

高血圧により誘導される心臓、腎臓の線維化を促進する分子の機能解析とそれを標的とした新しい線維化治療法開発基盤の構築

仲矢 道雄

九州大学薬学研究院薬効安全性学分野

概要

食塩は、人々の心を豊かにする美味しい食事、さらには人間の生命の維持に必要不可欠である。その一方で食塩の過剰摂取は、高血圧の大きな要因の一つとなる。高血圧の発症により機能が特に低下する組織は、心臓および腎臓である。そして、この機能低下の主な要因は、それぞれの組織における線維化である。線維化とは、コラーゲンなどの細胞外マトリックス蛋白質が過剰に産生された状態であり、組織を硬くすること等により、組織の機能を大きく低下させる。

心臓においては、高血圧が進むと、心筋細胞の肥大が生じ、それら肥大した心筋細胞から、周囲に存在する線維芽細胞を活性化する種々の因子が放出される。そして、これら因子によって、線維芽細胞は、『筋線維芽細胞』へと分化し、コラーゲン等の細胞外マトリックス蛋白質を過剰に産生するようになり、心臓の線維化が進行する。一方で高血圧症患者は、慢性腎臓病を罹患するリスクが高いことも知られている。慢性腎臓病においては、その発症原因に関わらず、ほぼ全ての場合、腎臓の線維化を伴う。すなわち、腎臓においても高血圧により組織の線維化が誘導される。

従って、線維化の進行を抑制することができれば、高血圧時の心臓、腎臓の機能低下を抑制することが出来ると考えられる。しかしながら、未だ決定的な線維化制御法は無く、線維化に対する画期的な治療法、治療薬の確立が望まれている。そのような中、我々は心臓の線維化に関与する新たな分子として、FPF(Fibrosis promoting factor)を見出した。すなわち、我々はこれまでに線維化を呈する心筋梗塞モデル(左冠状動脈の狭窄術)マウスを用いて、

- (1) FPF が、正常時の心臓、腎臓にはほとんど発現せず、心臓、腎臓の線維化時に発現量が顕著に上昇する。
- (2) 心筋梗塞モデルを施したマウス心臓から単離した筋線維芽細胞において FPF をノックダウンするとコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質の産生量が有意に減少する。

ことを見出した。これらの結果から、FPF は心臓および腎臓の線維化を促進する重要な分子だと考えられる。

そこで本研究では、高血圧モデルマウスを作成し、そのマウスの心臓および腎臓の線維化においても FPF が線維化に関与するかについて検討を行い、FPF を標的とした新しい線維化治療法開発の礎を築くことを目的とした。

まず、Real time RT-PCR 法を用いて高血圧モデルマウスの心臓における FPF の発現量の変化を測定した。その結果、FPF は心肥大に伴って発現量が増加することが明らかとなった。そこでさらに FPF が腎臓の線維化時においてもその発現量が増加するかについて片側尿管結紮(UUO)法を用いた腎線維化モデルを用いて検討した所、心臓の場合と同じく線維化に伴って顕著な発現増加が認められた。

次に、線維化したマウス心臓、腎臓における FPF の発現細胞を in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、FPF は線維化部にのみ発現が認められ、非線維化部には発現が認められなかった。さらに FPF のシグナルは筋線維芽細胞のマーカー分子である α SMA あるいは Periostin を発現する細胞にのみ認められ、FPF が筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなった。

FPFの線維化病態への関与を *in vivo* で調べるため、簡便にノックアウトマウス作成が可能な GONAD 法 (Ohtsuka M et al., *Genome Biol.*, 2018) を用いて、FPF のノックアウトマウスの作製に着手した。マウス FPF は約 500 アミノ酸から構成されるが、我々は FPF の開始コドンから約 30 アミノ酸の箇所にストップコドンが入るようにデザインし、Crispr-Cas9 システムを用いてゲノム編集を行った。その結果、目的のゲノムの変異を持つヘテロマウスの取得に成功した。このマウスを WT マウスと交配し、germline にのっていることを確かめたのち、生まれたヘテロの産仔同士を交配させ、FPF の KO マウスを取得した。実際、このマウスから心臓の筋線維芽細胞を単離し、FPF の抗体を用いて western blotting を行った所、目的のバンドの消失が認められ、KO されていることが確認できた。現在はこの KO マウスを繁殖している。

今後は繁殖次第、高血圧モデル処置を施し、WT マウスと KO マウスの線維化病態を比較する予定である。

1. 研究目的

食塩は、人々の心を豊かにする美味しい食事、さらには人間の生命の維持に必要な不可欠である。その一方で食塩の過剰摂取は、高血圧の大きな要因の一つとなる。高血圧の発症により機能が特に低下する組織は、心臓および腎臓である。そして、この機能低下の主な要因は、それぞれの組織における線維化である。線維化とは、コラーゲンなどの細胞外マトリックス蛋白質が過剰に産生された状態であり、組織を硬くすること等により、組織の機能を大きく低下させる(図 1)。

