

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07789

研究課題名（和文）心筋線維芽細胞に着目した小児特発性心筋症の病態解明

研究課題名（英文）Pathological functions of cardiac fibroblasts in pediatric cardiomyopathy

研究代表者

石井 良（ISHII, RYO）

大阪大学・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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：小児の特発性心筋症はその発祥の原因については未だ不明な点も多い。我々は多くの小児心筋症患者の遺伝子解析によりその原因遺伝子について特定を行うことが出来た。また、心臓移植や補助人工心臓植え込みの際に得られた患者の心臓から心筋線維芽細胞を培養して研究を行った。患者由来の心筋線維芽細胞は、健常な心筋線維芽細胞とは遺伝子発現が著しく異なっており、健常な心筋細胞とともに培養すると、健常な心筋細胞の収縮能や拡張能に悪影響を与えることが明らかになった。そして、心筋症患者由来iPS細胞を樹立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の私達の研究により、これまで心筋細胞にのみ原因があると考えられてきた特発性心筋症の病態において、心筋線維芽細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。心筋症の患者から得られた心筋線維芽細胞が、健常な心筋細胞の収縮能や拡張能に悪影響を与えているということは大きな発見である。今後、心筋細胞だけでなく心筋線維芽細胞もターゲットとした新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The precise molecular mechanisms of idiopathic cardiomyopathy is still unknown. We performed whole exome analysis for Japanese pediatric cardiomyopathy patients and identified lots of gene mutations which cause cardiomyopathy in children. We cultured cardiac fibroblasts obtained from the various cardiomyopathy patients while the heart transplantation or ventricular assist device implantation. The diseased cardiac fibroblasts show significant different gene expression patterns as compared to the healthy cardiac fibroblasts. When we co-cultured the healthy cardiomyocytes with diseased cardiac fibroblasts, the cardiomyocytes showed weakened contraction and dilatation ability. We established induced pluripotent stem cell lines from the patients with idiopathic cardiomyopathy in children.

研究分野：小児循環器学

キーワード：心筋症 心筋線維芽細胞 心筋細胞 遺伝子発現解析 心臓移植

1. 研究開始当初の背景

特発性心筋症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の手段はないが、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、世界での移植後5年生存率は70-80%である。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。それゆえ新たな治療方法の開発が望まれるが、そのためにはまず小児心筋症の病態解明が重要である。これまでいくつかの遺伝子が心筋症発生に関与していることが報告されているが、特に拡張型心筋症においては心筋細胞に発現する構造タンパクやイオンチャンネル等に変異が見つからない例も多く、発症メカニズムに未知な部分が多い。

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。従って、心筋線維芽細胞が特発性心筋症の病態形成に関与している可能性は十分考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、心筋線維芽細胞そのものが特発性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。

3. 研究の方法

我々は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。その中で、拡張型心筋症患者と拘束型心筋症患者について実験に用いた。正常対照は、市販の健常人由来心筋線維芽細胞を用いた。年齢を出来るだけ近づけるため、10代から30代の若年健常人由来の心筋線維芽細胞を選択した。

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、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析による心筋症の原因遺伝子特定を行った。本研究では、心筋症発症に関わる既知の遺伝子257個について、両親の遺伝子解析も同時に行うトリオ解析とした。既知ではない遺伝子異常については、真にpathogenicな変異であるか判定するためにはさらに詳細な実験が必要となり、本研究の目的から逸脱するため、それ以上の解析は行わず、遺伝子変異が同定できたものと同定できなかったものとして、以後の実験を行うこととした。

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

まずは患者由来心筋線維芽細胞の生物学的特徴を明らかにするため、細胞増殖能や遊走能、接着能、アポトーシスについて検証した。さらには次世代シーケンサーを用いたRNA-seqにより、正常心筋線維芽細胞と心筋症患者由来心筋線維芽細胞との間で、遺伝子発現プロファイルにどのような違いがあるのかを検証した。

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feederとして、正常ラット心筋細胞をその上で培養した。また、液性因子の影響を検証するため、インサーターを用いた共培養系も行った。ラット心筋細胞は日齢1-4のSDラットを用いてCollagenase処理して単離した。feeder上で拍動する心筋細胞について、S18000(Sony)を用いてmotion analysisを行った。

