

博士論文

心臓線維芽細胞活性化における分子機構の解明

小山雄広

目次

略語一覧	2
要旨	4
序文	5
材料と方法	13
結果	27
考察	58
引用文献	64
謝辞	79

略語一覽

α SMA : alpha smooth muscle actin

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

Col1a1 : collagen 1a1

Col3a1 : collagen 3a1

CMV : cytomegalovirus

DAVID : database for annotation, visualization and integrated discovery

DDR2 : discoidin domain receptor 2

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

DNA : deoxyribonucleic acid

FACS : fluorescence - activated cell sorting

FAP-1 : fibroblast activation protein-1

FBS : fetal bovine serum

FSP-1 : fibroblast specific protein-1

GFP : green fluorescent protein

HSP-47 : heat shock protein-47

KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes

LOX : lysyl oxidase

mRNA : messenger ribonucleic acid

PBS : phosphate buffer saline

PCR : polymerase chain reaction

PDGF : platelet derived growth factor

RFP : red fluorescent protein

RNA : ribonucleic acid

RT-PCR : real time polymerase chain reaction

rRNA : ribosomal ribonucleic acid

shRNA : short hairpin ribonucleic acid

SV40 : simian virus 40

TGF- β : transforming growth factor

PDGFR : platelet derived growth factor receptor

Thy1.2 : thymus cell antigen 1.2

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

要旨

心臓における線維化は心負荷に対する代償反応として生じるが、過剰な線維化が生じると拡張能低下の原因となる。心臓線維芽細胞の過剰な活性化機構は未だ明らかではないが、特にその原因として *in vitro* における心臓線維芽細胞活性化モデルの欠如が指摘されてきた。本研究では不死化心臓線維芽細胞を樹立し、活性化を検出する解析系を構築した。この解析系を用いて shRNA ライブラリーによる活性化因子の網羅的探索を試みた。その結果、Wnt シグナルの他に、カテコラミンシグナルを含む新たな活性化シグナルを同定した。心室拡張能低下の背景として、カテコラミンシグナルを介する心臓線維芽細胞の過剰な活性化が関与している可能性が示された。

序文

心臓における線維化は心負荷に対する代償反応や、心筋傷害時の組織修復の過程として生じる。心筋梗塞後、心筋壊死部では置換型の線維化が生じるが、非梗塞部、または圧負荷を受けた心筋組織においても過剰型の線維化が生じる[1], [2]。このような過剰な線維化は、心室拡張能の低下を惹起し心不全の原因となることが知られている[3], [4]。また心不全の病態において、心筋組織における線維化領域の増大が突然死を含めた予後不良因子となることが示唆されている[5]-[8]。

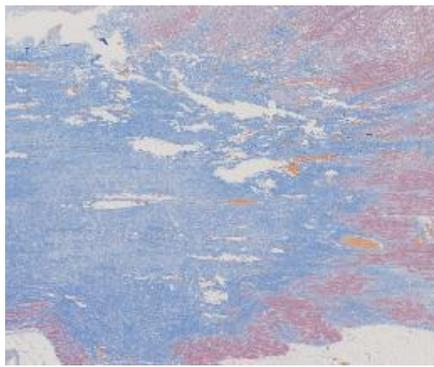
拡張障害を原因として発症する心不全は、心不全全体の約 40-50%程度を占めると言われている[9]。拡張障害による心不全は増加傾向にあり、その生命予後は一般人口と比較して不良である[10]。このような左室拡張障害は、加齢および虚血性心疾患を背景として生じるが、拡張障害に対する一定の診断方法や治療方針はなく治療に難渋することが多い[11], [12]。本邦においても、拡張障害による心不全は心不全入院患者全体の約 40%を占め、その生命予後は収縮能が低下した心不全患者と同等に不良であることが知られている[13]。

剖検例の報告では、拡張障害による心不全患者は、非心不全患者よりも心重量、及び左室線維化領域が有意に増大し、血管密度の低下と相関していた[14]。また MRI による遅延造影を用いて心筋組織における線維化を評価した報告では、左

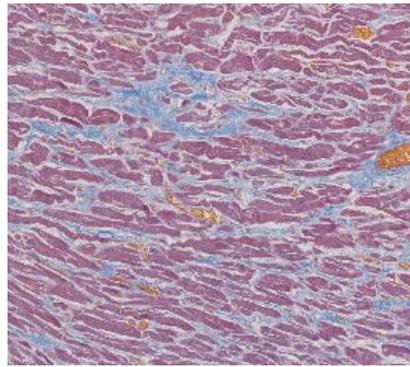
室収縮能に差を認めなかったが、心臓死を含めた重篤な心合併症が心筋組織の線維化を有した群において有意に多かった[15]。

近年、収縮能低下による心不全症例の予後は、内科的治療の充実により改善を認めている。その一方で、拡張障害による心不全患者の予後は改善していないことが問題とされている[16]。拡張障害による心不全を対象とした複数の無作為試験が行われたが、効果的な治療法は未だに存在しないのが現状である[17]–[20]。

このように現在の循環器臨床において、心室拡張障害の病態は大きな課題である。その病態機構を明らかにするために、心筋組織における過剰な線維化の発症機序を解明することが強く求められている（図 1）。しかしながら、心室拡張障害の原因となる心臓線維化の分子機構は未だ明らかになっていない。



置換型線維化



過剰型線維化



善玉



悪玉

心筋梗塞後の修復

心室拡張障害

心臓線維芽細胞が
活性化する機構は？

図 1. 心臓における過剰な線維化

心筋梗塞の病態では、心筋壊死部を置換するための線維化が生じる。その一方で、非梗塞部または圧負荷を受けた心筋組織においても、過剰な線維化が生じることが知られている。過剰な線維化が生じると、拡張能の低下を惹起し心不全の原因となるものの、心臓線維芽細胞の過剰な活性化機構は未だ明らかになっていない。

細胞外マトリックスの産生、及びその分解のバランスの破綻は組織線維化の原因となる。[1][21][22]。細胞外マトリックスの主体である I 型コラーゲンは、2 分子の COL1A1 と 1 分子の COL1A2 の三量体であるプロコラーゲンとして形成される[23]。その後、プロコラーゲンは lysyl oxidase による翻訳後修飾を経たのちに、成熟したコラーゲンとなり細胞外に分泌される[24]–[26]。心筋負荷時や心臓傷害時における I 型コラーゲンは、主に線維芽細胞が活性化した筋線維芽細胞(myofibroblast)により産生されることが知られている[27]–[29]。

組織が傷害を受けると、線維芽細胞が活性化することで細胞外基質の産生が亢進する。線維芽細胞を活性化する因子として、サイトカイン、増殖因子、機械的なストレスなどが知られている。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などが、線維芽細胞の活性化と増殖に関与していることが報告されている[30]–[34]。

組織傷害時や創傷治癒において、TGF- β シグナルを主体として活性化した線維芽細胞が中心的な役割を果たしている。TGF- β は炎症細胞から分泌され、線維芽細胞の活性化を促すことで細胞外基質の産生を亢進する。線維芽細胞において TGF- β が、セリンスレオニンキナーゼ型受容体である TGF- β 受容体 II 型に結合することで、II 型受容体が I 型 TGF- β 受容体をリン酸化する。I 型受容体により下流の SMAD2/3 がリン酸化され、SMAD4 との SMAD 複合体を形成する。

この SMAD 複合体が核内へ移行し α SMA などの標的遺伝子の発現を促すことが知られている[35]。

心臓における線維化の研究において、これまでいくつかの線維芽細胞に特異的なマーカーが用いられてきた(表 1)。それらのマーカーとして Thy1.2、Vimentin、DDR2 などが用いられていたが、いずれも骨髄由来細胞やペリサイトなど他の細胞種でも発現するため、線維芽細胞に特異的ではないことが問題とされてきた[36], [37]。

表 1 線維芽細胞マーカー

遺伝子	機能	他の細胞種
<i>Acta2</i>	細胞内骨格	平滑筋細胞、壁細胞
<i>Cdh9</i>	Ca依存性接着因子	神経細胞
<i>Cd40</i>	TNFα受容体ファミリー	抗原提示細胞
<i>Cd248</i>	コラーゲン受容体	血管周囲細胞、血管内皮細胞
<i>Col1a1</i>	I型コラーゲン合成	骨芽細胞、軟骨芽細胞
<i>Ddr2</i>	受容体型チロシンキナーゼ	平滑筋細胞、肝星細胞、内皮細胞
<i>Pdgfra</i>	受容体型チロシンキナーゼ	骨芽細胞
<i>Pdgfrb</i>	受容体型チロシンキナーゼ	平滑筋細胞、壁細胞
<i>Postn</i>	細胞接着	骨芽細胞
<i>Ptpn13</i>	セリン/プロテアーゼ	メラノサイト
<i>P4ha2</i>	コラーゲン合成	内皮細胞、上皮細胞
<i>S100a4</i>	Ca結合蛋白	平滑筋細胞
<i>Serpinh1</i>	コラーゲン結合シヤペロン	単球/マクロファージ
<i>Thy1</i>	細胞接着因子	T細胞、血管内皮細胞
<i>Vim</i>	中間径フィラメント	内皮細胞、平滑筋細胞、血管周囲細胞、筋上皮細胞

Acta2 : aSMA, *Cdh9* : Cadherin-9, *Cd40* : CD40, *Cd248* : CD248, *Col1a1* : Col1a1, *Ddr2* : DDR2, *Pdgfra* : PDGFR-A, *Pdgfrb* : PDGFR-B, *Postn* : Periostin, *Ptpn13* : FAP-1, *P4ha2* : Proline 4-hydroxylase alpha II, *S100a4* : FSP-1, *Serpinh1* : HSP-47, *Thy1* : Thymus cell antigen, *Vim* : Vimentin

近年、Collagen1a1 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 (Coll1a1-GFP マウス) が樹立された[38]。このマウスを用いて各臓器における線維化の研究が進められている。[39]–[41]。それらの研究においては Coll1a1-GFP マウスの間質に存在する GFP 陽性細胞は線維芽細胞であるとされている。また PDGFR- α も心臓線維芽細胞に特異的なマーカーとされ、心臓線維化の研究に用いられている[42]。

しかしながら、Coll1a1 および PDGFR- α はともに心臓線維芽細胞以外の細胞種においても非特異的に発現している。具体的には、Coll1a1 は血管内皮細胞及びペリサイトにおいても発現している[43]–[45]。PDGFR- α に関しても、心臓線維芽細胞以外に心外膜細胞などでも発現することが知られている[46]。本研究では心臓線維芽細胞をより特異的に同定するために、Coll1a1-GFP 陽性かつ PDGFR- α 陽性である細胞 (GFP⁺/R α ⁺細胞) を心臓線維芽細胞と定義し解析を行った。

心臓線維化の研究において、*in vitro* における有効な心臓線維芽細胞活性化モデルが存在しないことが、これまで問題とされてきた。従来、心臓線維化を解析する *in vitro* の系として、心筋組織より採取した初代培養細胞が用いられてきた。しかしながら、初代培養細胞を用いた解析系では、TGF- β を含む線維芽細胞活性化刺激による作用が軽微であることと、血管内皮細胞や血球系細胞などの異なる細胞腫が混入することなどの問題点が指摘されてきた。

そこで本研究において、心臓線維芽細胞由来の培養細胞株を新たに樹立し、心臓線維芽細胞活性化における分子機構の解明を試みた。

材料と方法

● 動物

C57BL/6J は日本クレア社から購入し、Colla1-GFP マウスは David Brenner 教授 (カリフォルニア州立大学サンディエゴ校) より譲与された。本実験で用いたすべての動物は、午前 8 時点灯、午後 8 時消灯、室温 23–25°C、湿度 40-60% に維持された動物飼育室で、自由飲水、自由摂取下で飼育した。

実験には 8-12 週令の雄マウス 30 匹を使用した。実験終了後には全身麻酔後に胸骨を正中で切開し、左心室より PBS 5 ml を灌流後に上行大動脈起始部を離断し心臓組織を採取した。

なお、すべての動物実験は東京大学医学部の動物実験に関する倫理委員会の規定と許可に基づいて行った。

● 増殖因子、カテコラミン

TGF- β (240-B-010)、は、R&D Systems 社 (Minneapolis, MN) より購入した。ノルエピネフリンは Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MI) より購入した。TGF- β は 5 ng/ml の濃度で使用し、ノルエピネフリンは 1 μ M の濃度で用いた。

● マウス心筋梗塞モデル

8-12 週令の雄マウスに対し、腹腔内にペントバルビタール投与 (60 $\mu\text{g}/\text{gBW}$) による全身麻酔を行った。十分な鎮痛を確認したのちに、22G サーフローの外筒を気管内挿管し陽圧換気を毎分 110 回行った。マウスを右側臥位とし、左第 4 肋間開胸を行った。左肺を愛護的に視野から避けたのちに、心膜を開放した。左前下行枝を同定し、左房下縁から 3 mm 心尖部側の位置で、8-0 プロリン糸で結紮した。心電図での ST 変化と、前壁中部から心尖部領域の蒼白化および壁運動の低下により、左前下行枝の結紮による貫壁性梗塞を確認した。十分な止血が得られ、気胸がないことを確認し、4-0 絹糸で大胸筋および表皮を縫合した。自発呼吸を確認したのちに抜管した。

● マウスからの心筋細胞の単離

8-12 週令の雄マウスにヘパリンナトリウム 100 単位を皮下注射し、頸椎脱臼させた後に開胸した。ペトリディッシュ上に心臓を採取し、氷上で cell isolation buffer I (NaCl 130 mM, 5.4 mM, MgCl_2 0.5 mM, NaH_2PO_4 0.33 mM, , NaOH, D-Glucose 22 mM, HEPES 25 mM) 50 ml を加えた。Langendorff 灌流装置に上行大動脈を接続し、2 分間かけて cell isolation buffer II (NaCl 130 mM, 5.4 mM, MgCl_2 0.5 mM, NaH_2PO_4 0.33 mM, D-Glucose 22 mM, HEPES 25 mM, NaOH, 400 mM EGTA/NaOH