心臓においては、高血圧が進むと、心筋細胞の肥大が生じ、それら肥大した心筋細胞から、周囲に存在する線維芽細胞を活性化する種々の因子が放出される。そして、これら因子によって、線維芽細胞は、『筋線維芽細胞』へと分化し、コラーゲン等の細胞外マトリックス蛋白質を過剰に産生するようになり、心臓の線維化が進行する。一方で高血圧症患者は、慢性腎臓病を罹患するリスクが高いことも知られている。慢性腎臓病においては、その発症原因に関わらず、ほぼ全ての場合、腎臓の線維化を伴う。すなわち、腎臓においても、高血圧により組織の線維化が誘導される。

従って、線維化の進行を抑制することができれば、高血圧時の心臓、腎臓の機能低下を抑制することが出来ると考えられる。しかしながら、未だ決定的な線維化制御法は無く、線維化に対する画期的な治療法、治療薬の確立が望まれている。そのような中、我々は心臓の線維化に関与する新たな分子として、FPF (Fibrosis promoting factor) を見出した。すなわち、我々はこれまでに線維化を呈する心筋梗塞モデル (左冠状動脈の狭窄術) マウスを用いて、以下の (1)、(2) の結果を見出している。

- (1) FPF が、正常時の心臓、腎臓にはほとんど発現せず、心臓、腎臓の線維化時に発現量が顕著に上昇する (図 2)。
- (2) 心筋梗塞モデルを施したマウス心臓から単離した筋線維芽細胞において FPF をノックダウンするとコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質の産生量が有意に減少する (図 3)。

これらの結果から、FPF は心臓および腎臓の線維化を促進する重要な分子だと考えられる。

また、FPF は、正常な心臓には発現せず、心筋梗塞後の線維化した心臓において筋線維芽細胞に特異的に発現することから、FPF は新たな線維化治療の開発に繋がる格好の標的分子となると考えられる。

そこで本研究では、高血圧モデルマウスを作成し、そのマウスの心臓および腎臓の線維化においても FPF が線維化に関与するかについて検討を行い、FPF を標的とした新しい線維化治療法開発の礎を築くことを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験動物

6 - 8 週齢の C57BL/6J 野性型雄性マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。また、マウスの飼育環境は九州大学の規定に従った。

2.2 横行大動脈狭窄による圧負荷心肥大モデルマウスの作製

6 - 8 週齢のマウスの体重を測定し、ソムノペンチル注射液 (50 mg/kg ペントバルビタールナトリウム) を腹腔内投与で麻酔後、仰臥位にて手術台に固定した。頸部及び胸部を剃毛し、手術用顕微鏡観察下で頸部の正中を切開し、気管を露出させた。カニューレを気管に挿入し、一回呼吸量 0.5 cc、呼吸回数 120 回/分にて人工呼吸を行った。

