

論文の内容の要旨

論文題目 心臓線維芽細胞活性化における分子機構の解明

氏名 小山雄広

心臓における線維化は、心負荷に対する代償反応や、組織傷害後の修復過程で生じる。その一方で過剰な線維化が生じると、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。心不全組織における線維化領域の増大は、突然死を含めた予後不良因子であることが示唆されており、心不全の中でも線維化による拡張障害を原因とするものが近年重要であると認識されてきている。

線維化による心不全に対する薬剤治療を開発するうえで、線維化の機序を解明することは必須であるが、その分子機構に対する我々の理解は未だ不十分である。特に *in vitro* での有効なモデルがないことが、これまで心臓の線維化に対する研究の進展を阻害してきた。そこで本研究において、不死化した心臓線維芽細胞培養株を新たに樹立することで、心臓線維芽細胞活性化における解析系の構築を試みた。

細胞外マトリックスの産生、及びその分解のバランスが破綻することで組織の線維化が生じる。組織傷害時においては、活性化した線維芽細胞が筋線維芽細胞へと分化することで、I型コラーゲンを産生することが知られている。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、機械的ストレスなどが知られている。TGF- β は線維化過程において中心的な役割を果たすが、TGF- β 以外にも、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカイン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。

これまで線維芽細胞に特異的なマーカーを用いて、心臓における線維化の研究がなされてきた。心臓線維芽細胞のマーカーとして Thy1.2 や Fsp1 などが使用されていたが、いずれも骨髄由来細胞などの他の細胞種でも発現するため、心臓線維芽細胞に特異的ではないことが問題とされてきた。近年、各臓器における線維化の研究において、Collagen1a1 (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) を用いた研究が進められている。この Col1a1-GFP マウスにおいて、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、心臓においては近年、心臓線維芽細胞のマーカーである PDGFR- α を用いて線維化の研究が進められている。

しかしながら、Coll1a1 および PDGFR- α はともに線維芽細胞以外でも発現していることが知られている。具体的には、Coll1a1 は血管内皮細胞や壁細胞なども発現し、PDGFR- α は心外膜細胞や心臓線維芽細胞以外の細胞においても発現している。そのため、Coll1a1 および PDGFR- α のどちらか一方を線維芽細胞のマーカーとして用いることには、特異性の点で限界があると考えられた。そこで、本研究において、Coll1a1-GFP 陽性かつ PDGFR- α 陽性である細胞を心臓線維芽細胞と定義し、活性化機構の解明を試みた。

まず、Coll1a1-GFP マウスの心臓における GFP 陽性細胞の細胞表面マーカーを、フローサイトメトリーおよび組織蛍光免疫染色により解析した。その結果、血球系細胞および壁細胞の細胞表面マーカーである CD45 と PDGFR- β を GFP 陽性細胞は発現していなかった。その一方で、心臓線維芽細胞の細胞表面マーカーとして知られている PDGFR- α および Thy1.2 の発現が陽性であった。しかしながら、一部の GFP 陽性細胞は CD31 陽性であった。このことから、Coll1a1-GFP 陽性細胞は血管内皮細胞を一部含んでおり、Coll1a1-GFP はマーカーとして心臓線維芽細胞に特異的ではないと考えられた。また、PDGFR- α の発現を解析すると、PDGFR- α 陽性であるにもかかわらず Coll1a1-GFP 陰性の細胞があり、PDGFR- α は心臓線維芽細胞以外にも非特異的に発現していると考えられた。

以上のことから、本研究において、Coll1a1-GFP 陽性かつ PDGFR- α 陽性である細胞 (GFP⁺/Ra⁺細胞) を心臓線維芽細胞と定義し、心臓線維芽細胞における活性化機構の解明を試みた。実際に GFP⁺/Ra⁺細胞の遺伝子発現を CD31 陽性細胞のそれと比較したところ、Coll1a1 および線維芽細胞マーカーの遺伝子発現が有意に多いことが分かった。このことから今回の研究において用いた定義は、心臓線維芽細胞に特異的であると考えられた。

引き続き生体内での心臓線維芽細胞活性化機構を検討した。Coll1a1-GFP マウスを用いて急性心筋梗塞モデルを作成した。梗塞部、非梗塞部の GFP⁺/Ra⁺細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、梗塞部において GFP⁺/Ra⁺細胞数の増加を認め、それらの Coll1a1 遺伝子発現も増加していた。興味深いことに、心筋壊死を伴わない非梗塞部においても GFP⁺/Ra⁺細胞が増加し、細胞外基質の産生が増加していることが分かった。

