

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23993

研究課題名(和文)心リモデリングに関わる線維産生細胞の再検討と分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of reidentification of fibrogenic cells involved in cardiac remodeling and elucidation of molecular control mechanisms

研究代表者

安田 純平 (YASUDA, Jumpei)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：90850777

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)：様々な疾患に伴って、臓器にコラーゲン線維が過剰に蓄積した状態を線維化という。申請者の所属研究室は最近、転写因子Tcf21が肝臓線維化の制御因子であることを明らかにした。Tcf21は肝臓以外の臓器でも線維化に関与することが示唆されているが、心臓線維化におけるTcf21の機能は全く解明されていない。本研究では、Tcf21発現制御が心臓線維化病態に及ぼす影響の検討とした。本研究により、心臓におけるコラーゲン産生細胞が心線維芽細胞であることが証明されたが、心線維芽細胞におけるTcf21の機能を完全に解明するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冠動脈疾患や高血圧症の患者は増加の一途を辿っており、その発症と進展に伴うコラーゲンの過剰沈着(心臓線維化)は心不全をきたす。心臓線維化を標的とする新たな心不全治療法の開発が喫緊の課題であるが、心臓線維化に関わるコラーゲン産生細胞の由来やその制御機構は不明である。本研究や今後の研究により、Tcf21の発現制御が心臓線維化の病態に及ぼす影響を明らかにすることで、Tcf21の発現制御による心臓線維化治療という新しい概念の治療法の開発に繋がるのが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is the excessive accumulation of collagen fibers in organs due to various diseases. Recently, the authors' laboratory revealed that the transcription factor Tcf21 is a regulator of liver fibrosis. It has been suggested that Tcf21 is involved in fibrosis in organs other than the liver. However, the function of Tcf21 in cardiac fibrosis has not been clarified at all. In the present study, we investigated the effects of Tcf21 regulation on the pathogenesis of cardiac fibrosis.

This study demonstrated that the collagen-producing cells in the heart are cardiac fibroblasts, but it did not fully elucidate the function of Tcf21 in cardiac fibroblasts.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心不全 臓器線維症 病態生理学 転写因子

1. 研究開始当初の背景

心疾患は国内外に多くの罹患者が存在し、その治療は医療経済的にも大きな負担となっている。冠動脈閉塞や高血圧症などにより心疾患が発症・進展すると、心臓の機能的・構造的変化(リモデリング)が起こる。心リモデリングによりコラーゲンなどの細胞外マトリックス(ECM)が過剰に沈着(線維化)すると、心収縮力の低下を招き最終的に心不全に陥る(図1)。

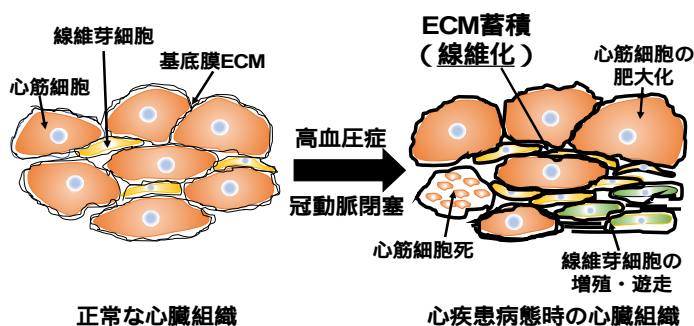


図1 心疾患病態における心リモデリングの模式図

心臓における ECM 産生細胞は線維芽細胞とされるが、厳密な証明はされておらず、このことが心リモデリング(心臓線維化)の治療法の開発を妨げる大きな要因となっている。

転写因子 Tcf21 は胎仔期の心臓や腎臓に発現し、その器官形成に関わることが報告されている。申請者の所属研究室では最近、肝線維化の責任細胞である活性化星細胞において Tcf21 の発現が低下する一方で、同細胞に Tcf21 遺伝子を導入するとマウスの肝線維症が抑制されることを明らかにした(Nakano et al. Hepatology, 2019)。また Tcf21 欠損マウスではイソプロテレノール誘導性の心臓線維化が抑制されたという報告(Baba et al. 第 82 回日本循環器学会学術集会要旨)もあることから、Tcf21 が心臓線維化に対しても重要な役割を果たしている可能性が推測されるが、Tcf21 の心リモデリング病態下での機能とその詳細な発現制御機構は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は、心リモデリングにおける ECM 産生細胞の同定、当該細胞内での Tcf21 の機能および発現調節機構の解明、Tcf21 発現制御が心臓線維化病態に及ぼす影響の検討を目的とした。これにより心臓線維化機序の一端を解明し、Tcf21 を標的とした新たな心不全治療法の開発基盤を提示するものである。