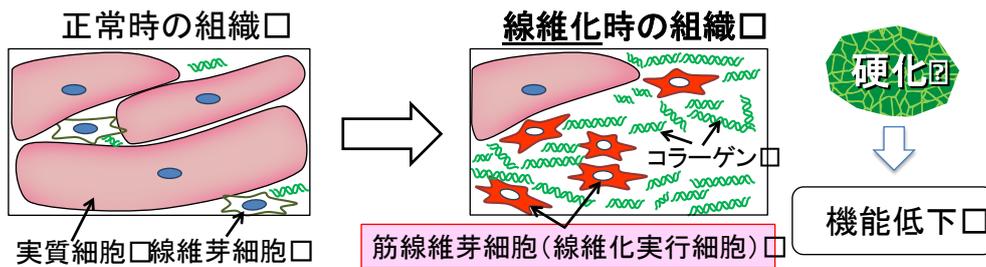


図1 組織の線維化

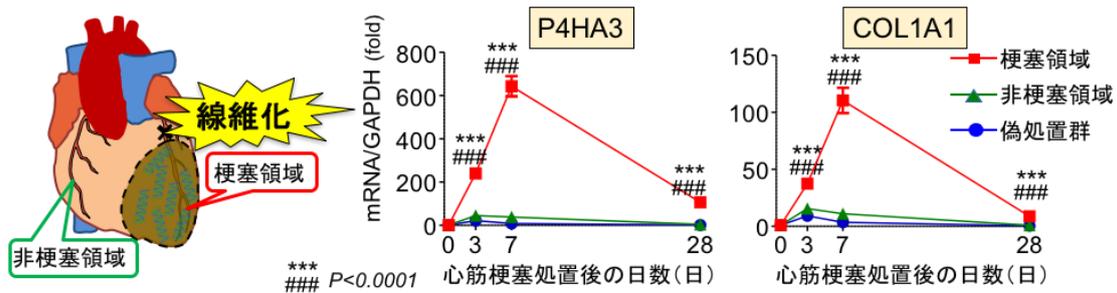


図2 心筋梗塞モデル処置後の心臓における FPF の発現量変化は、コラーゲンの発現量変化と相関する

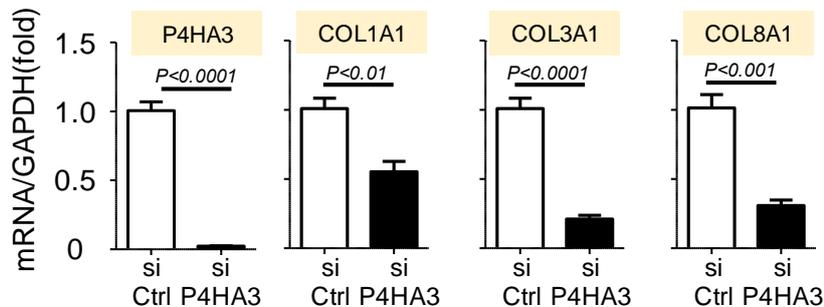


図3 筋線維芽細胞において FPF をノックダウンすると、種々のコラーゲンの産生が有意に減少する

その後、肋骨左側の第二肋間の切開によって心臓を露出させた。横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse Aortic Constriction) 施術は、腕頭動脈と左総頸動脈の間の横行大動脈を 26-gauge (WT マウスおよび MFG-E8 KO マウス用) または 27-gauge (アデノ随伴ウイルス投与マウス用) の注射針とともに 7-0 のナイロン縫合糸で縛りつけた後に注射針を抜くことにより行った。狭窄を行った後、縫合糸で切開箇所を縫合し、自発呼吸を開始するのを確認して人工呼吸器をはずした。以上の処置を施したマウスを心肥大モデル処置 (TAC) 群とし、横行大動脈の狭窄以外は同様の手術を施したマウス群を偽処置 (sham) 群とした。

2.3 片側尿管結紮 (UO) 法を用いた腎線維化モデルの作製

8 - 10 週齢の雄性マウスを用いた。1.5% イソフルラン吸入麻酔維持下で仰臥位にて手術台に固定した。手術用顕微鏡観察下で腹部の正中を切開し、右尿管を露出させ、尿管を 6-0 絹ブレード縫合糸で結紮した。その後、腹腔にプロカインペニシリン G 溶液を 20 μ L 滴下し、縫合糸で切開箇所を縫合した。以上の処置を施したマウスを片側尿管結紮 (UO) 群とし、尿管の結紮以外は同様の処置を施したマウスを偽処置 (sham) 群とした。UO 処置後、7 日目にソムノペンチル注射液の腹腔投与による麻酔下で開

腹し、腹部大動脈の切断により脱血を行い、腎臓の摘出を行った。

2. 4 mRNA の定量

TAC 処置後のマウスから摘出した心臓を、液体窒素を用いて速やかに凍結させ、 -80°C に保存した。 -80°C に保存していたマウスの心臓から Isogen (ニッポンジーン) のプロトコルに従い、total RNA を抽出した。その後、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を精製し、微量分光光度計 DS-11 (DeNovix) により濃度を決定した。続いて、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA への逆転写反応を行った。mRNA の定量は、TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) のプロトコルに従い、 95°C で DNA 合成酵素の活性化を 20 秒行い、 95°C 1 秒による cDNA の変性と 60°C 20 秒の伸長反応を 40 サイクル行った。内部標準として GAPDH を用いて解析を行った。

プライマーおよび TaqMan プローブは Sigma-Aldrich あるいは Applied Biosystems から購入した。それらに関しては Code 番号を記した。

2. 5 MACS beads を用いた心臓からのマクロファージと筋線維芽細胞の単離

TAC 処置 1 週間後にマウスから心臓を摘出し、心房を取り除いた後、心室を 15 - 20 片に分割した。その後、心臓片を Collagenase type II 溶液 (0.1% Collagenase type II/0.01% Elastase/PBS) 中で 37°C 10 分間の振盪を 10 回行い、筋線維芽細胞を含む細胞液をその都度、回収した。その後、Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche) により赤血球成分を除去し、10% FBS / 1% Penicilin / Streptomycin / DMEM で細胞を懸濁した後に、培養プレートに細胞を播種した。一晩、 CO_2 インキュベータで培養させた後に、非接着系の細胞を PBS 洗浄によって取り除き、Trypsin-EDTA により接着した細胞を回収した。磁気ビーズ標識された CD45 抗体で 30 分間反応させ、MS カラムを用いた MACS 磁気細胞分離法により、CD45(+) であるマクロファージと CD45(-) 細胞をそれぞれ回収した。その後、CD45(-) 細胞を APC で標識された PDGFR α (筋線維芽細胞の膜表面マーカー) 抗体と反応させた後、磁気ビーズ標識された抗 APC 抗体で 30 分間反応させ、MACS 磁気細胞分離法により、PDGFR α (+) である筋線維芽細胞を回収した。