10 μ l) 10ml を大動脈より逆行性に灌流した。その後、cell isolation buffer III (NaCl 130 mM, 5.4 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaH₂PO₄ 0.33 mM, D-Glucose 22 mM, HEPES 25 mM, NaOH, collagenase II 40 mg (Worthington biochemical, Lakewood, NJ), protease 2 mg (Sigma-Aldrich)、100 mM CaCl₂ 40 μ l) 27 ml を 9 分かけて灌流した。その後、右室、弁、弁下組織を取り除き左室心筋のみを、cell isolation buffer IV (NaCl 130 mM, 5.4 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaH₂PO₄ 0.33 mM, D-Glucose 22 mM, HEPES 25 mM, NaOH, collagenase II 10mg, protease (Sigma-Aldrich) 0.5 mg, 100 mM, CaCl₂ 30 μ l, bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) 20 mg) 10 ml 投与し、その中で鑷子を用いて左室心筋を震盪することで心筋細胞を単離した。心筋細胞を含む上清を 50 ml フアルコンチューブへ回収し、20G で 3 分間遠心したのちに、上清を除きペレットとして心筋細胞を回収した。

● フローサイトメトリー

マウスを全身麻酔により十分鎮痛したうえで、心臓を採取した。採取した心臓を 1.5 ml エッペンドルフチューブ内の血清を含む DMEM に移し、2 分間鉗による切断を行った。十分な細小化が得られたのちに、血清を含まない DMEM 6 ml にリベラーゼ TH (Roche, Basel, Switzerland) 300 μ g、エラスターゼ (Worthington biochemical) 60 μ l を加えた溶液中で 45 分間 37°C でインキュベートした。その後

に、細孔径 100 μ m のセルストレーナーを通し、ソーティング用、コントロール（非染色）用、単染色用としてそれぞれ 100 μ l の FACS (fluorescence activated cell sorting) バッファーで希釈した。それぞれに Anti-mouse 16/32 blocks (BioLegend, London, UK)を 100 μ l の細胞懸濁液あたり 1 μ l ずつ加えて氷上で 15 分間インキュベートし、Fc レセプターのブロッキングをおこなった。ここに各蛍光標識抗体を適切な濃度で加え、遮光された状態で 30 分間氷上にてインキュベートした。染色終了後、フローサイトメトリーバッファーで 3 回細胞を洗浄し、遠心後のペレットを 500 μ l のフローサイトメトリーバッファーで再懸濁した。懸濁液は細孔径 35 μ l のセルストレーナー付きポリエチレンチューブへ移した。調整したサンプルは BD フローサイトメトリーAria™ で解析した。目的とする細胞の分離は 85 μ l のノズルで行いフローサイトメトリーバッファーに回収した。フローサイトメトリーに使用した各蛍光標識抗体を表 2 に示す。

● 蛍光免疫染色

ペントバルビタールの腹腔内投与 (60 μ g/ gBW)による全身麻酔によりマウスの十分な鎮痛を確認したのちに、胸部正中切開により心臓を露出した。心尖部より 5 ml の PBS で全身を灌流したのちに、4%パラホルムアルデヒド 1 ml を灌流し組織を固定した。固定後に、大動脈基部を切断し心臓を採取した。その後、心

臓を 4%パラホルムアルデヒドに常温で 3 時間浸したのちに、30%スクロース置換を一晩行った。組織を Tissue-Tek® O.C.T. Compound (サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) に入れ、液体窒素中で十分に冷却した 2-メチルブタン内に OCT ごと浸し組織を包埋した。-20 °C 下にクライオスタット (Leica CM 1860, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて 5-10 µm 厚の凍結切片を薄切した。薄切した切片は 45 分間の風乾を行ったのち、Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 0.1%に 10 分間浸し固定膜透過を行った。PBS で 5 分間洗浄を 2 回行ったのちに、非特異反応を抑えるためのブロッキングを、4%スキムミルクにより常温で 30 分から 1 時間インキュベートすることで行った。ブロッキング後に、一次抗体をそれぞれ適正な濃度で使用し 4°Cで一晩インキュベートを行った。一次抗体とのインキュベート後に、PBS で 5 分間の洗浄を行ったのちに、二次抗体を適正な濃度で使用し常温で 1 時間インキュベートした。PBS により 4 回洗浄したのちに、ProLong (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により封入し、レーザー走査型共焦点顕微鏡 LSM510 (Zeiss, Oberkochen, Germany) により観察した。使用した一次抗体を表 2 に示す。

● 表2 フローサイトメトリーおよび免疫染色に使用した抗体

フローサイトメトリー

抗原	製造会社	抗体名
CD31	Biolegend	APC antimouse CD31 antibody
CD45	Biolegend	APC/Cy7 anti-mouse CD45 Antibody
PDGFR- α	Biolegend	APC antimouse CD140a antibody
PDGFR- β	Biolegend	APC anti-mouse CD140b Antibody
Thy1.2	Biolegend	APC anti-mouse CD90.2 Antibody

免疫染色

抗原	製造会社	抗体名
CD31	BD Biosciences	Rat anti-mouse CD31 antibody
PDGFR- α	R&D Systems	Goat anti-mouse PDGFR- α antibody
PDGFR- β	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit anti-mouse PDGFR- β antibody

● 心臓初代培養細胞

ペントバルビタールの腹腔内投与 (60 $\mu\text{g}/\text{gBW}$)による全身麻酔を行い、マウスの十分な鎮痛を確認したのちに、胸部正中切開により心臓を露出した。マウス心臓を PBS で灌流後に採取したのち、血清を含んだ DMEM 内で鉄により 2 分間細分化した。十分に細分化した組織塊をリベラーゼ TH (Roche) 、エラスターゼ (Worthington biochemical)を含んだ DMEM 培地で 60 mm ディッシュを用いて 37°Cの温度で 30 分間インキュベートした。インキュベート後に 21 ゲージ針を 3 回通過させ、100 μm のセルストレイナーを通して 50 ml ファルコンチューブへ移した。4 °Cで 5 分間 300 \times g で遠心したのちに、上清を除き、血清を含有した DMEM 6 ml に攪拌した。細胞懸濁液を 60 mm ディッシュへ移し 37 °C、二酸化炭素 5%でインキュベートした。培地交換により非接着細胞を除いたあと、80% 以下の confluency の状態で培養しトリプシンにより継代した。継代回数が 2-5 回の細胞を用いて実験を行った。

● 心臓線維芽細胞培養株の樹立

Coll1a1-GFP マウスの心臓組織から初代培養を採取し、血清を含む DMEM 下に培養した。Large T 抗原を発現するレトロウイルスを作成するために、pBabe-puro プラスミド (AddGene, Cambridge, MA) と Platinum-E packaging cell line (Cell

Biolabs, San Diego, CA) を用いてリコンビナントレトロウイルスを作成した。このレトロウイルスを用いて、Col1a1-GFP マウスより単離した初代培養細胞に、large T 抗原を導入することで不死化した。培養細胞のうち、GFP シグナルを有する細胞を FACS により細胞ごとに 96 well plate へ播種することでクローン化した。細胞株は維持用の血清を含む DMEM 下で 37°C、二酸化炭素濃度 5% 下で培養した。80% 以下の confluency の状態で培養しトリプシンにより継代した。

● プール型レンチウイルス shRNA ライブラリー

DECIPHER (Cellecta, Mountain View, CA) のプール型レンチウイルス shRNA ライブラリー(Mouse Module1)を含むレンチウイルスを作成した。15 cm ディッシュ 10 枚に血清を含む DMEM 30 ml 内に 293T 細胞を播種し 24 時間インキュベートした。600 μ l の Ready-to-use Packaging plasmid mix (0.5 μ g/ μ l)、および 60 μ g のプラスミドライブラリーを 12 ml の抗生剤および血清を含まない DMEM と 50 ml のポリプロピレンチューブ内で混合した。さらに 600 μ l の Plus Reagent を加え室温で 15 分静置した。それと同時に 12 ml の血清および抗生剤を含まない DMEM に、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) を 900 μ l を加えた。この lipofectamine 2000 を含んだ DMEM を Ready-to-use Packaging plasmid, Plasmid shRNA library, Plus Reagent を含んだ DMEM に加えた。転倒混和を十分に行い、

室温で 15 分間静置した。各 15 cm ディッシュに Plasmid mix/ Plus Reagent/ lipofectamine 2000 を含んだ DMEM 2.5 ml ずつを加えトランスフェクションし、ディッシュ全体に均一に混和するよう十分に揺らしインキュベートした。トランスフェクションの 24 時間後に、DNase I (1 U/ml) (Epicentre, Madison, WN)、MgCl₂ (5 mM)、HEPES pH 7.4 (Sigma-Aldrich) 及び血清をふくむ 30 ml DMEM へ培地を交換した。トランスフェクションの 48 時間後に各ディッシュから 30 ml の上清を回収した。上清を、Nalgene 0.2 µm PES フィルター (Thermo Scientific) を通し shRNA ライブラリーを含むレンチウイルスを作成した。

● レンチウイルス shRNA スクリーニング

樹立した心臓線維芽細胞株を 15 cm ディッシュに 1.5×10^6 個播種し MOI 0.5 となるようにレンチウイルス shRNA ライブラリー 800 µl をポリブレン 5 µg/ml 投与下に感染させた。翌日培地交換を行い、感染 4 日後の細胞を回収した。Propidium iodide (Thermo Fisher Scientific) による死細胞除去を行ったのちに、フローサイトメトリーAriaIII で、細胞集団を回収した。すべてバイオセーフティーレベル P2 の安全キャビネット内で実験操作を行った。スクリーニングは独立した実験を 2 回行った。

- シーケンス

フローサイトメトリーソーティングによって選別された各細胞群から QIA Amp DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出されたゲノム DNA を Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)によって定量した後、以下のプライマー・ペアを用いた二段階の PCR 反応によって、レンチウイルス配列に付随する核酸バーコード部位を包括的に増幅すると同時に、次世代シーケンサー Ion Torrent PGM system (Thermo Fisher Scientific)に適合した末端塩基配列の付加を行った。

1st PCR Forward: TTCTCTGGCAAGCAAAAGACGGCATA

1st PCR Reverse: TAGCCAACGCATCGCACAAAGCCA

2nd Forward:

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAAGCAGAAGACGGCATAACGAGA

2nd Reverse:

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCC

GAA

増幅後の DNA 断片を E-gel system (Thermo Fisher Scientific)を用いた電気泳動を行いながら分離・切り出しを行い、FastGene PCR/Gel Extraction kit (日本ジェネティクス、東京、日本)を用いて精製した。精製後の DNA 断片に対しては Agilent

Bioanalyzer (Agilent Technology, Santa Clara, CA)を用いた品質チェックおよび定量が行われた。定性的・定量的に基準を満たしたサンプルに限り、Ion Torrent PGM system (Thermo Fisher Scientific)を用いたエマルジョン PCR を行い、増幅断片について Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific 社)による次世代シーケンス解析を行った。

得られた次世代シーケンス配列情報のうち、レンチウイルス配列に付随した核酸バーコード配列部位(19 塩基)のみを抽出してリスト化した後に、Collecta 社のデータベースを用いることで、核酸バーコード配列リストを標的遺伝子名リストへと変換した。

● パスウェイ解析

二回の独立したプール型レンチウイルス shRNA ライブラリーの感染を行った。シーケンスの結果、両試験でともに標的遺伝子に対して複数の shRNA がコントロールに比して 2 倍以上濃縮していた遺伝子群を抽出し DAVID v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/>) による解析を行った [47]。Functional annotational clustering により解析し、生物学的に類似した機能をもつ遺伝子群をクラスターとして抽出した。濃縮スコア (enrichment score) が 2 倍以上でターム数が 4 以上のクラスターを有意であるとして抽出した。

● 定量 PCR

組織および細胞からの RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてプロトコールに従い抽出した。cDNA は、抽出した RNA を鋳型にランダムプライマーを用いて Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) により作成した。発現量の定量は、DNA Green (Roche)を用いて Light Cycler 480 System II (Roche)によるリアルタイム PCR を行った。内在性コントロールとして *Rn18s* を用いた。*Adrb1* に対するリアルタイム PCR は、Thunderbird probe qPCR mix (TOYOBO、大阪、日本)を用いて行った。

フローサイトメトリーを用いて分離した細胞から RNA を抽出する際には、細胞懸濁液を 4°C、300×g で 10 分間遠心した。遠心後に 350 μl の RLT Plus Buffer (QIAGEN) を加えて細胞を溶解した。溶液を QIA shredder スピンカラム (QIAGEN) に通し、得られた溶液を RNA mini column (QIAGEN) を用いて抽出し、RNase free water 20 μl により抽出した。リアルタイム PCR に使用したプライマー配列は表 3 の通りである。

● 表 3 RT-PCR に使用したプライマー

	forward primer	reverse primer
<i>Rn18s</i>	cgaaagcatttgccaagaat	agtcggcatcgtttatggtc
<i>Acta2</i>	gcatccacgaaaccaccta	cacgagtaacaaatcaaagc
<i>Adra1a</i>	ccatctccctcggtgaaaa	ggtttcatggataaaaagcccta
<i>Adra1b</i>	ttcttcatcgctctcccact	gggttgaggcagctggtg
<i>Adra2b</i>	gcagaggctcggagctaa	gcctctccgacagaagata
<i>Adrb1</i>	catcatgggtgtgttcacg	ggaaagccttcaccacggt
<i>Adrb2</i>	gtaccgtgccaccacaaga	cccgggaatagacaagaccatc
<i>Adrb3</i>	cagccagccctgttgaag	ccttcatagccatcaaacctg
<i>Col1a1</i>	gccaagaagacatccctgaag	tcattgcattgcacgtcatc
<i>Col3a1</i>	ttgccctgagagtccaaga	acaagcgctgcaggatct
<i>Ddr2</i>	atccagactgatccgaaagc	gcttcacaacaccactgcac
<i>Lox</i>	cagagtgggagaggcaagac	cctaagcccttggtgtgt

- 統計解析

データは平均値±標準誤差で表記した。統計学的有意差は、2 群間では Student's t-test により評価し、3 群以上では ANOVA 解析を用いた。初代心臓培養細胞および不死化心臓線維芽細胞株を含む *in vitro* の実験では独立した実験をそれぞれ三回以上行った。p 値が 0.05 未満であることを統計学的な有意差を持つとした。

結果

● Coll1a1-GFP マウスの心臓における GFP 陽性細胞

心臓における線維芽細胞の挙動を解析するため、Coll1a1 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 (Coll1a1-GFP マウス) を用いた。

Coll1a1-GFP マウスにおいては、Coll1a1 プロモーター上流-3122 kb から下流 +111 kb の領域、及び 7 kb - 8 kb 上流の DNase I hypersensitivity lesion を含む領域の下流に GFP を発現するレポーター遺伝子が組み込まれている[38] (図 2A)。これまでこのマウスを用いて肝臓及び腎臓など他臓器における線維化の研究が進められてきた[48], [49]。