これまでに心臓線維化における ECM 産生細胞を厳密に同定した報告はなく、本研究は所属研究室が樹立した I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子(COL1A2)発現を蛍光タンパク質 EGFP で検出する COL1A2/EGFP レポーターマウスを用いることで初めて可能となる。また、Tcf21 発現制御による臓器線維症治療も所属研究室により初めて提唱されたもので、既存の心不全治療法とは全く異なる概念に基づく新規治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 心臓線維化病態における ECM 産生細胞の同定

正常な COL1A2/EGFP マウスから非筋細胞を単離・培養した。培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定して、0.2% Triton-X で脱膜化した後、心臓構成細胞の特異的のマーカ抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察と撮影を行った。

次に β アドレナリン受容体非選択的作動薬であるイソプロテレノールを充填した浸透圧ポンプを COL1A2/EGFP レポーターマウスの頸背部皮下に埋め込む手術を行った。浸透圧ポンプによりイソプロテレノールを 4 週間連続で皮下投与することで心不全モデルを作製した。心不全モデルマウスから摘出した心臓組織を 4%パラホルムアルデヒドで 6 時間固定後にスクロース置換処理を施してから OCT コンパウンドに包埋して凍結組織ブロックを作製した。凍結組織ブロックから薄切切片を作製して、心臓構成細胞の特異的のマーカ抗体を使用して免疫蛍光染色を行った。染色した組織切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察と撮影を行った。

さらに正常な COL1A2/EGFP マウスから骨髓細胞を採取して、放射線照射で骨髓破壊した野生型マウスに移植した。この骨髓移植マウスの頸背部の皮下にイソプロテレノールを充填した浸透圧ポンプを埋め込み、心不全モデルマウスを作製した。4 週間後に心臓組織を摘出・採材して、凍結包埋組織ブロックを作製した。その後、薄切切片を作製して上記と同様の方法で免疫蛍光染色を行った。

(2) イソプロテレノール誘導性心不全モデルマウスにおける Tcf21 発現動態解析

野生型マウスの頸背部皮下に浸透圧ポンプを埋め込むことにより、イソプロテレノールを 1~4 週間連続で皮下投与することで心不全モデルを作製した。イソプロテレノール投与してから、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後に心臓組織を摘出・採材した。心不全モデルマウスから摘出した心臓組織から mRNA を抽出して、qPCR を行った。また摘出心臓組織を 10%ホルマリ

ン固定した後、パラフィンで包埋して薄切切片を作製した。パラフィン包埋薄切切片を使用して、ヘマトキシリン&エオジン染色とシリウスレッド/ファストグリーン染色を行った。染色した切片は明視野顕微鏡で観察した。

(3) Tcf21 遺伝子の発現誘導がコラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響

Tcf21 がコラーゲン産生に及ぼす影響を検討するために、マウス Tcf21 発現プラスミドを作製した。また、HEK293 細胞に Tcf21 発現プラスミド、およびコラーゲン産生をルシフェラーゼ活性で検出するレポータープラスミドを同時にトランスフェクションした。24 時間後に細胞抽出液を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 心臓線維化病態における ECM 産生細胞の同定

正常な COL1A2/EGFP マウスから単離・培養した非心筋細胞を用いて細胞免疫蛍光染色を行ったところ、単離・培養した細胞には心筋細胞マーカーの cardiac Troponin T (cTnT) は発現しておらず、心線維芽細胞マーカーの Vimentin は発現していた。Vimentin 陽性細胞の一部には EGFP が発現していた (図 2)。

また、COL1A2/EGFP レポーターマウスを使用したイソプロテレノール誘導性心不全モデルの心臓組織の凍結薄切切片を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、COL1A2 を発現している EGFP 陽性細胞には心筋細胞マーカーである cTnT は共発現しておらず、心線維芽細胞マーカーである Vimentin (図 3) および活性化した線維芽細胞マーカーである alpha smooth muscle actin (α SMA) は共発現していた。

