施して解析した。CD68、MHCクラスII、CD204、Iba-1およびGal-3発現マクロファージは傷害早期に一過性に増加し、その後減少した。一方、CD163発現マクロファージは投与後7日以降線維化とともに増加し、その後も持続した。

第3節 M1型/M2型分極化に基づいた心筋線維化に出現するマクロファージの特性

傷害部位に出現するマクロファージのM1型/M2型分極化を解析するため、炎症が最も高度にみられた投与後3日のサンプルを用いて二重免疫蛍光染色を実施した。CD68 (M1型) およびCD163 (M2型) を共発現しているマクロファージは極めて少なく、それぞれの抗原を単発現するマクロファージが約50%存在し、M1型/M2型分極化が認められた。また、MHCクラスII発現マクロファージはM2型 (CD163) に、CD204発現マクロファージはM1型 (CD68) に分極化していることが分かった。

さらに、マクロファージから産生される関連因子についてReal time PCR法を用いて測定した。M1型マクロファージ関連因子であるMCP-1、IL-1 β およびIL-6、M2型マクロファージ関連因子であるIL-10は投与直後に一過性に増加した。M2型マクロファージ関連因子である線維原性因子TGF- β 1は傷害早期から増加し、持続した。

また、単球系マーカーであるCCR2のmRNAは投与後1日で有意に増加したことから、投与後1日から有意に増加し始めたCD68発現M1型マクロファージは血中単球由来であることが示唆された。

第3章 イソプロテレノール誘発心筋線維化モデルラットにおける筋線維芽細胞の特性解析

第1節 筋線維芽細胞の基本的な細胞骨格の発現

筋線維芽細胞の形成過程にみられる細胞骨格の発現を解析するため、第2章で作製した心筋線維化モデルを用いて α -SMAおよびvimentinに対する免疫染色を実施した。 α -SMAおよびvimentinを発現する筋線維芽細胞が傷害早期の投与後3日に最も多く認められ、その後徐々に減少した。

第2節 筋線維芽細胞の由来細胞の探索

筋線維芽細胞の由来を探索するため、Thy-1、GFAP、nestinおよびA3に対する免疫組織化学染色を実施した。Thy-1発現細胞は、傷害部位において投与後3日から出現し、その後持続して認められた。さらに、傷害部位周囲の血管周囲にはThy-1やA3陽性細胞が増加した。Thy-1やA3発現細胞は未分化間葉系細胞と考えられていることから、これら細胞が筋線維芽細胞の由来の可能性が示唆された。なお、肝線維化ではGFAP発現の肝星細胞が出現し、肝線維化での筋線維芽細胞の由来と考えられているが、心筋線維化では認めら

れなかった。また、肝線維化で認められる体性幹細胞を認識する nestin 発現細胞も認められなかった。

総括

ラットの心臓発生過程と薬物誘発心筋線維化に出現するマクロファージと筋線維芽細胞の細胞特性を解析し、以下の成績を得た。

1. ラットの心臓発生過程において、CD68 発現マクロファージは生後一過性に増加し、一方、CD163 と MHC クラス II 発現マクロファージは生後から成体に至るまで増加し続けた。心臓の発生段階のマクロファージには M1 型 (CD68) /M2 型 (CD163) 分極化は認められなかった。
2. ラットのイソプロテレノール誘発心筋線維化において、CD68 発現 M1 型マクロファージが傷害早期に増加し、それに続く線維化に伴い CD163 発現 M2 型マクロファージが増加した。
3. ラットのイソプロテレノール誘発心筋線維化において、MHC クラス II、CD204、Iba-1 および Gal-3 発現マクロファージは傷害早期に増加した。MHC クラス II 発現マクロファージは M2 型に、CD204 発現マクロファージは M1 型に分極化していた。
4. ラットのイソプロテレノール誘発心筋線維化において、M1 型マクロファージ関連因子である MCP-1、IL-1 β と IL-6、M2 型マクロファージ関連因子である IL-10 は投与直後に一過性に増加した。線維原性因子である TGF- β 1 は傷害早期から増加し、線維化の形成時期と一致した。
5. ラットのイソプロテレノール誘発心筋線維化において、 α -SMA および vimentin を発現する筋線維芽細胞が傷害早期に増加した。
6. ラットのイソプロテレノール誘発心筋線維化において、Thy-1 や A3 発現の未分化間葉系細胞が傷害部位や周囲組織に出現した。筋線維芽細胞の由来はこのような未分化間葉系細胞である可能性が示唆された。

以上、この一連の研究で得られた成果は、心筋線維化の病理発生機序の一端を明らかにするとともに、有効な医薬品開発において有用な情報を提示すると考える。

審査結果の要旨

心臓は、血液循環の主要な動力源として、収縮および弛緩を規則正しく繰り返すことにより全身に血液を送り出すという重要な機能を担っている。この機能が低下し、全身の臓器や組織の需要に見合う十分な血液量を拍出できない状態を心不全という。高齢化社会に伴い心不全の患者数は年々増加している。心筋線維化は、心筋梗塞や弁膜症などの心臓疾

