

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860885

研究課題名(和文) 心臓線維芽細胞を標的とした心臓の発達・分化機構の解明

研究課題名(英文) Role of cardiac fibroblasts on cardiac development and differentiation during fetal period

研究代表者

赤池 徹 (AKAIKE, Toru)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20647101

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)：線維芽細胞は、線維・癒痕化形成だけでなく、心筋肥大や心筋収縮力を調節することが明らかになってきている。しかしながら、胎生期の線維芽細胞の役割はいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、胎生期の心臓発達や分化における心臓線維芽細胞の役割を解明することを目的に研究を行った。胎仔及び新生仔期ラット初代心臓線維芽細胞を用いた実験で、胎生期の心臓線維芽細胞が、心臓の増殖に強く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cardiac fibroblasts contribute to cardiac hypertrophy and increases of cardiac function, not only fibrosis and scarring in heart. However, role of cardiac fibroblasts during fetal period still remains unclear. We then tried to elucidate whether fetal cardiac fibroblasts regulated proliferation and differentiation of cardiomyocytes. We performed primary culture in fetal and neonatal rat heart, and determined cell-cycle related genes by qRT-PCR analysis. Expressions of CDK2 and cyclin D1 mRNA in cardiomyocytes co-cultured with fetal cardiac fibroblasts were significantly higher than that of neonatal cardiac fibroblasts. We found that fetal cardiac fibroblasts may contribute to cardiomyocyte proliferation.

研究分野：小児循環器

キーワード：線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

心臓線維芽細胞は成人心臓の 1/3 から 2/3 を構成する主要細胞である。心臓線維芽細胞は細胞外基質の産生や、炎症や障害による線維・癒痕化の形成に関与していることが知られているが、いまだその機能については完全に解明されていない。近年心臓線維芽細胞は心筋細胞の近傍に局在し、心筋細胞と協調することや、サイトカイン、ケモカイン、及び成長因子などを放出し、心筋の収縮力、心筋肥大、及びアポトーシスを調節することが明らかにされている。また、心臓線維芽細胞と共培養された心筋細胞は細胞配列を整え、収縮力を増大すること(LaFramboise et al, *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007, Kobayashi et al, *J Artif Organs.* 2008)や、筋線維芽細胞と共培養された筋芽細胞は分化度の高い骨格筋組織を形成すること(Cooper et al, *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004)や、骨格筋形成の際のアポトーシスを調節していることが報告されている(Zhang et al, *Develop Growth Differ.* 2010)。したがって、線維芽細胞が心筋細胞及び骨格筋細胞の分化に重要な役割を持つことが推測される。

心臓線維芽細胞の発現はヒト心筋において胎生 17 週で高く、胎生 23 週では漸減し、成人では著しく低下していることが報告された(Grigore et al, *Rom J Morphol Embryol.* 2012)。胎生中期に心臓線維芽細胞の発現が多いことは、この時期の発達、分化に必須な働きを持つ可能性が示唆される。これまでの心臓の発生・発達の研究は心筋細胞における転写因子カスケードや心臓構成細胞の細胞系譜などの検討を中心に進められてきており、胎生期において心臓線維芽細胞の心臓の発生・発達における役割について詳細に検討した研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、心臓の主要構成細胞である心臓線維芽細胞が、胎生期の心臓発達・分化に与える働きを解明することを目的とした。

胎子、新生仔、及び成獣ラットの心筋組織や心臓から採取した初代培養細胞を用い、網羅的遺伝子解析や共細胞培養技術を駆使して、心筋細胞の分化・増殖に影響を与える因子を同定することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 胎仔期及び新生仔期心臓線維芽細胞の網羅的遺伝子・蛋白プロファイリング

