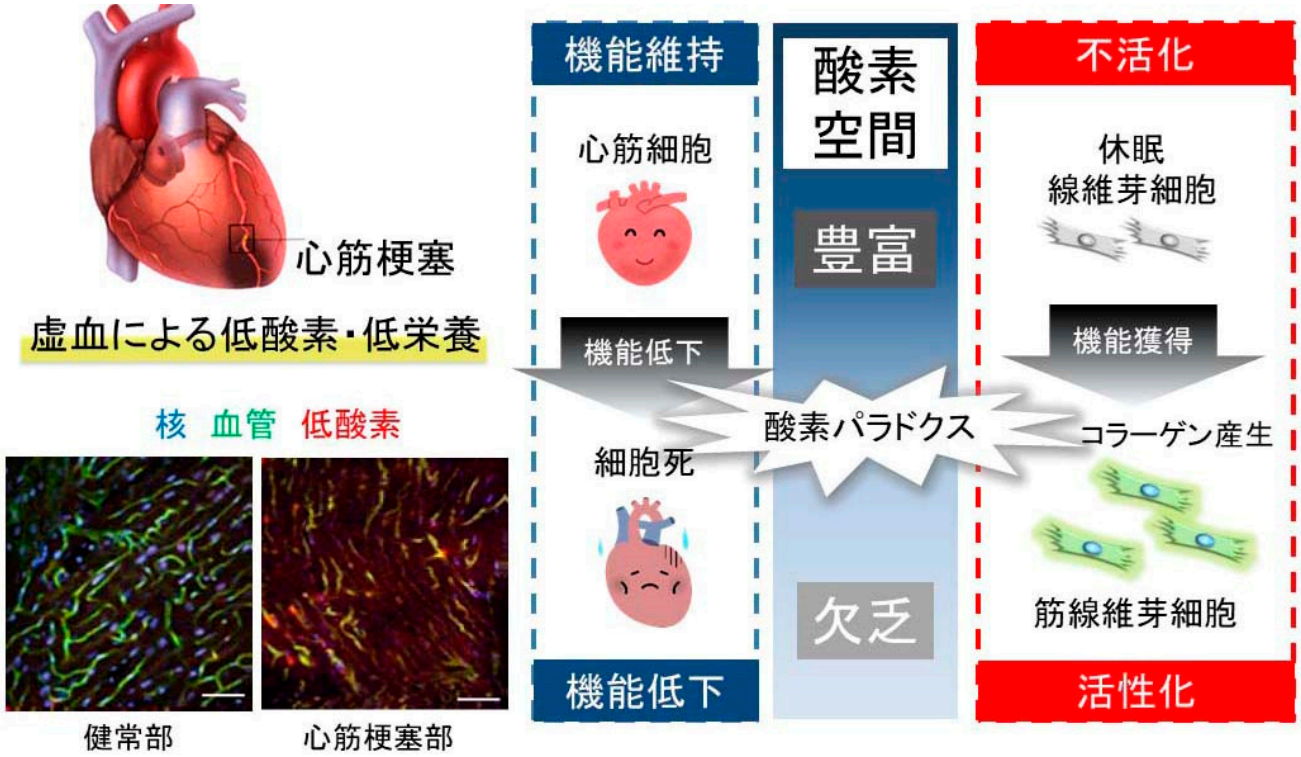
64　心臓線維化病態の解明と心不全治療法の開発	武田　憲彦

【目的】心臓はポンプとして収縮・拡張を繰り返すことで全身に血液を駆出しており、心臓の収縮あるいは拡張機能が低下するとそれぞれ収縮不全・拡張不全と呼ばれる心不全病態が引き起こされる。心臓線維化は拡張不全の主な原因であるが、なぜ心臓線維化が引き起こされるのかその分子病態は未だ明らかではない。本研究は心臓線維芽細胞が活性化する機構を解明し、心不全に対する治療法開発へと繋げることを目的とする。