2. 6 In situ hybridization

In situ hybridization は Advanced Cell Diagnostics 社の RNA scope を用いた。MI モデルマウスから摘出した心臓を、速やかに 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸し、室温で 16 ~ 32 時間固定した。その後、パラフィンで包埋し、 $5\ \mu\text{m}$ の組織切片を作成した。組織切片を 60°C で 1 時間インキュベートした後に、キシレン及び 100% エタノールを用いてパラフィンを除去した。その後、組織切片に過酸化水素溶液を滴下し、室温で 10 分間反応させ、内在性ペルオキシダーゼを不活化させた。蒸留水にて洗浄後、さらに抗原賦活化溶液を滴下し、ホットプレートを用いて $98\sim 102^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させた。蒸留水にてもう一度洗浄した後に、プロテアーゼ溶液を滴下し、HybEZTM オープン (Advanced Cell Diagnostics) 内にて 40°C で 30 分間反応させた。その後、目的遺伝子に対するプローブを組織切片に滴下し、HybEZTM オープンにおいて 40°C で 2 時間反応させ、その後、Amp 溶液によるシグナル増幅反応を行った。その後、Fast Red 混合液、または蛍光標識 Tyramide で反応させて目的遺伝子の mRNA のシグナルを検出した。シグナル検出反応の後、抗体を用いた共染色を行った。10% BSA/PBS を滴下し、室温で 1 時間反応 (ブロッキング) させ、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、蛍光標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させ、DAPI による核の染色を行った後に、 60°C で 15 分以上インキュベートし、乾燥させた。EcoMount を用いて封入した切片は共焦点顕微鏡 (LSM700, Zeiss) により撮像を行った。

2. 7 筋線維芽細胞への siRNA の導入

心筋梗塞モデル処置後 3 日目のマウスの心臓から単離した筋線維芽細胞に Lipofectamine RNAiMAX (invitrogen) のプロトコルに従って siRNA を導入した。10% FBS / 1% Penicillin-Streptomycin / DMEM で培養している細胞に Lipofectamine RNAiMAX を用いて、目的遺伝子に対する siRNA (Ambion) あるいはコントロールとして Silencer Select Negative Control no. 1 siRNA (Ambion) を導入した。siRNA の導入から 72 時間後に、RNeasy Plus Mini Kit を用いて RNA を精製した。

2. 8 GONAD 法

PPF KO マウスは GONAD 法を用いて作成した。GONAD 法とは受精卵を体外に取り出すことなく、

CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトマウス作成する方法である。前日に野生型のオス、メスマウス (C57BL/6N) の交配を行い、プラグが確認できた野生型メスマウスを用いて行った。具体的には、妊娠メスマウスにソムノペンチル注射液 (50 mg/kg ペントバルビタールナトリウム) を腹腔内投与後、背臥位に固定し、2 細胞期受精卵を有する卵管を体外に露出させた。その後、ガラスキャピラリーを用いて卵管に CRISPR-Cas9 と guide RNA (FPF の特定の位置に stop codon を挿入するような配列) を直接注入し、エレクトロポレーター (ニップोजーン) を用いて卵管全体に対して、電気穿孔法を施した。その後、卵管を体内に戻し、切開した皮膚を皮膚用ステープラを用いて縫合した。GONAD 法を施したマウスから生まれた仔マウスの尻尾からゲノムを回収し、Genotyping を行い、目的とするゲノム編集がなされていることを確認した。

2.9 統計解析

結果は少なくとも 3 例以上の独立した同一条件下で行ったものであり、すべて平均値±標準誤差で表した。二群間の比較には unpaired t-test を、多群間の比較には One-way ANOVA による Student-Newman-Keuls test を用いて検定を行い、P 値が 5% 未満の場合に有意差があると判断した。

3. 研究成果

(1) まず、Real time RT-PCR 法を用いて高血圧モデルマウスの心臓における FPF の発現量の変化を測定した。コラーゲンなどの線維化因子の発現量を測定し、心肥大が誘導されていることを確認したのち、FPF の発現量を測定したところ、FPF は心肥大に伴って発現量が増加することが明らかとなった (図 4)。

さらに FPF が腎臓の線維化時においてもその発現量が上昇するかについて片側尿管結紮 (UUO) 法を用いた腎線維化モデルを用いて検討した。その結果、心臓と同じく線維化に伴って顕著な発現増加が認められた (図 5)。

(2) 続いて、正常時のマウス心臓あるいは心筋梗塞後の線維化したマウス心臓における FPF の発現細胞を in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、FPF は正常なマウス心臓においては発現が認められなかった。一方で、線維化した心臓においては FPF は線維化部のみ発現が認められ、非線維化部には発現が認められな

