

学位番号甲第 505 号

学位申請者 : きの した とし お
木 下 利 雄

主 論 文 : Antifibrotic response of cardiac fibroblasts in hypertensive hearts through enhanced TIMP-1 expression by basic fibroblast growth factor

(高血圧心の心筋線維芽細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子によるTIMP-1発現亢進を介した線維化抑制効果)

著 者 : Toshio Kinoshita, Yukio Ishikawa, Michitsune Arita, Yuri Akishima-Fukasawa, Kazuko Fujita, Naomi Inomata, Takeya Suzuki, Atsushi Namiki, Tetuo Mikami, Takanori Ikeda, Junichi Yamazaki, Toshiharu Ishii, Yoshikiyo Akasaka

公 表 誌 : Cardiovascular Pathology 23 (2) : 92-100, 2014

論文内容の要旨 :

背景: 高血圧心不全における心筋リモデリングでは、代償性肥大期より間質線維化が進行し遠心性心拡大と収縮不全が惹起される。この線維化過程において心筋線維芽細胞(CF)は組織修復関連蛋白および種々のサイトカインを産生し、心筋間質線維化の進行に大きな役割を果たしている。これまで高血圧性心不全ラット(Dahl rat)におけるBasic Fibroblast Growth Factor(bFGF)の直接心筋内投与により心拡大・収縮不全の進行抑制による心筋リモデリングが実証されている。しかしbFGFによる心筋間質線維化を介した心筋リモデリング抑制機序は未だ解明されていない。

目的: 今回我々は培養CFを用いてbFGFによる心筋間質線維芽細胞における組織修復関連蛋白の発現変化の解析からbFGFによる心筋リモデリング抑制機序を解明することを目的とした。

方法: 高血圧心不全モデルDahl ratに6週齢より8%高食塩食を負荷し、高血圧心を作製する。それぞれ

6, 12, 15, 18 週齢において心臓を採取し組織標本を作製し Azan-Mallory 染色により血管周囲や心筋間質の線維化の経時的变化を定量的解析から評価した。また 15 週齢の高食塩負荷 Dahl rat 心筋に bFGF (100 μ g) を直接投与し、18 週齢における心筋間質線維化を定量的に評価した。代償肥大型 (12 週齢) および線維化増悪期 (16 週齢) 同ラットから採取された心筋組織より培養 CF を樹立し、2-3 代目の継代細胞を用いて線維化関連蛋白の発現動態を評価した。蛋白および mRNA レベルの発現性はウエスタンブロット法、TaqMan 法による Real-time PCR 法で解析した。また Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, 9 活性の評価には Zymography 法を用いた。bFGF 刺激による線維化関連蛋白の発現変化の特異性を評価する FGF-receptor1 (FGFR1) のノックアウト実験は FGFR1 mRNA をターゲットとする Small interfering RNA (siRNA) の感作実験から検証した。

結果： 高食塩負荷 Dahl rat における心筋間質線維化は 15 週齢から 18 週齢にかけて著明な増悪傾向を示した。15 週齢の高食塩負荷 Dahl rat に bFGF を直接心筋投与すると、15 週齢から 18 週齢にかけて bFGF 投与群では bFGF 非投与群に比較して心筋間質線維化が臓器レベルで有意に減少していた。細胞レベルでは代償肥大型 (12 週齢) と線維化増悪期 (16 週齢) から樹立した培養 CF のうち、線維化増悪期 CF では MMP-9、Collagen-1, 3 の発現上昇がみられた。この線維化増悪期 CF に bFGF を添加すると Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1 の著明な発現増加と MMP-9 の発現抑制および Zymography における MMP-9 の活性化抑制を認めた。また bFGF 添加により筋線維芽細胞への分化マーカーである α -Smooth muscle actin (α -SMA) の発現抑制が認められた。培養 CF の主たる受容体 FGFR1 mRNA の siRNA 感作実験では、bFGF 添加後 FGFR1 ノックアウト群では非ノックアウト群に比べ bFGF 誘導性の組織修復関連蛋白の発現が有意に減少しており、上記の反応性が FGFR1 を介した bFGF 特異的变化であることが確認された。

