

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08084

研究課題名（和文）伸展刺激による心臓筋線維芽細胞の脱分化調節機構を解明する

研究課題名（英文）Elucidate the regulational mechanism of de-differentiation of cardiac myofibroblast in response to stretch

研究代表者

小尾 正太郎 (Obi, Syotaro)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10734452

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト心臓由来の筋線維芽細胞に定量的な伸展張力を負荷すると、増殖能と遊走能が減少した。また、伸展張力により線維化マーカーの蛋白発現レベルが減少した。このことは伸展張力が筋線維芽細胞を脱分化させることを意味する。次に、筋線維芽細胞においてカルシウムイオンチャンネルであるTRPV4の発現をノックダウンすると、伸展張力に反応しなかった。以上より心臓線維化の1つの原因として、伸展張力が低下して筋線維芽細胞でのTRPV4の発現が増大し、線維化が増大すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓線維化の機序としてTRPV4が伸展張力に反応して線維化を制御していることが分かった。TRPV4をターゲットとした薬剤を開発することにより心臓の線維化を改善することができると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The proliferation level and migration level decreased after human cardiac myofibroblast were exposed to stretch. The protein expression level of fibrosis marker also decreased in response to stretch. It indicates that stretch induces de-differentiation of myofibroblast. Next the knockdown of TRPV4 which was a calcium ion channel in myofibroblast did not respond to stretch. These findings indicate that one of the cause of cardiac fibrosis is the decrease of stretch, the increase of TRPV4, and the increase of fibrosis.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：伸展張力

1. 研究開始当初の背景

心疾患による死亡数は年間約 20 万人であり、そのうち心不全が約 7 万人と原因疾患のうちで一番多い (平成 26 年人口動態統計)。心不全の原因には心筋の収縮力低下による収縮不全と、心臓線維化による拡張障害があり、高齢者の心不全ではほぼ同数である。心臓における線維化は、線維芽細胞とその分化形態である筋線維芽細胞が化学的・機械的刺激に応答して産生する細胞外基質の過剰な蓄積に起因し、心不全、不整脈、心筋症などを誘発する。今まで化学的刺激による線維芽細胞の活性化や分化に関して多くの報告はあるが、臨床的にはまだ十分な線維化抑制効果は報告されていない。さらには、機械的刺激が線維芽細胞に及ぼす効果に関してはよくわかっていない。

先行研究でヒト心臓筋線維芽細胞に伸展張力負荷装置を使って定量的な伸展張力を負荷すると、伸展張力依存性に筋線維芽細胞のマーカーである α SMA、線維化のマーカーである Collagen1A と Fibronectin、心不全のマーカーである BNP のたん白および遺伝子の発現レベルがいずれも減少した。また、伸展張力により SMAD2 のリン酸化レベルが減少した。カルシウムイオンチャンネルである transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) の遺伝子発現レベルが伸展張力により減少し、TRPV4 の作動薬である GSK1016790A を添加すると Fura2 を用いた 2 波長励起法で細胞内カルシウム流入量が増大した。さらには、siRNA を用いて TRPV4 の発現をノックダウンすると、basal において α SMA、Collagen1A、Fibronectin のたん白の発現が減少すること、及び伸展張力に反応しなくなることを発見した。以上をまとめると、ヒト心臓筋線維芽細胞に伸展張力を負荷すると筋線維芽細胞から線維芽細胞に脱分化し、この機序に TRPV4 が関与していることが分かった。

2. 研究の目的

伸展張力が心臓筋線維芽細胞の脱分化に及ぼす効果に関して、TRPV4 が脱分化制御機構に関わる細胞内シグナルや細胞機能を解明する。また、伸展張力が mRNA、マイクロ RNA、蛋白の発現に及ぼす効果および機序に関して検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト心臓由来の筋線維芽細胞に伸展張力負荷装置 (ストレックス) を用いて定量的な (0-15%、0.5Hz、0-48 時間) 伸展張力を負荷した。

(2) 細胞活性として、WST1 を用いて増殖レベルを測定し、遊走能として Boyden chamber を用いてメンブレンを遊走した細胞の核を DAPI で染色して蛍光顕微鏡下で観察し、遊走した細胞数を定量した。

(3) 蛋白の発現レベルをウェスタンブロッティングで検討し、mRNA とマイクロ RNA の発現レベルをリアルタイム PCR で測定した。

(4) DNA アレイで網羅的に mRNA の発現レベルを定量した。

(5) 飛行時間型質量分析計で網羅的に蛋白の発現レベルを定量した。

(6) GFP で標識した TRPV4 を組み込んだベクターを作製し、筋線維芽細胞に過剰発現させて TRPV4 蛋白の分布を共焦点顕微鏡で観察した。また増殖能も検討した。

