

平成 30 年 6 月 5 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：2016～2017

課題番号：16H06748

研究課題名(和文) 心臓線維化発症における分子機構の解明

研究課題名(英文) Research for molecular mechanism of cardiac fibrosis

研究代表者

小山 雄広 (Koyama, Katsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70780526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はCol1a1プロモーター下にGFPを発現するトランスジェニックマウス(Col1a1-GFPマウス)の心臓初代線維芽細胞を不死化することで、心臓線維芽細胞株を樹立することに成功している。さらに、この細胞株に対し乳酸を刺激することでCol1a1遺伝子発現が増加し線維芽細胞が乳酸により活性化することを確認することができた。乳酸投与により、核内にHIF-1が誘導されることをウェスタンブロットで確認しており、乳酸が線維芽細胞においてHIF-1を誘導しCol1a1遺伝子発現が上昇する機序の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in establishing cardiac fibroblast cell line from Col1a1-GFP transgenic mice, which express green fluorescent protein (GFP) under the control of Collagen1a1 promoter. Additionally we have found that lactic acid increases Collagen 1a1 transcription in mRNA level in the established cell line. There was an increase in nuclear transcription factor HIF1a protein level in Western blot analysis which suggest Col1a1 transcription level is controlled under HIF1a protein level.

研究分野：心臓線維化

キーワード：心臓線維化

1. 研究開始当初の背景

心不全は我が国で約200万人が罹患する疾患であり、高血圧、糖尿病、脂質異常症の増加に伴いその症例数は増加の一途をたどっている。心不全のうち、収縮能が低下した心不全に対しては有効な治療薬が既に開発されているが、拡張能が低下した心不全には有効な治療薬がなく、早期の治療介入を必要としている。このような拡張障害による心不全は、心筋組織における過剰な線維化を背景として発症する。心筋組織の線維化は、突然死を含めた予後不良因子であることが示唆されているが、なぜ過剰な線維化が生じるかについては未だに明らかになっていない。

2. 研究の目的

線維化は組織修復の過程として生じ、線維芽細胞の活性化による細胞外基質の増生を伴う。冠動脈が閉塞することで生じる心筋梗塞においては、虚血による壊死に陥った梗塞部を修復するための線維化が生じる。その一方で、組織傷害を伴わない非梗塞部においても、線維化が生じることが知られている。しかしながら、なぜ非梗塞部において過剰な線維化が起きるかは不明である。

傷害のない心筋組織における過剰な線維化は、拡張障害や致死性不整脈との関連が報告されているものの、その発症機序については未だに明らかになっていない。本研究では、心筋組織における過剰な線維化の発症機構について明らかにすることを目的とする。

本研究では、心筋細胞の代謝物である乳酸が線維芽細胞を活性化するという仮説に基づき、心臓における過剰な線維化の発症機序を明らかにすることを目的とした。

心筋負荷時において、心筋細胞により産生される乳酸を介して線維芽細胞が活性化していることが想定された。本研究では、心筋細胞より産生される乳酸が線維芽細胞を活性化し、過剰な線維化を惹起するとの仮説に基づきその検証を行った。

3. 研究の方法

これまで心臓線維芽細胞の培養株が存在せず、心臓初代培養細胞を用いて心臓線維芽細胞活性化の解析を行っていた。しかしながら、初代培養細胞は TGF- β による線維化刺激により活性化が十分に誘導されず、解析系としての限界を有していた。

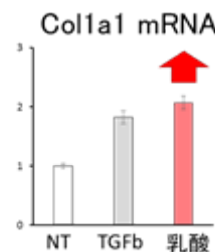
申請者は Col1a1 プロモーター下に GFP を発現するトランスジェニックマウス (Col1a1-GFP マウス) の心臓初代線維芽細胞を不死化することで、心臓線維芽細胞株を樹立することに成功した。この細胞株は TGF- β の刺激により、初代培養細胞と比較してよ

り鋭敏に活性化が誘導され、線維芽細胞活性化における *in vitro* の有効な系を既に構築した。

さらに、この細胞株に対し乳酸を刺激することで Col1a1 遺伝子発現が増加し線維芽細胞が乳酸により活性化することを確認した。同時に、細胞株の Col1a1 遺伝子発現について、プール型 shRNA ライブラリーを用いた網羅的解析を行い、転写活性を亢進させる HIF-1 シグナルが有意に含まれていた。また、乳酸投与により、ウェスタンブロットによるたんぱく定量により核内に HIF-1 が誘導される知見を得た。