さらに、COL1A2/EGFP マウス由来骨髄移植マウスを使用したイソプロテレノール誘導性心不全モデルの心臓組織の凍結薄切切片では、EGFP 発現細胞は観察されなかった。このことから、心不全病態におけるコラーゲン産生に骨髄由来の炎症系細胞は関与していないことが明らかとなった。

以上の結果から、心臓における ECM 産生細胞は心線維芽細胞であることが確認された。

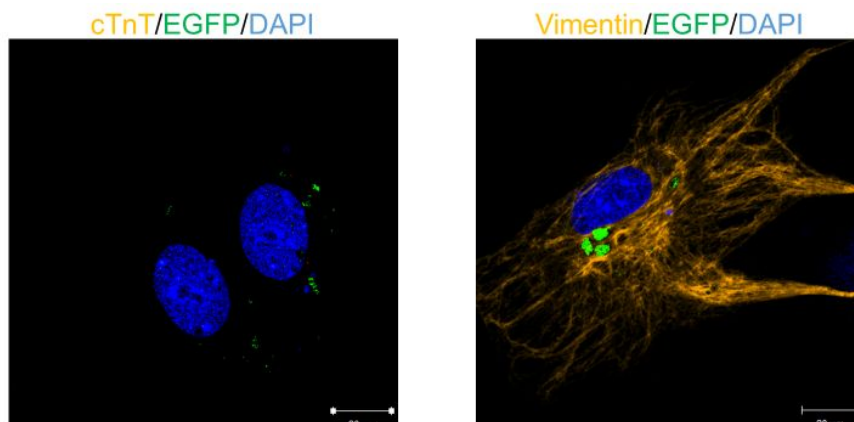


図2 COL/EGFPマウス由来の初代培養心線維芽細胞はEGFP陽性だった

cTnT: 心筋細胞マーカー、Vimentin: 心線維芽細胞マーカー

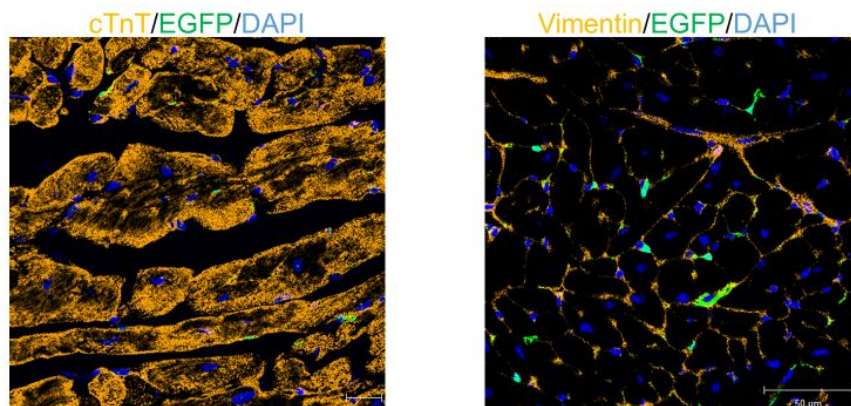


図3 COL/EGFPマウスの心筋組織において、EGFPはVimentinと共局在していた

(2) イソプロテレノール誘導性心不全モデルマウスの心臓組織中における Tcf21 発現動態解析

イソプロテレノール誘導性心不全モデルマウスの心臓組織より抽出した mRNA を使用して、qPCR を行ったところ、Tcf21 mRNA 発現はイソプロテレノール投与 1 週間後に急増しており、その後減少に転じていた (図 4)。