【方法】本研究では酸素・栄養素環境に着目し心臓線維化における役割を検証した。線維芽細胞の培養株である NIH3T3 細胞から放出される細胞外マトリクスを用いて検出し、虚血環境が線維芽細胞活性化に与える影響とその分子機構の解明に取り組んだ（計画 1）。次に心臓線維芽細胞活性を検出するレポーター細胞を作製し、心臓線維芽細胞活性化の分子機構を理解すべく、その細胞内シグナルの探索を行った（計画 2）。

【結果】計画 1：線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を、酸素濃度を 21%から 1%へ低下させる（低酸素負荷）、あるいは培養液中の血清を除いた条件（無血清負荷）および低酸素・無血清負荷を加えた環境で培養し、培養上清に含まれる細胞外マトリクスをシリウスレッド染色および I 型コラーゲン抗体で検出した。その結果、低酸素負荷、無血清負荷によりそれぞれ NIH3T3 培養上清中に放出されるコラーゲン量が増加すること、低酸素・無血清負荷では著しく増加することを見出した。計画 2：コラーゲンプロモーター下に GFP を発現するマウス（Collagen-GFP、Col-GFP）より心臓線維芽細胞を単離し SV40 を用いて不死化した。不死化した心臓線維芽細胞をクローン化し、コラーゲン産生を GFP シグナル強度として検出できる細胞株 B1-1 を樹立した。レンチウイルスを用いてプール型 shRNA を導入し、線維芽細胞活性化を制御する細胞内シグナルの探索を行った。

心臓線維芽細胞における酸素パラドクス



64. 心臓線維化病態の解明と心不全治療法の開発

武田　憲彦

自治医科大学 分子病態治療研究センター 循環病態・代謝学研究部

Key words：心不全，拡張不全，心線維化，低酸素，コラーゲン

緒　言

心臓はポンプとして収縮・拡張を交互に繰り返すことで全身に血液を駆出している。収縮あるいは拡張機能が低下するとそれぞれ収縮不全・拡張不全という心不全病態が引き起こされる。心不全は致死的病態であり、近年その患者数の爆発的増加（心不全パンデミック）が大きな課題となっている。収縮不全に対する薬物治療や経カテーテル治療はこれまで大きく進歩しているが、拡張不全に対して有効な治療法は存在せず、その病態解明と治療法開発が臨床的に強く求められている。

心臓線維化は拡張不全の主たる病因として知られている。心臓線維芽細胞の過剰な活性化は細胞外マトリクスであるコラーゲンを産生し、心臓線維化を引き起こす。研究代表者はこれまでに低酸素環境が線維芽細胞やマクロファージなど間質細胞の挙動において重要な役割を与えることを明らかにしてきた［1〜3］。本研究では心臓線維芽細胞がなぜ活性化するのか、その分子病態を解明することで、心臓線維化・拡張不全に対する治療法開発へと繋げることを目的として下記研究を行った。

方法および結果

1. 線維芽細胞活性化における虚血環境の役割を明らかにする（計画 1）

線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を用いて、虚血環境がコラーゲン産生に与える影響を解析した。虚血環境を再現するために、1. 低酸素負荷 (21% O_2 or 1% O_2)、2. 無血清負荷、3. 低酸素＋無血清負荷の条件で細胞を培養した。NIH3T3 細胞培養上清に含まれる可溶性コラーゲンにつき、シリウスレッド染色で定量計測を行った。その結果、低酸素、無血清負荷はいずれも培養上清中のコラーゲン量を増加させること、また低酸素・無血清培地の環境では上清中のコラーゲン量が著しく増加することが判った（図 1a)。

次に NIH3T3 細胞における I 型コラーゲン発現を免疫細胞染色法にて検討した。その結果、シリウスレッド染色で得られた知見と同様に、低酸素・無血清培地の環境で NIH3T3 細胞における I 型コラーゲン発現が増加していることを見出した（図 1b)。