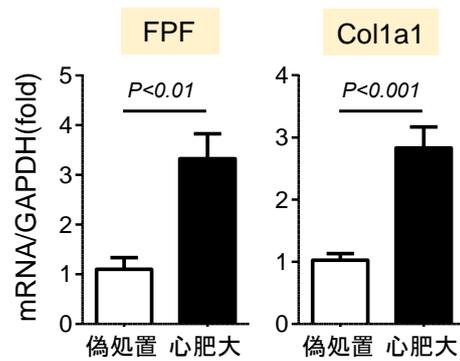


図 4 心肥大時の心臓における FPF の発現量変化は、コラーゲンの発現量変化と相関する

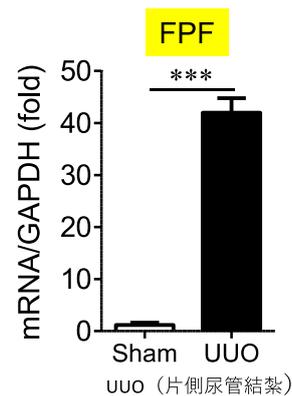


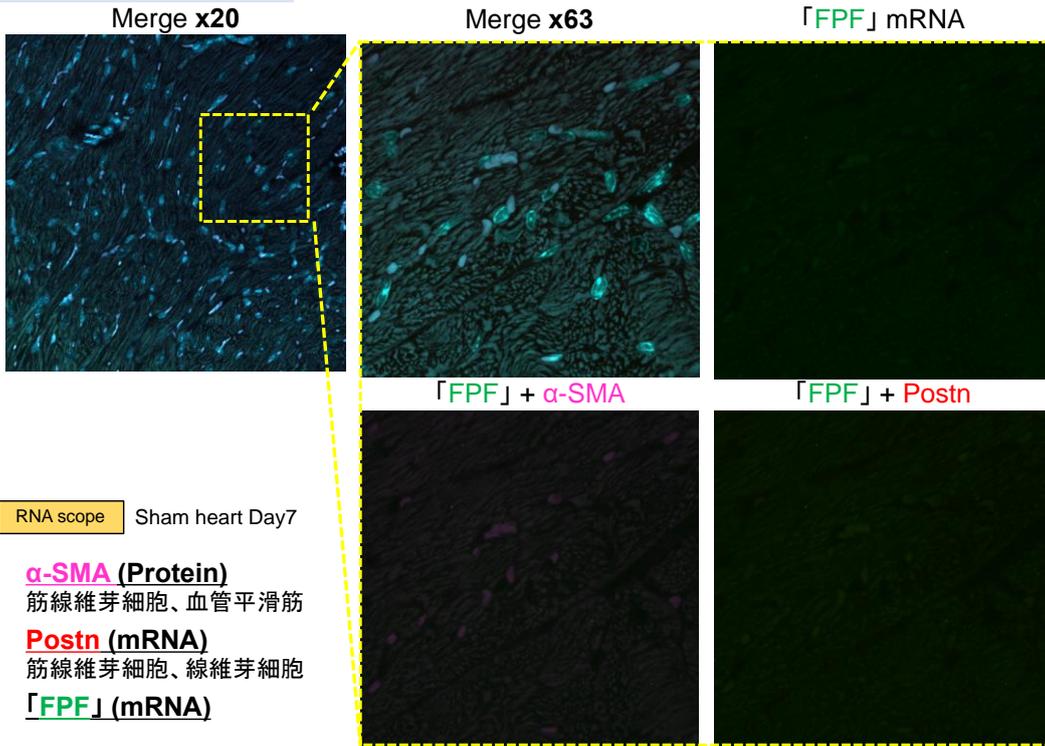
図 5 片側尿管結紮後の腎臓において FPF の発現量は増加する

った。そこで次に FPF のシグナルが、筋線維芽細胞のマーカー分子である α SMA (免疫染色) あるいは Periostin (in situ hybridization) を発現する細胞に認められるかを検討した所、FPF は α SMA タンパク質あるいは Periostin mRNA を発現する細胞にのみ認められた (図 6)。これらの結果から、FPF は線維化心臓の筋線維芽細胞にのみ特異的に発現すると考えられた。

