

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 水流 宏文
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1069 号
学位授与の日付 令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Cardiac fibroblasts play pathogenic roles in idiopathic restrictive cardiomyopathy.
(心筋線維芽細胞は拘束型心筋症の病因に寄与している)

論文審査委員 主査 教授 猪又 孝元
副査 教授 土田 正則
副査 特任教授 高橋 昌

博士論文の要旨

<背景と目的>

拘束型心筋症は、心室の収縮能や壁厚が保たれる一方で拡張能が障害されることが特徴であり、心室拡張末期圧上昇に伴ううっ血により臨床症状が誘発される。拡張障害に対する治療は確立されておらず、小児期発症の拘束型心筋症の予後は不良である。心筋症の病因は多様であり、現在まで多くの病因が研究されてきており、MYH7 や TNNI3 などの心筋構成蛋白の遺伝子異常が発症に寄与していることが報告されている。しかしながら、原因遺伝子が同定される症例が 25~50%と限られていること、遺伝子変異と心筋症の表現型とが一致しないことが知られており、心筋症の病因すべてを心筋の遺伝子変異では説明できないと考える。正常心臓は心筋細胞以外の細胞からも構成されており、そのうち心筋線維芽細胞は全細胞数の 60%と最多を占める間葉系細胞である。心筋線維芽細胞は化学的、電氣的、機械的刺激に反応して心筋細胞の挙動に影響を与え、正常の心機能維持に関与するのみならず疾患にも影響していることが知られている。虚血性心疾患や高血圧モデルを中心に研究が行われてきたが、心筋症における心筋線維芽細胞の機能ならびに病態関与については十分に分かっていない。申請者らは小児拘束型心筋症患者から得た心筋線維芽細胞を用い、生理学的特徴および RNA 転写解析を行った。加えて、正常心筋細胞との共培養実験により心筋線維芽細胞と心筋細胞との相互作用を評価した。

<方法>

拘束型心筋症患者が心臓移植もしくは補助人工心臓植込みを受けた際に得られた心臓組織を用い、初代培養、継代して実験に用いた。拘束型心筋症サンプル 4 例と購入した正常サンプル 3 例を比較検討した。細胞生理機能の評価として、増殖能、アポトーシス、筋線維芽細胞への転換、遊走能、接着能を解析した。増殖能は EdU 試薬を用い、24 時間培養した後に細胞画像解析装置で計測した。アポトーシスおよび筋線維芽細胞への転換は、低酸素ならびに血清除去による負荷を行い、カスパーゼ 3 抗体と α -SMA 抗体を用いて細胞画像解析装置で計測した。遊走能はフルコンフルエントに細胞培養した培養皿に対してピペット先端でスクラッチし、12 時間後に間隙への細胞遊走を計測した。接着能は 5×10^3 個の細胞を播種し、4 時間後に細胞皿に接

着した細胞数を計測した。心筋細胞との共培養実験には単離したラット心筋細胞を用いた。心筋線維芽細胞と心筋細胞とを直接接着させた共培養、インサートを用いて培養液を共有させた間接的な共培養の2種の方法で共培養した。48時間共培養させた後、モーションアナライザーを用いてベクトル化した心筋細胞の動きを解析し、リアルタイムPCRを用いて心筋細胞のRNA発現解析を行った。モーションアナライザーでは拍動数、収縮速度、拡張速度を評価した。患児の遺伝子解析として末梢血から抽出したDNAに対して全エクソーム解析を行い、心筋症と関連のある既知の257遺伝子の変異の有無を評価した。心筋線維芽細胞のRNA発現解析を次世代シーケンスを用いて解析した。単離培養した心筋線維芽細胞からRNAを抽出し、iDEPで解析した。