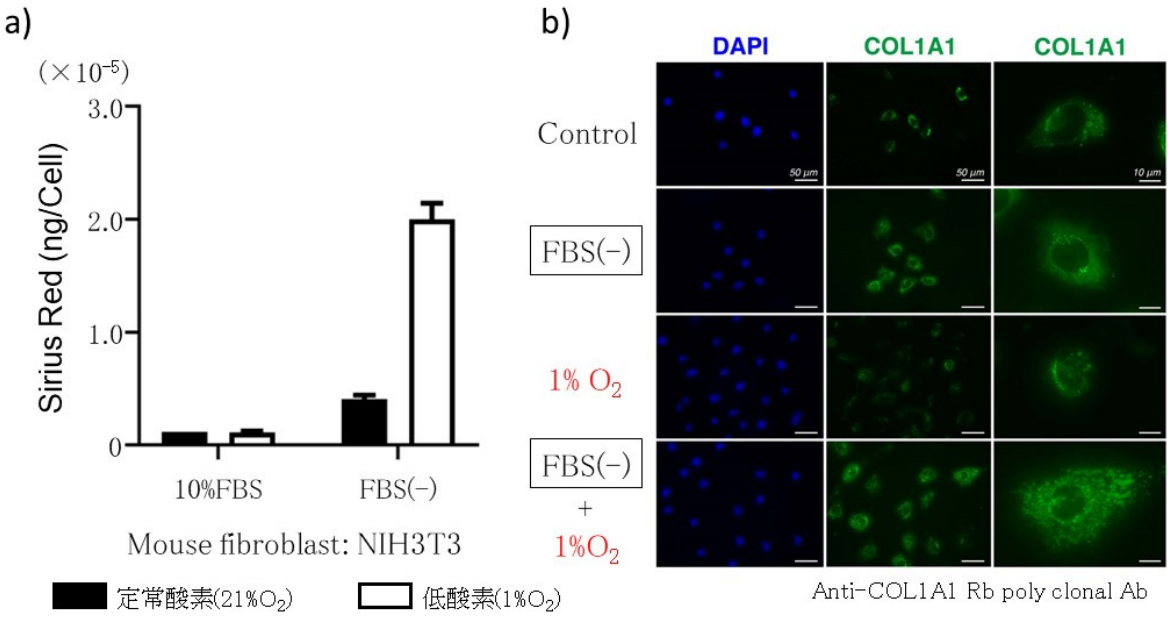


図 1. 虚血環境における線維芽細胞からのコラーゲン産生

a) NIH3T3 細胞から産生される可溶性コラーゲンの定量的解析。

b) 免疫細胞染色による NIH3T3 における I 型コラーゲン発現解析。

スケールバー：50μm（左列、中列）、10μm（右列）。

2. 心臓線維芽細胞活性化の分子機構を探索する（計画 2）

心臓線維芽細胞の活性化プロセスを明らかにするために、線維芽細胞の活性・コラーゲン産生をリアルタイムに検出できるレポーター細胞が必要であると考えた。そこで I 型コラーゲンプロモーター下に GFP を発現するマウス（Collagen-GFP、Col-GFP）より初代心臓線維芽細胞を単離・培養した。次にレトロウイルスを用いて SV40 を導入し、初代心臓線維芽細胞を不死化した。不死化した細胞をクローン化し、その活性を GFP シグナル強度として検出できる細胞株（B1-1）を樹立した（図 2a）。

次にレンチウイルスを用いてプール型 shRNA library を導入するスクリーニング系を樹立した。B1-1 細胞にスクリーニング系を用いた検討を行い、shRNA の導入を示す RFP 発現が誘導されていることを確認した（図 2b）。その結果、shRNA library の導入により GFP シグナルが増強（減弱）した、即ちコラーゲンプロモーター活性が増加（減少）する細胞の亜集団を同定、回収することが出来た。引き続きこれら GFP シグナルが増強（減弱）した細胞に導入された shRNA が標的とする細胞内シグナルの探索を行うことで、心臓線維芽細胞の活性調節に関わる細胞内シグナルの解明へと応用できると考えられる。

