

伸展刺激による心臓線維芽細胞の分化制御機構の解明

小尾正太郎

獨協医科大学 研究支援センター

【研究の背景】

心臓における線維化は、線維芽細胞とその分化形態である筋線維芽細胞が化学的・機械的刺激に応答して產生する細胞外基質の過剰な蓄積に起因し、心不全、不整脈、心筋症などを誘発する。今まで化学的刺激による線維芽細胞の活性化や分化に関して多くの報告はあるが、臨床的にはまだ十分な線維化抑制効果は報告されていない。さらには、機械的刺激が線維芽細胞に及ぼす効果に関してはよくわかっていない。心筋細胞の肥大には、TRP チャンネルの活性化による細胞内へのカルシウム流入、カルシニューリンの活性化、転写因子 NFAT の脱リン酸化および核内への移行、心筋成長因子やリモデリング関連遺伝子の発現増大が関与している。また、伸展張力による心筋細胞の肥大には、TRPC6 チャンネルの活性化が重要である(Spassova MA、2006)。近年、心臓の線維芽細胞に伸展張力を負荷すると、カルシウムが細胞内に流入し(Kiseleva I、1996)、平滑筋アクチンの出現(Wang J、2000、2003)や BNP の発現が増大する(Watson CJ、2012)ことが報告されている。そこで、心臓の線維芽細胞が伸展張力に応答して筋線維芽細胞に分化する機序として TRP チャンネルの活性化が関与していると仮定し、以下の実験を行なう。

【目的】

伸展張力が心臓筋線維芽細胞の分化に及ぼす効果について、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。

【方法】

培養細胞は、市販のヒト心臓（筋）線維芽細胞を使用した。伸展張力は、伸展張力負荷装置を用いて筋線維芽細胞に伸展率 0-15%、伸展頻度 0.5Hz の伸展刺激を最長 48 時間負荷した。細胞内カルシウム流入量の変化を Fura2 を用いた 2 波長励起法で計測した。蛋白の発現レベルをウェスタンブロッティングで検討し、遺伝子の発現を PCR および real time-PCR で検討した。

【結果】

- ① ヒト心臓線維芽細胞に伸展率 5%あるいは 15%、伸展頻度 0.5Hz の伸展張力を 48 時間負荷すると、コラーゲン I A、ファイブロネクチン、BNP の蛋白発現レベルが伸展張力の強さ（伸展率）依存性に有意に減少した。また、伸展刺激 12 時間及び 24 時間ではコラーゲン I A とファイブロネクチンの発現レベルは静的条件と比べて変化なかったが、BNP に関しては 12、24、48 時間と時間依存性に発現レベルが有意に減少した。一方、 α SMA の発現レベルは伸展刺激 12 時間後と 24 時間後に有意に減少したが、48 時間後では静的条件と比べて変化なかった。
- ② ヒト心臓線維芽細胞に伸展率 15%、伸展頻度 0.5Hz の伸展張力を 12 時間および 24 時間負荷すると、BNP の遺伝子発現レベルは有意に減少し、コラーゲン I A、ファイブロネクチン、 α SMA の遺伝子の発現レベルも減少傾向を示した。一方、同様の伸展刺激を 48 時間負荷すると、 α SMA の遺伝子発現レベルは有意に増大し、コラーゲン I A、

ファイブロネクチン、BNP の発現レベルは静的条件と変化しなかった。

- ③ ヒト心臓線維芽細胞に伸展率 15%、伸展頻度 0.5Hz の伸展張力を 10、20、30、60、120 分負荷して TGF β R2 と SMAD2 のリン酸化を検討したところ、伸展刺激 30 分後より TGF β R2 のリン酸化は有意に増大した。一方、SMAD2 のリン酸化は伸展刺激 20 分後より有意に減少した。
- ④ ヒトにおいて発現を確認されている TRP ファミリー 27 遺伝子のうちヒト心臓線維芽細胞で発現を認める遺伝子を PCR で検討したところ、TRPC1、C4、C6、M4、M7、A1、V1、V2、V4、P2、ML1、ML2、ML3 の 13 遺伝子を確認した。
- ⑤ ヒト心臓線維芽細胞に伸展率 15%、伸展頻度 0.5Hz の伸展張力を 12 時間負荷して上記 TRP13 遺伝子の発現レベルを検討すると、TRPM4 と TRPV4 の遺伝子発現レベルが有意に減少し、TRPML1 の発現は有意に増加した。他の遺伝子は伸展刺激で変化しなかった。一方、同様の伸展刺激を 48 時間負荷すると、TRPM4、V1、V4、P2、ML1 の発現レベルが有意に増大した。
- ⑥ ヒト心臓線維芽細胞に TRPV4 の作動薬である GSK1016790A を加えると、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。

【考 察】

- ① ヒト心臓線維芽細胞に伸展刺激を負荷すると、伸展率 15%、伸展頻度 0.5Hz、伸展時間 24 時間までの強さの伸展刺激の範囲内では、ヒト心臓(筋)線維芽細胞を脱分化させることができた。一方、伸展刺激を 48 時間負荷すると分化誘導させていることが分かった。伸展負荷の時間による相違の原因は、培養液の変化(48 時間では培養液中の脱分化関連サイトカイン・成長因子が減少してしまう、あるいは分化関連因子が増大する)と、わずかではあるが流れずり応力による影響が関与していると考えられる。今後、培養液中の FBS の濃度を変化させて同様の実験をすること、および流れずり応力がヒト心臓線維芽細胞に及ぼす効果に関して検討する必要がある。
- ② ヒト心臓筋線維芽細胞が伸展張力を感知する分子として TRPV4 が予想された。今後、TRPV4 の過剰発現およびノックダウンを検討する必要があり現在準備をしている。また、TRPM4 の作動薬が存在しないために細胞内カルシウムレベルを検討できなかったが、TRPM4 も今後検討する必要がある。
- ③ 伸展刺激を TRP が感知してヒト心臓線維芽細胞を脱分化させる機序に関して TGF β R2/SMAD2 のシグナルおよびカルシニューリンの関与に関して明らかにする必要がある(現在検討している)。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ヒト心臓線維芽細胞に伸展張力を負荷すると、脱分化が誘導されることが分かった。すなわち、伸展張力が生理的な状態から減少すると線維芽細胞が筋線維芽脂肪に分化誘導することが確認された。臨床においては、心筋梗塞により心臓の伸展率が減少すると線維化が生じてリモデリングが進行する。今後、伸展張力が心臓線維芽細胞に及ぼす効果やその機序を詳細に検討することは、新たな治療の開発につながると期待される。