

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32203

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893049

研究課題名(和文) 伸展刺激が心臓線維芽細胞の分化に及ぼす効果に関する研究

研究課題名(英文) The study about the effect of stretch on the differentiation of cardiac fibroblast

研究代表者

小尾 正太郎(OBI, SYOTARO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：10734452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト心臓線維芽細胞に伸展刺激を定量的に負荷した。伸展刺激群では、伸展の方向と垂直方向に細胞が伸展・配向し、平滑筋アクチンの蛋白および遺伝子の発現レベルはともに約2倍に増加した。一方、Ⅰ型コラーゲン、ファイブロネクチン、BNP、NEPの蛋白発現レベルは、伸展刺激によって減少した。ヒト心臓線維芽細胞においてTRPVチャンネルの発現を確認した。ヒト心臓線維芽細胞にTRPV2とTRPV4の作動薬を加えると、いずれも細胞内へのカルシウム流入量が増大した。一方、TRPV1の作動薬を加えても細胞内へのカルシウム流入量は変化しなかった。

研究成果の概要(英文)：Human cardiac fibroblast cells were exposed to cyclic stretch. Cyclic stretch induced the morphological change. Cyclic stretch increased the protein and mRNA expression level of  $\alpha$ SMA. On the other hand, it decreased the protein expression level of collagen type1, fibronectin, BNP, and NEP. Human cardiac fibroblast expresses TRPV1, 2, 3, and 4. TRPV2 agonist and TRPV4 agonist increased the intracellular calcium flow, while TRPV1 agonist did no change it.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：機械的刺激

## 1. 研究開始当初の背景

心臓における線維化は、心筋梗塞、不整脈、心筋症、心不全などの様々な心臓病に共通した病理的特徴である。線維化は心臓繊維芽細胞とその分化形態である筋繊維芽細胞が産生する細胞外基質の過剰な蓄積による。繊維芽細胞は正常な状態ではあまり活動していないが、低酸素や酸化ストレス、炎症性刺激、機械的刺激などの病的な刺激に応答すると、様々なシグナル伝達や生体活動分子が協調して繊維芽細胞が活性化される。その結果、繊維芽細胞の増殖、遊走、筋繊維芽細胞への分化、サイトカインや成長因子の合成や分泌、マトリックスメタロプロテアーゼの産生、細胞外基質の蓄積が生じ、線維化となる。一方、筋繊維芽細胞は健康な心臓にはほとんど存在しないが、心臓が障害を受けると、筋繊維芽細胞は傷害部位に多量に出現する。筋繊維芽細胞は繊維芽細胞よりずっと活動的であり、炎症性サイトカインや血管活性ペプチド、ホルモンに応答して、コラーゲンを多量に産生する。それ故、静的な繊維芽細胞から活動的な筋繊維芽細胞への形態変化は心臓の線維化カスケードの重要なステップである。今まで化学的刺激が心臓繊維芽細胞の分化に及ぼす効果に関しては多くの報告があるが、機械的刺激が心臓繊維芽細胞の分化に及ぼす効果に関しては十分にはわかっていない。

## 2. 研究の目的

私は今まで、機械的刺激である血圧に基づく伸展張力や血流に起因する流れずり応力が様々な細胞に対して影響を及ぼすことを報告してきた。また、TRP チャンネルによるカルシウム伝達機構が線維芽細胞から筋繊維芽細胞への分化と線維化カスケードに重要な役割を果たしていることが近年報告されている。そこで今回、伸展張力が心臓繊維芽細胞の分化に及ぼす効果に関して TRP チャンネルによるカルシウム伝達機構を中心に

検討した。

## 3. 研究の方法

伸展張力負荷装置を用いて、ヒト心臓繊維芽細胞に 0-15%の伸展率、0.5Hz の伸展回数 of 伸展刺激を 0-48 時間負荷した。その後、形態学的変化を顕微鏡下で観察し、SMA の発現変化をウェスタンブロッティングとリアルタイム PCR で、型コラーゲン、ファイブロネクチン、BNP、NEP の発現変化をウェスタンブロッティングで検討した。また、TRPV1-4 チャンネルの mRNA の発現レベルを PCR で検討した。さらには、TRPV チャンネルの作動薬( TRPV1 作動薬;カプサイシン、TRPV2 作動薬;プロベネシド、TRPV4 ; GSK1016790A ) を加えて細胞内カルシウム量を Fura2 を用いた 2 波長励起法で計測した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト心臓繊維芽細胞に 5%の伸展率、0.5Hz の伸展回数の伸展刺激を 24 時間負荷すると、伸展の方向と垂直方向に細胞が伸展・配向した。また、伸展刺激負荷群では細胞の厚みが増して大きくなっていた。この反応は、刺激が強いほど、時間が長いほど著明であった。