胎仔期における線維芽細胞の発現量・部位の確認

本研究はすべて Wistar rat を用いた。胎仔期、新生仔期、成獣期はそれぞれ胎生 16 日、

生後 1 日、生後 10 週のラットを用いた。

各発生段階の線維芽細胞の発現部位を確認するため、摘出心筋をホルマリン固定・パラフィン包埋し、切片標本作製した。心室短軸切片標本に線維芽細胞のマーカーである periostin 抗体を用いて免疫染色を行った。また、線維芽細胞の発現量を確認するため、摘出心筋から抽出した RNA を逆転写反応により cDNA に合成し、qRT-PCR 法により心筋細胞及び心臓線維芽細胞マーカーの発現を調査した。標本数はそれぞれ n=4 で行い、内因性コントロールとして 18S mRNA を使用した。

心臓線維芽細胞の網羅的遺伝子・蛋白プロファイリング

胎仔期、新生仔期及び成獣期の心臓から初代細胞培養を行い、心筋細胞と心臓線維芽細胞を分離培養した。分離培養の精度を確認するため、各培養細胞から RNA を抽出し、同様の手法で qRT-PCR 法により心筋細胞及び心臓線維芽細胞マーカーの発現を調査した。標本数はそれぞれ n=6 で行い、内因性コントロールとして 18S mRNA を使用した。

(2) 心臓線維芽細胞が心筋細胞の増殖、分化を促す分子機序の解明

線維芽細胞が心筋細胞の増殖や分化を調節するか調査するため、初代細胞分離培養から得られた心筋細胞と心臓線維芽細胞を用いて、非接触系の共培養を行った。細胞培養プレートに新生仔心筋細胞を播種し、その上に胎子又は新生仔心臓線維芽細胞を播種したポイデンチャンバーインサートを置き、同じ培養液中で 48 時間培養した。その後、心筋細胞から RNA を抽出し、(1)と同様の手法で qRT-PCR 法により心筋細胞及び心臓線維芽細胞マーカーの発現を調査した。標本数はそれぞれ n=4 で行い、内因性コントロールとして 18S mRNA を使用した。

4. 研究成果

(1) 胎仔期及び新生仔期心臓線維芽細胞の網羅的遺伝子・蛋白プロファイリング

胎仔期における線維芽細胞の発現量・部位の確認

各発生段階での心臓線維芽細胞の発現を心臓線維芽細胞のマーカーである periostin 抗体を用いた免疫染色法で確認した。periostin 陽性細胞は、胎仔期ラット心臓では心筋全体に、新生仔期ラット心臓では心内膜側に強く分布していた(図 1)。

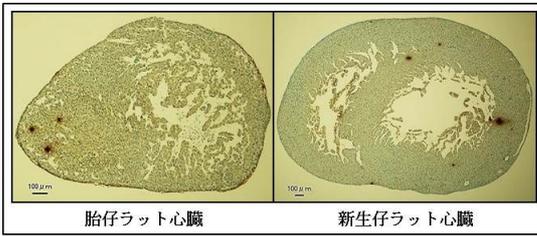


図 1. ラット心臓の短軸断面像（periostin 陽性：茶色）

さらに、心臓線維芽細胞の発現を定量的に評価するために qRT-PCR 法で心臓線維芽細胞マーカーの発現を確認した。心臓線維芽細胞のマーカーである vimentin mRNA の発現は胎仔及び新生仔心筋では成獣と比べ優位に高値であった（図 2）。また心臓線維芽細胞は筋線維芽細胞に形質転換し、サイトカインやケモカイン、及び成長因子などを放出する機能を持つことが知られている。その筋線維芽細胞のマーカーである CD44 mRNA の発現は成長段階で優位な変化はなかった（図 2）。心筋細胞のマーカーである MHC は胎生期から成長に従い、 β MHC から α MHC へシフトチェンジすることが明らかになっている。本研究においても、胎仔期から新生仔期に β MHC mRNA から α MHC mRNA へ劇的にシフトチェンジした（図 2）。

