

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07749

研究課題名（和文）心筋細胞と心筋線維芽細胞の相互作用に着目した小児拡張型心筋症の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation for the pathogenesis of pediatric dilated cardiomyopathy by focusing on the interaction between cardiomyocytes and cardiac fibroblasts

研究代表者

石井 良（ISHII, RYO）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90794008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：小児拡張型心筋症の患者から採取した心筋線維芽細胞では、健常な心筋細胞と共培養を行うと、収縮能および拡張能が増悪させることが明らかとなった。拡張型心筋症心筋線維芽細胞では、遺伝子発現パターンが健常の心筋線維芽細胞と異なっており、様々な液性因子や接着因子の発現変化によって、心筋線維芽細胞が主体的に心筋細胞の機能を障害することが明らかとなった。パスウェイ解析により、細胞外マトリクスの発現変化と接着因子のシグナル経路の異常、さらにHippo pathwayやTGF β の経路が拡張型心筋症の心筋線維芽細胞では有意に変化していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小児拡張型心筋症の病態形成において、心筋細胞だけではなく心筋線維芽細胞も重要な役割を果たしていることが明らかとなった。拡張型心筋症の心筋線維芽細胞は、遺伝子発現プロファイルが変容しており、細胞外マトリクスや接着因子シグナル、TGF β やHippoシグナルに大きな変化を起している。これらのシグナル経路の変化により、健常な心筋細胞との共培養においても、心筋細胞の収縮能および拡張能の増悪を来す。この成果は、今後拡張型心筋症の新規治療開発において、心筋線維芽細胞をターゲットとした治療法につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Primary cultured cardiac fibroblast (CF) cell lines were established from pediatric dilated cardiomyopathy (DCM) patients and compared with three CF lines from healthy controls. When DCM-CFs were co-cultured with healthy cardiomyocytes, they deteriorated the contractile and diastolic functions of cardiomyocytes. RNA-sequencing revealed markedly different comprehensive gene expression profiles in DCM-CFs compared with healthy-CFs. Several humoral factors and the extracellular matrix (ECM) were significantly upregulated or downregulated in DCM-CFs. The pathway analysis revealed that ECM-receptor interactions, focal adhesion signaling, Hippo signaling, and transforming growth factor-beta signaling pathways were significantly affected in DCM-CFs. In contrast, single cell RNA-sequencing revealed that there was no specific subpopulation in the DCM-CFs that contributed to the alterations in gene expression.

研究分野：小児循環器学

キーワード：拡張型心筋症 心筋線維芽細胞 心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性拡張型心筋症 (DCM) は進行性で予後の悪い難病であり、近年の抗心不全治療の進歩にも関わらず、治療抵抗性で重症心不全となる症例は少なくない。治療抵抗性の場合には心臓移植しか救命的手段はないが、世界中でドナーは不足しており、特に我が国では顕著である。また、たとえ心臓移植までたどり着いたとしても、拒絶反応や腎機能障害、感染症、冠動脈病変などの多くの移植後合併症のため、世界での心臓移植後5年生存率は70-80%と決して良くない。これら移植医療に置ける諸問題は特に小児においては顕著であり、深刻なドナー不足だけでなく移植後何十年もの長期にわたり合併症との戦いが継続する。それゆえDCMに対する新たな治療戦略の開発が望まれるが、そのためにはまずDCMの病態解明が重要である。これまで種々の遺伝子がDCM発症に関与していることが報告されているが、一方では心筋細胞に発現する構造タンパクやイオンチャネル等に変異が見つからない例も多く、心筋細胞の異常だけでDCMの病態を説明できるのかについては疑問が残る。

近年、心筋細胞だけではなく心筋線維芽細胞が心機能の維持や心臓発生、心不全病態に大きく関与していることが報告されている。(Furtado et al. Differentiation. 2016;92:93-101) 心臓において心筋細胞はその体積の約75%を占めるが、細胞数としては心筋線維芽細胞が半数以上を占めている。心筋線維芽細胞は様々な細胞外マトリクスを分泌して心筋細胞の足場を形成し支持するだけでなく、様々な液性因子を分泌し心筋細胞の機能を根底から支えている。

しかしこれまで、心筋線維芽細胞が特発性心筋症の病態形成において、どのような役割を果たしているのかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではまず、心筋線維芽細胞そのものが特発性拡張型心筋症の病態形成において主体的な役割を果たしているかどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

