

# Single cell解析に基づく心不全特異的な線維芽細胞集団を 標的とした心不全の新規治療戦略

慶應義塾大学医学部 循環器内科  
小室 仁

(共同研究者)

|                 |      |       |
|-----------------|------|-------|
| 慶應義塾大学医学部 循環器内科 | 助教   | 橋本 寿之 |
| 慶應義塾大学医学部 循環器内科 | 助教   | 楠本 大  |
| 慶應義塾大学医学部 循環器内科 | 専任講師 | 湯浅 慎介 |

## はじめに

人類最大の死因の一つである心不全には、治療抵抗性の心不全が存在し新規治療法の確立が待望されている。心不全研究は多く行われてきたが、ほとんどは心筋細胞に関する研究が中心であったが、近年心臓の支持細胞の中心である線維芽細胞の役割の重要性が注目されている。例えばマウスでは心筋梗塞を発症すると心臓線維芽細胞が活性化され、心筋梗塞の病態に関与することが報告されている。一方、心不全においても病気の進行に線維化が関与することは知られているが、線維芽細胞が心不全発症時にどのように変化をするか、またどのように心不全の病態に関与するかは明らかにされていない。申請者は網羅的遺伝子発現解析 (single cell RNA-seq: scRNA-seqやRNA-seq) を用いることでマウスの心臓線維芽細胞には不均一性があり、心不全期特異的に出現する線維芽細胞集団を発見した。その細胞集団特異的に発現している転写因子c-Mycには心保護作用があることが推測された。本研究は心臓線維芽細胞に発現するc-Mycの心臓における役割を解析し、心臓線維芽細胞が心不全の治療標的になり得るかを検証する。

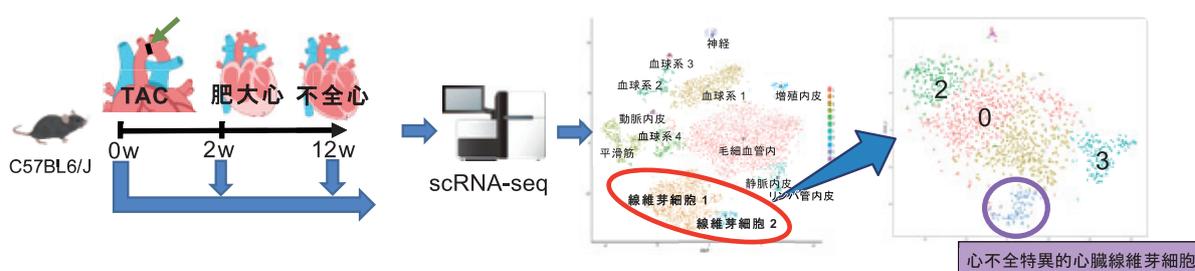
心臓線維芽細胞が心不全の病態にどのように寄与しているかをエピジェネティクス解析及び動物モデル解析により明らかにすることで、本研究成果は今まで心筋細胞の疾患であると考えられていた心不全の疾患概念を大きく変える可能性を秘めている。また、心不全の病態に大きく関わる線維化の分子機序を解明することにより、心不全特異的な心臓線維芽細胞の発生過程や特徴的な遺伝子発現を標的として、線維化を抑制するという心不全の新たな治療選択肢が提唱できる。また、線維芽細胞の遺伝子発現パターンを基に心不全の病期を新たな視点から定義することができるようになる。

## 結 果

まず、心筋梗塞時には線維芽細胞が線維化の進行に合わせて必要な役割を持った形態に分

化していたことから、心不全時にも理にかなった分化をすることを考えた。そこで心不全時に特異的に出現するような線維芽細胞の存在を探る目的に single-cell RNA-seq (scRNA-seq) を行った。マウスにTACを行い、健常状態のマウスとTAC後2週間程度の肥大心筋マウス、TAC後12週以降の不全心マウスを用意し、その心臓を摘出して細胞をバラバラにして非心筋細胞のみ抽出してから scRNA-seq を行った。TAC後、2週、12週と時間が経つにつれて心室体重比や心室脛骨長比が上昇し、AZAN染色と imageJ を用いた定量法でも線維化が増加していることを確認した。scRNA-seq で得られた結果から tSNE という次元削減法を用いて非心筋細胞を遺伝子発現に基づいて分類したところ、Pdgrf  $\alpha$  や Tcf21、Coll1a1 を発現している細胞である線維芽細胞は大まかに2種類に分かれた (図1)。さらに線維芽細胞のみを取り出して同様の方法で再分類したところ、健常心及び肥大心、不全心合わせて遺伝子発現の異なる6つの線維芽細胞集団が存在することがわかった。そのうち、心不全期の心臓でのみ出現する線維芽細胞集団が存在することを見出し、この細胞の解析を行うこととした (図1)。