- (7) siRNA を用いて TRPV4 の発現をノックダウンした。
- (8) マイクロ RNA の阻害剤を用いて阻害実験をした。

4. 研究成果

(1) 筋線維芽細胞に伸展張力を 48 時間負荷した後に細胞を回収し、細胞数を測定後に再度細胞を静的条件の細胞と同量播種して 12 時間後に増殖能を検討した。伸展張力を負荷した細胞の方が増殖レベルが減少していた。この伸展張力が筋線維芽細胞の増殖能を低下させるという所見は、伸展張力が筋線維芽細胞の活性を低下させるだけでなく、筋線維芽細胞から線維芽細胞へ脱分化を誘導することを示唆する。

(2) 筋線維芽細胞に伸展張力を 48 時間負荷した後に細胞を回収し、細胞数を測定後に再度細胞を静的条件の細胞と同量播種して 24 時間後に遊走能を検討した。伸展張力を負荷した細胞の方が遊走数が減少していた。この伸展張力が筋線維芽細胞の遊走能を低下させるという所見は、増殖能と同様に伸展張力が筋線維芽細胞の活性を低下させるだけでなく、筋線維芽細胞から線維芽細胞へ脱分化を誘導することを示唆する。

(3) 筋線維芽細胞に伸展張力を 24 時間負荷した後に細胞を回収し、DNA アレイで網羅的に mRNA の発現レベルを定量した (N=4)。約 2 万遺伝子のうち伸展張力により 86 遺伝子が 2 倍以上増大し、142 遺伝子が 1/2 以下に減少した。伸展張力に応答し線維化に関連する新規の遺伝子を多数同定した。DAVID を用いたアノテーションにより伸展張力に応答するシグナルを同定した。特に、TGFb/SMAD シグナル以外に Wnt/b-catenin シグナルの関与が示唆された。

(4) 筋線維芽細胞に伸展張力を 48 時間負荷した後に細胞を回収し、質量分析計で網羅的に蛋白の発現レベルを定量した (N=5)。同定した 551 蛋白のうち 109 蛋白が 2 倍以上増大し、25 蛋白が 1/2 以下に減少した。伸展張力に応答し線維化に関連する新規の分子を多数同定した。DAVID を用いたアノテーションにより伸展張力に応答するシグナルを同定した。

(5) TRPV4 をノックダウンさせた筋線維芽細胞に伸展張力を 48 時間負荷した後に増殖能を検討した。TRPV4 をノックダウンすると basal で減少し、また伸展張力にも応答しなかった。このことは、伸展張力が筋線維芽細胞の増殖能を減少させる機序として TRPV4 が関与することを意味する。

(6) TRPV4 をノックダウンさせると basal で増殖能が減少した。このことは、basal においても TRPV4 が増殖能に関与していることを示唆する。そこで、TRPV4 を過剰発現させた筋線維芽細胞に伸展張力を 48 時間負荷した後に増殖能を検討した。その結果 TRPV4 を過剰発現すると basal で増大した。このことは、basal において TRPV4 の発現増大が増殖能の増大となるように制御していることを意味する。

(7) TRPV4 をノックダウンさせた筋線維芽細胞に伸展張力を 48 時間負荷した後に

遊走能を検討した。TRPV4 をノックダウンすると basal で減少し、また伸展張力にも応答しなかった。このことは、伸展張力が筋線維芽細胞の遊走能を減少させる機序として TRPV4 が関与することを意味する。

(8) 筋線維芽細胞に伸展張力を 24 時間あるいは 48 時間負荷した後に線維化のマーカである α SMA、Collagen-1、Fibronectin、Smad2、 β -catenin の蛋白の発現レベルを定量した。伸展張力は、線維化のマーカ蛋白の発現レベルをいずれも減少させた。このことは、伸展張力が筋線維芽細胞を線維芽細胞に遺伝子レベルで脱分化させることを意味する。

(9) TRPV4 をノックダウンさせた筋線維芽細胞に伸展張力を 24 時間あるいは 48 時間負荷した後に線維化のマーカである α SMA、Collagen-1、Fibronectin、Smad2、 β -catenin の蛋白の発現レベルを定量した。TRPV4 をノックダウンすると basal でいずれも減少し、また伸展張力にも応答しなかった。このことは、伸展張力が筋線維芽細胞を線維芽細胞に脱分化させる機序として TRPV4 が関与することを意味する。

(10) TRPV4 を過剰発現させた筋線維芽細胞に伸展張力を 24 時間負荷した後に細胞を固定し、TRPV4 の分布を検討したところ、静的条件下の細胞とかわらず細胞全体に均一に分布していた。この伸展張力が細胞膜貫通蛋白である TRPV4 の分布には影響を及ぼさないという所見は、伸展張力は細胞膜の流動性にはあまり影響を及ぼしていないことを意味する。今後、伸展張力が TRPV4 の構造に影響を及ぼしているかどうか検討していきたい。