我々の施設は、わが国における11歳未満の心臓移植実施施設として、多くの小児心筋症患者を診療している。そこで、補助人工心臓装着の際や心臓移植施行の際に廃棄される左室心筋組織の一部から、心筋線維芽細胞を単離し培養している(図1)。本研究では、DCMの小児患者4名から樹立した、心筋線維芽細胞を対象として研究を行った。正常対照としては、市販で入手可能な若年者由来心筋線維芽細胞を用いた。

(1) 患者遺伝的背景の同定

それぞれの患者における遺伝子異常を明らかにするため、全エクソン解析を行った。病原性については、American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)のガイドラインに従って、判断を行った。

(2) 患者由来心筋線維芽細胞が持つ細胞生物学的な特徴の解明と疾患原性の検証

まずは患者由来線維芽細胞の生物学的特徴を明らかにするため、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞接着能、アポトーシスについて検証した。次に、心筋線維芽細胞自身が心筋細胞に pathogenic な影響を与えるかどうかを明らかにするため、患者由来心筋線維芽細胞を正常心筋細胞と共培養する実験を行った。正常心筋細胞は日齢 1-2 の新生仔ラット心筋細胞の初代培養細胞を用いた。共培養については、心筋線維芽細胞を feeder として、その上で正常心筋細胞を培養する、direct co-culture 系と、インサーター上で心筋線維芽細胞を培養し、培地のみ共有する indirect co-culture 系とを用いた。indirect co-culture では、主に液性因子による影響を観測することが出来る。拍動する心筋細胞について、SI8000 モーションアナライザー (SONY) を用いて、モーションベクトル解析を行った。

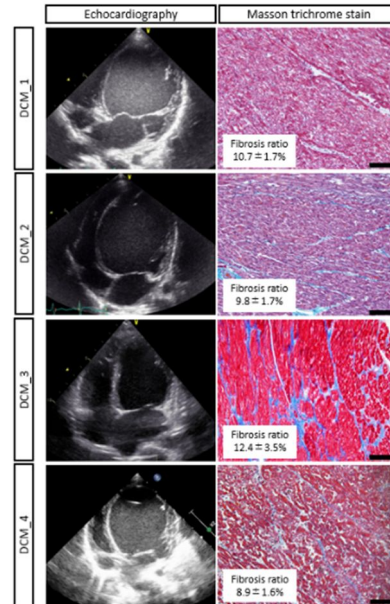


図 1. 患者の臨床背景. 心エコー図(左)と心筋組織の Masson trichrome 染色像(右)

(3) 患者心筋線維芽細胞の網羅的遺伝子発現解析とシグナル経路解析

患者および正常対照の心筋線維芽細胞を回収し、RNA を抽出した。これに対してまずは、バルクでの RNA-sequence 解析を行った。heat-map 解析、K means 解析を行い、発現プロファイルのクラスタリングを行った。さらに、differential expression gene 解析を行い、患者由来心筋線維芽細胞で、有意に発現上昇している遺伝子について絞り込みを行った。さらに、シングルセル RNA 解析も行った。心筋線維芽細胞は homogeneous な細胞集団ではなく、かなり heterogeneous な細胞集団だと考えられている。そのため、バルクでの RNA-seq 解析で得られた遺伝子発現プロファイルの変化が、特定の細胞集団による変化なのか、あるいは細胞集団全体での変化なのかを同定することとした。また、Subio プラットフォームを用いて、パスウェイ解析を行い、患者由来心筋線維芽細胞で有意に発現が変化しているシグナル経路を同定することとした。

4. 研究成果

DCM 患者 4 名のうち 1 名で、既知の *TNNT2* 遺伝子のミスセンスバリエーションを同定した。他の 3 名では、有意な遺伝子バリエーションを同定できなかった。DCM 患者由来心筋線維芽細胞は、それ単体の培養では、細胞増殖能、遊走能、アポトーシス、接着能について、正常心筋線維芽細胞と異なる点は見られなかった。(図 2) しかし、正常心筋細胞と共培養すると、DCM 患者由来心筋線維芽細胞は、正常心筋細胞の収縮能と拡張能を増悪させることが明らかとなった(図 3)。この変化は、遺伝子バリエーションが同定されている例と同定されていない例とでは、明らかな差は見出されなかった。さらに、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。クラスタリングと主成分分析では DCM 心筋線維芽細胞では正常心筋線維芽細胞と比較して発現パターンがかなり異なることが判明した(図 4)。DEG(differential expression genes) 解析から、DCM 患者由来心筋線維芽細胞で有意に発現が変化している遺伝子を複数同定することが出来た。

図 2. 拡張型心筋症心筋線維芽細胞 (DCM) と健常心筋線維芽細胞 (HCF) における基本的生理機能解析。A, 細胞増殖能 B, 細胞遊走能 C, 細胞接着能 D, アポトーシス E, 活性化能
いずれにおいても DCM vs HCF で有意差を認めなかった。

