

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23959

研究課題名(和文) 心臓線維化発症における代謝変化と分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of metabolic changes and molecular mechanism in cardiac fibrosis

研究代表者

和氣 正樹 (Wake, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：30847124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の治療において、収縮能低下による薬物治療は大きく進歩してきた。一方、収縮能の保たれた拡張不全の治療は収縮不全の治療と比較すると進んでいない。拡張不全は心筋組織の過剰な線維化が主病態とされるが、線維芽細胞が過剰に活性化する全貌は明ではない。そこで、臓器線維化を引き起こす線維芽細胞と、炎症を制御するマクロファージを中心にこの病態を解明することとした。

これまでに、炎症性マクロファージがOncostain-Mを介して線維化を抑制する点を明らかにしたが、さらに線維芽細胞単独でも、低酸素、酸性環境やミトコンドリア代謝阻害でも線維化が進行する可能性が示唆され、この分子機構の詳細も明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで臓器線維化は、慢性炎症を背景に、TGF- $\beta$ 等の分泌過剰が起こり、筋線維芽細胞からコラーゲンが分泌されることで進行すると考えられてきた。しかし、これまでの研究から線維芽細胞は、サイトカイン刺激が無い状況下でも細胞自身でコラーゲン産生を亢進するシステムが内在されている可能性が示唆された。

これは、外傷などの急激な細胞外環境の変化に即応するためのシステムと予想される。そして、細胞内の代謝変化をセンサーに急激にコラーゲン分泌へと細胞の反応全体を変化させていると考えられた。この代謝の制御を中心とした治療が可能となれば、過剰な線維化を基礎とした疾患の治療につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the treatment of heart failure, significant progress has been made in the pharmacological treatment of systolic failure. On the other hand, the treatment of diastolic failure (reserved ejection fraction), in which contractility is preserved, has not progressed as much as the treatment of systolic failure. The main pathogenesis of diastolic dysfunction is excess fibrosis of myocardial tissue, but the complete picture of fibroblast activation is unclear. Therefore, we decided to elucidate the pathogenesis of this disease by focusing on fibroblasts, which cause organ fibrosis, and macrophages, which regulate inflammation.

We have shown that inflammatory macrophages inhibit fibrosis via Oncostain-M, and we will also elucidate the molecular mechanism of fibrosis in fibroblasts alone, as hypoxia, acidic environment and inhibition of mitochondrial metabolism may also promote fibrosis.

研究分野：心臓線維化

キーワード：心線維芽細胞 筋線維芽細胞 心臓マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

心不全臨床において、収縮不全による心不全では経カテーテル治療や薬物治療の導入により予後が大きく改善している。その一方心臓線維化を背景にした拡張不全による心不全患者では未だに有効な治療法がない。そして、この病態は心臓リモデリングとして理解されている。

これまでの報告において心不全症例では血中炎症性サイトカイン濃度が増加しマクロファージが心臓へ集積するなど無菌性炎症が惹起されることが知られている。そこで、心臓マクロファージの機能解析を行うことで、心臓線維化・拡張不全の病態を理解するのみならずその病態治療アプローチを開発できると考え本研究を開始した。

これまでの予備的検討から、低酸素状態が病態の背景に存在することがわかってい。そして、このような組織リモデリングの過程では、炎症惹起型のマクロファージと炎症抑制型マクロファージが存在することが知られている。これまでの我々の検討から心臓リモデリング組織の場合でも低酸素環境にあること、またこのような低酸素領域にマクロファージが低酸素に応答するタンパクである HIF-1 依存的に集積することを確認した。更にフローサイトメトリーを用いてマクロファージ亜集団の機能解析を行った。心臓に集積する炎症惹起型のマクロファージが腫瘍抑制タンパクと考えられている Oncostatin-M 分泌を介して心筋組織の過剰な線維化を抑制していることを同定した。

## 2. 研究の目的

上記背景から、臓器リモデリング過程において心臓マクロファージと心臓線維芽細胞が活性化し、筋心臓線維芽細胞の相互機能解析を切り口として心臓線維化・拡張不全に対する新たな治療法を開発することとした。そこで、Oncostatin-M の活性を評価するため、コラーゲン分泌の主な細胞である線維芽細胞も併せて検討したところ、従来から指摘されている筋線維芽細胞だけではなく、筋線維芽細胞へ形質転換しないまま、通常の線維芽細胞が大量にコラーゲン分泌をしていることを新たに見出した。

このため、新たにマクロファージの機能解析と共に線維芽細胞そのもののコラーゲン産生機構に注目し臓器リモデリングをきたすコラーゲン産生のシステムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)コラーゲン産生線維芽細胞のモデルとして NIH 3T3 細胞を使用した。虚血による臓器リモデリングと同様に、低酸素・低 pH 環境下において、そのコラーゲン産生を評価した。