患者由来心筋線維芽細胞からのiPS細胞作成

CytoTune-iPS2.0キット(IDPharma)を用いて、遺伝子変異の同定された心筋症患者からiPS細胞を作成した。

4. 研究成果

患者遺伝的背景の同定

我々の施設で診療している小児心筋症患者に対して、白血球中よりゲノム DNA を抽出し、それを全エクソンシーケンスにて解析した。既報告の心筋症関連遺伝子として 257 遺伝子をターゲットにして、エクソン中のバリエーションを同定した。同定されたバリエーションのうち、アレル頻度が低く、複数のコンピュータシミュレーションにて、タンパクの機能異常が推定されるバリエーションを抽出した。さらに、健常な両親の全エクソン解析も行い、両親のどちらかに見られるバリエーションについて(コンパウンドヘテロが推測されるものは除く)は除外した。また、疾患源性があると確実に特定できたものを抽出するため、心筋症のフェノタイプを呈したという既報が複数認められるようなバリエーションのみを今回の研究では、心筋症に関連する遺伝子変異あり、として確定させた。

本研究では、心筋線維芽細胞を採取している小児期発症特発性心筋症患者 52 例に対して、上記の全エクソン解析を行い、うち 16 例で有意なバリエーションを特定できた。

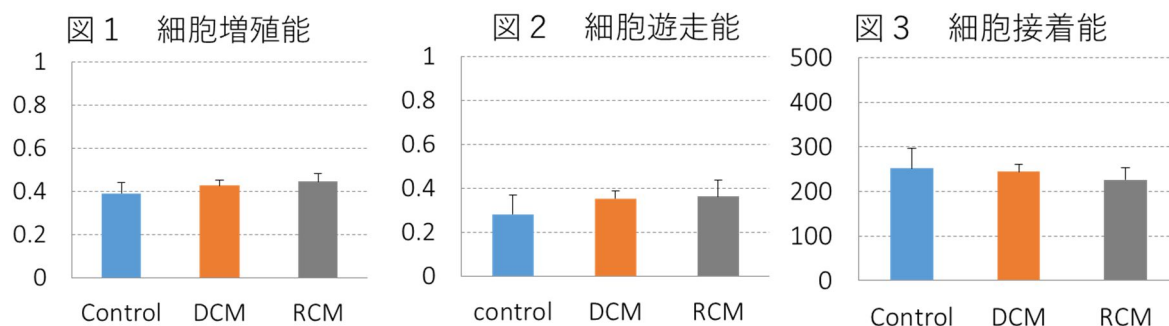
患者由来心筋線維芽細胞が持つ細胞生物学的な特徴の解明と疾患源性の検証

本研究では、小児期発症拡張型心筋症と拘束型心筋症の患者から採取した心筋線維芽細胞を培養して実験に用いた。健常コントロールとして 3 人の検体を用意した。拡張型心筋症は 4 症例、拘束型心筋症も 4 症例とした。

まずは、細胞増殖能について、EdU 取り込みアッセイにて評価した。健常コントロール、拡張型心筋症、拘束型心筋症の心筋線維芽細胞、すべての群において特に細胞増殖能には有意な差を認めなかった。(図 1)

次に、細胞遊走能について検討した。細胞遊走能は一般的なスクラッチアッセイによって検証した。健常コントロール、拡張型心筋症、拘束型心筋症の心筋線維芽細胞、すべての群において、特に細胞遊走能には有意差を認めなかった。(図 2)

次に、細胞接着能について検討した。細胞接着能は、単離した心筋線維芽細胞を細胞培養ディッシュ上に播種したのち、一定時間に接着した細胞数をカウントすることで評価を行った。健常コントロール、拡張型心筋症、拘束型心筋症の心筋線維芽細胞、すべての群において、特に細胞接着能には有意差を認めなかった。(図 3)