患に起因する心筋細胞の傷害後の修復機転として引き起こされる。心筋線維化は、心筋組織の硬度の上昇や心収縮の統合性の障害を導き、その結果心臓の拡張および収縮機能の低下をもたらすことで心不全を惹起する。現在のところ、心筋線維化に対する有効な治療法は確立されていない。

線維化の形成過程における重要な細胞がマクロファージと筋線維芽細胞である。傷害部位に出現するマクロファージは、機能的にCD68を発現するM1とCD163を発現するM2に分極化される。M1は高い貪食活性を有するが、起炎因子を産生することで炎症を惹起し、組織傷害を助長する。一方、M2は炎症抑制、線維化および組織修復に関与する。しかし、これらマクロファージの機能は、傷害の程度や経過により異なると考えられている。筋線維芽細胞は、その形成過程で α -平滑筋アクチン (α -SMA) やvimentinなどの細胞骨格を発現する。しかし、その発現パターンは傷害後の病期や臓器間で異なる。さらに、筋線維芽細胞の由来については既存の線維芽細胞の他に未分化間葉系細胞が考えられているが、その詳細は明らかになっていない。肝線維化や腎線維化に出現するマクロファージや筋線維芽細胞の特性については良く研究されているが、心筋線維化におけるそれら細胞の出現状況やその発生機序の詳細は未だ不明な点が多い。

本研究では、心筋線維化に関わるマクロファージの性状と筋線維芽細胞の由来および細胞特性を主に免疫組織化学的手法を用いて解析している。

第1章では、リモデリングである線維化は、発生過程のモデリング状態に類似するとされる。そこで、第1節では、胎齢18日と20日の胎児、生後1日～20日齢の新生児、7週齢の成体のラットの心臓を採材し、マクロファージを認識するCD68、CD163、MHC クラス II およびCD204に対する免疫染色を実施している。その結果、CD204発現マクロファージは胎生期にすでに出現していたが、その他の抗原を発現するマクロファージは生後増加し始める特徴があった。そのうちCD68発現マクロファージは生後一過性に増加し、CD163およびMHC クラス II発現マクロファージは成体に至るまで増加し続けた。第2節では、二重免疫蛍光染色を実施し、M1/M2の分極化について解析している。その結果、生後一過性に増加したCD68 (M1) 発現マクロファージのほとんどがCD163 (M2) を共発現しており、マクロファージのM1/M2分極化の概念は発生段階では適応できないことを確認している。

第2章では、第1節において、7週齢ラットにイソプロテレノールを投与し、投与後8時間～28日に採材した心臓を病理組織学的に解析している。その結果、投与後8時間では著変はみられないが、投与後1日より炎症細胞の浸潤・水腫が生じ、3日と5日ではその程度が増大した。投与後7日から線維化が見られ始め、14日に最も高度となり、21日と28日にかけて癒痕化した。心筋線維化の病態解析にこの薬物誘発モデルが有用であることを示している。第2節と第3節では、このモデルにおけるマクロファージの細胞特性を解析している。その結果、CD68、MHC クラス II、CD204、Iba-1およびGal-3 (galectin-3) を発現するマクロファージは傷害早期に増加し、その後減少するが、CD163発現マクロファージは投与後7日以降線維化とともに増加し始めることが分かった。さらに、二重免疫蛍光染色を実施しM1/M2分極化について解析したところ、CD68 (M1) とCD163 (M2) を共発現す

るマクロファージは極めて少なく、発生段階（第1章）とは異なり、心筋線維化においてはM1/M2分極化が存在していることを明らかにした。さらに、MHC クラス II発現マクロファージはM2型に、CD204発現マクロファージはM1型に分極化していることを示した。この成果は、心筋線維化に出現するM1型とM2型のマクロファージは病期に依存し異なる細胞特性を現すことを提示している。また、M1マクロファージ関連因子（MCP-1、IL-1 β 、IL-6）やM2マクロファージ関連因子（IL-10）は投与直後に一過性に増加し、TGF- β 1は傷害早期から増加し始め、線維化の形成と関連することを明らかにしている。なお、CCR2（単球系マーカー）の発現がCD68発現M1マクロファージの増加時期に一致していたことから、M1マクロファージは血中単球に由来する可能性を提示している。

第3章では、第2章で用いた薬物誘発ラットモデルにおける筋線維芽細胞の細胞特性を解析している。第1節では、筋線維芽細胞に特異的に発現する α -SMAおよびvimentinに対する免疫染色を実施し、これら細胞骨格を発現する筋線維芽細胞が投与後3日に最も多く認められ、その後減少することを明らかにしている。第2節では、未分化間葉系細胞のマーカー（Thy-1、A3）を用いて筋線維芽細胞の由来を探索している。その結果、Thy-1発現細胞は、線維化部位において投与後3日から出現し、A3発現細胞は傷害部位やその周囲に散見されることが分かった。この成果は、未分化間葉系細胞が筋線維芽細胞の由来である可能性を示唆している。

本研究では、ラットの心臓発生過程に加え、薬物誘発心筋線維化に出現するマクロファージと筋線維芽細胞の出現動態と細胞特性を解析し、心筋線維化の病理発生機序の一端を明らかにしている。この研究成果は、獣医学・医学、特に毒性病理学・実験動物学の研究分野の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。