Coll1a1-GFP マウスより心臓を単離し凍結切片を作成したのちに、GFP 陽性細胞の局在を共焦点顕微鏡により解析した。心臓における GFP 陽性細胞の多くは心臓組織の間質に存在し、紡錘状の形態を呈していた (図 2B)。一方、GFP シグナルは一部の血管内皮細胞においても確認された

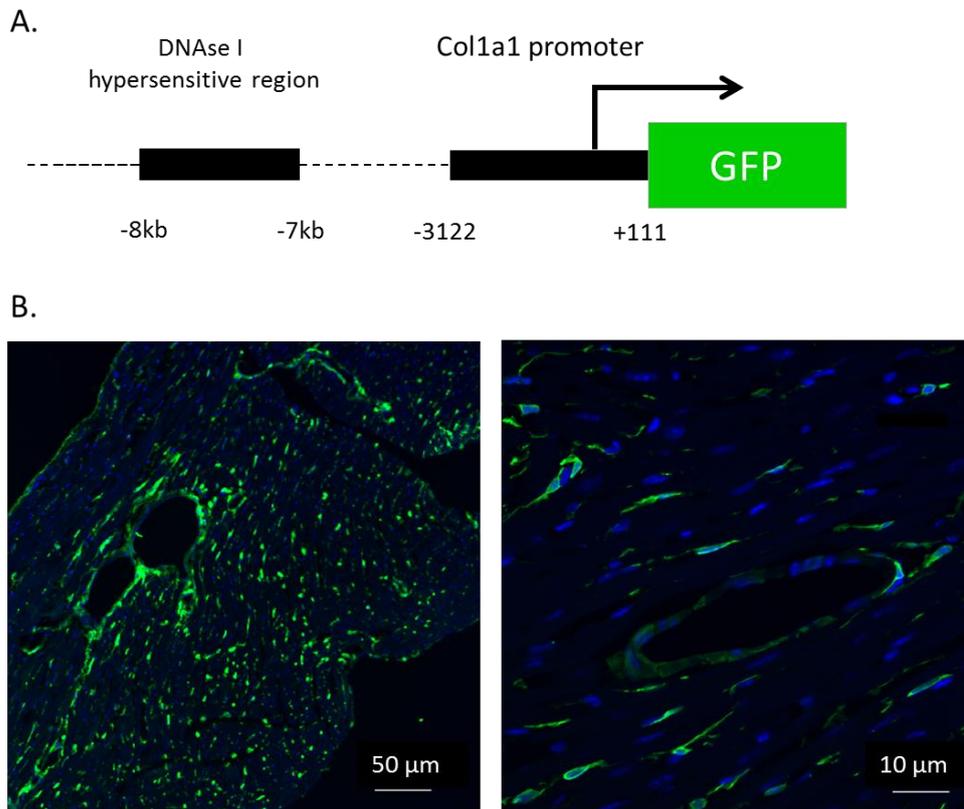


図 2. Col1a1-GFP マウスの心臓における GFP 陽性細胞

- A. Col1a1-GFP マウスにおいては、Col1a1 プロモーター上流-3122 kb から下流+111 kb の領域、及び 7 kb- 8 kb 上流の DNase I hypersensitive region を含む領域の下流に、GFP を発現するレポーター遺伝子が組み込まれている。
- B. Col1a1-GFP マウスを用いて作成した心臓凍結切片のレーザー走査型共焦点顕微鏡像。
(緑 : GFP, 青 : DAPI, 左図白線: 50 μm, 右図白線: 10 μm)

● 心臓 GFP 陽性細胞の表面マーカー発現

心筋組織における GFP 陽性細胞の種類を明らかにするために、GFP 陽性細胞の表面マーカー発現をフローサイトメトリーにより解析した (図 3)。

その結果、血管内皮細胞、血球系細胞、ペリサイトのマーカーである CD31、CD45、PDGFR- β の発現は、大部分の GFP 陽性細胞において陰性であった。その一方でこれまで心臓線維芽細胞のマーカーとして報告されている Thy1.2 及び PDGFR- α の発現は陽性であった。

これまで Col1a1 は線維芽細胞以外にも血管内皮細胞やペリサイトにおいても発現することが報告されている[43], [44], [50]。今回心筋組織における GFP 陽性細胞の表面マーカーを解析したところ、その約 1%が CD31 陽性であった。

PDGFR- α は心臓線維芽細胞の大部分において発現していると報告されている[42]。心臓 GFP 陽性細胞の表面マーカーを解析したところ、GFP 陽性細胞全体の約 80%は PDGFR- α 陽性である一方で、PDGFR- α 陽性細胞全体のなかで約 16%は GFP シグナルが陰性であった。

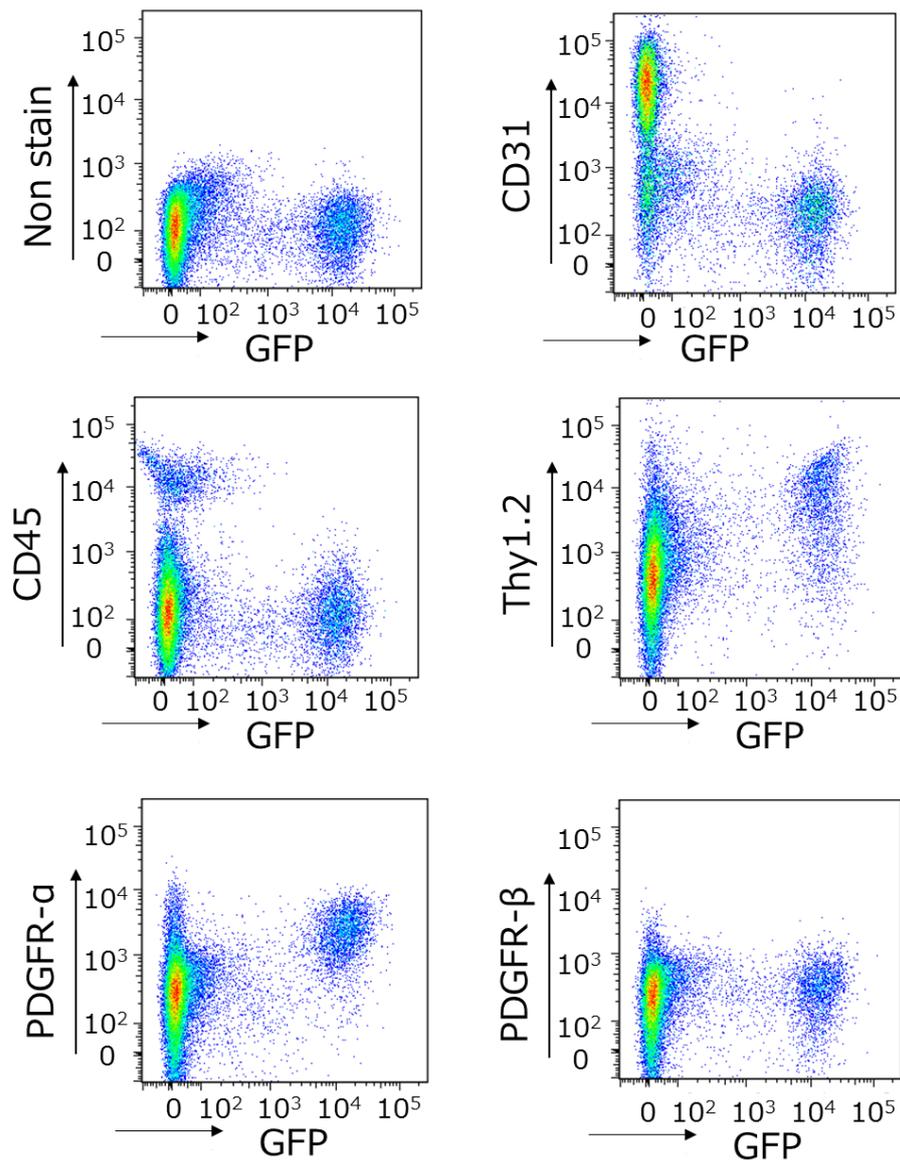


図 3. 心臓 GFP 陽性細胞の表面マーカー発現

Coll1a1-GFP マウスの心臓における GFP 陽性細胞の表面マーカー発現につき、抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Thy1.2 抗体、抗 PDGFR- α 抗体、抗 PDGFR- β 抗体を用いて FACS により解析を行った。

● 心筋組織における心臓 GFP 陽性細胞の表面マーカー発現

引き続き心筋組織における GFP 陽性細胞の表面マーカーを、蛍光免疫染色法を用いて解析した。Colla1-GFP マウスより、心筋組織を単離し、凍結切片を作成した後に、抗 CD31 抗体、抗 PDGFR- α 抗体、抗 PDGFR- β 抗体を用いて、共焦点顕微鏡にて観察した。

その結果、心筋組織における GFP 陽性細胞の一部において、血管内皮細胞のマーカーである CD31 が共発現していることを確認した (図 4 上段)。また、GFP 陽性細胞はペリサイトのマーカーである PDGFR- β を発現しないことを確認した (図 4 中段)。GFP 陽性細胞は、これまで心臓線維芽細胞のマーカーの一つとして知られている PDGFR- α を発現していた。一方で PDGFR- α 陽性細胞の一部は GFP 発現が陰性であった (図 4 下段)。

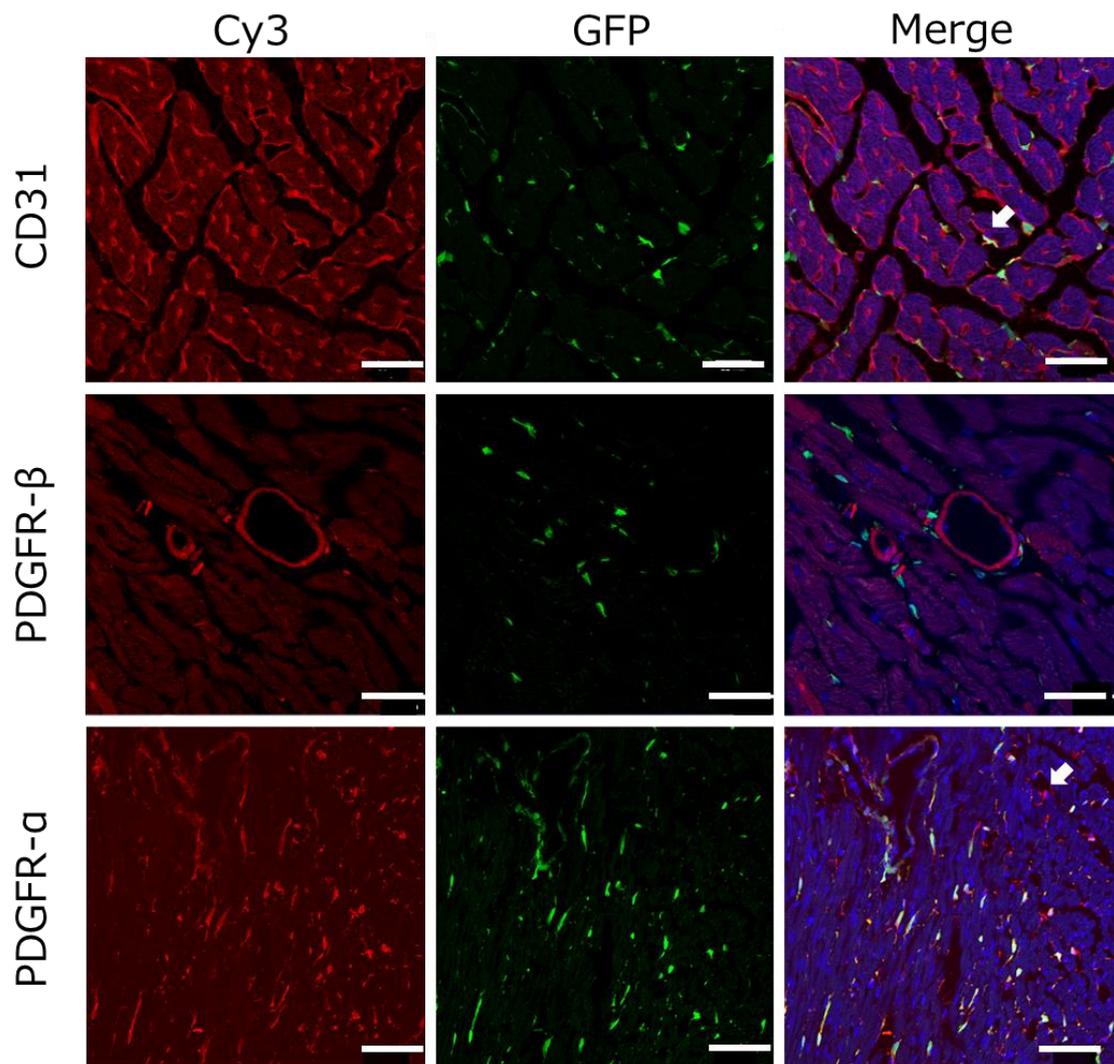


図 4. 心筋組織における心臓 GFP 陽性細胞の表面マーカー発現

Coll1a1-GFP マウスの心筋組織の共焦点顕微鏡像。抗 CD31 抗体、抗 PDGFR- β 抗体、抗 PDGFR- α 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。

右上段矢印；一部の GFP 陽性細胞において CD31 の発現を認める。

右下段矢印；一部の PDGFR- α 陽性細胞において GFP 発現を認めない。

(上段: 抗 CD31 抗体、中段: 抗 PDGFR- β 抗体、下段: 抗 PDGFR- α 抗体、赤: Cy3 標識二次抗体、緑: GFP、青: DAPI、白線: 20 μ m)

● 本研究で定義する心臓線維芽細胞

心臓線維芽細胞において、Thy1.2 や Fsp-1 などいくつかのマーカーが提唱されてきたが、いずれも特異的なマーカーではないことがこれまで問題とされてきた。

Coll1a1-GFP マウスは Coll1a1 プロモーター下に GFP を発現する。そのため、Coll1a1 を発現する細胞を GFP シグナルにより同定することが可能である。近年、このマウスの Coll1a1-GFP 陽性細胞を解析することにより、各臓器における線維化の研究が進められている[48], [51]。心臓においても Coll1a1-GFP 陽性細胞は線維芽細胞とよく一致することが報告されている[52]。

