

## 論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 ARID5B の心臓の線維化における役割

氏名 河原崎秀一

心筋梗塞後の心臓では組織の線維化が認められる。線維化は結合組織の膠原線維が過剰に蓄積することで起きる。心臓では非梗塞例でも高度の虚血心や拡張型心筋症などの心筋症においても線維化が認められる。心臓では、線維化が進行した部位ではコンプライアンスが低下し、左室収縮力の低下につながり、心不全発症の原因となる。しかしながら、線維化が進行する機序は依然不明な部分が多く、有効な治療法は開発されていない。線維化の機序の解明と治療法の開発は心疾患の治療領域においても急務である。

ARID5B は、マウス多能性神経堤細胞を血管平滑筋細胞に分化誘導する過程で、発現の増強する転写因子として同定され、血管平滑筋細胞の分化に関与する遺伝子と考えられていた。さらに、ARID5B 変異型ホモ接合体マウスは、脂肪細胞の機能異常、骨格形成異常、免疫機能の異常、生殖機能障害と全身に異常を認めた。また、ヒトでは、ARID5B の遺伝子多型が小児リンパ性白血病の発症に関与し、冠動脈疾患や糖尿病の発症とも関わりがあると報告されている。これらのメカニズムは明らかになっていないが、ARID5B が線維化に関わる増殖因子 PDGF の下流のターゲット遺伝子の一つである可能性が報告されている。これらのことから、私は、ARID5B が PDGF のシグナル経路に関与し、線維芽細胞の機能に影響するのではないかと考え、ARID5B が心臓の線維化において重要な役割を果たすという仮説を検証することを実験の目的とした。

心臓の線維化の *in vivo* モデルとして Angiotensin II 持続投与モデルに着目した。浸透圧勾配を利用したポンプを利用しマウスの皮下に Angiotensin II を一定期間投与すると左心室に肥大が起こり線維化進行することは報告されている。ARID5B 遺伝子変異ヘテロ接合体マウスに Angiotensin II を 14 日間持続投与したところ、遺伝子変異群では野生型に比較し、左心室の壁肥厚は高度であり、より高度な線維化の進行を認めた。mRNA レベルでは線維化のマーカーとして fibronectin の発現が ARID5B 遺伝子変異群で野生型よりも有意に上昇していた。免疫染色での検討では ARID5B 遺伝子変異群においてより高度なマクロファージの

集積を認めた。ARID5B 遺伝子変異ヘテロ接合型マウスにおいて、より高度な線維化の進行、マクロファージの集積を認めたことより、ARID5B は心臓の線維化の進行を抑える役割を果たしていることが示唆された。

線維化の進行においては心筋細胞のみならず、血球細胞、線維芽細胞といった間質細胞が重要な役割を果たしている。これまで報告されている線維化のメカニズムは以下のものである。まず虚血や高血圧など種々の心臓への負荷刺激の結果、心筋細胞のアポトーシスが起る。アポトーシスに対する創傷治癒反応として、内皮細胞から血球の遊走因子（ケモカイン）が放出され、これによりマクロファージなどの血球細胞の心臓への集積が起る。続いて集積した血球細胞から各種サイトカインが産生され、これにより、線維芽細胞は活性化され筋芽細胞となり膠原線維を産生する。膠原線維は通常、損傷を受けた組織のコンプライアンスを保つ目的で一時的でかつ適度に産生されるが、何らかの原因で膠原線維の産生が長期間にわたり過剰に起こることで、組織の線維化が進む。

一方、ARID5B については $\alpha$ アイソフォームは心筋細胞、線維芽細胞に発現し血球細胞には発現していないが、 $\beta$ アイソフォームは全身に発現しており心筋細胞、血球細胞、線維芽細胞のいずれにも発現している。そこで心筋細胞、血球細胞、線維芽細胞それぞれに発現する ARID5B の線維化における役割を検討するため、以下の実験系に着目した。

