

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17561

研究課題名(和文)患者心筋線維芽細胞を用いた拘束型心筋症の病態解明と新たな治療ターゲットの同定

研究課題名(英文) Analysis of pathological mechanisms of restrictive cardiomyopathy by using cardiac fibroblasts

研究代表者

石田 秀和 (Ishida, Hidekazu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50467552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児期発症の拘束型心筋症患者に対して全エクソン遺伝子解析を行った。拘束型心筋症の患者26例のうち17例で病原性バリエーションを同定した。最も多いのはトロポニンIの変異であった。また、拘束型心筋症患者から心筋線維芽細胞を採取・培養し、細胞生物学的な解析を行った。細胞増殖能、遊走能、接着能、アポトーシス、活性化能については、拘束型心筋症と健常とで差は認めなかった。しかし、健常な心筋細胞と共培養を行うと、健常であるはずの心筋細胞の拡張能を悪化させることが明らかとなった。それに関係する液性因子や接着因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児期発症の拘束型心筋症患者において、網羅的な遺伝子解析を行い、26例中17例で病原性バリエーションを同定した。これはこれまで報告された拘束型心筋症の解析例のうち最多である。また、拘束型心筋症患者から採取した心筋線維芽細胞は、健常な心筋細胞の拡張能を悪化させることを発見し、それに関係する可能性がある因子を同定した。すなわち、拘束型心筋症では、心筋細胞だけでなく心筋線維芽細胞も主体的に病気の発症に関わっており、今後、心筋線維芽細胞をターゲットとする新たな治療法の開発につながる成果をあげることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We conducted whole exome sequence in pediatric restrictive cardiomyopathy (RCM) patients. We analyzed 26 RCM patients and found pathological variants in 17 of 26 patients. The most major variants were observed in troponin I gene. We established cardiac fibroblasts (CFs) from RCM patients. The CFs from RCM were not significantly altered from healthy CFs in terms of proliferation, migration, attachment, apoptosis, and miofibroblasts. The RCM-CFs were co-cultured with healthy cardiomyocytes. We found that co-cultured cardiomyocytes with RCM-CFs deteriorated the diastolic function. We identified several candidates of humoral and contact factors which might be associated with the impaired diastolic function of cardiomyocytes.

研究分野：小児循環器学

キーワード：拘束型心筋症 心筋線維芽細胞 心筋細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

拘束型心筋症 (Restrictive Cardiomyopathy: RCM) は、心室の拡張障害を主体とする稀な心筋症である。小児期発症の生命予後は拡張型心筋症や肥大型心筋症など他の心筋症と比較しても非常に悪く、米国における最近のコホートでは、RCM は心筋症全体の 4.5% を占め、診断から 2 年後に心臓移植を回避して生存している率は 40% である (Weber et al. *Circulation*. 2012; 126:1237-1244)。これまで開発されてきた抗心不全治療は、内科的薬物治療 (遮断薬や ACE 阻害薬、利尿薬、カテコラミンなど) にしても、補助人工心臓を始めとする機械的補助治療にしても、主に心室の収縮障害に対して有効な治療法であり、拡張障害に対してエビデンスのある有効な治療法は存在しない。すなわち、現在までのところ RCM に対する有効な治療法は存在せず、心臓移植のみが唯一の救命手段である。

このように、非常に予後不良な RCM であるが、その病態形成メカニズムについては多くが謎に包まれている。患者数が少ないというのも一つの要因で、上述の米国全体でのレジストリ研究では 19 年間で約 150 例が登録されているのみである。近年、次世代シーケンサーの進歩と全エクソンシーケンスの広がりにより、心筋トロポニン I や T、デスミンを始めとするいくつかの遺伝子異常が一部の RCM 患者において報告されている。しかし、サルコメアタンパクを代表とする多くの変異遺伝子は、拡張型心筋症や肥大型心筋症においても同様の変異が報告されており、それらが RCM という特異な病態形成にどのように関与しているのか、そのメカニズムは明らかになっていない。また、動物モデルの報告もほとんどなく、変異型心筋トロポニン I を心筋で発現させたトランスジェニックマウスの報告があるが (Wen et al. *J. Mol. Biol.* 2009; 392: 1158-1167)、心筋の Ca 感受性の変化が観察されたのみでヒト類似の病態は認められなかった。

一方、心機能の維持や心不全病態において、心筋細胞ではなく心筋線維芽細胞も重要な役割を果たしていることが近年報告され、注目を集めている (Furtado et al. *Circ. Res.* 2014; 114: 1422-1434)。心筋線維芽細胞は心臓における細胞数の半分以上を占める支持細胞であり、細胞外マトリクスを分泌して心筋細胞の足場を形成するだけでなく、様々な液性因子や直接的 interaction を介して心筋細胞の機能を根底から支えている。そのため、RCM 発症機序において心筋線維芽細胞も大きな役割を果たしている可能性は十分あると考えられる。また、心筋線維芽細胞は皮膚線維芽細胞などと比較して心筋前駆細胞や心筋細胞により近い遺伝子発現プロファイルを有していることが報告されている (Furtado et al. *Development* 2016; 143: 387-397)。