心臓線維芽細胞の多くは PDGFR- α を発現するとされ、PDGFR- α を心臓線維芽細胞の表面マーカーとした解析が進められている[42], [53]。

しかしながら、Coll1a1 および PDGFR- α は心臓線維芽細胞以外の細胞種においても発現している。具体的に、血管内皮細胞及びペリサイトは Coll1a1 を発現することが知られている[43], [44], [50]。また、PDGFR- α についても、心外膜で発現することが知られている[42], [53], [54]。

Thy1.2 も心臓線維芽細胞に対するマーカーとして、これまでのいくつかの心臓線維化の研究において用いられている。しかしながら、Thy1.2 は血球系細胞においても発現が認められることが知られている[55]。その一方で、PDGFR- α は

線維芽細胞において恒常的に発現しており、心筋組織の傷害時に活性化した線維芽細胞のマーカーとしても有効であることが報告されている[52]。また、本研究と同系統の *Col1a1-GFP* マウスを用いた心臓線維芽細胞の解析において、*PDGFR- α* は *Thy1.2* と比較してより特異的なマーカーであった[52]。

これらのことから本研究において、心臓線維芽細胞を *Col1a1-GFP* 陽性かつ *PDGFR- α* 陽性細胞 (*GFP⁺/R α ⁺*細胞) と定義することで、より特異的に心臓線維芽細胞を解析できると考えた (図 5)。

Col1a1-GFP陽性 PDGFR- α 陽性

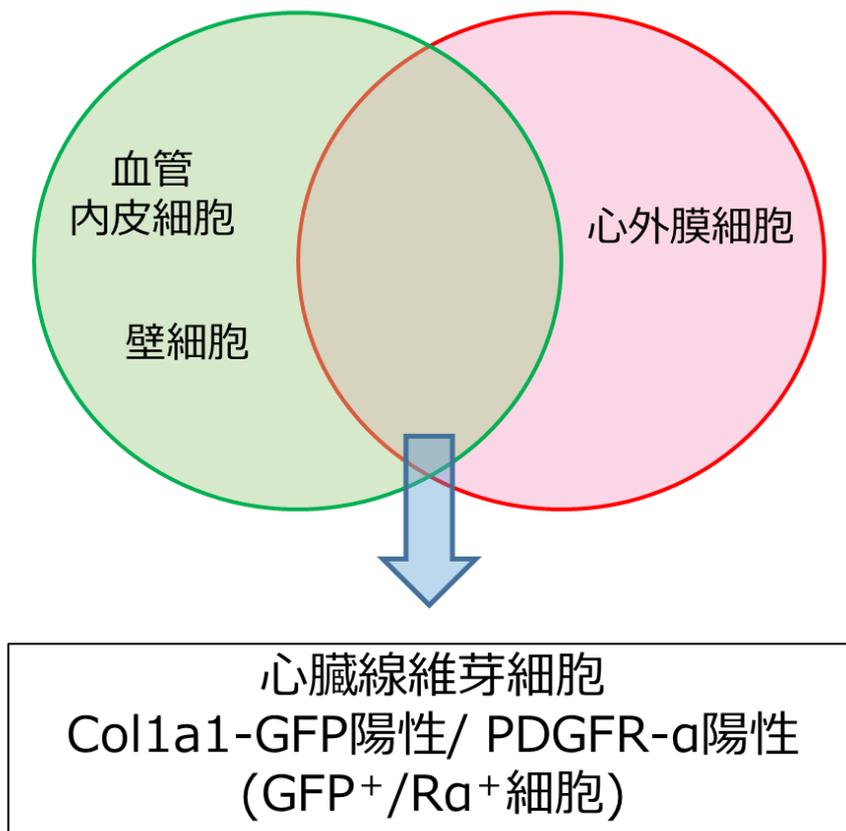


図 5. 本研究で定義する心臓線維芽細胞

本研究では心臓線維芽細胞を Col1a1-GFP 陽性かつ PDGFR- α 陽性である細胞 (GFP⁺/R α ⁺細胞) と定義し解析を行った。

- 心臓 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞と CD31 陽性細胞における線維芽細胞マーカー発現の解析

Colla1 は心臓線維芽細胞のみならず血管内皮細胞においても発現する。そこで、今回心臓線維芽細胞と定義した $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞の遺伝子発現を血管内皮細胞と比較した。 Colla1-GFP マウスの心筋組織からフローサイトメトリーを用いて心臓 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞を単離した。同様に、フローサイトメトリーを用いて CD31 陽性細胞である血管内皮細胞を単離した。非心筋細胞の約半数が CD31 陽性細胞であった (図 6A)。

血管内皮細胞マーカー *Pecam1* の発現は、 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞において血管内皮細胞と比べ著しく低下していた。その一方で、*Colla1*、*Pdgfra*、*Vim*、*Ddr2* は心臓線維芽細胞のマーカーとして用いられているが、 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞におけるそれらの発現量は、血管内皮細胞と比較すると有意に増加していた (図 6B)。上記所見により、 Colla1-GFP 陽性かつ $\text{PDGFR-}\alpha$ 陽性であることは心臓線維芽細胞のマーカーとして適していると考えられた。

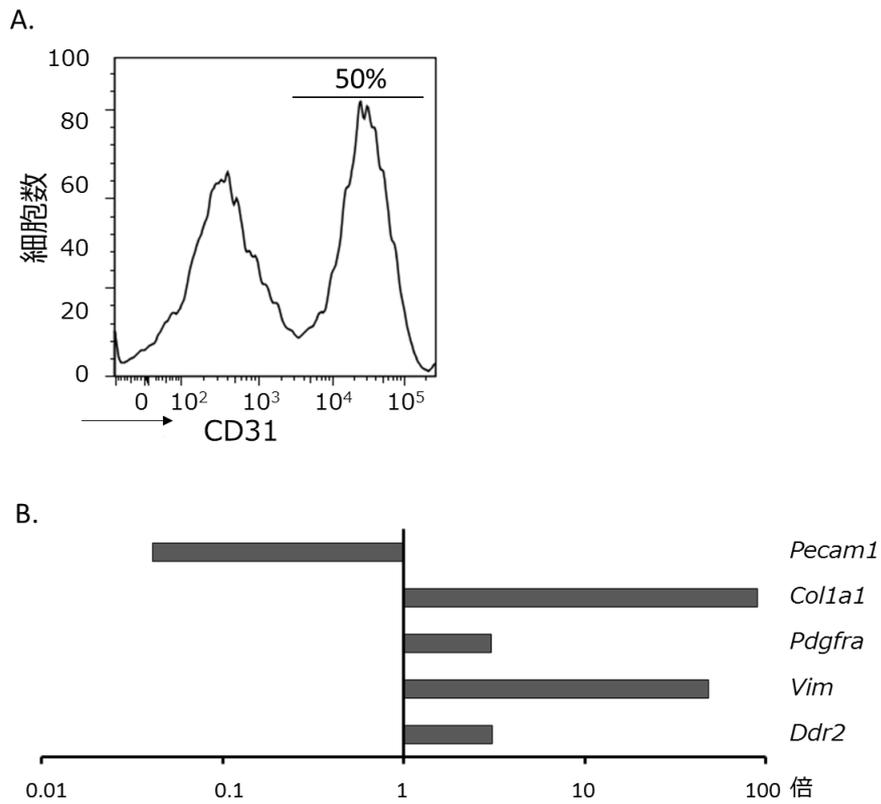


図 6. 心臓 $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞と $CD31$ 陽性細胞における線維芽細胞マーカー発現の解析

$Coll1a1$ -GFP マウスの心筋組織からフローサイトメトリーにより $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞と $CD31$ 陽性細胞を分離し、遺伝子発現を比較した。

- A. 非心筋細胞のうち約半数を $CD31$ 陽性細胞が占めていた。
- B. 線維芽細胞マーカーと $CD31$ 陽性細胞の遺伝子発現量を比較した。 $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞における相対発現量を、 $CD31$ 陽性細胞の発現を 1 とした常用対数で横軸に示している。(*Pecam1*: $CD31$, *Coll1a1*: $Coll1a1$, *Pdgfra*: PDGFR- α , *Vim*: Vimentin, *Ddr2*: DDR2)

- **心筋梗塞部および非梗塞部における GFP⁺/Rα⁺細胞**

次に生体内における心臓線維芽細胞の挙動について解析するために、Colla1-GFP マウスを用いて急性心筋梗塞モデルを作成した。心筋梗塞 2 週間後に心筋組織より非心筋細胞を回収しフローサイトメトリーを用いて解析を行った。コントロール（非心筋梗塞群）において GFP⁺/Rα⁺細胞は非心筋細胞の約 10%を占めていた（図 7A）。梗塞部および非梗塞部の GFP⁺/Rα⁺細胞の占める割合をコントロールと比較した。心筋梗塞 2 週間後の梗塞部において、GFP⁺/Rα⁺細胞は、非心筋細胞の 32%へと増加していた。共焦点顕微鏡による組織像においても梗塞部において GFP 陽性細胞の増加を認めた(図 7A, B)。興味深いことに心筋壊死をともしない非梗塞部においても GFP⁺/Rα⁺細胞が増加していた（コントロール；10%、非梗塞部；18%）(図 7A)。

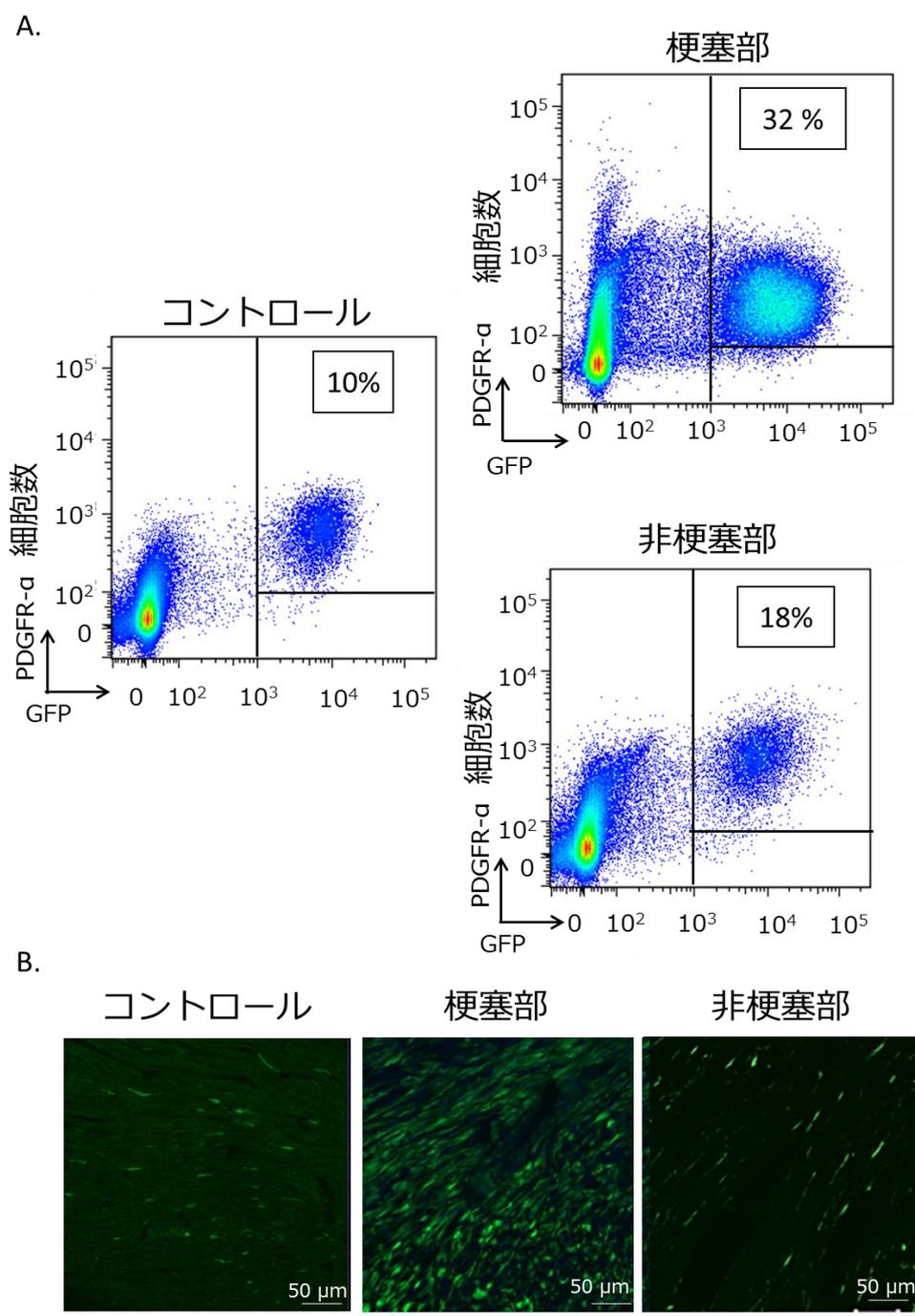


図 7. 心筋梗塞部および非梗塞部における $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞

- A. Coll1a1-GFP マウスに対し急性心筋梗塞モデルを作成した。2週間後、非心筋細胞における、 $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。非心筋細胞に占める割合の概数を表記した。
- B. 心筋梗塞部、非梗塞部の凍結切片による共焦点顕微鏡像（白線:50 μm）。

● 心臓 GFP⁺/Rα⁺細胞における遺伝子発現

梗塞部、及び非梗塞部における GFP⁺/Rα⁺細胞の遺伝子発現様式を解析するために、心筋梗塞 2 週間後の心筋組織を用いて、フローサイトメトリーにより GFP⁺/Rα⁺細胞を単離した。

その結果、梗塞部における心臓 GFP⁺/Rα⁺細胞では、コントロールと比較して *Colla1* の発現が著明に上昇していた (図 8)。心臓における線維化組織においては III 型コラーゲンも増加していることが知られている[56]–[59]。梗塞部における心臓 GFP⁺/Rα⁺細胞においても *Col3a1* 遺伝子が有意に発現していた。また、コラーゲン架橋に関わる *Lox* の発現が上昇し *Acta2* の発現は低下していた。興味深いことに、非梗塞部における GFP⁺/Rα⁺細胞においても、*Colla1* 及び *Col3a1* 遺伝子発現は有意に上昇していた。