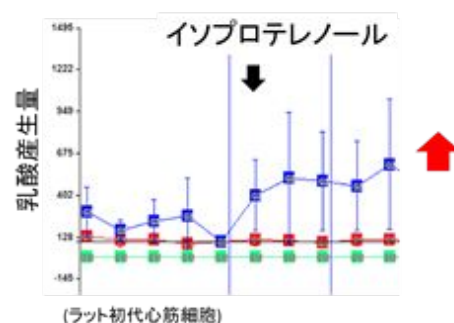
4. 研究成果

Col1a1-GFP マウスより樹立した心臓線維芽細胞株を用いた。その結果、心臓線維芽細胞において、乳酸により Collagen1a1 転写が増加することが示された。乳酸刺激後 24 時間で TGF- β と同等かそれ以上の Col1a1 mRNA 量の増加を認めた。



また心筋細胞の 受容体刺激により、心筋細胞からの乳酸産生が増加することを代謝解析により確認できた。このことは心臓組織において、運動負荷時には、心筋細胞由来の乳酸が心臓線維芽細胞の Col1a1 転写を更新していることが示唆された。

心筋細胞は負荷時に乳酸産生をきたす

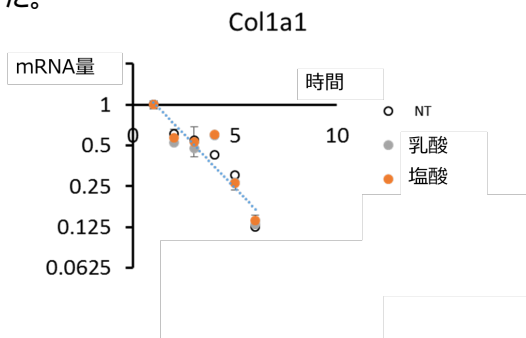


実際に炭素同位体を用いた解析によりマウスの心筋梗塞モデルでは虚血早期に非梗塞部の組織において乳酸の蓄積を確認することができ、生体内で心筋の運動負荷による乳酸蓄積を観察することができた。

また乳酸刺激による線維芽細胞刺激において、ウェスタンブロットにより線維芽細胞

の核内にHIF-1 が集積することが示された。TGF シグナル阻害薬である SB-431542 を用いたところ Col1a1 転写抑制効果はなく、TGF beta シグナルの関与は認められなかった。

またアクチノマイシン D を用いて、乳酸による Col1a1 mRNA の半減期に対する作用についても検証したが、乳酸の有無によって mRNA 半減期には変化は認められなかった。mRNA 量の増加は転写の亢進によるものと考えられた。



Sirtinol などの Sirtuin 阻害剤により Col1a1 mRNA 量について検証を行ったが Sirtuin の関与は認められなかった。

Luciferase assay による HIF1a promoter 活性では乳酸の有無により HIF1a の転写活性に与える影響を今後検証する。

また *in vivo* において心筋線維芽細胞特異的 HIF1a 欠失マウスを用いて生体内における心臓線維芽細胞での HIF1a 集積による組織線維化への影響を検証する。

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)

1. H. Semba, K Koyama (24 人中 17 人目)

HIF-1 -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity

Nat Commun. 2016 May 18;7:11635. 査読有

2. M Ito, M Takahashi, K Koyama (12 人中 4 人目)

Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts major adverse cardiovascular events after cardiac care unit discharge,

J Cardiol.2016 67, 184 - 91. 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. European society of cardiology, ESC congress 2017 Fira - Village 1 Barcelona

High-Throughput shRNA Screening of the Molecular Mechanisms in Cardiac Fibroblast Activation 2017 年 8 月 29 日

Koyama K, Takeda N, Isagawa T, Abe H, Semba H, Soma K, Wake M, Kato M, Nakagama Y, Manabe I, Nagai R, Komuro I

2. The Role of Eosinophils in Hypoxia Induced Pulmonary Arterial Remodeling The 24th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization

The 14th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. 2016/12/10 長崎ブリックホール

Soma K, Takeda N, Isagawa T, Abe H, Semba H, Koyama K, Wake M, Kato M, Nakagama Y, Manabe I, Nagai R, Komuro I

3. Soma K, Takeda N, Isagawa T, Abe H, Semba H, Koyama K, Wake M, Kato M, Nakagama Y, Manabe I, Nagai R, and Komuro I

Flt-1 in M1 macrophages promotes immature vascular formation.

European Society of Cardiology Congress 2017 Fira Barcelona gran via 2017/8/28

[図書](計 1 件)

心臓線維芽細胞の組織修復の新しい機序, Annual review 2016. 中外医学社. 小山雄広

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 雄広 (Koyama Katsuhiro)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号： 70780526