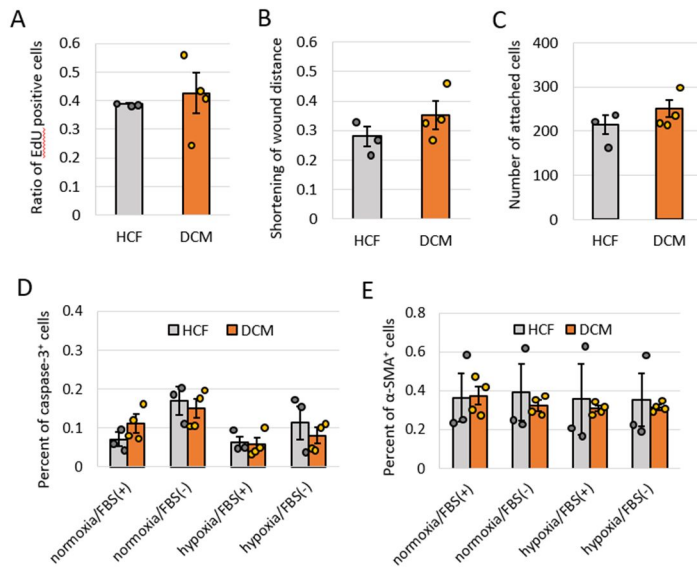


図 3. 拡張型心筋症心筋線維芽細胞 (DCM) と健常心筋線維芽細胞 (HCF) と共培養した健常心筋細胞のモーションベクトル解析。上段: indirect co-culture。下段: direct co-culture。A, 拍動数(bpm) B, 収縮速度 C, 拡張速度
* P<0.05

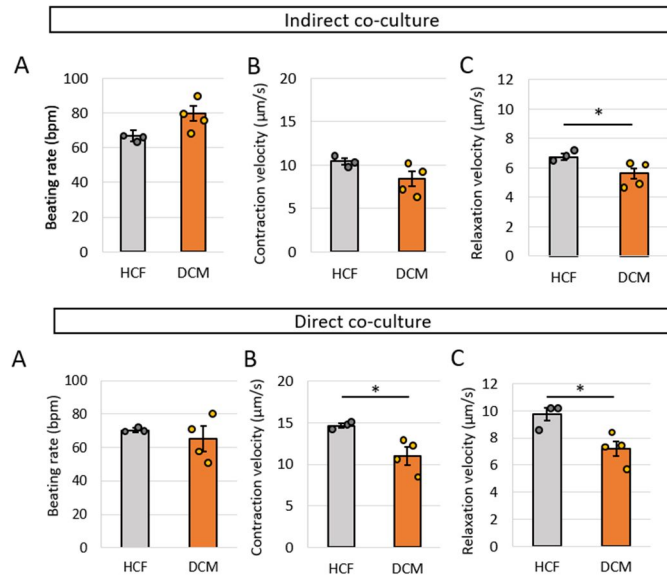
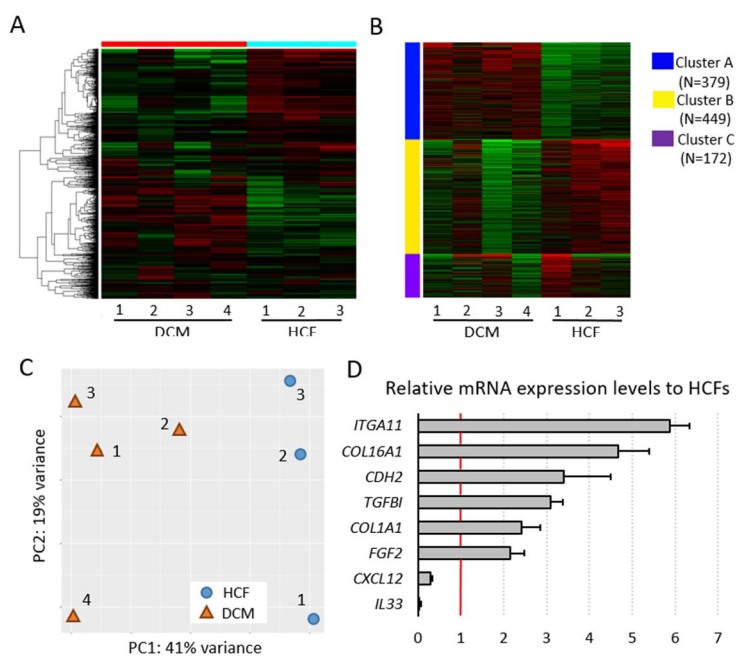


