

非心筋細胞の心不全病態及び多臓器連関における役割の全貌解明とそれに基づく新規治療法開発

小室 仁

慶應義塾大学医学部 循環器内科

【研究の背景】

心不全(HF)の患者数は世界的に増加しており、HF は加齢による死因の中で最も多いものの一つである¹⁾。心肥大は血行力学的過負荷に対する代償反応として形成され、壁応力を減少する。しかし、長期にわたる過負荷は、左室の拡張や線維化などの心筋リモデリングを伴う心機能障害を誘発し、最終的にはHFに至る。カルシウム動態の異常²⁾、アドレナリン受容体の過剰活性化³⁾、アポトーシス⁴⁾、心筋細胞(CM)におけるDNA損傷^{5,6)}など、HFのメカニズムに関する研究は数多くなされているが、HFの複雑な病態生理はまだ完全には解明されていない。

CMは心臓を形成する細胞の20~30%を占めるに過ぎず、70%以上は内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、血液細胞などの非心筋細胞である⁷⁾。このことは、非心筋細胞がHF発症において極めて重要な役割を果たす可能性を示唆している。非心筋細胞の中でも、心臓線維芽細胞(CF)は、CMを含む複数の細胞種と強く相互作用している⁸⁾。しかし、CFは、特に心筋梗塞(MI)後の線維化という観点から主に研究されてきた。CFは心筋梗塞後に活性化され、瘢痕を安定化させるために多くの種類の細胞外マトリックスタンパク質を発現する⁹⁾。著明な線維化は不全心においても観察され¹⁰⁾、左室の硬さを増加させることによって拡張機能障害に関与していることが報告されているが¹¹⁾、CFがCMに影響を与えるか、あるいは収縮機能障害を引き起こすかどうかは不明である。本研究では、マウスの心臓に圧負荷を与え、単一細胞RNA-seq(scRNA-seq)を行ったところ、不全心においてCFは不均一であり6つのサブグループに分かれることが判明した。その中で心不全期に特異的に出現するCFが存在すること、さらにそのCFにのみ転写因子Mycが高発現していることを発見した。そこでこの心不全特異的線維芽細胞におけるMycの役割を明らかにするために、CF特異的Myc KOマウスとMyc OEマウスを作成した。圧負荷による心不全を誘導したところ、WTマウスに比較してOEマウスにおいて心機能の低下が顕著となり、逆にKOマウスでは心機能の低下が抑制された。次に、Mycを発現するこの心不全特異的線維芽細胞が心不全の病態に関与するメカニズムを解明するためにWT shamマウスとWT TACマウス、CF特異的Myc KO TACマウスの心臓のRNA-seqを行い、発現変動遺伝子のパスウェイ解析の結果からCFとCMのinteractionが病態に関与していることが示唆された。そこで、RNA-seqのデータとscRNA-seqのデータと合わせて液性因子の絞り込みを行うと、Cxcl1というケモカインが候補因子として見つかり、ChIP qPCRや*in vitro*の実験を行うことでMycがCxcl1をCF内で直接のターゲットとして発現を上昇させ、CFから分泌させることでCMに発現するCxcl1の受容体に作用して心不全を引き起こすことを示した。

【目 的】

そこで申請者は、上記の結果をヒトの検体(心不全患者)でも検証することとし、さらに、心不全期にCFにおいてどのようなメカニズムでMycの発現が上昇するのか、また、CFとCMの間でのinteractionの後、どのようにして心不全の病態に関与するのかなどCFによる心不全病態への関与の全貌を解明し、新たな心不全の治療法を開発することを目的とした。

【方 法】

1) ヒトにおけるMYC-CXCL1経路の検証

これまでマウスで示された、MYC-CXCL1経路を介したCFとCMのinteractionが心不全の病態に関与することをヒトの

心不全患者においても認められることを検証するため、健常者と拡張型心筋症 (DCM) 患者の心筋生検サンプルを用いて、単核 RNA-seq (snRNA-seq) と単一分子蛍光 In-situ ハイブリダイゼーション (smFISH) を行った。

2) 心臓線維芽細胞において Myc を発現する上流機序探索

不全心における CF で Myc の発現が上昇するメカニズムとしては、メカニカルストレスや酸化ストレス、アンジオテンシン II やエンドセリンなどの神経体液性因子やサイトカインによるものが考えられる。そこでメカニカルストレスによる影響を見るため、CF を初代培養し、1.5ml チューブに回収後、2000rpm 20 分で遠心して機械的なストレスを与え¹²⁾、その後 RNA を回収して遺伝子発現を検証した。また、低張ストレスで物理的に細胞膜を膨張させる方法¹³⁾でも同様に RNA を回収して遺伝子発現を検証した。さらに、酸化ストレスについては H₂O₂、神経体液性因子についてはアンジオテンシン II とエンドセリンを CF に添加し、その後 RNA を回収して遺伝子発現を検証した。最後に、炎症に関与する細胞が分泌するサイトカインのうち線維芽細胞に作用しうるもので、既報にて Myc を発現上昇する可能性があるサイトカインを絞り込み、CF に添加し、その後 RNA を回収して遺伝子発現を検証した。

3) 心臓線維芽細胞と心筋細胞の間での interaction 後の経路探索

Cxcl1 の受容体は G タンパク質共役受容体の G α i/o と結合することが知られているので、Cxcl1 は受容体 Cxcr2 を介して Src/Ras/Raf/MEK/ERK 経路を活性化することが予想されたので、リン酸化 ERK の活性化を western blot で検証した。