まず、血球細胞に発現する ARID5B の線維化に果たす役割を検証するため、骨髄移植モデルに着目した。野生型マウスに放射線照射を行った上で ARID5B 遺伝子変異ヘテロ接合型マウス由来の骨髄細胞を経静脈的に投与することで骨髄由来細胞に ARID5B 遺伝子変異を持つマウスを作成することができる。ARID5B 遺伝子変異を持つ血球細胞が生着したことを確認した上で、このマウスに Angiotensin II の持続投与を行ったが、ARID5B 遺伝子変異群では対照群と比較し、線維化の程度は同程度であった。この結果より、血球細胞での ARID5B の遺伝子変異が線維化の進行に与える影響は限定的と考えられた。

次に線維芽細胞に発現する ARID5B の線維化における役割を検討するため、*in vitro* レベルでマウス線維芽細胞 10T1/2 に TGF- $\beta$  を添加する実験系に着目した。10T1/2 は未分化な線維芽細胞だが、TGF- $\beta$  の添加により、 $\alpha$  SMA アクチンなど平滑筋マーカーが上昇することが報告されている。10T1/2 への ARID5B の siRNA のトランスフェクションを行い ARID5B のノックダウンを行った。ARID5B のノックダウンを行った細胞群に TGF- $\beta$  を添加し、mRNA レベルでの刺激への応答反応を検討した。結果、 $\alpha$  SMA、CTGF といったマーカーは ARID5B のノックダウン群および対照群とともに上昇しており両者には有意差は認められなかった。次にマウス新生仔の心臓由来の初代培養細胞の心線維芽細胞に対し同様に ARID5B の siRNA を用いて ARID5B のノックダウンを行った上で TGF- $\beta$  の添加を行った。結果、 $\alpha$  SMA、CTGF といったマーカーは ARID5B のノックダウン群および対照群とともに上昇しており両者には有

意差は認められなかった。つまり ARID5B のノックダウンを行った線維芽細胞においても TGF- $\beta$  刺激に対する反応性には明らかな変化は認められなかった。

心筋細胞に発現する ARID5B の線維化における役割を検証するにあたり、心筋細胞のアポトーシスの評価に着目した。線維化は創傷治癒過程の一つであり、心臓の線維化形成の過程において初期には虚血や高血圧等の刺激により心筋細胞のアポトーシスが起これ、アポトーシスを起こした部位に対する創傷治癒反応として線維化が起こると報告されている。In vivo レベルの実験として ARID5B 遺伝子変異型マウスに 2 週間の Angiotensin II 投与を行い、繊維化を起こした心臓切片に TUNEL 染色を行った。結果、ARID5B 遺伝子変異ヘテロ接合群において野生型よりもアポトーシスを起こした細胞数が多いことが確認された。これは ARID5B 遺伝子変異群では Angiotensin II 投与後に心筋細胞の細胞死が増加しており、この結果創傷治癒反応としての線維化がより高度に起こったという仮説を支持する結果であった。現在、ARID5B の心筋特異的ノックアウトマウスを作出中であり、作出が完了次第、Angiotensin II 負荷実験を行う予定である。

アポトーシスは、一般に個体を健全に保つために、あらかじめプログラムされた細胞死と考えられている。アポトーシスを引き起こすシグナルとしては、TNF などのサイトカインによる刺激、DNA 損傷、ミトコンドリアの異常、小胞体ストレスなどが報告されており、一連のカパーゼが活性化され、細胞死を起こす。私は、ARID5B が脂肪細胞において代謝に関与する可能性が示唆されていることから、心筋細胞においても、何らかのエネルギー代謝経路に関与しており、アポトーシスを抑制しているのではないかと考えている。

今回の実験により、ARID5B が心臓の線維化において重要な役割を果たしていることが新たに示された。これまでの実験結果からは、心筋細胞の ARID5B が、アポトーシスを抑制し、線維化を抑制していると考えられるが、さらに詳細なメカニズムは今後実験を継続して検討する必要がある。また、心筋の代謝との関わりを含め、ARID5B が心筋細胞において果たす役割を明らかにするべく研究を継続する所存である。