また、アポトーシスしている細胞の割合についても検証した。アポトーシスの指標としては、cleaved Caspase-3 の免疫染色によっておこない、全ての細胞数に対して、アポトーシスしている細胞の割合を算出した。アポトーシスの誘導として、定常状態以外に、低酸素刺激と培養液中の血清を除去することで、アポトーシス誘導を行った。健常コントロール、拡張型心筋症、拘束型心筋症の心筋線維芽細胞、すべての群において、どの条件下であっても、アポトーシスの比率に有意な差は認めなかった。(図 4)

最後に、線維芽細胞の活性化を評価するため、myofibroblast の割合を検討した。-smooth muscle actin で免疫染色を行い、陽性の細胞を活性化型の myofibroblast として算出した。この実験においても、myofibroblast への刺激として、定常状態以外に、低酸素刺激と培養液中の血清を除去することで、線維芽細胞の活性化誘導を行った。健常コントロール、拡張型心筋症、拘束型心筋症の心筋線維芽細胞、すべての群において、どの条件下であっても、myofibroblast の比率に有意な差は認めなかった。(図 5)

以上の実験により、特に心筋線維芽細胞単体の細胞生理学的特性は、健常コントロール、拡張型心筋症、拘束型心筋症の心筋線維芽細胞、すべての群において、どの条件下であっても、有意な差は認めないことが判明した。

図4 アポトーシス

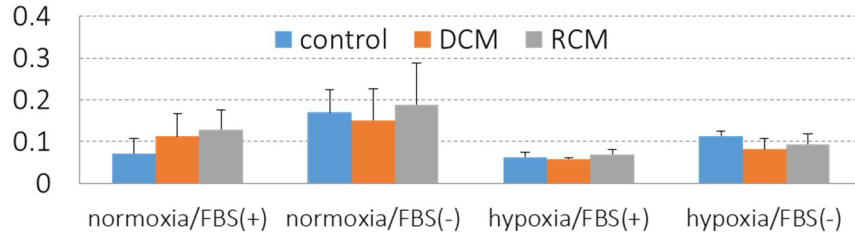
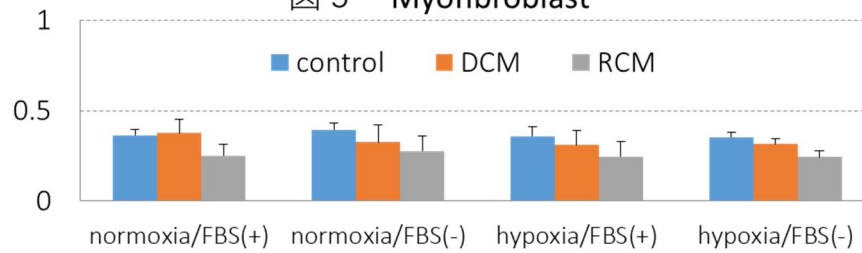
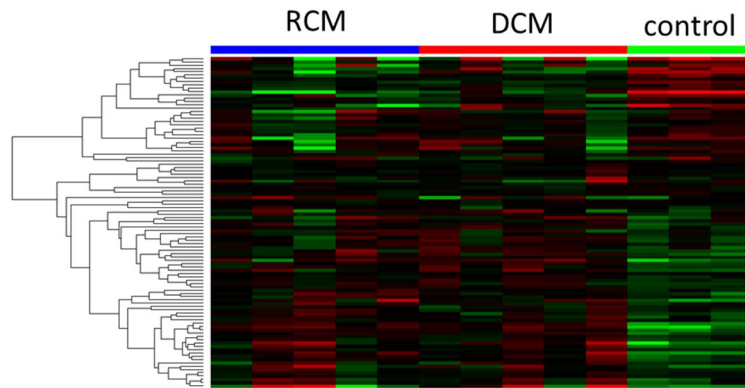