考察： 高血圧性心不全ラット (Dahl rat) における組織の反応性線維化は bFGF 心筋内投与により抑制し得ることを組織レベルで実証し、bFGF による心筋リモデリング抑制効果における間質線維化抑制の関与を示した。さらに我々が示してきた bFGF による臓器レベルでの心筋リモデリング抑制作用の機序を細胞・分子レベルにおける線維化関連蛋白の発現変化から実証した点が意義深い。すなわち本研究で明らかにされた高血圧心不全発症過程の線維化増悪期由来 CF における MMP-9 と Collagen-1, 3 の発現上昇から、CF による心筋組織再構築と細胞外基質沈着の亢進能が *in vitro* で実証され、CF の心筋リモデリングにおける組織修復能の積極的な関与が示唆された。bFGF 添加による TIMP-1 発現増加はヒト平滑筋細胞で報告されているが、CF における TIMP-1 発現増加の報告は殆どみられない。一般に TIMP-1 は TIMP-1/MMP-9 複合体を形成し、MMP-9 の活性化を抑制する。このことから bFGF は CF 上の TIMP-1 発現亢進から MMP-9 活性を抑制し、臓器レベルでの心筋間質の過剰な組織改築を抑制し、心筋リモデリング抑制に寄与していると考えられた。これまで左心室拡大と収縮不全におけるヒト血中 MMP-9 の有意な増加が報告されてきたが、本結果より CF における TIMP-1 発現を介した MMP-9 の発現動態が示唆された。また bFGF 添加により α -SMA の発現抑制が証明され、筋線維芽細胞への分化抑制から collagen-1 や-3 による細胞外基質の産生低下による心筋間質線維化抑制の関与も示唆された。

結論： bFGF は心筋間質線維芽細胞における TIMP-1 発現増加とそれに伴う MMP-9 活性化抑制を介して過剰な心

筋組織改築とコラーゲン沈着を抑制し心筋間質線維化を抑制することで心筋リモデリング抑制に寄与していると考えられた。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 505 号	氏 名	木 下 利 雄
論文審査担当者	主 査	杉 山 篤
	副 査	赤 羽 悟 美
	副 査	高 橋 啓
	副 査	東 丸 貴 信
	副 査	盛 田 俊 介

論文審査の結果の要旨 :

平成 26 年 2 月 10 日 (月) 19:00~20:00 医学部 3 号館ミーティングルームにおいて、書面での事前審査者 1 名を含む 5 名の審査者により学位審査を行った。

申請者は basic fibroblast growth factor (bFGF) による心筋間質線維化を介した心筋リモデリング抑制機序に関する研究を行った。まず高血圧性心不全ラットの心筋組織の反応性線維化は bFGF 心筋内投与により抑制できることを組織レベルで証明し、次に bFGF による臓器レベルでの心筋リモデリング抑制メカニズムを細胞・分子レベルにおける線維化関連蛋白の発現変化から実証した。申請者は線維化増悪期由来心筋線維芽細胞における MMP-9 と Collagen-1,3 の発現上昇から心筋線維芽細胞による心筋組織再構築と細胞外基質沈着の亢進能を *in vitro* で証明することにより心筋線維芽細胞の心筋リモデリングにおける組織修復過程への関与を確認し、このような病態は bFGF 投与による心筋線維芽細胞における TIMP-1 発現上昇により抑制されることを示した。また bFGF 添加により α -SMA の発現抑制を介する筋線維芽細胞への分化抑制による collagen-1 や-3 といった細胞外基質の産生低下による心筋間質線維化の抑制機序の可能性も示した。以上より、bFGF は心筋間質線維芽細胞における TIMP-1 発現増加とそれに伴う MMP-9 活性化抑制を介して過剰な心筋組織改築とコラーゲン沈着を抑制し心筋間質線維化を抑制することで心筋リモデリング抑制に寄与していると結論づけた。

主な質疑内容は以下の通りである。bFGF を心筋に直接投与した際にマクロファージが bFGF を発現することの心筋リモデリングにおける意味、高血圧性心不全モデルラットの特徴、bFGF 投与による心筋内血管新生の有無、肥大相で収縮不全が始まった時点における bFGF の関与、bFGF の DCM モデルにおける線維化予防効果の有無、bFGF の心筋線維化抑制作用の臨床応用、心筋前壁領域に注入した bFGF による線維化抑制効果が観察された範囲、bFGF の心筋直接投与による拡張能や収縮能低下の予防効果の有無、*in vivo* における bFGF による TIMP-1 の発現亢進の有無などに関する質疑に対して、申請者は適切に回答し、研究の限界や今後の課題について言及した。本研究は bFGF が TIMP-1 発現増加と MMP-9 活性化抑制を介して心筋間質線維化を抑制し、心筋リモデリング抑制に寄与していることを証明した独創的な研究であり、学位授与に相当すると判断した。