図1 scRNA-seqによる心臓線維芽細胞分類までの実験スキーム

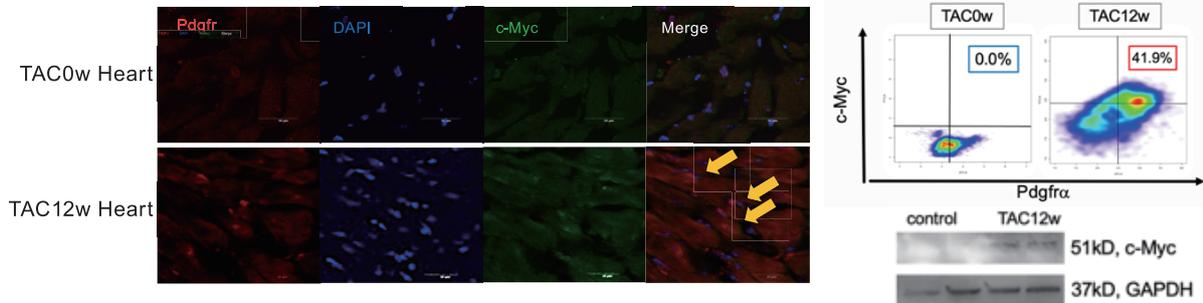


この細胞は、健常心及び肥大心では存在せず不全心でのみ出現する細胞であり、既報において傷害時に活性化された線維芽細胞で発現していた Postn は発現していたが、心筋梗塞時とは異なり、 $\alpha$ -SMA や骨軟骨系の遺伝子発現は見られず、心筋梗塞で出現する Myofibroblast や Matrifibrocyte とは異なる線維芽細胞であると考えた。また scRNA-seq のデータの解析からがん遺伝子である c-Myc がこの心不全特異的な心臓線維芽細胞において時期及び細胞特異的に発現していることがわかり、この心不全特異的な心臓線維芽細胞において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

そこでまずは、in silico にて見出したこの c-Myc 陽性の心不全特異的な心臓線維芽細胞の存在を in vivo で確認した。c-Myc の exon 2 に GFP を KI して c-Myc を標識したマウスを用いて免疫染色を行ったところ、TAC0w では存在していなかった c-Myc 陽性心臓線維芽細胞が TAC12w のマウスでは出現していることを確認した (図2)。また、TAC0w マウスと TAC12w マウスの心臓を摘出し FACS を行ったところ線維芽細胞マーカーの Pdgrf  $\alpha$  と c-Myc の double positive なグループを TAC12w でのみ認めた (図2)。さらに、TAC0w マウスと TAC12w マウスの心臓を摘出し心臓線維芽細胞のみを primary culture し、そのタンパク質を回収し Western blot したところ、タンパク質レベルでも c-Myc の発現が TAC12w

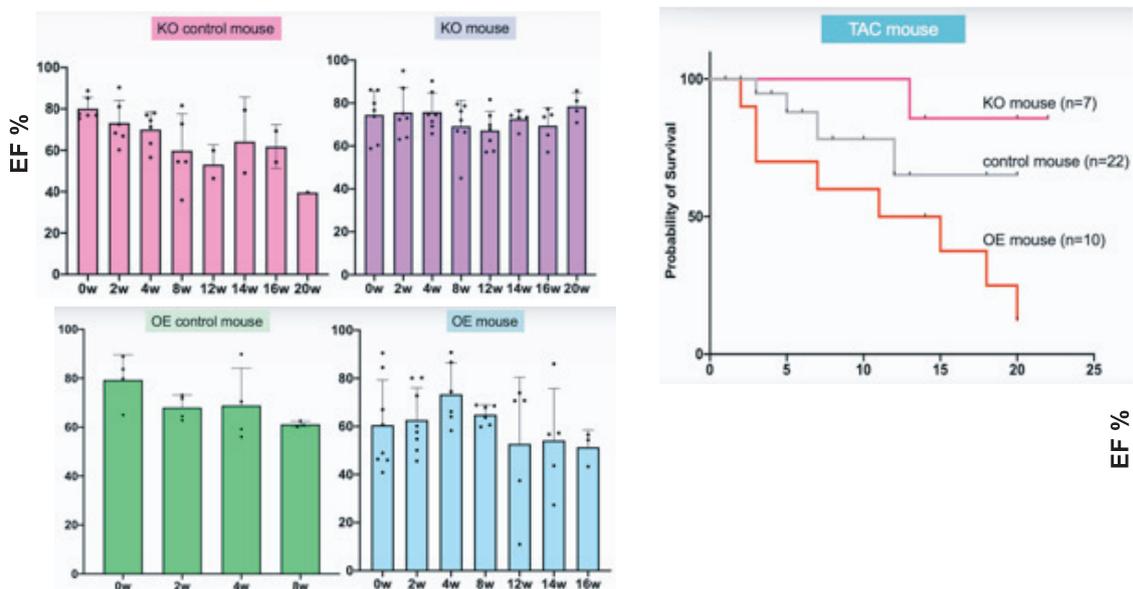
で特異的に認められた (図2)。ここまでの結果から、in silicoにて確認されたc-Myc陽性の心不全特異的心臓線維芽細胞は実際にマウスの心臓に存在することが示された。

