

心不全で特異的に出現する線維芽細胞の機能を解明する

小尾正太郎

獨協医科大学先端医科学研究センター

【研究の背景】

従来心不全の研究は心筋細胞を対象とし、様々な治療薬が開発されてきたが、現時点では心不全は増加し、予後が不良の心不全患者がいまだ多いのが現状である。このことは治療標的が発見されずに残っていることを示す。予備的研究でヒト心臓を構成する細胞をシングルセル RNA シークエンスを用いて健常者と心不全患者で検討したところ、心筋細胞の集団では遺伝子の発現変化はさほど変化がなかった。一方、線維芽細胞の集団では、心不全患者において筋線維芽細胞の細胞群のみが特異的に存在していた。また、筋線維芽細胞の集団では TRPV4 遺伝子を発現する細胞が特徴的であった。さらには、ノックダウン実験から TRPV4 が筋線維芽細胞の分化を制御していることが分かった。これらの結果から心不全では TRPV4 を発現する筋線維芽細胞が新たに出現しており、この細胞集団が心不全を誘導していると考えられた。

【目的】

筋線維芽細胞における TRPV4 の機能を解明する。

【方法】

細胞:ヒト心臓由来の線維芽細胞をコラーゲン I でコートした培養皿でペニシリン・ストレプトマイシン・アンフォテリシンB添加 10%FBS (GIBCO) /DMEM で 37°C、5%CO₂ で培養した。筋線維芽細胞への分化はウェスタンブロッティングで抗 aSMA 抗体で発現を確認した。

HEK293T 細胞を Poly-L-Lysine でコートした培養皿でペニシリン・ストレプトマイシン・アンフォテリシンB添加 10%非働化 FBS/DMEM で 37°C、5%CO₂ で培養した。

試薬:TRPV4 阻害剤として GSK2193874 を DMSO で溶解し、培養液の 1000 分の 1 量、最終濃度 5nM 添加した。

ベクター:hTRPV4 の cDNA を 3xFLAG ベクターに組み込んだ hTRPV4-3xFLAG を作成した。hARRB2 の cDNA を 6xHis ベクターに組みこんだ hhARRB2-6xHis を作成した。hARRB2 の cDNA を GST ベクターに組み込んだ hARRB2-GST を作成した。

GST 融合 hARRB2 蛋白:hARRB2-GST を大腸菌に感染させて GST 融合 hARRB2 蛋白を合成した。

過剰発現:hTRPV4-3xFLAG cDNA と hARRB2-6xHis cDNA を HEK293T 細胞に塩化カルシウム法で遺伝子導入した。

GST プルダウンアッセイ:hTRPV4 過剰発現蛋白と GST 融合 hARRB2 蛋白を反応させて Glutathione Sepharose 4B 下で回収した。

免疫沈降:hTRPV4-3xFLAG と hARRB2-6xHis をともに HEK293T 細胞で過剰発現した溶液を抗 FLAG 磁気ビーズあるいは抗 His 磁気ビーズをそれぞれ加えて回収した。

細胞質蛋白と核内蛋白の分離:細胞を回収し、細胞質分離溶液で細胞質分画を抽出し、残りを核内蛋白分離溶液で核内分画を抽出した。

ルシフェラーゼアッセイ:筋線維芽細胞に CTNNB1 リポーターベクターと TK ベクターをリポフェクション法で遺伝子導入し、発光強度を発光測定装置で測定した。解析は firefly 発光強度を Nano Luc 発光強度で除して求めた。

ノックダウン: hTRPV4-siRNA あるいは control-siRNA をリポフェクション法で筋線維芽細胞に遺伝子導入した。

RNA-シーケンス: 細胞から total RNA を抽出し、Poly A 選択 RNA を PCR し、ライブラリーを調整後 DNBSEQ-T7 シーケンサーを用いて配列を得た。この配列を RaNA-seq を用いてゲノム配列にマッピングし発現量を決定し、アノテーションを行った。

【結 果】

1. TRPV4 下流に関与する遺伝子の同定

TRPV4 ノックダウンにより RNA シーケンスを行った (N=3)。TRPV4 ノックダウンにより 50 遺伝子が発現増大し、2026 遺伝子が発現減少した (2 倍以上、 $P < 0.05$)。アノテーションでは、GO PATHWAY で Lysosome ($P = 6.61E-17$)、Metabolism ($2.18E-10$)、Extracellular matrix organization ($5.26E-9$)、Neutrophil degranulation ($7.58E-9$)、Innate immune system ($3.23E-7$)、Olfactory signaling pathway ($2.87E-6$)、Oxidative phosphorylation ($3.73E-6$) と続いていた。

2. TRPV4-ARRB2-CTTNB1 axis

TRPV4 下流の新規因子の同定を試みた。ARRB2 に結合する蛋白を質量分析計で計測すると TRPV4 が同定されたという報告がある¹⁾。そこで TRPV4 に ARRB2 が結合するのかどうか検討した。GST 融合 ARRB2 蛋白と TRPV4 蛋白が結合するか、プルダウンアッセイを用いて現在結合条件を検討している。また、ARRB2 蛋白と TRPV4 蛋白が結合するか、免疫沈降を用いて結合条件を検討している。次に TRPV4 刺激による ARRB2 の細胞内の分布の変化を検討した。TRPV4 阻害剤により細胞質の ARRB2 の発現量は変化がないが、核内の ARRB2 の発現量は減少した。ここで ARRB2 の下流に CTTNB1 が関与することが報告されている²⁾。そこで TRPV4 刺激による CTTNB1 の活性をリポーターアッセイで検討した。TRPV4 阻害剤により CTTNB1 の転写活性は減少した。以上より TRPV4-ARRB2-CTTNB1 シグナルにより筋線維芽細胞の分化が制御されていることが分かった。

【考 察】

筋線維芽細胞では TRPV4-ARRB2-CTTNB1 シグナルにより筋線維芽細胞の分化が制御されていることが新たに分かった。今後、TRPV4 と ARRB2 の結合や ARRB2 ノックダウン、さらには線維芽細胞特異的 TRPV4 欠損マウスによる心不全モデルを検討することにより、より詳細な心不全の機序が解明されると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回 TRPV4 の下流シグナルとして新たに ARRB2-CTTNB1 が関与することが分かった。今後は TRPV4 だけでなく ARRB2-CTTNB1 をターゲットとすることにより新たな心不全治療が開発されると期待できる。

【参考・引用文献】

1. Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, Yates JR 3rd, Lefkowitz RJ. Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 12011-6, 2007.
2. Wang L, Moonen JR, Cao A, Isobe S, Li CG, Tojais NF, Taylor S, Marciano DP, Chen PI, Gu M, Li D, Harper RL, El-Bizri N, Kim YM, Stankunas K, Rabinovitch M. Dysregulated Smooth Muscle Cell BMPR2-ARRB2 Axis Causes Pulmonary Hypertension. *Circ Res.* 132(5):545-564, 2023.