これは非梗塞部の心臓線維芽細胞が活性化していることを示す所見と考えられた。

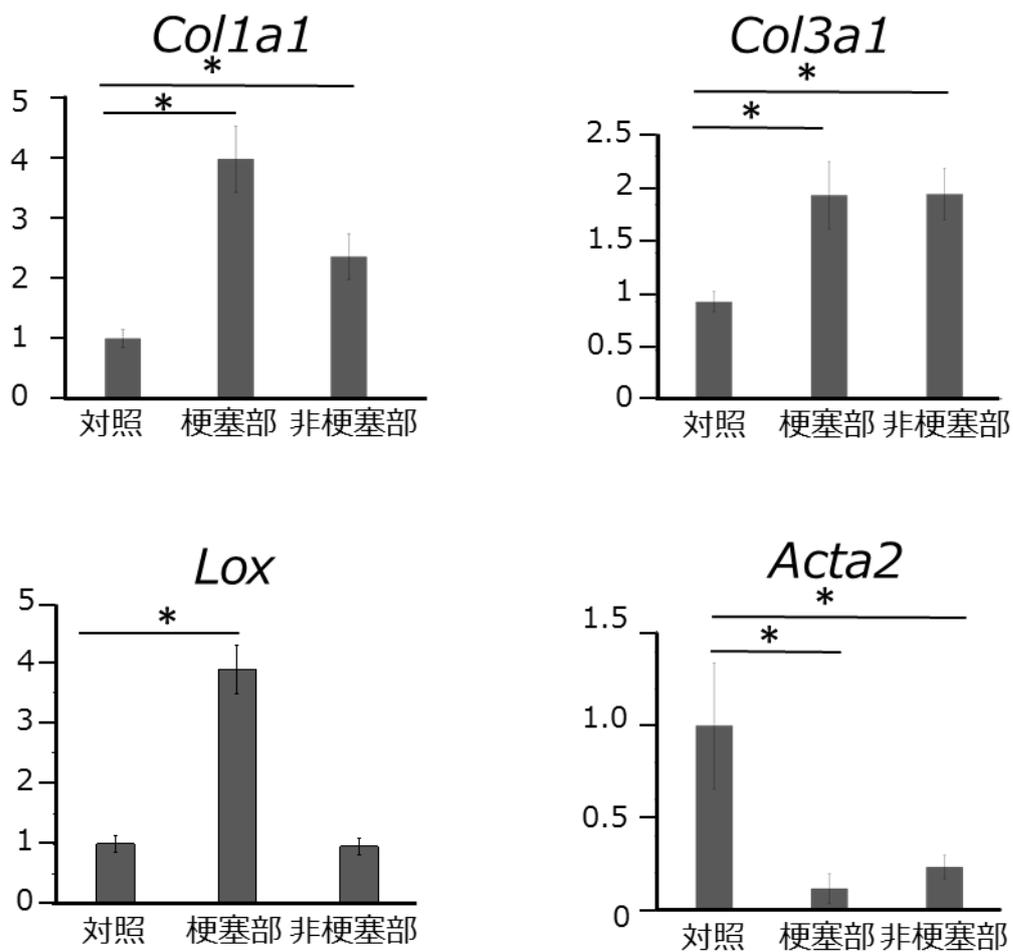


図 8. 心臓 $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞における遺伝子発現

Col1a1-GFP マウスに急性心筋梗塞モデルを作成した。2 週間後の梗塞部および非梗塞部から、フローサイトメトリーにより $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞を単離した。 $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞における遺伝子の相対的発現量を定量的 PCR で解析した。 $*p<0.05$ 。

● 不死化心臓線維芽細胞株の樹立

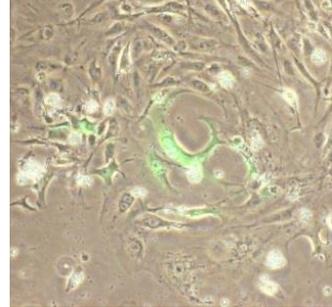
前述したように心臓線維芽細胞は、壊死を伴わない非梗塞部においても活性化していると考えられる。しかしながら、非梗塞部においてなぜ心臓線維芽細胞が活性化するのかについての分子機序は明らかになっていない。そこでこのような過剰な線維化を発症する分子機構を解明するため、*in vitro* における心臓線維芽細胞活性化を解析する実験系の構築を試みた。

まず、Colla1-GFP マウスの心筋組織から初代培養細胞を採取した。この初代培養細胞に対し、レトロウイルスを用いて large T 抗原を導入することで不死化することに成功した。引き続き、初代培養細胞のうち GFP シグナルが弱陽性の細胞群をフローサイトメトリーにより単離し心臓線維芽細胞培養株を樹立した (clone B1-1) (図 9)。

Col1a1-GFPマウス



心臓初代 培養細胞



large T抗原の
導入により不死化



FACSにより
シングルセルソート

不死化
心臓線維芽細胞株
を樹立

図 9. 不死化心臓線維芽細胞株の樹立

Col1a1-GFP マウスの心臓から不死化心臓線維芽細胞株を樹立した。心筋組織より回収した初代培養細胞に対し、レトロウイルスにより large T 抗原を導入することで不死化した。フローサイトメトリーにより GFP 陽性細胞ごとに分離しクローン化することで、不死化心臓線維芽細胞株を樹立した。

- 不死化した心臓線維芽細胞における細胞表面マーカー解析

樹立した心臓線維芽細胞株 (B1-1) の表面マーカーの解析をフローサイトメトリーにより行った (図 10)。コントロールとして *Coll1a1*-GFP マウスの心筋組織より回収した非心筋細胞を用いた。

B1-1 細胞においては、心臓 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞と比較して GFP シグナルは減弱していた。表面マーカーを解析すると、心臓 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞と同様に CD31 及び CD45 の細胞表面マーカーが陰性であった。心臓 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞の多くは Thy1.2 陽性であったが、B1-1 細胞においては Thy1.2 が陰性であった。その一方で、B1-1 細胞は PDGFR- β は陽性であった。B1-1 細胞は心臓線維芽細胞のマーカーとして用いられる PDGFR- α は心臓 $\text{GFP}^+/\text{R}\alpha^+$ 細胞と同様に陽性であった。

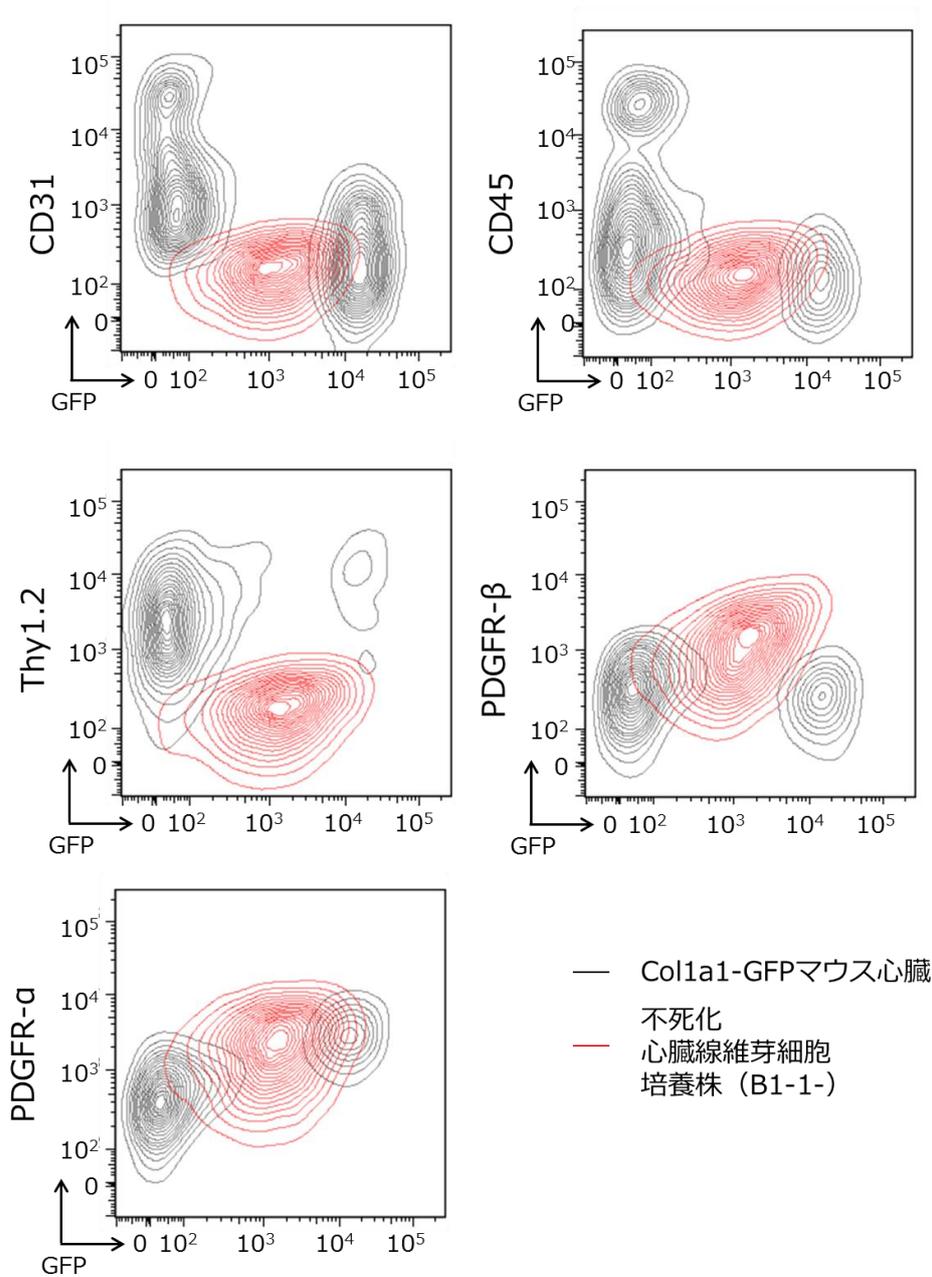


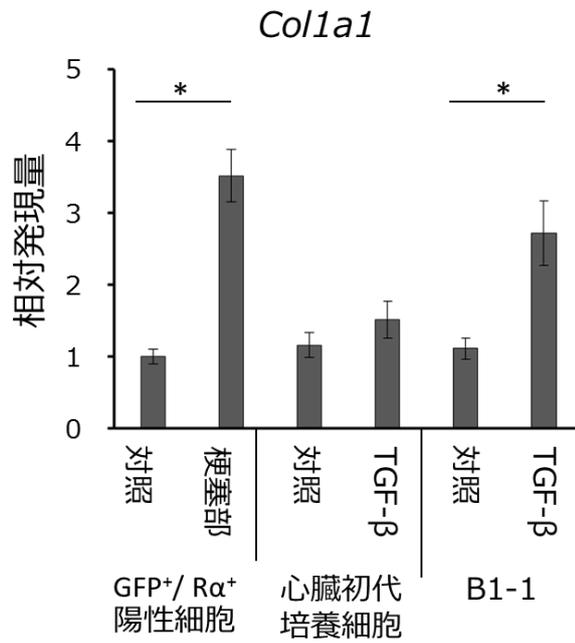
図 10. 不死化した心臓線維芽細胞における細胞表面マーカー解析

樹立した心臓線維芽細胞株 (B1-1) の表面マーカーの解析をフローサイトメトリーにより行った。コントロールとして Col1a1-GFP マウスの心臓より回収した非心筋細胞を用いた。

- 不死化心臓線維芽細胞株における **Coll1a1** 遺伝子の発現

これまで心臓線維化を解析する *in vitro* の系として心臓初代培養細胞が用いられてきた。しかしながら、線維芽細胞活性化に対する応答性は乏しいことが指摘されてきた (図 11A)。そこで、今回樹立した不死化心臓線維芽細胞株 (B1-1) における **Coll1a1** 発現を検討した。その結果、B1-1 細胞においては、TGF- β 刺激に対して有意な **Coll1a1** 発現誘導が確認された。**Coll1a1** 発現量は梗塞部における GFP⁺/ R α ⁺細胞とほぼ同等であり生体内における線維芽細胞の活性化をよりよく反映していると考えられた (図 11A)。興味深いことに **Coll1a1** 発現量の増加とともに B1-1 細胞株においては GFP 蛍光強度が有意に上昇していた (図 11B)。以上より、B1-1 は GFP の蛍光強度により、**Coll1a1** の転写活性をリアルタイムでモニタリングできる細胞であると考えられた。

A.



B.

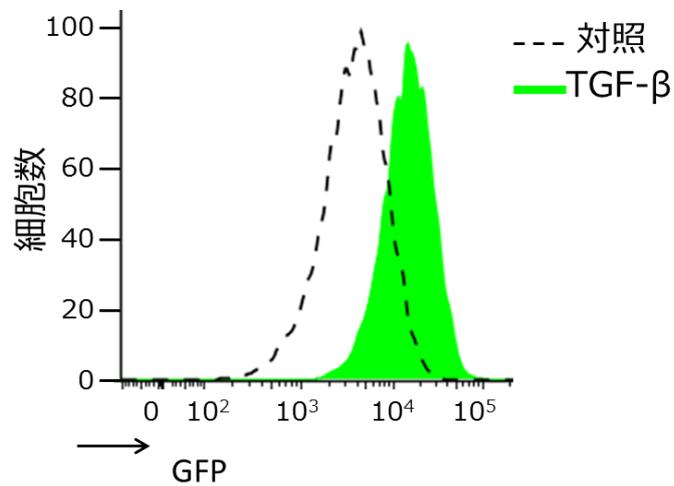


図 11. 不死化心臓線維芽細胞株における Col1a1 遺伝子の発現

- A. 不死化心臓線維芽細胞株 (B1-1) における Col1a1 遺伝子の発現を、心臓初代培養細胞、および Col1a1-GFP マウスの心臓 GFP⁺/Rα⁺細胞と比較した。
- B. B1-1 は TGF-β 刺激により GFP 蛍光強度の増加を認めた。* $p < 0.05$ 。

● shRNA ライブラリーによる線維芽細胞活性化機構の解析

引き続き、今回樹立した不死化心臓線維芽細胞株(B1-1)を用いて、GFP シグナルをレポーターとして、心臓線維芽細胞の活性化機構の探索を行った。約 5000 の遺伝子を標的とした 27500 種のプール型 shRNA レンチウイルスライブラリーを感染させた。このレンチウイルスは RFP (red fluorescent protein) を CMV プロモーター下に発現するため、感染した細胞は RFP シグナルを用いることで検出することが可能である (図 12A)。また、各 shRNA はそれぞれ対応したバーコード配列を有している。shRNA ライブラリーの感染により、ある特定のフェノタイプを発現する細胞集団のゲノムを抽出し、次世代シーケンサーによりバーコード配列の領域を解析することで、フェノタイプに関連する遺伝子群をスクリーニングすることが可能である (図 12B)。shRNA ライブラリーの感染により不活化した細胞群 (GFP シグナルが減弱した群) を I 群、活性化した細胞群 (GFP シグナルが増強した群) を II 群とし、プール全体を III 群とした。I 群および II 群でそれぞれ III 群と比較して濃縮していた shRNA の標的遺伝子を解析した (図 12C)。