このように、心筋梗塞後に心筋壊死を伴わない非梗塞部においても、線維芽細胞は過剰に活性化し細胞外基質の産生が亢進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構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* での心臓線維芽細胞の活性化機構を解析する実験系の構築を試みた。

まず、Coll1a1-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 抗原を導入し、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 が陽性である細胞を、フローサイトメトリーにより単離することで、心臓線維芽細胞培養株を樹立した。

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、この系においては線維芽細胞活性化に対する応答性が乏しいことが指摘されてきた。今回樹立した不死化心臓線維芽細胞株 (B1-1) においては著明な TGF- β 刺激への応答性が確認された。このことから、本研究で樹立した心臓線維芽細胞培養株は、これまで用いられてきた心臓初代培養細胞よりも、生体内での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。興味深いことに、Colla1 発現が増加するとともに B1-1 細胞の GFP 蛍光強度が増加した。このことから、B1-1 細胞では GFP の蛍光強度により線維芽細胞の活性化をモニタリングできると考えられた。

引き続き、不死化した心臓線維芽細胞株を用いて線維芽細胞活性化機構の解明を試みた。プール型レンチウイルス shRNA ライブラリーにより、線維芽細胞活性化に関わる細胞内シグナルの網羅的解析を行った。作成した shRNA ライブラリーには、約 5000 の遺伝子を標的とした各 shRNA コンストラクトのそれぞれに対応したバーコード配列が含まれている。このバーコード領域を次世代シーケンサーで検出することにより標的遺伝子を同定し、関連する遺伝子群を網羅的に解析することが可能である。

解析の結果、活性化に関連する遺伝子群としては、Wnt シグナルなどの既知の線維化を活性化するシグナルの他に、アドレナリン受容体シグナルに関わる経路が同定された。次に、心筋組織におけるアドレナリン受容体発現を検討した。Colla1-GFP マウスより単離した心臓線維芽細胞および心筋細胞において、アドレナリン受容体の異なるアイソタイプが線維芽細胞、心筋細胞間で発現していることが分かった。

不死化した心臓線維芽細胞培養株に対して、ノルエピネフリン刺激を加えたところ確かに活性化し、*in vitro* においてアドレナリン受容体シグナルが、線維芽細胞を活性化することが分かった。

以上より、心筋組織における線維化の背景として、アドレナリン/アドレナリン受容体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唆された。実際、臨床においてノルエピネフリンの血中濃度は心不全患者において著明に上昇していることが知られており、ノルエピネフリンが心臓線維芽細胞を直接に活性化することで、心不全における間質の線維化が惹起される可能性が示唆された。また、心臓線維芽細胞におけるアドレナリン受容体シグナルを治療標的とすることで、心室拡張障害を抑制しうる可能性が示唆された。

本研究においては、心臓線維芽細胞の活性化シグナルとしてノルエピネフリンを *in vitro* で同定した。アドレナリン受容体シグナルが Colla1 発現を上昇させるが、それ以外に増殖能や細胞外基質分解能に関与するのか今後検証を加える必要がある。

また、線維芽細胞活性化因子であるノルエピネフリンの由来として、交感神経末端、心筋細胞、副腎髄質などが考えられるが、心臓線維芽細胞における細胞間・臓器間のアドレナリン/アドレ

ナリン受容体シグナルの役割については未だ不明である。心臓線維芽細胞のアドレナリン受容体シグナルを介した細胞間・臓器間ネットワークにつき遺伝子改変動物を用いて検証を加える必要がある。

心臓線維芽細胞が、他の臓器で指摘されるような筋線維芽細胞へと分化するのについても未だ知られていない点が多い。本研究では、心筋梗塞後の GFP⁺/Rα⁺細胞においては αSMA 発現の上昇を認めなかった。他臓器における筋線維芽細胞のマーカである αSMA を、心臓においても線維芽細胞が活性化時に発現するのかは現時点では不明である。このことは、線維芽細胞の活性化機構が臓器間で異なる可能性を示している。

心臓線維芽細胞の発生時の起源についてはいくつかの研究により徐々に明らかになりつつあるが、傷害時における起源や活性化機構については依然として不明な点が多い。心臓線維芽細胞の起源およびその役割は、病態モデルによって異なる可能性があり、今後の研究により詳細な説明が待たれる。