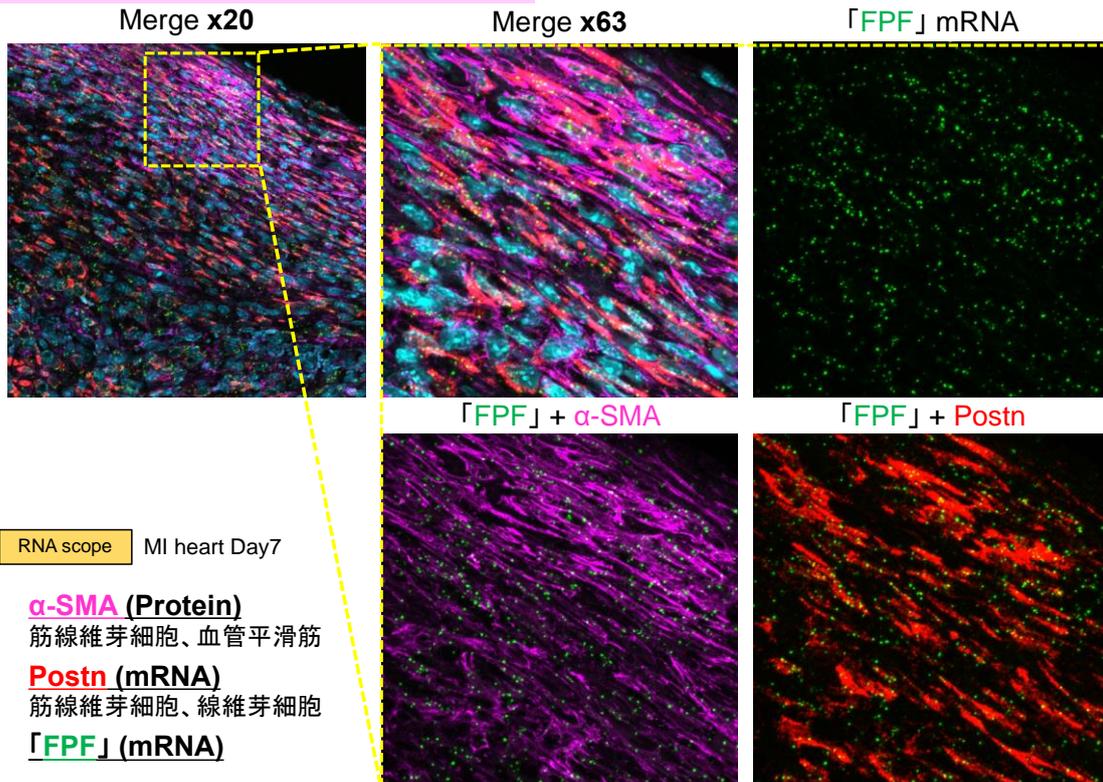
そこで次に線維化した腎臓においても FPF が筋線維芽細胞に特異的に発現するかについて in situ hybridization により検討した。その結果、腎臓においても FPF は筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなった (図 7)。

(3) FPF の線維化病態への関与を in vivo で調べるため、簡便にノックアウトマウス作成が可能な GONAD 法 (Ohtsuka M et al., Genome Biol., 2018) を用いて、FPF のノックアウトマウスの作製に着手した。マウス FPF は約 500 アミノ酸から構成されるが、我々は FPF の開始コドンから

Sham 正常時の心臓



心筋梗塞後の梗塞領域(線維化部位)



心筋梗塞後の梗塞領域(線維化部位)