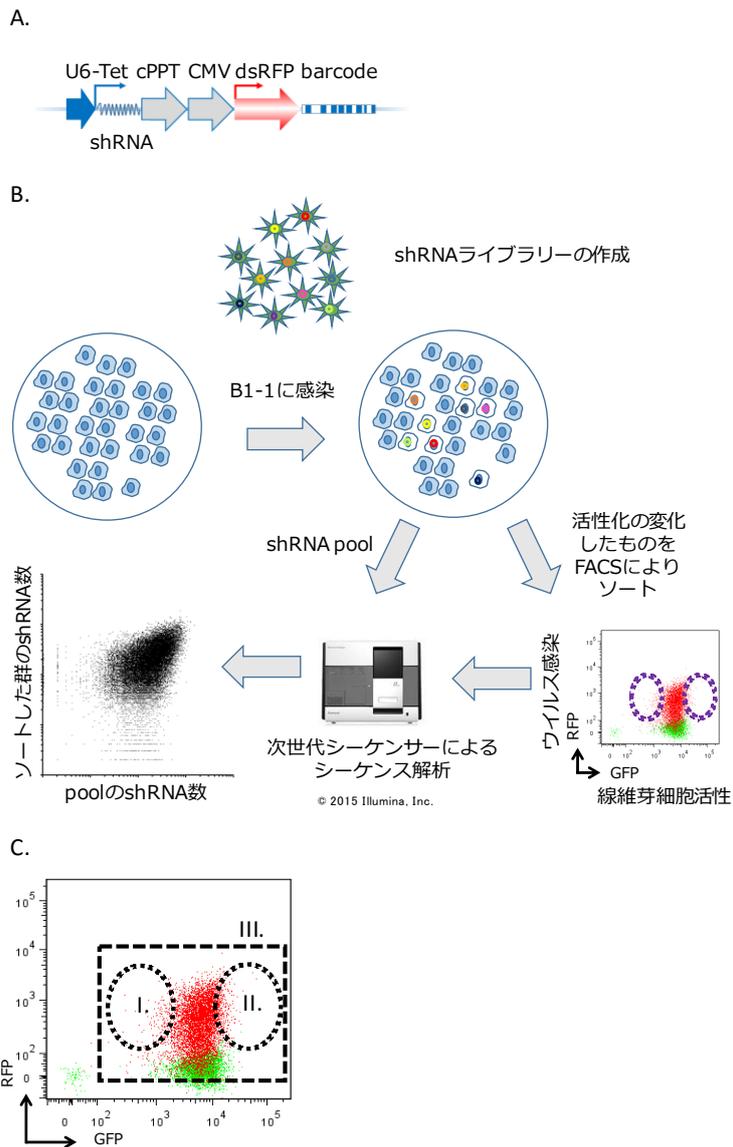


図 12. shRNA ライブラリーによる線維芽細胞活性化機構の解析

A. 27000 種の shRNA をレンチウイルスベクターに組み込みプール型レンチウイルスライブラリーを作成した。各 shRNA には対応するバーコードが配列されている。

B. shRNA ライブラリーを B1-1 に感染させ、GFP を指標として線維芽細胞が活性化、および不活性化したものをフローサイトメトリーにより分離した。

C. shRNA ライブラリーの感染により不活性化した細胞群を I 群 (GFP シグナル低下)、活性化した細胞群を II 群 (GFP シグナル増加) とし、プール全体を III 群とした。I 群および II 群でそれぞれ III 群と比較して濃縮していた shRNA の標的遺伝子を解析した。

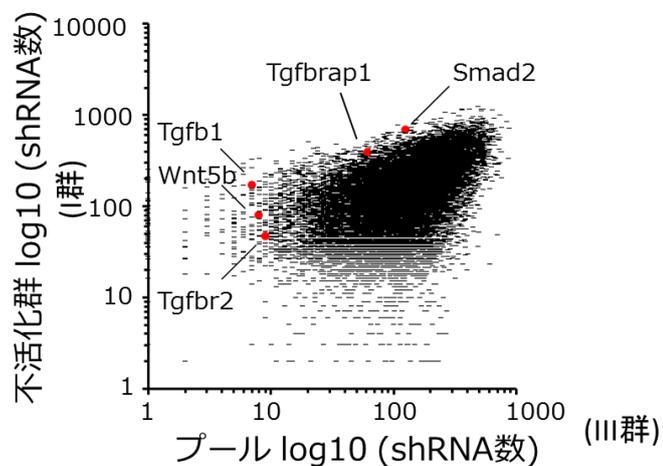
- 線維芽細胞活性化および不活性化に関与する遺伝子の探索

線維芽細胞不活化群 (I 群) 及びプール全体 (III 群) に含まれる shRNA 数の比較を行った(図 13A)。その結果、TGF- β シグナルに関与する遺伝子 (*Tgfb1*, *Tgfbr2*, *Tgfbrap1* *Smad2*)、Wnt シグナルに関与する遺伝子 (*Wnt5b*) を標的とする shRNA が不活化群 (I 群) において増加していた。

一方線維芽細胞が活性化していた群 (II 群) においては、プール全体 (III 群) と比較して、TGF- β シグナル抑制因子 (*Smad6*, *Smad7*) , Wnt シグナル抑制因子 (*Wif1*, *Sfrp1*, *Sost*) を標的とする shRNA が増加していた (図 13B)。

A.

線維芽細胞不活化群



B.

線維芽細胞活性化群

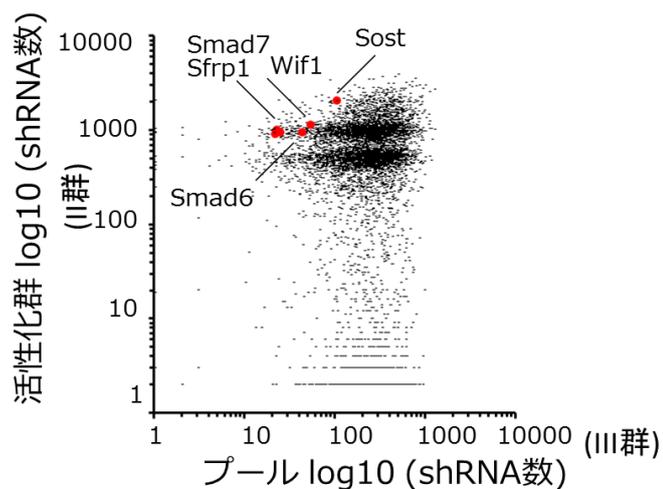


図 13. 線維芽細胞活性化および不活化に関与する遺伝子の探索

レンチウイルス shRNA ライブラリー感染により不活化もしくは活性化した線維芽細胞群に含まれていた shRNA 数を解析した。

- A. 不活化した群 (I 群) では TGF- β シグナルに関与する遺伝子 (*Tgfb1*, *Tgfbr2*, *Tgfbrap1*, *Smad2*)、Wnt シグナルに関与する遺伝子 (*Wnt5b*) が含まれていた。
- B. 活性化した群 (II 群) では TGF- β シグナル抑制因子 (*Smad6*, *Smad7*)、及び Wnt シグナル抑制因子 (*Wif1*, *Sfrp1*, *Sost*) が含まれていた。

- 線維芽細胞の活性化及び不活性化に關与する遺伝子群のパスウェイ解析

二回の shRNA ライブラリーを用いた実験で共通して濃縮していた遺伝子に対し DAVID v6.7 を用いて遺伝子オントロジー解析を行った。

不活化した群 (I 群) および活性化した群 (II 群) において、特徴的に濃縮していた遺伝子を functional annotational clustering により解析し、生物学的に類似した機能をもつ遺伝子群をクラスターとして抽出した。濃縮スコア (enrichment score) が 2 倍以上でターム数が 4 以上のものを表に示した。(表 4A, B)。

表 4. 線維芽細胞の活性化及び不活性化に関与する遺伝子群のパスウェイ解析

イ解析

A. 不活化群に濃縮していた遺伝子群のパスウェイ解析

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 3.78	<i>p</i> value < 0.05
GO:0007188~G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger		
GO:0007187~G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger		
GO:0019933~cAMP-mediated signaling		
GO:0019935~cyclic-nucleotide-mediated signaling		
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 3.61	<i>p</i> value < 0.05
GO:0007193~inhibition of adenylate cyclase activity by G-protein signaling		
GO:0031280~negative regulation of cyclase activity		
GO:0051350~negative regulation of lyase activity		
GO:0007194~negative regulation of adenylate cyclase activity		
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 2.01	<i>p</i> value < 0.05
IPR005817:Wnt superfamily		
IPR018161:Secreted growth factor Wnt protein, conserved site		
IPR005816:Secreted growth factor Wnt protein		
SM00097:WNT1		
GO:0007223~Wnt receptor signaling pathway, calcium modulating pathway		
PIRSF001784:int-1 transforming protein		

B. 活性化群に濃縮していた遺伝子群のパスウェイ解析

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 2.22	<i>p</i> value < 0.05
GO:0006873~cellular ion homeostasis		
GO:0055082~cellular chemical homeostasis		
GO:0050801~ion homeostasis		
GO:0019725~cellular homeostasis		

● 心臓線維芽細胞におけるアドレナリン受容体発現の解析

前述のパスウェイ解析において、線維芽細胞が不活化された群（I群）では既に知られている Wnt パスウェイに加えて、cAMP (cyclic adenosine monophosphate), アデニル酸シクラーゼ経路が有意に増加していた。アドレナリン/アドレナリン受容体シグナルは G タンパクを介してアデニル酸シクラーゼを活性化し細胞内 cAMP を増加させることが知られている。そこで、心臓線維芽細胞におけるアドレナリン受容体発現様式につき解析を行った。

Colla1-GFP マウスの心筋組織からフローサイトメトリーにより単離した心臓 GFP⁺/R α ⁺細胞及び CD31 陽性細胞と、ランゲンドルフ灌流により単離した心筋細胞を用いて、アドレナリン受容体の発現量を解析した。

アドレナリン α 型受容体 1a サブユニット、1b サブユニットの発現は心臓 GFP⁺/R α ⁺陽性細胞において低値だったが、 α 受容体 2b サブユニットは心筋細胞と比較して増加していた（図 14）。一方心臓 GFP⁺/R α ⁺陽性細胞においても α 2 受容体、 β 1、 β 2、 β 3 受容体の発現が認められた。

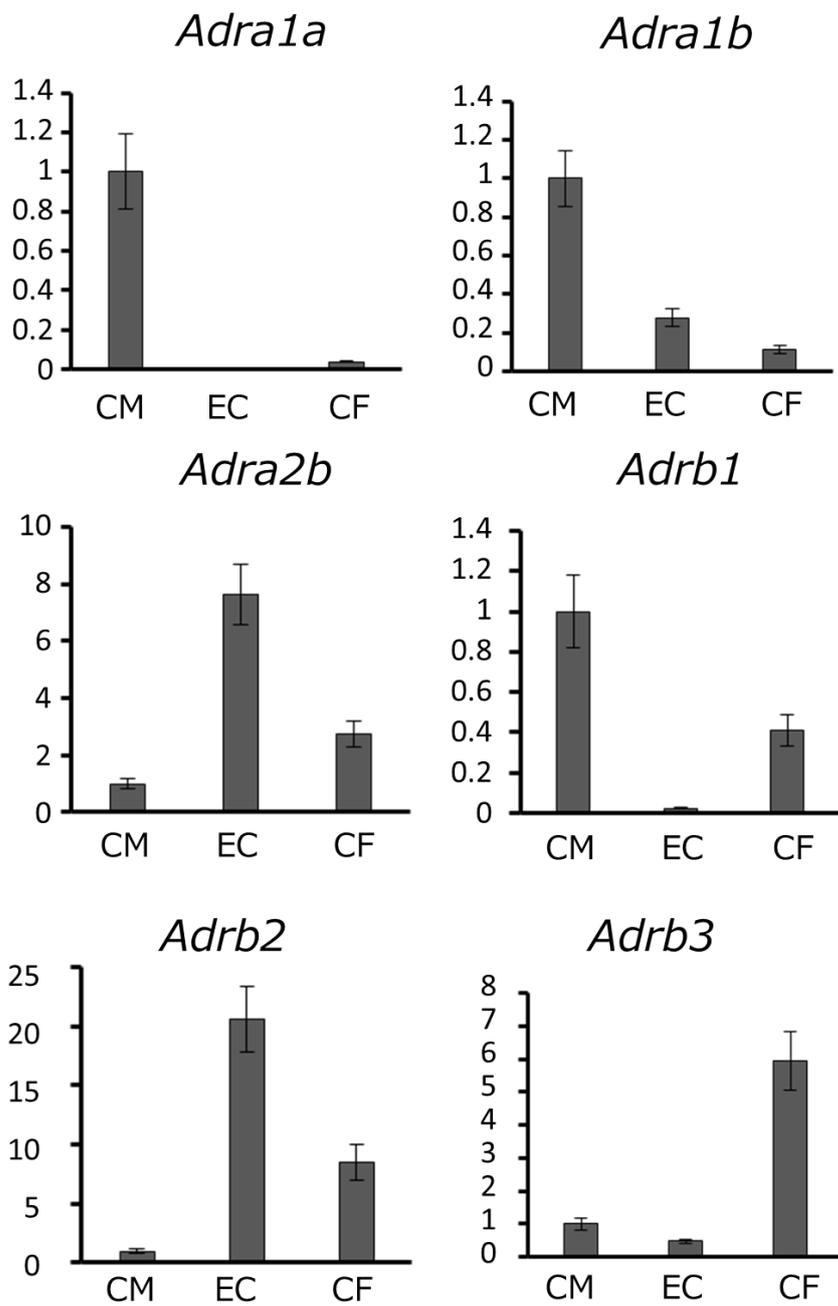


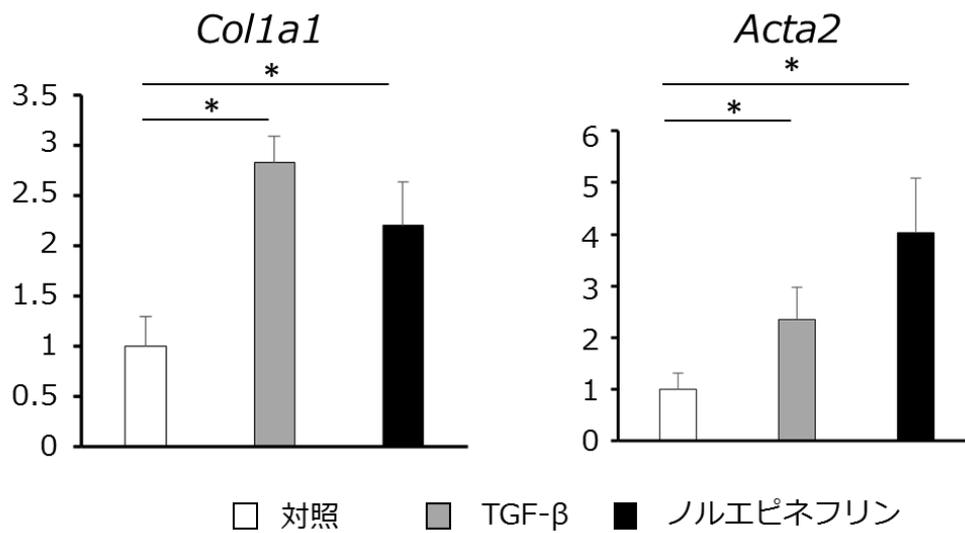
図 14. 心臓線維芽細胞におけるアドレナリン受容体発現の解析

Coll1a1-GFP マウスの GFP⁺/R α ⁺陽性細胞におけるアドレナリン受容体の各サブユニットの遺伝子発現を定量 PCR により解析した。CD31 陽性細胞およびランゲンドルフ灌流により単離した心筋細胞と比較した。CM: ランゲンドルフ灌流により単離した心筋細胞、EC: CD31 陽性細胞、CF: GFP⁺/R α ⁺陽性細胞