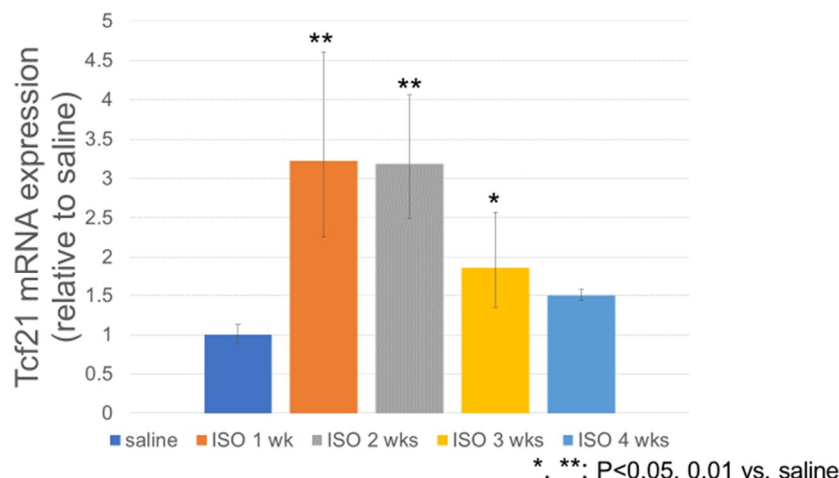


図4 ISO投与1~4週間後のTcf21 mRNA発現

一方で、心臓組織中の線維化をシリウスレッド/ファストグリーン染色によって評価すると、シリウスレッドで赤く染色される線維化領域の面積はイソプロテレノール投与期間が延びるほど増加していた (図 5)。このことから、心臓線維化に伴って Tcf21 発現が減少する可能性が示唆された。

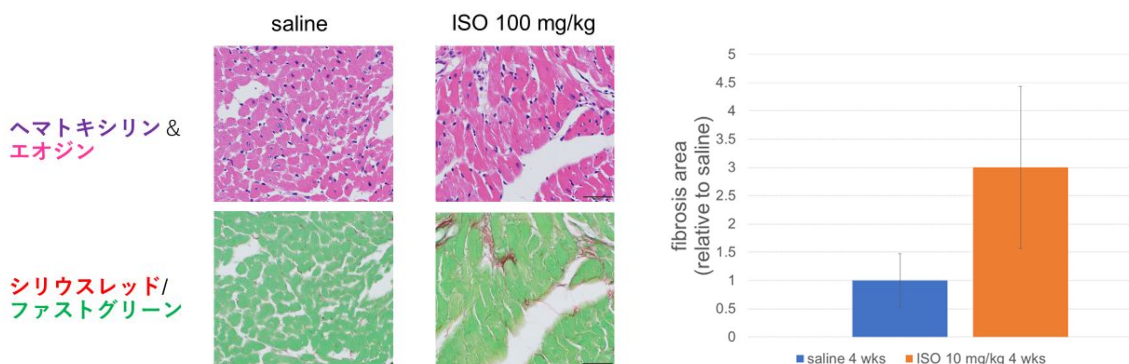


図5 ISO投与4週間後のマウス心筋組織では線維化領域が形成された

(3) Tcf21 遺伝子の発現誘導がコラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響

HEK293 細胞にマウス Tcf21 発現プラスミドと、コラーゲン/ルシフェラーゼレポータープラスミドを同時にトランスフェクションして、24 時間後の細胞抽出液を使用してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、Tcf21 はルシフェラーゼ活性を増加させたことから、コラーゲン遺伝子発現を増加させる機能を持つ可能性が示唆された。

これまでに心臓線維化における ECM 産生細胞を厳密に同定した報告はなかった。本研究により、心臓における ECM 産生細胞が心線維芽細胞であることが証明された。しかしながら、心線維芽細胞がどのような分子制御によって心臓線維化を誘導するのかは、完全な解明には至っていない。所属研究室では、新規転写因子 Tcf21 が臓器横断的な線維化制御因子である可能性を提示してきた。本研究では、心臓線維化における Tcf21 の機能を完全に解明するには至らなかった。今後は、イソプロテレノール誘導性心不全モデルマウスへの Tcf21 発現アデノ随伴ウイルスの投与が、心臓線維化病態に及ぼす影響を検討する計画を立案している。これによって、心リモデリング研究の進展や、Tcf21 を標的分子とした新規心不全治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田 純平、中尾祥絵、柳川 享世、住吉 秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 心臓線維化の責任細胞の再検討
3. 学会等名 第15回結合組織勉強会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松木勇樹、住吉秀明、柳川享世、安田純平、中野泰博、後藤光昭、赤池敏宏、稲垣 豊
2. 発表標題 効率性と安全性に優れたエクソソーム治療法の創生に向けたモニタリング用エクソソームの開発
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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