(11) 伸展張力が筋線維芽細胞を線維芽細胞に脱分化させる機序としてマイクロ RNA が関与していないか検討した。筋線維芽細胞のマーカである α SMA の 3'UTR 領域に結合しうるマイクロ RNA を TargetScan Human を用いて検討したところ miR-140-3p.1 と miR-155-5p が予想された。そこで筋線維芽細胞に伸展張力を 24 時間負荷してマイクロ RNA の発現レベルを定量したところ、伸展張力の強さ依存性に miR-140-3p.1 の発現レベルが増大した。一方、miR-155-5p の発現レベルは basal で定量できないほど低値であった。この伸展張力の強さ依存性に miR-140-3p.1 の発現レベルが増大するという所見は、miR-140-3p.1 が伸展張力のマーカ及び線維化のマーカとして有効であることを意味する。

(12) miR-140-3p.1 の阻害剤を用いて α SMA の蛋白の発現レベルを検討したところ、basal では変化がなかった。また、miR-140-3p.1 の阻害剤を加えたうえで伸展張力を 24 時間負荷しても伸展張力に反応していた。このことは、miR-140-3p.1 は筋線維芽細胞の脱分化への関与は低いことが分かった。おそらく、筋線維芽細胞の脱分化には様々な因子が関与しており、miR-140-3p.1 単独では効果は弱いと考えられた。

(13) 以上をまとめると、伸展張力は筋線維芽細胞を脱分化させた。その機序として TRPV4 が伸展張力を感知し、SMAD2 と b-Catenin の発現が低下して線維化が減

少しした。今後 TRPV4 をターゲットとした薬剤を用いることにより心臓の線維化を病態とする心臓拡張不全を治療できると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sawaguchi T, Nakajima T, Haruyama A, Hasegawa T, Shibasaki I, Nakajima T, Kaneda H, Arikawa T, Obi S, Sakuma M, Ogawa H, Takei Y, Toyoda S, Nakamura F, Abe S, Fukuda H, Inoue T.	4. 巻 14(11)
2. 論文標題 Association of serum leptin and adiponectin concentrations with echocardiographic parameters and pathophysiological states in patients with cardiovascular disease receiving cardiovascular surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0225008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225008. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima T, Shibasaki I, Sawaguchi T, Haruyama A, Kaneda H, Nakajima T, Hasegawa T, Arikawa T, Obi S, Sakuma M, Ogawa H, Toyoda S, Nakamura F, Abe S, Fukuda H, Inoue T.	4. 巻 8(10)
2. 論文標題 Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a Biomarker of Muscle Wasting and Renal Dysfunction in Preoperative Cardiovascular Surgery Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 E1576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8101576.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koyabu Y, Abe S, Sakuma M, Kanaya T, Obi S, Yoneda S, Toyoda S, Nakajima T, Inoue T.	4. 巻 58(16)
2. 論文標題 Short-term Safety and Mid-term Efficacy of Prasugrel Versus Clopidogrel in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2315-2322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.2262-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito F, Toyoda S, Arikawa T, Inami S, Watanabe R, Obi S, Sakuma M, Kanaya T, Abe S, Nakajima T, Inoue T.	4. 巻 58(16)
2. 論文標題 Prediction of Acute-phase Complications in Patients with Infectious Endocarditis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2323-2331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.1813-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Obi S, Nakajima T, Hasegawa T, Nakamura F, Sakuma M, Toyoda S, Tei C, and Inoue T.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Heat induces myogenic transcription factors of myoblast cells via transient receptor potential vanilloid 1 (Trpv1).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 101-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12550.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneda H, Nakajima T, Haruyama A, Shibasaki I, Hasegawa T, Sawaguchi T, Kuwata T, Obi S, Arikawa T, Sakuma M, Amano H, Toyoda S, Fukuda H, Inoue T.	4. 巻 13(8)
2. 論文標題 Association of serum concentrations of irisin and the adipokines adiponectin and leptin with epicardial fat in cardiovascular surgery patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0201499.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima T, Koide S, Yasuda T, Hasegawa T, Yamasoba T, Obi S, Toyoda S, Nakamura F, Inoue T, Poole DC, Kano Y.	4. 巻 125(1)
2. 論文標題 Muscle hypertrophy following blood flow-restricted low force isometric electrical stimulation in rat tibialis anterior: Role for muscle hypoxia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Appl Physiol (1985).	6. 最初と最後の頁 134-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00972.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakuma M, Nasuno T, Abe S, Obi S, Toyoda S, Taguchi I, Sohma R, Inoue K, Nishino S, Node K, Attizzani G, Bezerra H, Costa M, Simon D, and Inoue T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Mobilization of progenitor cells and assessment of vessel healing after second generation drug-eluting stenting by optical coherence tomography.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Cardiol Heart Vasc	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcha.2017.12.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------