<結果>

拘束型心筋症患児の診断時年齢は8カ月から7歳であり、二次性心筋症および心外膜炎を各種検査により除外した。全エクソーム解析では4例中3例でTNNI3変異を認め、残りの1例では既知の遺伝子変異は同定されなかった。増殖能、アポトーシス、筋線維芽細胞への転換、遊走能、接着能は疾患群とコントロール群とで有意差を認めなかった。共培養実験の内、間接共培養では拍動数と収縮速度に有意差はなかったが、拡張速度は疾患群において有意に低下していた。直接共培養では拍動数における有意差はなかったが、収縮速度および拡張速度において疾患群で有意な低下を認めた。リアルタイムPCRでは直接共培養、間接共培養いずれにおいても有意差を認めなかった。RNAシーケンスでのヒートマップおよびK-means解析では疾患群とコントロール群で異なる発現パターンを呈していた。パスウェイ解析では細胞接着、発生、細胞外マトリックスにおける発現が疾患群で亢進していた。疾患群の内、TNNI3変異の有無による明らかな差異は見られなかった。個別遺伝子においては、疾患モデルで関与が報告されている遺伝子であるITGA11、COL16A1の発現が疾患群で亢進していた一方、心筋細胞のホメオスタシスに関わる遺伝子であるFGF5、CXCL12の発現が低下していた。

<考察>

本研究で申請者らは拘束型心筋症患者から得た心筋線維芽細胞は異なる遺伝子発現パターンを呈していること、分泌物によるパラクライン効果と直接の細胞間相互作用によって正常心筋細胞の拡張能を悪化させることを示した。また、遺伝子発現パターンがTNNI3遺伝子変異の有無で変わらないことを示した。3症例が有していたTNNI3変異はアクチン-ミオシン相互作用においてカルシウム感受性を上昇させることが報告されており、拡張能の障害につながると考えられる。細胞生理機能と遺伝子発現パターンが患者間で変わらなかったことから、遺伝子変異ではなく、血行動態の異常あるいは心筋細胞と心筋線維芽細胞との相互作用が心筋線維芽細胞の性質に寄与していると推測した。心筋線維芽細胞は足場として機能することでホメオスタシスに寄与していることに加え、細胞外基質やサイトカインの異常が病態に関連していることが既報で報告されている。申請者らの結果ではITGA11、COL16A1、TGFBI、MMP2、COL1A1の発現が疾患群で亢進していた。一方でFGF5、CXCL12、MMP1、IL33の発現が疾患群で低下していた。発現が亢進していた遺伝子群の一部は分泌蛋白をコードしており、既報での疾患モデルにおいて病因との関連が報告されている。発現が低下していた遺伝子群は線維化の抑制や心保護に関連していることが報告されている。本研究で特定のシグナルや分子を明らかにすることはできなかったが、上記遺伝子発現の変化が心筋症に寄与している可能性が考えられた。リミテーションとしては、ラットの心筋細胞を用いた点、心筋線維芽細胞が異質な細胞集団であり本研究の遺伝子発現の変化が特定の細胞集団によるものかを明らかにできていない点があげられた。これらを解明するためにさらなる研究が必要だが、心筋線維芽細胞が心筋症の新たな治療ターゲットになる可能性があると考えられた。

審査結果の要旨

拘束型心筋症は、心室の収縮能や壁厚が保たれる一方で、拡張能が障害されることが特徴である。TNNI3 などの遺伝子変異が病因として報告されているが、変異が同定される症例が限られていること、遺伝子変異と心筋症の表現型とが一致しないことから、心筋症の病因すべてを心筋の遺伝子変異のみでは説明できないと考え、心筋線維芽細胞に着目した。心筋線維芽細胞は足場としての機能に加えて心機能維持や疾患への関与が報告されているが、心筋症における機能は十分に解明されていない。本論文では小児患者から得た心筋線維芽細胞を用い、細胞生理機能解析、心筋細胞との共培養実験解析、RNA 転写解析を行い、拘束型心筋症における心筋線維芽細胞の生理機能と病態への関与を研究した。コントロールとの比較検討で、細胞生理機能には有意差を認めなかったが、心筋細胞との共培養実験では拡張能の有意な低下を認めた。心筋線維芽細胞の RNA 発現は明らかに異なっていた。各結果が TNNI3 変異の有無で変わっていなかったことから、血行動態の異常により心筋線維芽細胞の性質が変異し、パラクライン効果と直接の細胞間作用により心筋細胞の挙動を変化させたと考察された。

本論文は学位論文としての価値があると評価する。