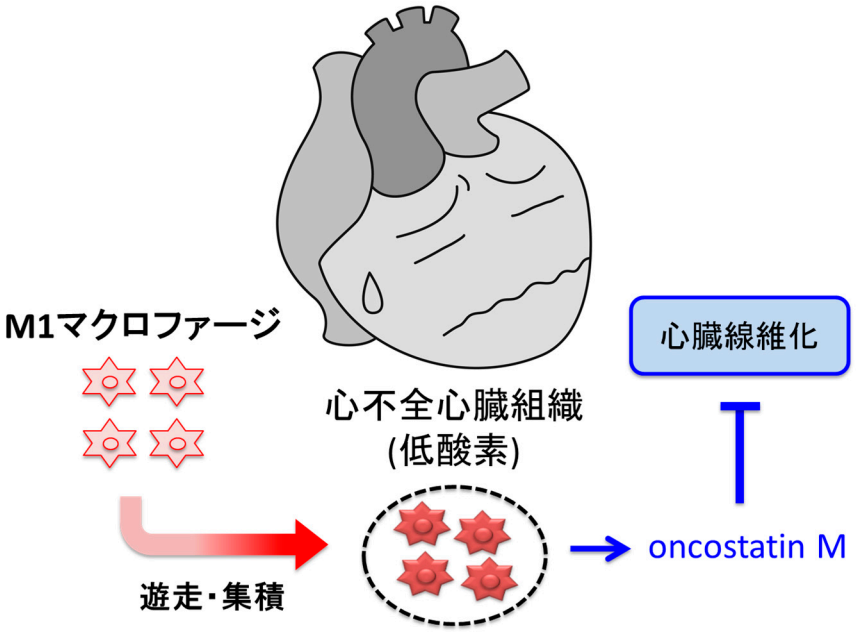
217　マクロファージを介した心臓線維芽細胞制御機構の解明	仙波　宏章

【目的】高齢化に伴い本邦の心不全患者は爆発的に増加しており、「心不全パンデミック」と呼ばれ社会的問題となっている。心不全には、左室収縮能が低下した収縮障害性心不全のみならず、収縮能の保たれた拡張障害性の心不全も高率に存在することが知られている。しかし現在の心不全診療において、拡張障害の心不全患者の予後を改善する有効な治療法は未だに確立されていない。本研究は、拡張障害の病態基盤である心臓線維化のメカニズムを詳細に解明し、拡張障害性心不全に対する新規治療法開発の基盤的知見を得ることを目的とした研究である。

【方法】我々は、実験的心不全マウスモデルとして横行行大動脈圧負荷モデル（Transverse Aortic Constriction in mice : TAC）を採用し、これを用いて心筋組織に集積するマクロファージの役割に着目し解析を進めることとした。分子細胞学的手法を用いてマクロファージの *in vitro* 解析をおこない、線維化制御因子として同定したマクロファージ由来分泌物質について、さらにマウスおよびヒト検体を用いて *in vivo* 解析を実施した。

【結果】上記解析により我々は、TAC 後の心不全状態の心臓組織では炎症惹起性の M1 マクロファージが低酸素誘導型転写因子 HIF-1α を介して心臓組織に遊走、集積し、oncostatin M を分泌して心臓線維化を抑制的に制御していることを明らかにした。マクロファージを介した炎症プロセス、低酸素シグナルという独自の観点から心臓線維芽細胞の活性化制御メカニズムを解明した本研究の成果は、拡張障害性の心不全に対する新規治療法開発のための基盤的知見であり、これまで治療介入が困難であった心臓拡張不全患者の予後改善に大きく貢献するものである。

マクロファージ由来の分泌タンパク質 oncostatin M による心臓線維化抑制制御



217. マクロファージを介した心臓線維芽細胞制御機構の解明

仙波　宏章

心臓血管研究所 基礎研究室

Key words：心不全，心臓線維化，マクロファージ，炎症，低酸素

緒　言

高齢化に伴って本邦の心不全患者は増加し続けており、近年この状況は「心不全パンデミック」と呼ばれ問題視されている。心不全は、収縮機能障害による心不全と拡張機能障害による心不全の 2 つに大別される。収縮機能障害による心不全に対しては、β遮断薬や ACE 阻害薬などの薬物療法や心臓再同期療法などが確立し、その予後は近年飛躍的に改善が得られた。一方で、心臓線維化、拡張機能障害による心不全の予後を改善する有効な治療法はいまだ確立されていない。すなわち、100 万人規模の心不全患者のうち、約半数は未だ未治療の状態にあるとも言えるだろう。よって、心臓線維化のメカニズムを解明し拡張障害の治療法を開発することは、我々循環器内科医にとっての急務である。