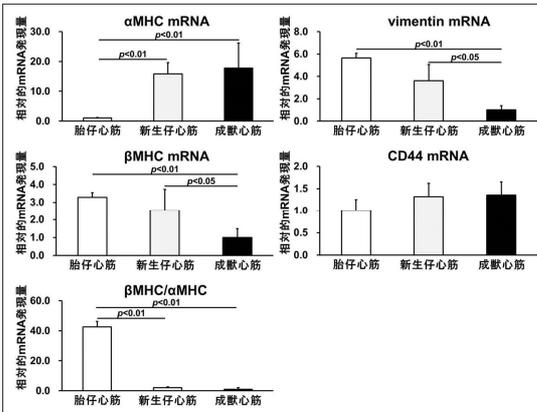


図 2. 胎仔、新生仔心筋では vimentin mRNA の発現が高値であった。（n=4）

以上の結果から胎仔期、新生仔期では、心臓線維芽細胞の発現が高値であることが示唆された。

心臓線維芽細胞の網羅的遺伝子・蛋白プロファイリング

胎仔期及び新生仔期と成獣期での心臓線維芽細胞の構成遺伝子・蛋白の相違を高速液体クロマトグラフィー・質量分析装置を用いた定量プロテオミクス解析や DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行う。

まず各時期の心筋から初代培養を行った。心筋細胞と心臓線維芽細胞の接着性の違いによる分離方法で心筋細胞と心臓線維芽細胞の分離培養を行った（図 3）。

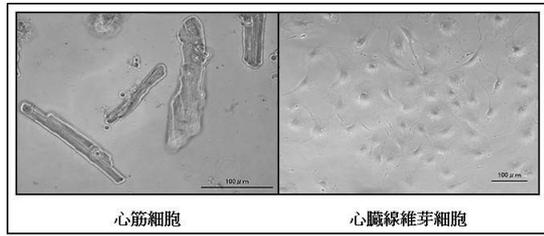


図 3. 成獣心筋の初代細胞分離培養

初代分離培養の純度を確認するために、qRT-PCR 法により心筋細胞マーカーの β MHC mRNA と心臓線維芽細胞マーカーである vimentin mRNA の発現を確認した。心筋細胞では β MHC mRNA が、心臓線維芽細胞では vimentin mRNA の発現が高値であった（図 4）。

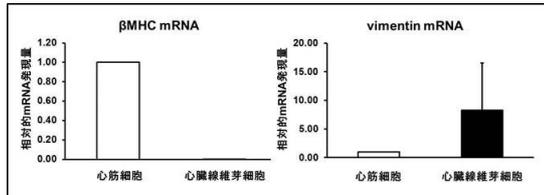


図 4. 心筋細胞では β MHC mRNA が、心臓線維芽細胞では vimentin mRNA の発現が高値であった。（n=6）

以上の結果から、初代分離細胞培養方法を確認できた。

今後、各時期の心臓線維芽細胞を用いて、高速液体クロマトグラフィー・質量分析装置を用いた定量プロテオミクス解析や DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行う。その結果から胎仔期心臓線維芽細胞に、特異的又は、優位に発現する因子を同定していく必要がある。

(2) 心臓線維芽細胞が心筋細胞の増殖、分化を促す分子機序の解明

胎生期に心臓線維芽細胞が心臓の発達や分化を調節しているという仮説を検証するため、初代心筋細胞および心臓線維芽細胞を用いた実験を行った。胎生 16 日ラット及び新生仔ラット心臓から採取した心筋細胞及び心臓線維芽細胞を共培養し、心筋細胞の増殖能を qRT-PCR 法で細胞増殖マーカーにより評価した。

まず、心筋細胞の増殖能は出生後速やかに低下することが知られている。まず、胎仔心筋細胞と、新生仔心筋細胞の増殖能を、細胞増殖マーカーで調査した。cdc2 mRNA、CDK2 mRNA、cyclin D1 mRNA、及び cyclin E1 mRNA の発現は、新生仔心筋細胞に比べて胎仔心筋細胞で高値であった（図 5）。