- アドレナリン受容体を介する線維芽細胞活性化作用

引き続き心臓線維芽細胞活性化におけるアドレナリン/ アドレナリン受容体シグナルの役割を解析した。心不全及び高血圧性心筋疾患の病態における血中のノルエピネフリンレベルが上昇していることが知られている[60]。そこで、不活化心臓線維芽細胞 (B1-1) におけるノルエピネフリンの作用を解析した。ノルエピネフリン投与 24 時間後において、B1-1 細胞における *Colla1* 及び α SMA 遺伝子発現が有意に増加した (図 15)。

アドレナリン受容体を介する cAMP 代謝シグナルは心筋細胞のみならず、心臓線維芽細胞においても、活性化に関与していることが示された。



● **図 15. アドレナリン受容体を介する線維芽細胞活性化作用**

不死化心臓線維芽細胞株を TGF-β 5 ng/ml、ノルエピネフリン 1 μM で刺激し、24 時間後の Col1a1 と aSMA の遺伝子発現量を定量 PCR で検討した。* $p < 0.05$ 。

考察

本研究において、心臓における線維化の発生機序を解析するために Colla1-GFP マウスより心臓線維芽細胞株を新しく樹立し活性化機構を解析した。この培養細胞株は TGF- β の刺激により Colla1 の転写が増加した。また、マウスの心筋梗塞モデルにおいて、梗塞部より分離した線維芽細胞と比較して同程度に Colla1 の発現が増加していた。このことより、新規に樹立した細胞株は、生体内での線維芽細胞の活性化をよく反映し、線維芽細胞活性化機構の解析の有効なモデルであると考えられた。

従来は初代培養の心臓線維芽細胞が *in vitro* の解析系として用いられてきたが、線維化因子の刺激による活性化が不十分であることや他の細胞種の混入を認めることが欠点としてあげられた。今回、樹立した不死化心臓線維芽細胞株は、TGF- β 刺激により生体内の線維芽細胞に相当する Colla1 転写活性が得られた。これまでの *in vitro* の解析系を克服しているという点で、この細胞株を樹立したことの心臓線維化の研究に対する貢献は大きい。

また、この細胞株では Colla1 プロモーター下に GFP を発現することから、GFP の蛍光強度により Colla1 の転写活性をモニターすることが可能である。この細胞を用いて心臓線維芽細胞の活性化機構の網羅的解析を行った。その結果、活性化のシグナルとして Wnt シグナルなどのいくつかの既知のシグナルのほか

にアドレナリン受容体に関連するシグナルが候補として得られた。実際 *in vitro* での検証では、心臓線維芽細胞株におけるアドレナリン受容体シグナルによる活性化を認めた。

● 心臓線維芽細胞活性化因子

心臓線維芽細胞は $\beta 2$ アドレナリン受容体を発現することが知られている [2][61]。ラットの心臓線維芽細胞で carvedilol による β 受容体シグナルを阻害することで I 型および III 型コラーゲン産生が低下したとする報告がある [62]。心不全患者においてはノルエピネフリンの血中濃度が上昇していることが知られており、心臓線維芽細胞に対し直接作用を介することで心不全の線維化へ関与している可能性が示唆された。

今後はアドレナリン受容体のアイソタイプを含め生体内でのアドレナリン/アドレナリン受容体シグナルの果たす役割について、阻害剤および線維芽細胞特異的アドレナリン受容体欠失マウスを用いて検討を加える必要がある。

● 線維芽細胞および筋線維芽細胞の起源の多様性

心臓の線維芽細胞については、これまでいくつかのマーカーが提唱されてきたが、本研究では、Coll1a1-GFP 陽性かつ PDGFR- α 陽性であると定義した。この

ことにより、より線維芽細胞に特異的に解析が可能であり、今回用いた定義は心臓線維芽細胞の有効なマーカーであると考えられた。

発生時および傷害時の線維芽細胞の起源についてはこれまでいくつかの研究がなされている。Colla1-GFP マウスを用いた解析において、圧負荷心不全モデルでは、負荷時の筋線維芽細胞はもともとの線維芽細胞が増殖したものであることが報告されている[63]。EndMT(endothelial mesenchymal transition)は腎臓や肝臓などにおいて、傷害時に血管内皮細胞が筋線維芽細胞へと転換する現象のことである。圧負荷心不全モデルでは、EndMTにより血管内皮細胞が筋線維芽細胞へと分化し線維化へ寄与することが報告されている[64]。その一方で、Colla1-GFP マウスを用いた研究では、圧負荷心不全モデルで間質に生じる筋線維芽細胞はEndMTに由来せず、常在型線維芽細胞が分化したものであると報告している[65]。

今回樹立した培養細胞は常在型線維芽細胞由来であり、本研究では常在型線維芽細胞の活性化に関与する遺伝子群を探索した。

常在型線維芽細胞、血管内皮細胞、ペリサイト、線維細胞の心臓線維化への関与は病態モデルおよび傷害後の時間経過によっても異なる可能性があるが、現時点でこれらの複数の細胞種がどの程度線維化へ寄与するかは不明である。傷害後の心臓において、常在型線維芽細胞[52]、血管内皮細胞[64]、血球系細胞[66],

[67]などの細胞腫のうち、どの細胞種がどの程度の割合で細胞外基質産生に寄与しているかについても今後明らかにする必要がある。

● 心臓線維芽細胞の多様性

心臓線維芽細胞の起源は、複数あることが知られており、障害時のそれぞれの集団の活性化時の違いについて研究が行われつつある[68]。今回用いた *Coll1a1-GFP* マウスにおける $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞が、活性化した時に均一な挙動を示すのか、異なる挙動を示す亜集団を形成するのかは現時点では不明であり、今後解明する必要がある。

本研究では *Coll1a1-GFP* マウスの心筋梗塞モデルを用いた。梗塞部、非梗塞部の $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞の細胞表面マーカーを解析すると、梗塞部の $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞の *PDGFR- α* 発現が、非梗塞部の $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞と比較して低下している。梗塞部と非梗塞部において線維芽細胞活性化の仕方が、臓器内で異なっていることを示唆している。

また、心筋梗塞 2 週間後の $GFP^+/R\alpha^+$ 細胞の遺伝子発現では α SMA 発現の上昇を認めなかった。筋線維芽細胞は他臓器において α SMA を発現し、組織修復に関わる細胞で、線維芽細胞より分化すると考えられている。*Coll1a1-GFP* マウスに対し作成した心筋梗塞モデルの梗塞部における線維芽細胞では、すくなくとも

遺伝子発現のレベルでは *Acta2* の発現の上昇は認められなかった。時間経過および病態モデルによる影響が考えられた。遺伝子発現に加えて、 α SMA タンパク発現を検討する必要がある。他臓器において α SMA は筋線維芽細胞のマーカーと考えられているが、心臓線維芽細胞が活性化時に α SMA を発現するかは現時点では不明である。

● 細胞外基質の分解機構と線維化の収束過程

また心筋組織の線維化に関しては、線維芽細胞の *Colla1* の転写調節だけでなく細胞外基質の分解による影響を受ける。定常状態での細胞外基質のターンオーバーの頻度、および傷害時のターンオーバーの変化につき検討することが必要である。また活性化した線維芽細胞を不活化する機構を含め、今後は線維化の収束過程についても解明が待たれる。

● 臓器間の線維化活性化機構

線維芽細胞におけるアドレナリン受容体シグナルが心臓の過剰な線維化に関与していることが本研究で示唆された。心筋梗塞後にノルアドレナリン血中濃度は上昇するが[69]、心臓以外の臓器において、アドレナリン受容体シグナルを介して線維芽細胞が活性化しているかは本研究では検討していない。臨床的に、心機能の悪化に伴い腎機能も同様に低下する、心腎連関と呼ばれる現象が知ら

れており、臓器間の線維化亢進機構が病態に関与している可能性がある。臓器間で線維化を亢進する機構の存在については今後検討を要する。

引用文献

- [1] A. Shirwany and K. T. Weber, “Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease.,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 97–8, Jul. 2006.
- [2] K. E. Porter and N. a. Turner, “Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 123, no. 2, pp. 255–278, 2009.
- [3] M.-Y. M. Su, L.-Y. Lin, Y.-H. E. Tseng, C.-C. Chang, C.-K. Wu, J.-L. Lin, and W.-Y. I. Tseng, “CMR-verified diffuse myocardial fibrosis is associated with diastolic dysfunction in HFpEF.,” *JACC. Cardiovasc. Imaging*, vol. 7, no. 10, pp. 991–7, Oct. 2014.
- [4] D. A. Kass, J. G. F. Bronzwaer, and W. J. Paulus, “What Mechanisms Underlie Diastolic Dysfunction in Heart Failure?,” *Circ Res*, vol. 94, no. 12, pp. 1533–1542, 2004.
- [5] A. Briasoulis, S. Mallikethi-Reddy, M. Palla, I. Alesh, and L. Afonso, “Myocardial fibrosis on cardiac magnetic resonance and cardiac outcomes in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis,” *Heart*, vol. 101, no. 17, pp. 1406–1411, Sep. 2015.

[6] S. Kuruvilla, N. Adenaw, A. B. Katwal, M. J. Lipinski, C. M. Kramer, and M. Salerno, “Late gadolinium enhancement on cardiac magnetic resonance predicts adverse cardiovascular outcomes in nonischemic cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis.,” *Circ. Cardiovasc. Imaging*, vol. 7, no. 2, pp. 250–8, Mar. 2014.

[7] M. Perazzolo Marra, M. De Lazzari, A. Zorzi, F. Migliore, F. Zilio, C. Calore, G. Vettor, F. Tona, G. Tarantini, L. Cacciavillani, F. Corbetti, B. Giorgi, D. Miotto, G. Thiene, C. Basso, S. Iliceto, and D. Corrado, “Impact of the presence and amount of myocardial fibrosis by cardiac magnetic resonance on arrhythmic outcome and sudden cardiac death in nonischemic dilated cardiomyopathy.,” *Heart Rhythm*, vol. 11, no. 5, pp. 856–63, May 2014.

[8] A. Gulati, A. Jabbour, T. F. Ismail, K. Guha, J. Khwaja, S. Raza, K. Morarji, T. D. H. Brown, N. A. Ismail, M. R. Dweck, E. Di Pietro, M. Roughton, R. Wage, Y. Daryani, R. O’Hanlon, M. N. Sheppard, F. Alpendurada, A. R. Lyon, S. A. Cook, M. R. Cowie, R. G. Assomull, D. J. Pennell, and S. K. Prasad, “Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy.,” *JAMA*, vol. 309, no. 9, pp. 896–908, Mar. 2013.

[9] B. S. Burlew and K. T. Weber, “Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction,” *Herz*, vol. 27, no. 2, pp. 92–8, Mar. 2002.

[10] R. S. Vasan, M. G. Larson, E. J. Benjamin, J. C. Evans, C. K. Reiss, and D. Levy, “Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1948–55, Jun. 1999.

[11] T. Ohara and W. C. Little, “Evolving focus on diastolic dysfunction in patients with coronary artery disease,” *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 25, no. 6, pp. 613–21, Nov. 2010.

[12] B. Villari, G. Vassalli, J. Schneider, M. Chiariello, and O. M. Hess, “Age Dependency of Left Ventricular Diastolic Function in Pressure Overload Hypertrophy,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 29, no. 1, pp. 181–186, Jan. 1997.

[13] H. Tsutsui, M. Tsuchihashi, and A. Takeshita, “Mortality and readmission of hospitalized patients with congestive heart failure and preserved versus depressed systolic function,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 88, no. 5, pp. 530–3, Sep. 2001.

[14] S. F. Mohammed, S. Hussain, S. a. Mirzoyev, W. D. Edwards, J. J. Maleszewski, and M. M. Redfield, “Coronary Microvascular Rarefaction and

Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction,”

Circulation, vol. 131, no. 6, pp. 550–559, 2014.

[15] K. C. Wu, R. G. Weiss, D. R. Thiemann, K. Kitagawa, A. Schmidt, D.

Dalal, S. Lai, D. a. Bluemke, G. Gerstenblith, E. Marbán, G. F. Tomaselli, and J.

a C. Lima, “Late Gadolinium Enhancement by Cardiovascular Magnetic

Resonance Heralds an Adverse Prognosis in Nonischemic Cardiomyopathy,” *J.*

Am. Coll. Cardiol., vol. 51, no. 25, pp. 2414–2421, 2008.

[16] B. S. Theophilus E. Owan, M.D., David O. Hodge, M.S., Regina M.

Herges, M. P. H. Steven J. Jacobsen, M.D., Ph.D., Veronique L. Roger, M.D.,

and M. D. and Margaret M. Redfield, “No TitTrends in Prevalence and Outcome

of Heart Failure with Preserved Ejection Fractionle,” *N. Engl. J. Med.*, vol.