2. 研究の目的

本研究では、RCM 患者から採取した心筋線維芽細胞を用いて、まずは細胞生物学的な特性と網羅的発現プロファイルの解析を行う。患者の遺伝的背景は全エクソン解析で明らかにして表現型情報と対応させる。また、RCM 心筋線維芽細胞をフィーダーにして、健常心筋細胞を共培養することで、心筋線維芽細胞が主体的に RCM 病態形成に関わる可能性を検討する。この系での網羅的発現解析 (RNA-seq) から RCM 病態形成に関わるシグナル経路を同定することで、心室拡張障害に対する新たな治療ターゲットの候補を絞り込みたい。

3. 研究の方法

我々の施設は我が国における 11 歳未満の小児心臓移植実施施設の一つとして、これまで多くの RCM 患者を診療しており、本学倫理審査委員会承認のもと、これらの患者からゲノム DNA の採取および心筋線維芽細胞を採取・培養(図 1)しており、それらを用いて RCM の病態発生機序の解明と治療ターゲットの同定を試みた。

1. 全エクソンシーケンスによる遺伝学的背景の把握

我々はこれまでも多くの心筋症患者において全エクソンシーケンスを行って成果を挙げている。小児患者においては多くの症例で両親(+ 健常のきょうだい)からもゲノム検体を採取することが可能であり、本研究では基本的にはトリオ解析を行い、変異遺伝子の同定を行った。

2. RCM 患者由来心筋線維芽細胞と心筋細胞の網羅的発現プロファイリングと cell physiology 解析

患者由来心筋線維芽細胞の細胞生物学的な特性を明らかにするため、まずは、細胞増殖能、接着能、遊走能、アポトーシス、myofibroblast の割合といった基本的な解析を行った。さらに、次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析(RNA-seq)により、患者由来と正常の心筋線維芽細胞の発現プロファイルの比較を行った。さらに、RCM における心筋線維芽細胞と RCM-iPS 細胞由来の心筋細胞のレオロジー(粘弾性)について、原子間力顕微鏡を用いた解析を行った。一般に心室の拡張障害であれば心筋間質の線維化や、心内膜あるいは心外膜の線維化がその主要因と考えられるが、実際の自験例では、肉眼的所見においても病理組織学的解析においても、重症 RCM 患者の摘出心は拡張型心筋症患者を比して線維化が著しいわけではない。すなわち、心筋細胞あるいは心筋線維芽細胞そのものの「硬さ」が関係している可能性を考えて実験を行った。

3. 心筋線維芽細胞と心筋細胞の細胞間相互作用解析

さらに、RCM 患者由来心筋線維芽細胞が病態形成に主体的な役割を果たしているのか検証するため、RCM 心筋線維芽細胞を健常な心筋細胞と共培養した。共培養の方法としては、液性因子のみの影響を調べるため、セルストレイナーを用いた共培養系と、細胞接着や細胞外基質分泌を介した影響を調べるため、心筋線維芽細胞をフィーダーとして心筋細胞をその上に播種する、直接共培養系とを行った。健常心筋細胞の力学的挙動の変化を明らかにするためモーションアナライザー-SI8000(Sony)で拍動ベクトルを定量化した。

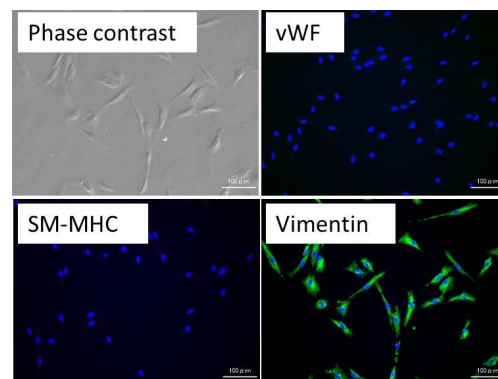
4. 研究成果

1. 全エクソンシーケンスによる遺伝学的背景の把握

26 例の小児 RCM 患者に対して全エクソンシーケンスを行った。うち 17 例で候補となるミスセンスバリエーションを同定した。トロポニン I のミスセンスバリエーションが最も多かった。心筋線維芽細胞の採取・樹立を行った RCM 患者の中から下記 4 名において、心筋線維芽細胞を用いた以後の実験を行った。4 名中 3 名においてトロポニン I のミスセンスバリエーションを同定した。これらのバリエーションは既報にても RCM および HCM を引き起こすバリエーションとして知られており、病原性バリエーションであると考えられた。4 名中 1 名の患者では、病原性バリエーションは同定されなかつ