図2 c-Myc陽性の心不全特異的心臓線維芽細胞の存在証明



次に、c-Myc陽性の心不全特異的心臓線維芽細胞の機能解析を行う目的で、c-Myc flox mouseとTcf21 iCre mouseを交配させることで心臓線維芽細胞特異的c-Myc KOマウスを、CAG promoter下にSTOP配列がloxPに挟まれていて、さらにその下流にc-Myc遺伝子が入っているマウスとTcf21 iCre mouseを交配させることで心臓線維芽細胞特異的c-Myc過剰発現 (OE) マウスを作成し、不全心の線維芽細胞におけるc-Mycの役割を検証することとした。Tcf21 iCre-c-Myc flox mouse及びTcf21 iCre-c-Myc STOP flox mouseにTACを施したのちにタモキシフェン (TAX) でCreを誘導してc-Myc KOとc-Myc OEをし、心機能や遺伝子発現を、TAXによる誘導をしていない各々の系統マウスのそれと比較した。その結果、TACを施したOE mouseにおいて心機能の低下がcontrolに比較して顕著となり、一方でTACを施したKO mouseでは心機能の低下が抑制された (図3)。また、生存曲線を

図3 c-Myc KO/c-Myc OEマウスのエコー所見 (左) と生存曲線 (右)

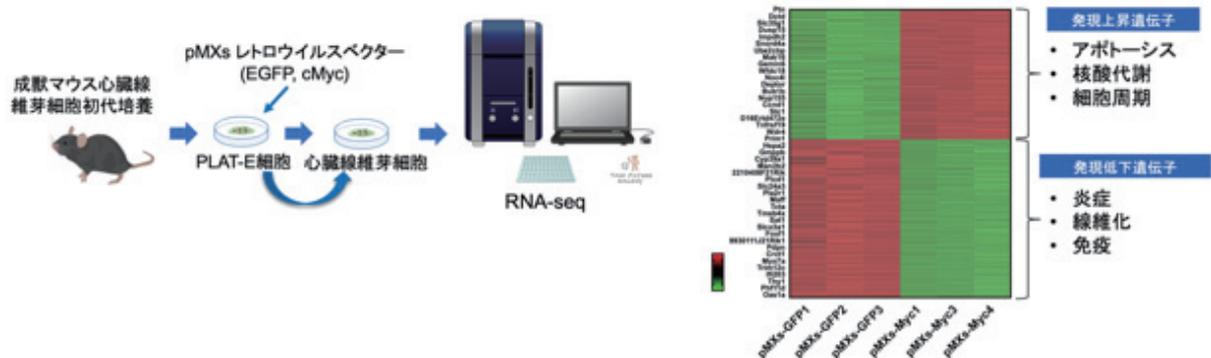


作成したところ、controlに比べてKO mouseは生存率が上昇し、OE mouseは生存率が著明に低下し、これはエコーの結果と矛盾しなかった(図3)。このことから線維芽細胞におけるc-Mycは何らかの機序で心機能を低下させ心不全増悪に働いていることが考えられた。

