

[過程-2]

審査の結果の要旨

氏名 小山雄広

本研究は、近年左室拡張障害の原因として注目されている心臓線維化について明らかにするため、その分子機構の解明を試みた。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を用いて、*in vivo* および *in vitro* のアプローチを行い以下の結果を得ている。

1. Col1a1-GFP マウスの正常心臓において FACS および蛍光顕微鏡を用いた解析から、GFP 陽性かつ PDGFR- α 陽性である細胞 (GFP⁺/R α ⁺細胞) の膜タンパク発現が、心臓線維芽細胞と一致することを確認した。同心臓から FACS によりソートした血管内皮細胞の遺伝子発現と比較して、GFP⁺/R α ⁺細胞では、線維芽細胞特異的な *Col1a1*, *Vim* などの遺伝子発現が増加していることを確認した。
2. Col1a1-GFP マウスに対し急性心筋梗塞モデルを作成し、梗塞後 2 週間において梗塞部の GFP⁺/R α ⁺細胞数の増加及び *Col1a1* 発現の増加を認めた。また、非梗塞部においても、正常心臓の細胞と比較して *Col1a1* 発現が増加していた。このことは心筋梗塞後に、心筋の傷害を伴わない非梗塞部においても、GFP⁺/R α ⁺細胞が活性化し、細胞外基質産生が亢進していることを示している。
3. Col1a1-GFP マウスの正常心臓より初代心臓培養細胞を採取した。採取した細胞に対しレトロウイルスを用いて SV40 を導入し、GFP 陽性の細胞をシングルセルクローン化した。TGF- β の刺激により GFP 蛍光強度が増加する細胞株を心臓線維芽細胞株として樹立した。この細胞株に対し TGF- β を用いて刺激することにより *Col1a1* 発現が、梗塞部の GFP⁺/R α ⁺細胞と同程度に増加することを確認した。従来、線維化の *in vitro* の系として初代心臓線維芽細胞が用いられてきたが、今研究で新規に樹立した細胞株において、線維化刺激に対して *Col1a1* 発現が従来の初代心臓線維芽細胞より強く誘導された。従来の初代心臓線維芽細胞と比較して、より鋭敏な活性化を示す心臓線維芽細胞の *in vitro* における系を樹立した。

4. 樹立した心臓線維芽細胞株に対しプール型レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いて、Col1a1 転写活性に関与する遺伝子の網羅的解析を行った。shRNA レンチウイルスライブラリー感染により GFP 蛍光強度の低下した群および増加した群で、全体と比較し高率にノックダウンされていた遺伝子群に対し解析を行った。その結果、線維芽細胞活性化に関与する遺伝子群には TGF- β シグナルおよび Wnt シグナルに関与する遺伝子群とともに、アデニル酸シクラーゼ経路に関与する遺伝子群が優位に含まれていた。
5. 生体内においてアドレナリン受容体の遺伝子発現を心筋細胞、血管内皮細胞、心臓線維芽細胞間で比較したところ、心臓線維芽細胞において発現していることを確認した。実際、樹立した心臓線維芽細胞株に対しノルアドレナリンによる刺激を検証したところ、アドレナリン受容体シグナルを介して、心臓線維芽細胞における Col1a1 発現が増加することを確認した。生体内において、アドレナリン受容体シグナルを介した心臓線維芽細胞の活性化が調節されていることが示唆された。

本論文において、心臓線維芽細胞株をマウス心臓より樹立し、心臓線維芽細胞活性化の *in vitro* における解析系を構築した。樹立した心臓線維芽細胞株に対し、shRNA ライブラリーを用いた網羅的解析を行い、心臓線維芽細胞がアドレナリン受容体シグナルにより活性化することを明らかにした。本研究は従来の *in vitro* の系より有効な解析系を構築した点で、心臓線維化の分子機構の解明において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。