図 1. RCM 患者由来心筋線維芽細胞

断片化した心筋組織を細胞培養皿に settle し、周辺から増殖する細胞を回収し expand する。これらの細胞は Vimentin 陽性で、内皮マーカーの von Willbrand factor(vWF) 陰性、平滑筋マーカー-smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) 陰性である。



た(表1)。これらの患者の心エコー像や心筋の病理組織像は特に有意な差はなく、心臓表現型としては病原性バリエーションの有無では差は認められなかった。

	RCM#1	RCM#2	RCM#3	RCM#4
Gender	Male	Male	Male	Female
Age at diagnosis	5 y.o.	2 y.o.	6 y.o.	8 m.o.
Age at sampling	10 y.o.	3 y.o.	11 y.o.	2 y.o.
Gene mutation	<i>TNNI3</i> (K178E)	<i>TNNI3</i> (R170W)	<i>TNNI3</i> (R192H)	Not detected

表1. 各 RCM 患者の臨床情報と全エクソンシーケンスによる遺伝子解析結果

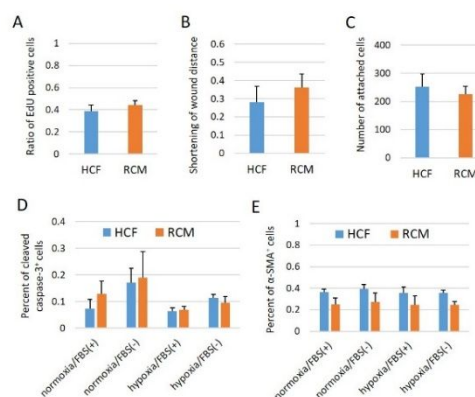
2. RCM 患者由来心筋線維芽細胞と心筋細胞の網羅的発現プロファイリングと cell physiology 解析

上記の小児 RCM 患者 4 名から樹立した心筋線維芽細胞について解析を行った。これらの細胞は、心臓移植時もしくは補助人工心臓装着時に採取した左室自由壁心筋から回収した。心筋線維芽細胞はサブコンフルエントの状態になれば継代し、継代数 4 から 7 のものを実験に使用した。また、CD31 および smooth muscle myosin heavy chain 抗体にて免疫細胞染色を行い、内皮細胞および平滑筋細胞の混入がない事、トロポニン T 抗体にて心筋細胞の混入がない事を確認した。健常の心筋線維芽細胞は、PromoCell 社より購入した 3 ラインを用いた。

まず、細胞増殖能を検証するため EdU を用いた実験を行った。RCM 心筋線維芽細胞と健常心筋線維芽細胞とでは有意な増殖能の差を認めなかった。次に細胞遊走能を検証するため、wound scratch assay を行った。細胞遊走能においても RCM 心筋線維芽細胞と健常心筋線維芽細胞とでは有意差を認めなかった。次に細胞接着能を検証したが、これも有意差は認めなかった。また、Caspase3 の免疫染色によるアポトーシス細胞の割合を検討したが、serum free および低酸素によるアポトーシス誘導にも関わらず、RCM 心筋線維芽細胞と健常心筋線維芽細胞とでは有意な差を認めなかった。さらに、同様の刺激下にて myofibroblast への活性化能を検証したが、これも RCM 心筋線維芽細胞と健常心筋線維芽細胞とで有意な差を見出せなかった(図2)。

図2. RCM 患者由来心筋線維芽細胞の細胞生理学的解析

HCF: healthy cardiac fibroblasts. RCM: RCM patient derived cardiac fibroblasts. (A) 細胞増殖能 (B) 細胞遊走能 (C) 細胞接着能 (D) アポトーシス (E) myofibroblasts の割合
これら、基本的細胞機能は、健常心筋線維芽細胞(HCF)と RCM 患者心筋線維芽細胞(RCM)とで、有意な差を認めなかった。



次に、次世代シーケンサーをもちいた RNA-sequence 解析を行った。hierarchical clustering 解析と K-means 解析では、興味深いことに、RCM 心筋線維芽細胞は、健常心筋線維芽細胞と大きく異なった遺伝子発現パターンを示した。主成分分析の遺伝子発現パターンの差は大きかった(図3)。