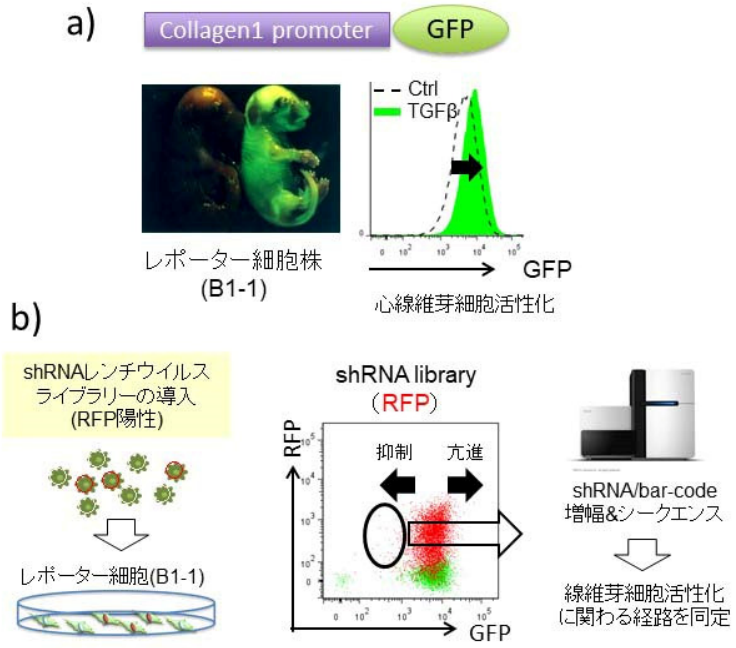


図 2. 心臓線維芽細胞活性化の細胞内シグナル探索

a）心臓線維芽細胞レポーター細胞（B1-1）の樹立。

b）プール型 shRNA library を用いた細胞内シグナル探索。

考　察

心筋細胞など多くの実質細胞の機能は低酸素環境で低下し、あるいは細胞死が引き起こされる。そのため酸素や栄養素はこれまで細胞生存に必要不可欠であると考えられてきた。本研究において研究代表者は心臓の間質を形成する線維芽細胞が低酸素・低栄養という飢餓的環境下でも生存することが可能であること、更にこのような環境でむしろ活性化し、より多くのコラーゲンを産生することを見出した。上記結果は“酸素は細胞生存に必須である”との従来の常識では説明できない知見であり、線維芽細胞における酸素パラドクスの存在を示していると考えられる。引き続き線維芽細胞における酸素パラドクスの分子実態を明らかにすることで、心臓線維化、拡張不全に対する治療法開発へと繋げることができると期待される。

文　献

1） Abe H, Takeda N, Isagawa T, Semba H, Nishimura S, Morioka MS, et al. Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. Nat Commun. 2019;10(1):2824. Epub 2019/06/30. doi: 10.1038/s41467-019-10859-w. PubMed PMID: 31249305; PubMed Central PMCID: PMCPMC6597788.

2） Goodwin J, Choi H, Hsieh MH, Neugent ML, Ahn JM, Hayenga HN, et al. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1alpha/Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Axis by Dichloroacetate Suppresses Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018;58(2):216-31. Epub 2017/09/16. doi: 10.1165/rcmb.2016-0186OC. PubMed PMID: 28915065; PubMed Central PMCID: PMCPMC5805994.

3） Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, et al. HIF-1alpha-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. Nat Commun. 2016;7:11635. Epub 2016/05/18. doi: 10.1038/ncomms11635. PubMed PMID: 27189088; PubMed Central PMCID: PMCPMC4873978.