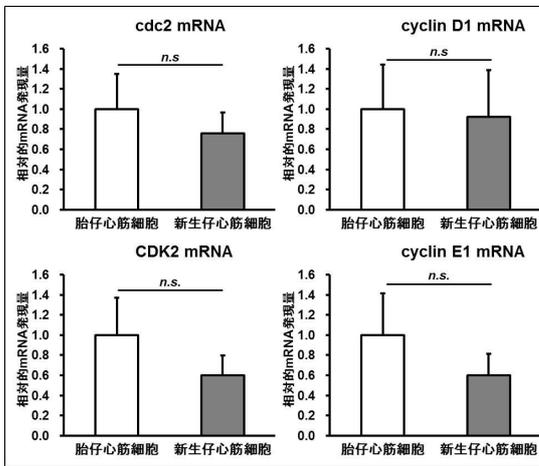


図 5. 新生仔心筋細胞と比べ、胎仔心筋細胞で細胞増殖マーカーの発現が高値であった。(n=4)

次に、新生仔心筋細胞を胎仔又は新生仔心臓線維芽細胞とそれぞれ共培養した。新生仔心臓線維芽細胞と共培養した群と比べ、胎仔心臓線維芽細胞と共培養した群のほうが、細胞増殖マーカーが高値であった。特に CDK2 mRNA と cyclin D1 mRNA の発現は優位に高値であった(図 6)。

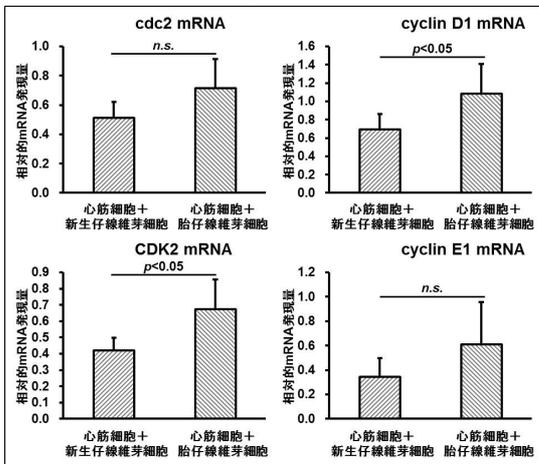


図 6. 新生仔心臓線維芽細胞と比べ、胎仔心臓線維芽細胞と共培養した新生仔心筋細胞の細胞増殖マーカーの発現は高値であった。(n=4)

今後は、図 5 で示すように胎仔心筋細胞の方が新生仔心筋細胞より増殖能は高値であるため、胎仔心筋細胞を各発生段階の心臓線維芽細胞と共培養し、増殖能が変化するか確認する。また、細胞分化マーカーも調査し、分化能の評価を行っていく。

さらに、(1)の実験で、同定された胎仔心臓線維芽細胞に特異的又は優位な因子が心筋細胞の増殖や分化に影響を与えるかを遺伝子導入技術や発現抑制技術を駆使して、その詳細なメカニズムを検討していく必要がある。

本研究の結果より、胎生期心臓線維芽細胞が、心臓の増殖に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 2 件)

Akaike T, Minamisawa S. Role of ion channels in ductus arteriosus closure. Human Genetics & Embryology. 3:116, 2014. DOI:10.4172/2161-0436.1000116. (査読有)

Hsieh YT, Liu NM, Ohmori E, Yokota T, Kajimura I, Akaike T, Ohshima T, Goda N, Minamisawa S. Transcriptional profiles of the ductus arteriosus in Brown-Norway rat with irregular elastic fiber formation. Circ J. 2014; 78(5):1224-33. (査読有)

(学会発表)(計 3 件)

赤池 徹, 梶村いちげ、南沢 享. Inhibition of Cyclooxygenase Closes Chicken Ductus Arteriosus. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。

赤池 徹、大森衣里子、梶村いちげ、宮川 富田幸子、合田亘人、南沢 享. Elastic fibers are fragmented and impaired in chicken ductus arteriosus. 第 50 回日本小児循環器学会総会・学術総会、2014 年 7 月 4 日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

赤池 徹、謝 宜庭、劉 孟佳、大森衣里子、横田知大、梶村いちげ、南沢 享. Elastic Fiber Formation of Ductus Arteriosus in Brown-Norway Rats has a Unique Character Trait. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤池 徹 (AKAIKE, Toru)

東京慈恵会医科大学・細胞生理学・助教

研究者番号： 25860885