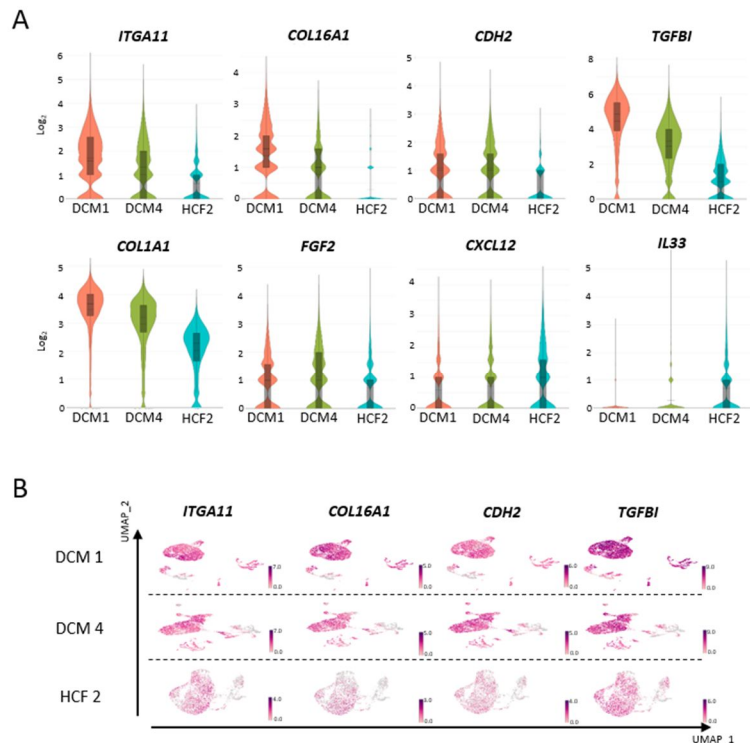
図 4. 拡張型心筋症心筋線維芽細胞 (DCM) と健常心筋線維芽細胞 (HCF) の RNA-seq 解析。A, クラスタリング解析 B, K-means 解析 C, 主成分分析 D, differential expression genes (DEG)
DCM 心筋線維芽細胞は HCF と比較して大きく発現プロファイルが異なっており、それは主成分分析においても明らかである。いくつかの接着因子や細胞外マトリクス、サイトカインやケモカインに関連する遺伝子の発現が有意に変化していた。



これらは、シングルセル RNA-seq 解析における pseudo bulk 分析においても、同様の結果であったが、シングルセル RNA-seq 解析では、上記の有意な遺伝子発現変化に寄与する特定の sub-population を同定することは出来なかった。むしろ、心筋線維芽細胞全体の発現変化が、上記の bulk RNA-seq の結果に寄与していると考えられた。(図 5)

最後に、パスウェイ解析によって、DCM 患者由来心筋線維芽細胞では、細胞外マトリクスや細胞接着に関わるシグナル経路、また、Hippo pathway や TGF pathway が有意に変動していることが明らかとなった。これらのシグナル経路が、複合的に影響して、心筋細胞の収縮能や拡張能に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの成果については、Journal of the American Heart Association 誌に発表した。(J Am Heart Assoc. 2023 Jul 4;12(13):e029676. doi: 10.1161/JAHA.123.029676.)

図 5. 拡張型心筋症心筋線維芽細胞 (DCM) と健常心筋線維芽細胞 (HCF) の single cell RNA-seq 解析。 A, バイオリンプロット解析では、bulk RNA-seq で示された DEG の発現変化は、シングルセルレベルでの解析においても同様であることが示された。 B, シングルセル RNA-seq 解析では、それぞれ有意な発現変化を示した遺伝子群で、特定の sub-population が発現変化に主体的に寄与しているわけではないことが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuru Hirofumi, Yoshihara Chika, Suginobe Hidehiro, Matsumoto Mizuki, Ishii Yoichiro, Narita Jun, Ishii Ryo, Wang Renjie, Ueyama Atsuko, Ueda Kazutoshi, Hirose Masaki, Hashimoto Kazuhisa, Nagano Hiroki, Tanaka Ryosuke, Okajima Takaharu, Ozono Keiichi, Ishida Hidekazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathogenic Roles of Cardiac Fibroblasts in Pediatric Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e029676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.123.029676	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田秀和、石井良
2. 発表標題 小児拡張型心筋症の病態形成における 心筋線維芽細胞の役割
3. 学会等名 日本小児心筋疾患学会
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担 者	石田 秀和 (ISHIDA HIDEKAZU) (50467552)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師 (14401)	

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
---------	---------