

氏 名 とみた けんご  
**富田 賢吾**

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 136 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程  
東西統合医学専攻

学位論文題目 **MMP-9-mediated cardiac fibroblast activation contributes to  
sepsis-associated cardiac dysfunction in mice**  
**(MMP-9 を介した心線維芽細胞活性化の敗血症性心機能障害機構へ  
の関与)**

論文審査委員

(主査)	教授	山本 善裕
(副査)	教授	関根 道和
(副査)	教授	林 篤志
(副査)	教授	山崎 光章
(指導教員)	教授	服部 裕一

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

敗血症、特に敗血症性ショックを伴うものは予後が悪く、種々の抗菌薬治療が確立した現在においても未だに ICU で高い死亡率を有している。心機能低下は敗血症における臓器障害の兆候としてよく知られているが一般的な定義がなく、大規模な疫学調査の不足によりその頻度は不明である。しかし、近年の臨床試験において敗血症による心機能障害は長期敗血症性ショック患者のおよそ 40-50% にみられ、死亡率の増加に関与していると報告されている。心機能の低下は敗血症性ショック時には前・後負荷の低下を伴うが、興味深いことにそれらの変化がなくとも敗血症時には心機能の低下が認められることが報告されている。心機能障害の因果関係について敗血症モデル動物を用いた研究は現在広く行われているが、敗血症性心機能障害の効果的な予防や治療につながるメカニズムはいまだに解明されていない。

心線維芽細胞は心臓にある全細胞の 60-70% を占め、細胞間で介在センサーとして重要な役割を有していることや、免疫細胞や筋細胞におけるエンドトキシンの反応を、一酸化窒素(NO)やサイトカインの産生を通じて増幅させていることが考えられる。さらに、心線維芽細胞は細胞外マトリックス (ECM) タンパク質合成の中心的役割を果たしている。サイトカインなどの刺激によってコントロールされる心線維芽細胞活性化と筋線維芽細胞様の形質転換は心筋の線維化の亢進や有害な心室リモデリングに寄与している可能性がある。

そこで、本研究では、心線維芽細胞が心臓において病態を調節する因子として振る舞うことで敗血症の予後や重症化に影響していると仮説を立て、敗血症における心線維芽細胞の病態調節機構について検証した。

#### [方法並びに成績]

ヒト心臓線維芽細胞にリポポリサッカライド (LPS) を処置すると、マトリックスメタロプロテアーゼである MMP-9 の発現及び活性の有意な増加が認められたが、MMP-2 や TGF- $\beta$ 1 の変化は認めなかった。LPS により TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカインや誘導型 NO 合成酵素である iNOS の mRNA 発現上昇がみられたが、これらの遺伝子発現増加は MMP 阻害薬 ONO-4817 により有意に抑制された。また LPS の投与により筋線維芽細胞に多く含まれている  $\alpha$ -SMA タンパクの増加がみられ、蛍光免疫染色においても、 $\alpha$ -SMA の増加と、stress fiber といわれる  $\alpha$ -SMA 含有性の形質的变化が認められたことから、LPS により筋線維芽細胞への形質転換が起こっていると解釈される。この筋線維芽細胞への形質転換に伴う変化は MMP-9 の siRNA を導入することによって強く抑制された。次に、盲腸結紮・穿孔 (CLP) 誘発性敗血症マウスでの検討を行った。CLP 24 時間後の心室筋において冠血管周囲や心筋細胞間に線維化形成が組織学的に認められ、心エコーにより拡張能不全とともに心駆出率 (EF) や左室内径短縮率 (%FS) の低下を伴う心機能の低下を認めた。これらの変化は経口的に ONO-4817 を処置することにより有意に改善した。CLP 24 時間後の敗血症マウスの心室筋では MMP-9 のほか、MMP-2 および TGF- $\beta$ 1 の遺伝子レベルでの発現増加が認められたが、これらの profibrotic 遺伝子の増加は、心筋細胞や冠血管細胞由来のものと考えられる。CLP 心筋では、MMP タンパクの活性上昇についても、MMP-9 のみならず MMP-2 活性増加も認めた。

#### [総括]

本研究でははじめて、活性化された心線維芽細胞が敗血症性心機能不全に有意な役割を果たしていることを示す。心線維芽細胞は、炎症性サイトカインやその他の炎症性媒介物質を産生して心臓における炎症に積極的に関与する。さらに、心線維芽細胞の筋線維芽細

胞型への形質転換は、心臓における線維化形成を促進するであろう。活性化した心線維芽細胞のそのような作用は主に MMP-9 によるものであった。活性化した心臓線維芽細胞より分泌された MMP-9 は、心線維芽細胞における炎症性遺伝子の発現レベルを増加させ、筋線維芽細胞への形質転換を促進した。すなわち、心線維芽細胞は、MMP-9 の有意な関与のもとに、心臓における炎症と線維化に重要な病態生理学的な役割を果たし、心機能低下をもたらして、敗血症の予後を左右する大きな因子であることが示唆された。MMP 阻害薬は、敗血症性ショックへの移行を防ぐ薬として有用である可能性をもった薬理学プローブとして興味深いことが示され、今後の臨床への高い応用性を有しているものと期待される。