(2)同細胞を用い、細胞代謝とコラーゲン産生能力との関係性を評価し、線維化に至る代謝経路を特定する。

(3)コラーゲン産生に重要な役割を示している代謝経路を特定するために、細胞内代謝の特定を行う。

## 4. 研究成果

(1)酸素濃度を低下 (O<sub>2</sub> 1%) させ培養すると線維芽細胞のコラーゲン産生は増加した。さらに、コラーゲン mRNA を評価したところ、mRNA 非依存的にコラーゲン産生が増加している可能性が示された。また、低酸素環境下では解糖系の亢進により乳酸産生が増加することが知られているが、乳酸を直接細胞に投与 (20mM) してもコラーゲン産生が増加した。一方、酸の刺激に対して、コラーゲン産生が増加した可能性があるため pH を調整した乳酸ナトリウムを投与 (20mM) したが、この場合、コントロールに比しコラーゲン産生は増加したが、pH を調整していない乳酸よりも低下した。

これらの結果より低酸素環境と酸性環境が新たなコラーゲン産生の条件である可能性が示唆された。これは虚血や主要中心部等の低酸素、低 pH の環境であり、細胞の生存が危機にさらされている状況と考えられた。さらに、mRNA の解析では PAI-1 や  $\alpha$ -SMA の活性化がみられなかったため線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換は起こっていない可能性が考えられた。

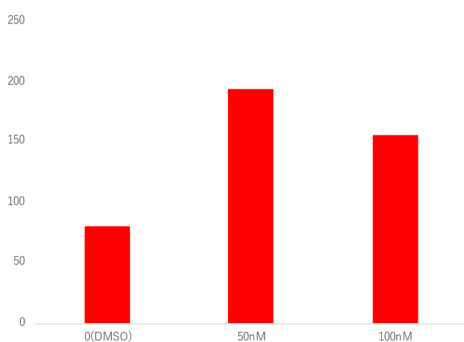
さらに、pH 調整した乳酸であっても、コラーゲン産生が増加していることから乳酸そのものが、コラーゲン産生に関与している可能性が考えられた。乳酸は、コラーゲン 1 の mRNA を上げる結果が得られていたため、乳酸による新たなコラーゲン産生機構が存在する可能性が考えられた。

(2)さらに、ミトコンドリア代謝の一部を阻害したところ、コラーゲン産生をすることが示された。この経路によるコラーゲン産生も mRNA から筋線維芽細胞への形質転換は起こっていないと考えられた。この経路制御は、創傷治癒の過程の促進や老化による臓器線維化抑制等の治療が可能となると考えられた。そして、虚血や飢餓状態の環境下では解糖系が主な代謝経路として作用している可能性が示唆された。

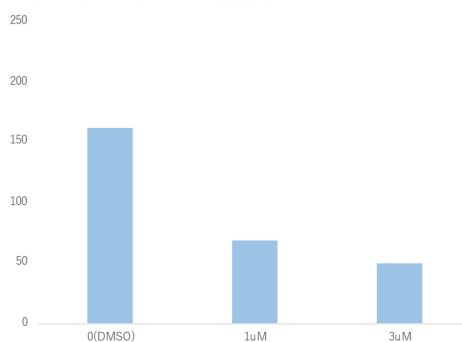
(3)上記結果を踏まえると、血清飢餓や乳の酸刺激によっても、コラーゲン産生が亢進する可能性が示されたことから、細胞にとって危機・飢餓的な状況下において線維芽細胞へ活性化することなくコラーゲン産生が亢進している点が示唆された。そこで、飢餓を示す生物反応として代表とされるオートファジーを検討に加えることとした。オートファジーによりコラーゲンの基質になるアミノ酸を産生し、コラーゲン産生増加につながっているとの仮説をもとに検討を加えた。しかし、結果は予想に反しオートファジー阻害薬によって、コラーゲン産生が増加し、一方でオートファジー抑制薬によってコラーゲン産生が低下した。これまでの知見からコラーゲンは分泌顆粒が脱顆粒することで、細胞外に分泌されることが明らかにされており、オートファジーは細胞の動的な変化によってコラーゲン産生を変化させる可能性が示唆された。

## オートファジーとコラーゲン産生

オートファジー阻害



オートファジー促進



これまで、コラーゲン産生経路の詳細は十分に明らかにされていないが、今回の研究結果から、線維芽細胞は、臓器虚血や乳酸をはじめとした細胞増殖にとって過酷な環境下でもコラーゲン産生が増加することが示唆された。さらに、その代謝細胞内代謝は解糖系を中心としている可能性が示唆された。オートファジーが介在し、コラーゲン産生が制御されている可能性が示唆された。代謝とオートファジーを介したコラーゲン産生については新しい知見であり、引き続き、同メカニズムについて研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------