図5 Myofibroblast



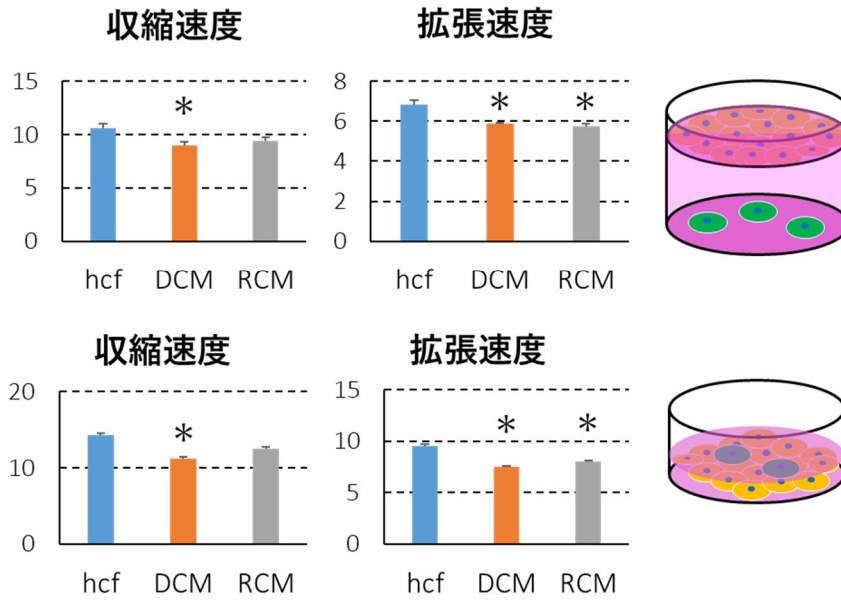
次に、心筋線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルが、健常の心筋線維芽細胞と異なっているのか、それが初代培養系においても維持されているのかを検証するため、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。heatmap 解析では、拡張型心筋症由来心筋線維芽細胞と拘束型心筋症由来心筋線維芽細胞とは、健常の心筋線維芽細胞とは、明らかに遺伝子発現パターンが異なっており、それは初代培養系においても維持されていることが明らかとなった。(図6)

図6 RNA-seq解析



最後に、心筋症患者由来心筋線維芽細胞と健常の心筋細胞を共培養することによって、病的な心筋線維芽細胞が心筋細胞の収縮能や拡張能に影響を与えるかどうかを検証した。まずは、心筋線維芽細胞から分泌される液性因子のみの影響を観察するために、インサージョンプレートを用いた共培養系 (indirect co-culture) にて実験を行った。さらに、接着因子や細胞同士の直接の相互作用を確認するために、同じ培養皿上に心筋線維芽細胞と心筋細胞とを播種して (direct co-culture) 実験を行った。心筋細胞の収縮能を拡張能については、Sony SI8000 モーションアナライザーを用いて、心筋細胞の動きをベクトル化して定量的解析を行った。indirect co-culture, direct co-culture とともに、拡張型心筋症心筋線維芽細胞と共培養した心筋細胞は収縮能の低下が認められた。拘束型心筋症心筋線維芽細胞と共培養した心筋細胞では拡張能の有意な低下が認められた。(図7)

図7 モーションアナライザー解析



患者由来心筋線維芽細胞からの iPS 細胞作成

TNNI3 変異を認めた拘束型心筋症患者から CytoTune-iPS2.0 キット (ID Pharma) を用いて、遺伝子変異の同定された心筋症患者から iPS 細胞を作成した。iPS 細胞のクオリティチェックとして、多分化能マーカーの確認を免疫染色で行った。また 3 胚葉系への分化を確認した。さらに、核型解析にて正常核型であることを確認した。樹立した iPS 細胞ラインは、心筋細胞への分化能は良好であることを確認できた。(図8)

図8 作成したiPS細胞株



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 0件）

1. 著者名 Tsuru Hirofumi, Ishida Hidekazu, Narita Jun, Ishii Ryo, Suginobe Hidehiro, Ishii Yoichiro, Wang Renjie, Kogaki Shigetoyo, Taira Masaki, Ueno Takayoshi, Miyashita Yohei, Kioka Hidetaka, Asano Yoshihiro, Sawa Yoshiki, Ozono Keiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cardiac Fibroblasts Play Pathogenic Roles in Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-20-1008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 水流宏文、石井良ら
2. 発表標題 心筋線維芽細胞に着目した小児心筋症の病態解明と治療応用
3. 学会等名 第55回 日本小児循環器学会総会
4. 発表年 2019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・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	小垣 滋豊 (KOGAKI SHIGETOYO) (00311754)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (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
---------	---------