## 学位論文審査の要旨

(目的)

敗血症、特に敗血症性ショックを伴うものは予後が悪く、種々の抗菌薬治療が確立した現在においても未だに ICU で高い死亡率を有している。心機能低下は敗血症における臓器障害の兆候としてよく知られているが一般的な定義がなく、大規模な疫学調査の不足によりその頻度は不明である。しかし、近年の臨床試験において敗血症による心機能障害は長期敗血症性ショック患者のおよそ 40-50% にみられ、死亡率の増加に関与していると報告されている。心機能の低下は敗血症性ショック時には前・後負荷の低下を伴うが、興味深いことにそれらの変化がなくとも敗血症時には心機能の低下が認められることが報告されている。心機能障害の因果関係について敗血症モデル動物を用いた研究は現在広く行われているが、敗血症性心機能障害の効果的な予防や治療につながるメカニズムはいまだに解明されていない。

心線維芽細胞は心臓にある全細胞の 60-70% を占め、細胞間で介在センサーとして重要な役割を有していることや、免疫細胞や筋細胞におけるエンドトキシンの反応を、一酸化窒素(NO)やサイトカインの産生を通じて増幅させていることが考えられる。さらに、心線維芽細胞は細胞外マトリックス (ECM) タンパク質合成の中心的役割を果たしている。サイトカインなどの刺激によってコントロールされる心線維芽細胞活性化と筋線維芽細胞様の形質転換は心筋の線維化の亢進や有害な心室リモデリングに寄与している可能性がある。

そこで、本研究では、心線維芽細胞が心臓において病態を調節する因子として振る舞うことで敗血症の予後や重症化に影響していると仮説を立て、敗血症における心線維芽細胞の病態調節機構について検証した。

#### [方法並びに成績]

ヒト心臓線維芽細胞にリポポリサッカライド (LPS) を処置すると、マトリックスメタロプロテアーゼである MMP-9 の発現及び活性の有意な増加が認められたが、MMP-2 や TGF- $\beta$ 1 の変化は認めなかった。LPS により TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカインや誘導型 NO 合成酵素である iNOS の mRNA 発現上昇がみられたが、これらの遺伝子発現増加は MMP 阻害薬 ONO-4817 により有意に抑制された。また LPS の投与により筋線維芽細胞に多く含まれている  $\alpha$ -SMA タンパクの増加がみられ、蛍光免疫染色においても、 $\alpha$ -SMA の増加と、stress fiber といわれる  $\alpha$ -SMA 含有性の形質的变化が認められたことから、LPS により筋線維芽細胞への形質転換が起こっていると解釈される。この筋線維芽細胞への形質転換に伴う変化は MMP-9 の siRNA を導入することによって強く抑制された。次に、盲腸結紮・穿孔 (CLP) 誘発性敗血症マウスでの検討を行った。CLP 24 時間後の心室筋において冠血管周囲や心筋細胞間に線維化形成が組織学的に認められ、心エコーにより拡張能不全とともに心駆出率 (EF) や左室内径短縮率 (%FS) の低下を伴う心機能の低下を認めた。これらの変化は経口的に ONO-4817 を処置することにより有意に改善した。CLP 24 時間後の敗血症マウスの心室筋では MMP-9 のほか、MMP-2 および TGF- $\beta$ 1 の遺伝子レベルでの発現増加が認められたが、これらの profibrotic 遺伝子の増加は、心筋細胞や冠血管細胞由来のものと考えられる。CLP 心筋では、MMP タンパクの活性上昇についても、MMP-9 のみならず MMP-2 活性増加も認めた。

#### [総括]

本研究において、活性化された心線維芽細胞が敗血症性心機能不全に有意な役割を果たしていることが初めて明らかになった。心線維芽細胞は、炎症性サイトカインやその他の炎症性媒介物質を産生して心臓における炎症に積極的に関与し、心線維芽細胞の筋線維芽

細胞型への形質転換は、心臓における線維化形成を促進すると考えられた。活性化した心臓線維芽細胞より分泌された MMP-9 は、心線維芽細胞における炎症性遺伝子の発現レベルを増加させ、筋線維芽細胞への形質転換を促進した。すなわち、心線維芽細胞は、MMP-9 の有意な関与のもとに、心臓における炎症と線維化に重要な病態生理学的な役割を果たし、敗血症の予後を左右する大きな因子であることが示唆され医学における学術的重要性は高い。また、MMP 阻害薬は、敗血症性ショックへの移行を防ぐ薬として有用である可能性をもつことが示された。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。