そこで今度はこれらの機序を解明する目的でin vitroの解析を行うこととした。成獣マウスの心臓を摘出し、心臓線維芽細胞のみを抽出して初代培養し、pMXsレトロウイルスベクターを用いてcMycをその成獣マウス心臓線維芽細胞に過剰発現させることとした。pMXsレトロウイルスベクターにPuromycineとc-Mycを導入したプラスミドをPLAT-E細胞に導入し、それを線維芽細胞に感染させた。感染後、Puromycineでselectionし純化した(図4)。

ここでc-Mycを過剰発現した心臓線維芽細胞とpMXsのc-Mycが入っていないベクターを導入したコントロール線維芽細胞の遺伝子発現をRNA-seqを用いて網羅的に比較したところ、c-Myc過剰発現細胞で有意に炎症及び線維化に関連する遺伝子群の発現の低下を認めた(図4)。このことからc-Myc陽性の心不全特異的心臓線維芽細胞は、in vitroにおいては心不全の進行を抑制するような働きをすることが予想された。しかし、これはin vivoの結果を矛盾するため、実際にはc-Myc陽性の心不全特異的心臓線維芽細胞は単独ではなく他の細胞と相互作用することで心不全の進行に寄与しているものと予想された。

図4 c-Myc 陽性心不全特異的心臓線維芽細胞の機能解析 (RNA-seq)



そこで、c-Myc陽性の心不全特異的心臓線維芽細胞が何らかの液性因子を分泌し心筋細胞に働きかけることで心不全の病態に寄与していると仮説を立てて、c-Mycを過剰発現した心臓線維芽細胞の培養液をconditional mediumとして心筋細胞に添加して培養し、心筋細胞の変化を観察することとした。

## 考 察

我々は今回の研究により、不全心に特異的に出現する心臓線維芽細胞集団を見つけ、その細胞集団ではc-Mycが特徴的に発現していることを見出した。さらに、その線維芽細胞においてc-Mycは心不全の進行に寄与していることが示唆された。その一方で、c-Mycを心

臓線維芽細胞で過剰発現させその遺伝子発現を網羅的に解析したところ、その細胞自体は炎症や線維化に関連した遺伝子群の発現が低下しており、心不全の進行を抑制する働きが予想される結果であった。

これらのことから、in vivoではc-Myc陽性心不全特異的心臓線維芽細胞は別の細胞と相互作用することによって心不全の進行に寄与しているという仮説が立てられた。そこで、今後はこのc-Myc陽性心不全特異的心臓線維芽細胞が何らかの液性因子を分泌し、それが心筋細胞に作用し心不全の進行、心機能の低下を引き起こす可能性を考え、液性因子の探索を行っていくこととしている。現時点では、文献的検索の結果、いくつかのサイトカインが心臓線維芽細胞から分泌され炎症細胞を惹起して炎症を引き起こし心不全の進行を促す可能性やmicro RNAが心臓線維芽細胞から分泌され、心筋細胞で胎児性遺伝子の発現が促進し、その結果心機能の低下を促す可能性が考えられ検証中である。

## **要 約**

不全心に特異的に出現する心臓線維芽細胞集団を見つけ、その細胞集団ではc-Mycが特徴的に発現していることを見出した。さらに、その線維芽細胞においてc-Mycは心不全の進行に寄与していることが示唆された。その一方で、c-Mycを心臓線維芽細胞で過剰発現させその遺伝子発現を網羅的に解析したところ、その細胞自体は炎症や線維化に関連した遺伝子群の発現が低下しており、心不全の進行を抑制する働きが予想される結果であった。

これらのことから、in vivoではc-Myc陽性心不全特異的心臓線維芽細胞は別の細胞と相互作用することによって心不全の進行に寄与しているという仮説が立てられた。

## **文 献**

1. Fu et al. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest.* 128 (5) :2127-2143, 2018.
2. González et al. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 71 (15) :1696-1706, 2018.
3. Macosko et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell.* 161, 1202–1214, 2015.
4. Guo et al. Single cell RNA analysis identifies cellular heterogeneity and adaptive responses of the lung at birth. *Nat Commun.* 10 (1) :37, 2019.
5. Wang et al. CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration. *European Heart Journal*, 39:1818–1831, 2018.
6. Glembotski et al. Functions for the cardiomyokine, MANF, in cardioprotection, hypertrophy and

- heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 143:120-131, 2020.
7. Li et al. c-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting Sprouty2. *J Biol Chem.* 288 (25) :18121-33, 2013.
  8. Nishi et al. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biol.* 31 (4) :744-55, 2011.