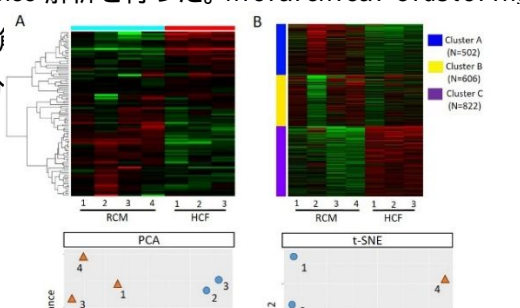


図3 .RNA-sequence による、RCM 患者由来心筋線維芽細胞と健康心筋線維芽細胞での網羅的遺伝子発現解析

HCF: healthy cardiac fibroblasts. RCM: RCM patient derived cardiac fibroblasts. (A) hierarchical clustering (B) K-means による heatmap, (下段) 主成分分析(PCA)および t-SNE 解析でも、HCF と RCM の心筋線維芽細胞は大きく異なった遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった。

3 . 心筋線維芽細胞と心筋細胞の細胞間相互作用解析

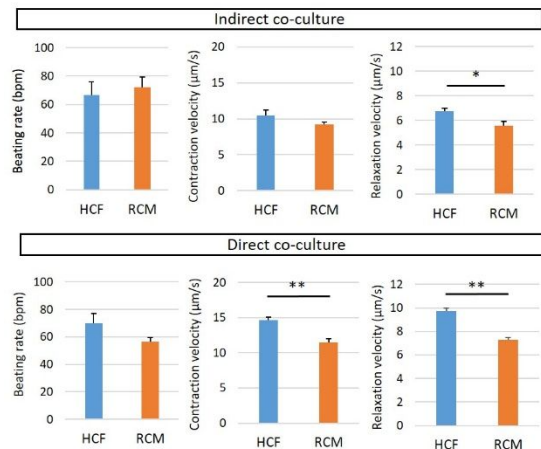
RCM 心筋線維芽細胞が心筋細胞の収縮および拡張能に与える影響を解析するため、共培養による実験を行った。まず、indirect co-culture 系として、セルストレイナーを用いて上層に RCM もしくは健康心筋線維芽細胞を培養し、下層に健康ラット新生仔由来心筋細胞を培養した。また、direct co-culture 系として、同一の細胞培養ディッシュ内に心筋線維芽細胞をコンフルエントで培養したところに、健康ラット新生仔由来心筋細胞を播種して培養した。

心筋細胞は自律的に beating しており、その収縮および拡張における運動ベクトルを、モーションアナライザー S18000 (SONY)にて定量化して解析を行った。興味深いことに、両方の共培養系においてともに、心筋細胞の拡張能は RCM 心筋線維芽細胞と共培養すると有意に増悪していた(図3)。その増悪度は、direct co-culture 系においてより顕著であり、RCM 心筋線維芽細胞からの液性因子および接着因子の両方の因子が、心筋細胞の拡張能低下に関与していることが伺われた。

最後に、RCM 心筋線維芽細胞がどのようにして健康心筋細胞の拡張能を増悪させるかを明らかにするために、RNA-sequence 解析データについて、differential expression gene 解析を行い、RCM 心筋線維芽細胞で有意に発現が上昇あるいは減少している遺伝子を同定した。既報にて、心筋細胞の機能維持に関わっていることが報告されている遺伝子として、ITGA11 や COL6A1, TGFB1, FGF5, CXCL12, IL33 などが同定できた。本研究では、どの因子が最も重要な役割を果たしているかは同定できなかったが、今後の検討課題と考える。これらの研究成果は、Circulation Journal. 2021;85(5):677-686. において発表した。

図4 .健康心筋細胞との共培養によるモーションアナライザー解析

HCF: healthy cardiac fibroblasts. RCM: RCM patient derived cardiac fibroblasts. (上段) セルストレイナーを用いて培地のみ共有される indirect co-culture による解析。健康心筋細胞の拍動数および収縮能は有意な差を認めないが、拡張能については、RCM 心筋線維芽細胞と共培養した心筋細胞は有意に低下した。(下段) 心筋線維芽細胞をフィーダーとして健康心筋細胞を培養した direct co-culture による解析。モーションアナライザー解析では健康心筋細胞の収縮能および拡張能は、RCM 心筋線維芽細胞と共培養すると有意に低下した。* P<0.05. ** P<0.01



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuru Hirofumi, Ishida Hidekazu, Narita Jun, Ishii Ryo, Suginohe Hidehiro, Ishii Yoichiro, Wang Renjie, Kogaki Shigetoyo, Taira Masaki, Ueno Takayoshi, Miyashita Yohei, Kioka Hidetaka, Asano Yoshihiro, Sawa Yoshiki, Ozono Keiichi	4. 巻 85
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 677 ~ 686
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Hidekazu	4. 巻 37
2. 論文標題 Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy in Children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery	6. 最初と最後の頁 184 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.9794/jspccs.37.184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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, 石田秀和, 杉辺英世, 桂木慎一, 石井 良, 成田 淳, 上野高義, 小垣滋豊, 澤 芳樹, 大園恵一
2. 発表標題 小児心筋症における心筋線維芽細胞の生理機能ならびに病態関与の解析
3. 学会等名 第56回 日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------