このことは、ヒト心臓繊維芽細胞が伸展張力を感知して細胞応答していることを示している。

(2) ヒト心臓繊維芽細胞に 10%あるいは 15%の伸展率、0.5Hz の伸展回数の伸展刺激を 48 時間負荷すると、SMA の蛋白および遺伝子の発現レベルはともに約 2 倍に増加した。一方、型コラーゲン、ファイブロネクチン、BNP、NEP の蛋白発現レベルは、伸展刺激によって有意に減少した。

このことは、伸展刺激は心臓繊維芽細胞による心臓の線維化を抑制していることを示唆する。

(3) ヒト心臓繊維芽細胞において TRPV1-4 の mRNA の発現を確認した。

TRP チャンネルの発現は神経細胞や心筋細胞において発現していることが報告されているが、ヒト心臓繊維芽細胞においても発現していることを確認した。

(4) ヒト心臓繊維芽細胞に TRPV2 の作動薬であるプロベネシドと TRPV4 の作動薬である GSK1016790A を加えると、いずれも細胞外から細胞内へのカルシウム流入量が増大した。一方、TRPV1 の作動薬であるカプサイシンを加えても細胞内へのカルシウム流入量は変化しなかった。

ヒト心臓繊維芽細胞に発現している TRP チャンネルのうち TRPV2 と TRPV4 が機能を持つチャンネルであることが分かった。

(5) 以上まとめると、ヒト心臓繊維芽細胞に伸展張力を負荷すると、病的な筋繊維芽細胞に分化するのではなく、心臓の線維化を抑制する健康な状態になった。ヒト心臓繊維芽細胞が伸展張力を感知する機構として TRPV2 あるいは TRPV4 による細胞外から細胞内へのカルシウムの流入が関与していると示唆された。今後、ヒト心臓繊維芽細胞が伸展張力を感知する分子を同定し、細胞応答するシグナルを解明していくことは、機械的刺激による細胞応答の機序に関してより深い理解を得られるだけでなく、心筋梗塞や心筋症などによる心臓の線維化を予防したり治療するのに応用できると期待される。

#### 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. Kikuchi H, Oguri G, Yamamoto K, Takano N, Tanaka T, Takahashi M, Nakamura F, Yamasoba T, Komuro I, Obi

S, Nakajima T. Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels regulates IL-6 expression in mouse adipocytes. Cardiovascular Pharmacology 4: 156, 2015.

2. Nakajima T, Yasuda T, Koide S, Yamasoba T, Obi S, Toyoda S, Sato Y, Inoue T, Kano Y. Repetitive restriction of muscle blood flow enhances mTOR signaling pathways in a rat model. Heart Vessels. 2016 Feb 1.

〔学会発表〕(計3件)

小尾正太郎、井上晃男、中島敏明 「TRPV1 senses hyperthermia following IL6 production in myoblast cells」 日本循環器学会 2016.3.20 仙台

小尾正太郎、井上晃男、中島敏明 「温熱刺激によって骨格筋細胞からインターロイキン6が産生される機序を探る」 日本臨床生理学学会 2015.10.30 埼玉

小尾正太郎、井上晃男、中島敏明 「温熱刺激は骨格筋細胞でのインターロイキン6と熱ショック蛋白90αの産生を増大する」 第21回日本心臓リハビリテーション学会 博多 2015.7.19

〔図書〕(計0件)

〔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  
[http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/1nai/laboratory/01-07\\_01.html](http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/1nai/laboratory/01-07_01.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小尾 正太郎 (OBI, SYOTARO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：10734452

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 研究協力者

長谷川 貴亮 (HASEGAWA, TAKAAKI)

獨協医科大学・心臓血管内科・研究員

研究者番号：