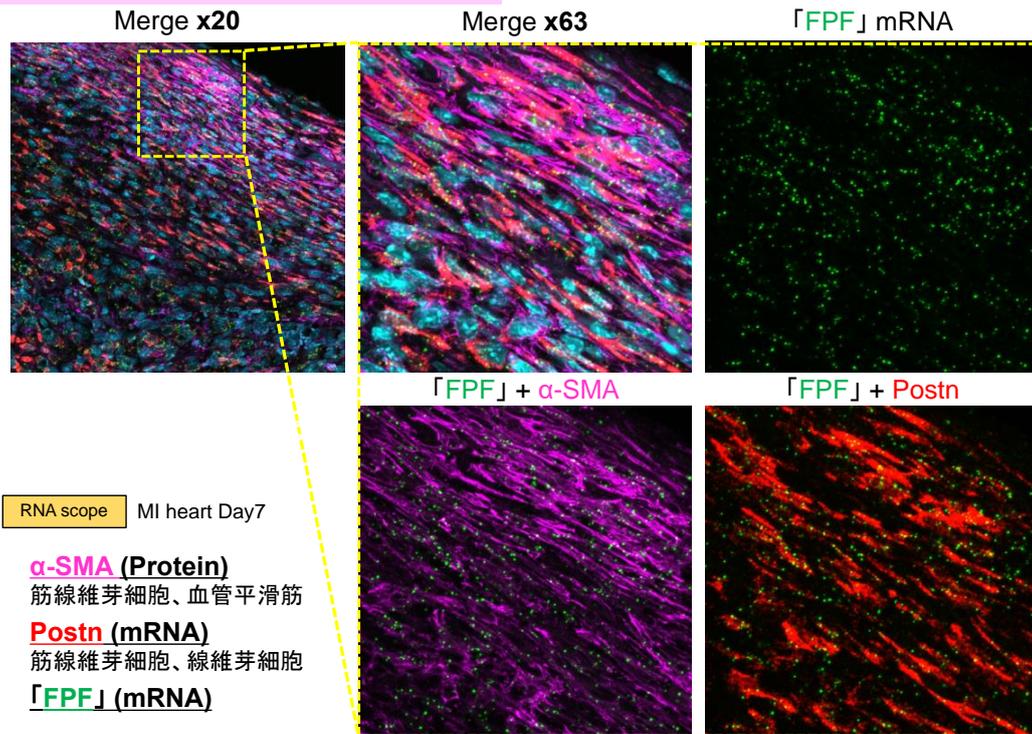


図 6 FPF は正常時のマウス心臓には発現せず、線維化したマウス心臓の線維化部の筋線維芽細胞に発現する

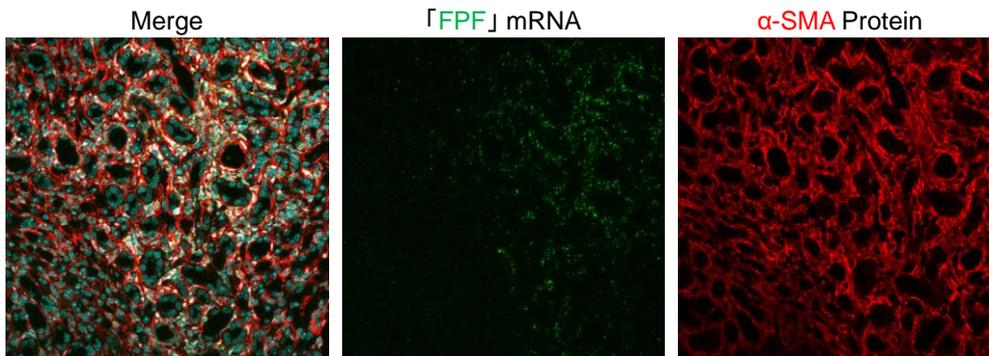


図 7 FPF は線維化したマウス腎臓の線維化部の筋線維芽細胞に発現する

約 30 アミノ酸の箇所にストップコドンが入るようにデザインし、Crispr-Cas9 システムを用いてゲノム編集を行った。その結果、目的のゲノムの変異を持つヘテロマウスの取得に成功した。このマウスを WT マウスと交配し、germline に行っていることを確かめたのち、生まれたヘテロの産仔同士を交配させ、FPF の KO マウスを取得した(図 8: M48, M52 が目的の KO マウス)。実際、この KO マウスから心臓の筋線維芽細胞を単離し、FPF の抗体を用いて western blotting を行った所、FPF のバンドの消失が認められ、KO されていることが確認できた(図 9)。