【結 果】

1) ヒトにおける MYC-CXCL1 経路の検証

snRNA-seq では、マウスと同様に、ヒトのサンプルでも心不全患者の CF には不均一性を認め、健常者と比較して CF のうち MYC を発現している細胞の割合は心不全で増加した。また、smFISH と免疫染色にて MYC-CXCL1 陽性 CF を確認したところ、心不全の心臓では有意に MYC-CXCL1 陽性 CF の割合が多かった。

2) 心臓線維芽細胞において Myc を発現する上流機序探索

まず、我々は心臓線維芽細胞を遠心する、低張液または水で培養することによってメカニカルストレスを与えたが、Myc の発現は control の CF に比べて有意な上昇は認められなかった。次に、酸化ストレスを与えるために H₂O₂ 0.6mM を、神経体液性因子による影響をみるために Ang II 5 μ M、ET-1 1 μ M を CF に添加したところ、いずれの条件でも有意に Myc の発現は上昇しなかった。最後に、炎症に関与する細胞が分泌するサイトカインのうち線維芽細胞に作用しうるものとして TNF- α 、TGF- β 、PDGF、X、IL-6、IL-13 を CF に添加したところ、X のみ有意に Myc の発現を上昇させることがわかった。

3) 心臓線維芽細胞と心筋細胞の間での interaction 後の経路探索

新生仔ラットの初代培養心筋細胞に Cxcl1 を添加し 24 時間後にタンパク質を回収したサンプルと、Cxcl1 と共にその受容体 Cxcr2 の中和抗体を添加し 24 時間後にタンパク質を回収したサンプルを用いて western blot を行った。結果は、Cxcl1 によって pERK の活性化が起こり、Cxcr2 の中和抗体でその活性化が抑制されることを確認した。

【考 察】

ここまでの研究によって、心臓への負荷に反応して心臓線維芽細胞で Myc の発現が上昇する結果、発現上昇し分泌された Cxcl1 が心筋細胞の Cxcr2 に作用して心不全が惹起される。Myc の発現上昇の原因としては、何らかの細胞が分泌する X の可能性が考えられた。

これまで心不全の研究では、心筋細胞に着目して研究が行われることが多かったが、このように不全心では心筋細胞だけではなく、線維芽細胞などの非心筋細胞も相互作用しながら心不全の病態に関与していることが示唆された。

今後は、心不全時に X を分泌している細胞を同定するとともに、抑制することによって X の心不全における役割を解明していく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、これまで心筋細胞中心に捉えられてきた心不全の病態に対し、非心筋細胞である CF が Myc-Cxcl1-Cxcr2 経

路を介して心筋細胞機能を直接障害する新しい分子機構を明らかにした点に臨床的意義がある。これにより、心不全の進展を抑制するための新たな治療標的として CF およびその分泌因子を位置づけることが可能となった。さらに、心不全患者心筋においても同経路が確認されたことから、マウス実験の知見がヒト病態に外挿可能であることが示され、従来の心筋細胞を標的とする治療を超えた新規分子標的治療の開発につながると期待される。また、今後この経路の上流因子や関連液性因子の解明を進めることで、心不全の個別化治療・予防戦略の確立に貢献する可能性が高い。

【参考・引用文献】

1. Braunwald, E. The war against heart failure: The Lancet lecture. *The Lancet* 385, 812-824 (2015).
2. Kho, C., Lee, A. & Hajjar, R. J. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling – Targets for heart failure therapy. *Nat Rev Cardiol* 9, 717-733 (2012).
3. Mudd, J. O. & Kass, D. A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928 (2008).
4. R. Sanders Williams, M. D. APOPTOSIS AND HEART FAILURE. *N Engl J Med* 341, 759-760 (1999).
5. Higo, T, Naito, A, Sumida, T. *et al.* DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun* 8, 2-5 (2017).
6. Nakada, Y, Nhi Nguyen, N, Xiao, F. *et al.* DNA Damage Response Mediates Pressure Overload-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation* 139, 1237-1239 (2019).
7. Pinto, A. R, Ilinykh, A, Ivey, M. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res* 118, 400-409 (2016).
8. Ko, T, Fujita, K, Nomura, S. *et al.* Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure via Htra3-TGF- β -IGFBP7 axis. *Nat Commun* 13, 1-17 (2022).
9. Fu, X, Khalil, H, Kanisicak, O. *et al.* Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *Journal of Clinical Investigation* 128, 2127-2143 (2018).
10. Aghajanian, H, Kimura, T, Rurik, J. *et al.* Targeting cardiac fibrosis with engineered T cells. *Nature* 573, 430-433 (2019).
11. González, A., Schelbert, E. B., Diez, J. *et al.* Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 71, 1696-1706 (2018).
12. Morikawa, T, Matsuzaka, K, Nakajima, K, *et al.* Dental pulp cells promote the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, prostaglandin E₂ and substance P in mechanically stressed periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 2016 Oct;70:158-164.
13. Pan L, Zhang P, Hu F, *et al.* Hypotonic Stress Induces Fast, Reversible Degradation of the Vimentin Cytoskeleton via Intracellular Calcium Release. *Adv Sci (Weinh)*. 2019 Jul 22;6(18):1900865.