355:251–9, 2006.

[17] J. G. F. Cleland, M. Tendera, J. Adamus, N. Freemantle, L. Polonski,

and J. Taylor, “The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-

CHF) study.,” *Eur. Heart J.*, vol. 27, no. 19, pp. 2338–45, Oct. 2006.

[18] S. Yusuf, M. A. Pfeffer, K. Swedberg, C. B. Granger, P. Held, J. J. V

McMurray, E. L. Michelson, B. Olofsson, and J. Ostergren, “Effects of

candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular

ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial.,” *Lancet (London, England)*, vol. 362, no. 9386, pp. 777–81, Sep. 2003.

[19] B. M. Massie, P. E. Carson, J. J. McMurray, M. Komajda, R. McKelvie, M. R. Zile, S. Anderson, M. Donovan, E. Iverson, C. Staiger, and A. Ptaszynska, “Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 23, pp. 2456–67, Dec. 2008.

[20] B. Pitt, M. A. Pfeffer, S. F. Assmann, R. Boineau, I. S. Anand, B. Claggett, N. Clausell, A. S. Desai, R. Diaz, J. L. Fleg, I. Gordeev, B. Harty, J. F. Heitner, C. T. Kenwood, E. F. Lewis, E. O’Meara, J. L. Probstfield, T. Shaburishvili, S. J. Shah, S. D. Solomon, N. K. Sweitzer, S. Yang, and S. M. McKinlay, “Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 15, pp. 1383–92, Apr. 2014.

[21] M. E. Blaauboer, F. R. Boeijen, C. L. Emson, S. M. Turner, B. Zandieh-Doulabi, R. Hanemaaijer, T. H. Smit, R. Stoop, and V. Everts, “Extracellular matrix proteins: a positive feedback loop in lung fibrosis?,” *Matrix Biol.*, vol. 34, pp. 170–8, Feb. 2014.

[22] K. Minton, “Extracellular matrix: Preconditioning the ECM for fibrosis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 766–767, 2014.

- [23] M. Yamauchi and M. Sricholpech, "Lysine post-translational modifications of collagen.," *Essays Biochem.*, vol. 52, pp. 113–33, Jan. 2012.
- [24] A. A. Mironov, G. V Beznoussenko, P. Nicoziani, O. Martella, A. Trucco, H. S. Kweon, D. Di Giandomenico, R. S. Polishchuk, A. Fusella, P. Lupetti, E. G. Berger, W. J. Geerts, A. J. Koster, K. N. Burger, and A. Luini, "Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae.," *J. Cell Biol.*, vol. 155, no. 7, pp. 1225–38, 2001.
- [25] B. Peterkofsky, "Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 54, no. 6 Suppl, p. 1135S–1140S, 1991.
- [26] S. Murad, D. Grove, K. A. Lindberg, G. Reynolds, A. Sivarajah, and S. R. Pinnell, "Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 5, pp. 2879–82, 1981.
- [27] J.-J. Santiago, A. L. Dangerfield, S. G. Rattan, K. L. Bathe, R. H. Cunnington, J. E. Raizman, K. M. Bedosky, D. H. Freed, E. Kardami, and I. M. C. Dixon, "Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in

vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts.,” *Dev. Dyn.*, vol. 239, no. 6, pp. 1573–84, Jun. 2010.

[28] W. Chen and N. G. Frangogiannis, “Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 4, pp. 945–953, 2013.

[29] J. Baum and H. S. Duffy, “Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 57, no. 4, pp. 376–9, Apr. 2011.

[30] P. Camelliti, T. K. Borg, and P. Kohl, “Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts.,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 65, no. 1, pp. 40–51, Jan. 2005.

[31] J. Atance, M. J. Yost, and W. Carver, “Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 200, no. 3, pp. 377–86, Sep. 2004.

[32] J. H.-C. Wang, G. Yang, Z. Li, and W. Shen, “Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction.,” *J. Biomech.*, vol. 37, no. 4, pp. 573–6, Apr. 2004.

- [33] D. E. Sullivan, M. Ferris, H. Nguyen, E. Abboud, and R. Arnold, “TNF- α induces TGF β 1 - expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation,” *J Cell Mol Med*, vol. 13, pp. 1866–1876, 2010.
- [34] C. P. Thomas, N. S. Raikwar, E. a. Kelley, and K. Z. Liu, “Alternate processing of Flt1 transcripts is directed by conserved cis-elements within an intronic region of FLT1 that reciprocally regulates splicing and polyadenylation,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 15, pp. 5130–5140, 2010.
- [35] B. Hu, Z. Wu, and S. H. Phan, “Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression.,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 29, no. 3 Pt 1, pp. 397–404, Sep. 2003.
- [36] P. Kong, P. Christia, A. Saxena, Y. Su, and N. G. Frangogiannis, “Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis.,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 305, pp. H1363–72, 2013.
- [37] F. Hudon-David, F. Bouzeghrane, P. Couture, and G. Thibault, “Thy-1 expression by cardiac fibroblasts: lack of association with myofibroblast contractile markers.,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 42, no. 5, pp. 991–1000, May 2007.

[38] Y. Yata, A. Scanga, A. Gillan, L. Yang, S. Reif, M. Breindl, D. a Brenner, and R. a Rippe, “DNase I-hypersensitive sites enhance alpha1(I) collagen gene expression in hepatic stellate cells.,” *Hepatology*, vol. 37, no. I, pp. 267–276, 2003.

[39] Y.-T. Chen, F.-C. Chang, C.-F. Wu, Y.-H. Chou, H.-L. Hsu, W.-C. Chiang, J. Shen, Y.-M. Chen, K.-D. Wu, T.-J. Tsai, J. S. Duffield, and S.-L. Lin, “Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte–myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis,” *Kidney Int.*, vol. 80, no. 11, pp. 1170–1181, 2011.

[40] T. Kisseleva, M. Cong, Y. Paik, D. Scholten, C. Jiang, C. Benner, K. Iwaisako, T. Moore-Morris, B. Scott, H. Tsukamoto, S. M. Evans, W. Dillmann, C. K. Glass, and D. a Brenner, “Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 24, pp. 9448–53, Jun. 2012.

[41] C. Hung, G. Linn, Y. H. Chow, A. Kobayashi, K. Mittelsteadt, W. a. Altemeier, S. a. Gharib, L. M. Schnapp, and J. S. Duffield, “Role of lung Pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 188, no. 7, pp. 820–830, 2013.

- [42] A. Acharya, S. T. Baek, G. Huang, B. Eskiocak, S. Goetsch, C. Y. Sung, S. Banfi, M. F. Sauer, G. S. Olsen, J. S. Duffield, E. N. Olson, and M. D. Tallquist, “The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors.,” *Development*, vol. 139, no. 12, pp. 2139–49, Jun. 2012.
- [43] E. A. Sankey, F. E. Bown, L. F. Morton, D. M. Scott, and M. J. Barnes, “Analysis of the collagen types synthesized by bovine corneal endothelial cells in culture.,” *Biochem. J.*, vol. 198, no. 3, pp. 707–10, Sep. 1981.
- [44] B. V Howard, E. J. Macarak, D. Gunson, and N. A. Kefalides, “Characterization of the collagen synthesized by endothelial cells in culture.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 73, no. 7, pp. 2361–4, Jul. 1976.
- [45] K. Kubota, J. Okazaki, O. Louie, K. C. Kent, and B. Liu, “TGF-beta stimulates collagen (I) in vascular smooth muscle cells via a short element in the proximal collagen promoter.,” *J. Surg. Res.*, vol. 109, no. 1, pp. 43–50, Jan. 2003.
- [46] J. Kim, Q. Wu, Y. Zhang, K. M. Wiens, Y. Huang, N. Rubin, and H. Shimada, “PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebra fi sh hearts,” pp. 3–7, 2010.

[47] D. W. Huang, R. A. Lempicki, and B. T. Sherman, “Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.,” *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–57, 2009.

[48] S.-L. Lin, T. Kisseleva, D. a Brenner, and J. S. Duffield, “Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 173, no. 6, pp. 1617–1627, 2008.

[49] I. Mederacke, C. C. Hsu, J. S. Troeger, P. Huebener, X. Mu, D. H. Dapito, J.-P. Pradere, and R. F. Schwabe, “Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology.,” *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2823, 2013.

[50] M. Ponticos, T. Partridge, C. M. Black, D. J. Abraham, and G. Bougharios, “Regulation of Collagen Type I in Vascular Smooth Muscle Cells by Competition between Nkx2 . 5 and EF1 / ZEB1,” vol. 24, no. 14, pp. 6151–6161, 2004.

[51] J. S. Troeger, I. Mederacke, G.-Y. Gwak, D. H. Dapito, X. Mu, C. C. Hsu, J.-P. Pradere, R. a Friedman, and R. F. Schwabe, “Deactivation of hepatic

stellate cells during liver fibrosis resolution in mice.,” *Gastroenterology*, vol. 143, no. 4, pp. 1073–83.e22, Oct. 2012.

[52] T. Moore-morris, N. Guimarães-camboa, I. Banerjee, A. C. Zambon, T. Kisseleva, A. Velayoudon, W. B. Stallcup, Y. Gu, N. D. Dalton, M. Cedenilla, R. Gomez-amaro, B. Zhou, D. A. Brenner, K. L. Peterson, J. Chen, and S. M. Evans, “Resident fibroblast lineages mediate pressure overload – induced cardiac fibrosis,” vol. 124, no. 7, pp. 2921–2934, 2014.

[53] C. L. Smith, S. T. Baek, C. Y. Sung, and M. D. Tallquist, “Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling.,” *Circ. Res.*, vol. 108, no. 12, pp. e15–26, Jun. 2011.

[54] J. J. H. Chong, H. Reinecke, M. Iwata, B. Torok-Storb, A. Stempien-Otero, and C. E. Murry, “Progenitor cells identified by PDGFR-alpha expression in the developing and diseased human heart.,” *Stem Cells Dev.*, vol. 22, no. 13, pp. 1932–43, Jul. 2013.

[55] F. Hudon-David, F. Bouzeghrane, P. Couture, and G. Thibault, “Thy-1 expression by cardiac fibroblasts: lack of association with myofibroblast contractile markers.,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 42, no. 5, pp. 991–1000, May 2007.

- [56] M. Kitamura, M. Shimizu, H. Ino, K. Okeie, M. Yamaguchi, N. Fujino, H. Mabuchi, and I. Nakanishi, "Collagen remodeling and cardiac dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy: The significance of type III and VI collagens," *Clin. Cardiol.*, vol. 24, no. 4, pp. 325–329, Apr. 2001.
- [57] X. Zhang, H. Liu, T. Hock, V. J. Thannickal, and Y. Y. Sanders, "Histone deacetylase inhibition downregulates collagen 3A1 in fibrotic lung fibroblasts.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 10, pp. 19605–17, Jan. 2013.
- [58] K. Yoshioka, T. Takemura, M. Tohda, N. Akano, H. Miyamoto, A. Ooshima, and S. Maki, "Glomerular localization of type III collagen in human kidney disease," *Kidney Int.*, vol. 35, no. 5, pp. 1203–1211, May 1989.
- [59] H. N. Soufen, V. M. C. Salemi, I. M. S. Aneas, F. J. A. Ramires, A. M. D. Benício, L. A. Benvenuti, J. E. Krieger, and C. Mady, "Collagen content, but not the ratios of collagen type III/I mRNAs, differs among hypertensive, alcoholic, and idiopathic dilated cardiomyopathy," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 41, pp. 1098–1104, 2008.
- [60] J. A. Thomas and B. H. Marks, "Plasma norepinephrine in congestive heart failure," *Am. J. Cardiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 233–243, Feb. 1978.

[61] N. a Turner, K. E. Porter, W. H. T. Smith, H. L. White, S. G. Ball, and A. J. Balmforth, “Chronic beta2-adrenergic receptor stimulation increases proliferation of human cardiac fibroblasts via an autocrine mechanism.,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 784–792, 2003.

[62] D. Grimm, M. Huber, H. C. Jabusch, M. Shakibaei, S. Fredersdorf, M. Paul, G. A. Riegger, and E. P. Kromer, “Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade.,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 33, no. 3, pp. 487–501, Mar. 2001.

[63] T. Moore-Morris, M. D. Tallquist, and S. M. Evans, “Sorting out where fibroblasts come from.,” *Circ. Res.*, vol. 115, no. 7, pp. 602–4, Sep. 2014.

[64] E. M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo, and R. Kalluri, “Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis.,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 952–61, Aug. 2007.

[65] T. Moore-Morris, N. Guimarães-Camboa, I. Banerjee, A. C. Zambon, T. Kisseleva, A. Velayoudon, W. B. Stallcup, Y. Gu, N. D. Dalton, M. Cedenilla,

R. Gomez-Amaro, B. Zhou, D. a. Brenner, K. L. Peterson, J. Chen, and S. M. Evans, “Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 7, pp. 2921–2934, 2014.

[66] M. J. Van Amerongen, E. R. Popa, J. Van Ark, A. H. Petersen, G. M. Van Dam, and M. J. A. Van Luyn, “Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction,” no. December 2007, pp. 377–386, 2008.

[67] G. Kania, P. Blyszczuk, S. Stein, A. Valaperti, D. Germano, S. Dirnhofer, L. Hunziker, C. M. Matter, and U. Eriksson, “Heart-infiltrating prominin-1+/CD133+ progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor beta-mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis,” *Circ. Res.*, vol. 105, no. 5, pp. 462–470, 2009.

[68] J. J. H. Chong, E. Forte, and R. P. Harvey, “Developmental origins and lineage descendants of endogenous adult cardiac progenitor cells,” *Stem Cell Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 592–614, 2014.

[69] N. J. Christensen and J. Videbaek, “Plasma catecholamines and carbohydrate metabolism in patients with acute myocardial infarction,” *J. Clin. Invest.*, vol. 54, no. 2, pp. 278–86, Aug. 1974.

謝辞

本研究を実施するにあたり、その機会を受け賜りました東京大学大学院医学系研究科循環器内科学講座 小室一成教授に感謝致します。本研究の立案、遂行にあたり、実験指導及び実験方針に対するご助言を頂きました、東京大学循環器内科 武田憲彦先生に心よりお礼申し上げます。また、研究遂行にあたり、貴重なご助言、ご指導を頂きました、東京医科歯科大学ゲノム病理学 砂河孝行先生に心より感謝致します。日々の研究生活において多くのご支援をいただき、有意義なものにして下さった東京大学大学院医学系研究科循環器内科学講座の皆様
に心より感謝致します。