現在はこの KO マウスを繁殖している。繁殖次第、高血圧モデル処置を施し、WT マウスと KO マウスの線維化病態を比較する予定である。

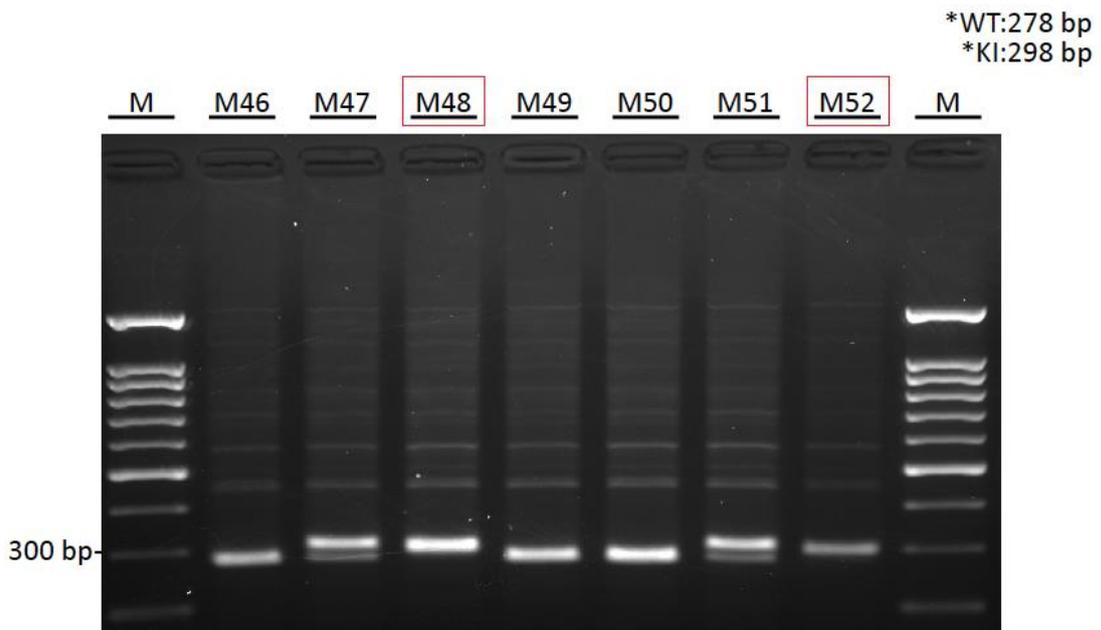


図 8 FPFKO マウスの樹立

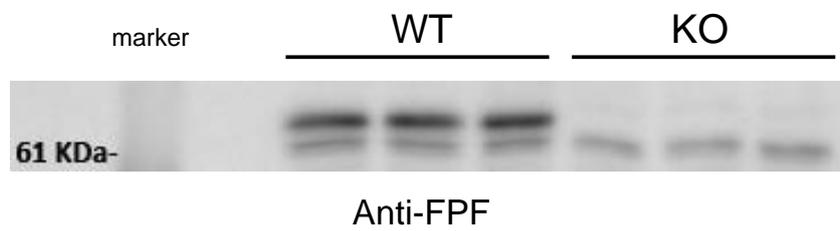


図 9 FPFKO マウスから単離した筋線維芽細胞においては FPF 蛋白質が発現しない

Functional Analysis of a Molecule that Promotes Hypertrophy-Induced Fibrosis of the Heart and Kidney for Developing a New Fibrotic Treatment Method

Michio Nakaya

Department of Pharmacology and Toxicology Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Kyushu University

Summary

Salt is essential for a delicious diet that enriches people's minds, as well as for the maintenance of human life. On the other hand, excessive salt intake is one of the major causes of hypertension. Tissues whose function is particularly impaired by the development of hypertension are the heart and kidneys. The main cause of this decline in function is fibrosis in each tissue. Fibrosis is the excessive production of extracellular matrix proteins such as collagen, which greatly reduces tissue function by hardening the tissue.

Hypertension in the heart causes hypertrophy of cardiac muscle cells, which release various factors that activate surrounding fibroblasts. By these factors, fibroblasts differentiate into 'myofibroblast' and produce excessive amounts of extracellular matrix proteins such as collagen, leading to progression of cardiac fibrosis. Hypertensive patients, on the other hand, are known to be at increased risk for chronic kidney disease. Chronic kidney disease, regardless of its cause, is almost always accompanied by fibrosis of the kidneys. That is, hypertension also induces tissue fibrosis in the kidney.

Therefore, if the progress of fibrosis can be suppressed, it is considered that the functional depression of the heart and kidney at the time of hypertension can be suppressed. However, there is still no definitive method for controlling fibrosis, and it is desired to establish an epoch-making therapy and a therapeutic agent for fibrosis. In this context, we have identified FPF (Fibrosis promoting factor) as a new molecule involved in cardiac fibrosis. In other words, by using a model of myocardial infarction (left coronary artery stenosis) mouse with fibrosis, we have found

- (1) FPF is rarely expressed in the normal heart and kidney, but is markedly increased in the fibrosis of the heart and kidney.
- (2) Knockdown of FPF significantly reduces the production of extracellular matrix proteins such as collagen in myofibroblasts isolated from mouse hearts subjected to myocardial infarction model.

These results suggest that FPF is an important molecule that promotes cardiac and renal fibrosis.

In this study, we examined whether FPF is involved in the fibrosis of the heart and kidney in hypertensive mice and aimed to establish the foundation for the development of a new fibrotic therapy targeting FPF.

At first, the change of the expression level of FPF in the heart of the hypertensive model mouse was measured using the real time RT-PCR method. The results showed that FPF expression increased with cardiac hypertrophy. We further investigated whether FPF expression is increased during renal fibrosis using a model of renal fibrosis

using unilateral ureteral ligation (UUO). As in the case of the heart, a marked increase in FPF expression was observed during kidney fibrosis.

Next, we examined cells expressing FPF in fibrotic mouse heart and kidney by using in situ hybridization method. As a result, the FPF expression was found only in the fibrotic area, and the expression was not detected in the non-fibrotic area. Furthermore, the signal of FPF was observed only in cells expressing α SMA or Periostin, marker molecules of myofibroblasts, indicating that FPF is specifically expressed in myofibroblasts.

In order to examine the involvement of FPF in the fibrotic disease in vivo, we set out to make the knockout mouse of FPF using the GONAD method (Ohtsuka M et al., Genome Biol., 2018). Mouse FPF consists of approximately 500 amino acids, and we designed a stop codon approximately 30 amino acids from the start codon of FPF and performed genome editing using the Crispr-Cas9 system. We succeeded in obtaining hetero mice with mutations in the target genome. These mice were mated with WT mice to ensure that they were on the germline, and then mated with heterozygous offspring to obtain FPF KO mice. Indeed, when cardiac myofibroblasts were isolated from these mice and Western blotting was performed using antibodies to FPF, the desired band disappeared, indicating that FPF protein was really knocked-out. We are now breeding the KO mice. We plan to compare the fibrosis status of WT and KO mice by treating them with a hypertension model.