最近、自然炎症プロセスの持続的な活性化が、心臓線維化、心不全の病態基盤として注目されている。心不全患者では、TNF-αなどの炎症性サイトカインの血中濃度が上昇しており、心不全の臨床的重症度とよく相関することが知られている。また心臓移植を施行された実際の心不全症例の心筋組織を解析すると、CD68（+）マクロファージが集積していることが観察される。マクロファージは古くから「炎症プロセスを活性化するもの」として理解されてきたが、最近の研究からマクロファージには炎症惹起型の M1、炎症制御型の M2 など多様な極性があり、炎症プロセスを病態基盤とした疾患の進展にはそういったマクロファージの亜集団がそれぞれ重要な役割を果たしていることが分かってきた。しかし、マクロファージを介した炎症プロセスが心臓線維化や拡張障害性心不全の進展過程にどのような固有の役割を果たしているのかは十分に解明されていない。

また心不全の心臓組織は、供給低下、需要増大によって著しい低酸素状態にあることもよく知られている。低酸素に対して細胞はそれぞれ固有の遺伝子発現応答を示すが、その細胞応答は主に低酸素応答転写因子 Hypoxia Inducible Factor（HIF）によって調節されている。さらにこの低酸素シグナルは、細胞応答を制御するのみならず、炎症性サイトカイン、NO 放出の調節を介して炎症プロセスの活性化、続にも関与している。このような炎症プロセス×低酸素シグナル間の協調的な相互活性化が、心臓線維化、心不全の進展に重要であると考えられる［1］。我々は、M1、M2 マクロファージには HIF のアイソフォームである HIF-1α、HIF-2αがそれぞれ特異的に発現しており、M1、M2 の固有な細胞機能を制御していること（HIF-αスイッチング）を報告した［2］。さらに我々は最近、HIF-1αを介して細胞内グルコール代謝が解糖系へシフトすること（active glycolysis）が、低酸素環境における M1 マクロファージの遊走機能に必須であることを明らかにした［3］。

本研究はこれらの独自の知見を土台として、マクロファージを介した炎症プロセス、低酸素シグナルという観点から心臓線維芽細胞の活性化制御メカニズムを解明することを目的として進められ、マクロファージの分泌蛋白質が重要な役割を果たしていることを明らかにしたものである（図 1）［4］。

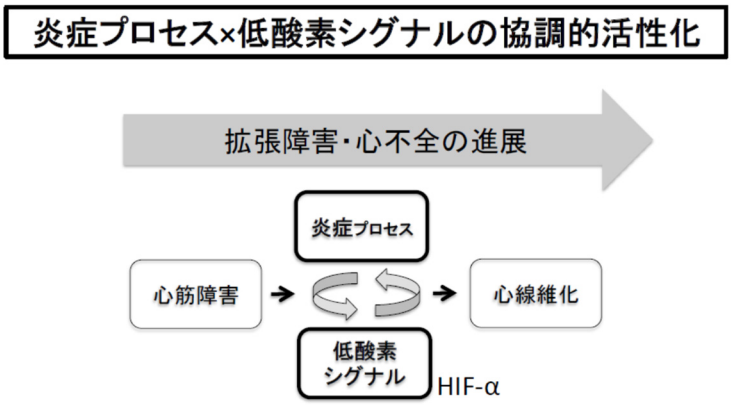


図 1. 研究の概念図
低酸素シグナルと炎症プロセスは協調的に活性化し、心臓繊維化を誘導する。

方法および結果

1. 心臓線維化抑制因子の同定

1）実験的心不全マウスモデルの確立

横行行大動脈圧負荷モデル（Transverse Aortic Constriction in mice：TAC）は、心肥大、心不全のメカニズムを研究するための実験的マウスモデルである［3］。具体的には、麻酔管理下のマウスを開胸し、大動脈弓部を露出して結紮を施すことで心臓に後負荷をもたらし、術後約 2～4 週にかけて心肥大、心臓線維化、心機能低下を引き起こし心不全に至るという実験モデルである。我々らは本研究の基軸として TAC モデルを習得し、安定的に心不全マウスを作出するワークフローを確立した。

2）心不全組織へのマクロファージ集積

まず我々は TAC を施したマウスの心臓組織を病理学的に観察し、TAC 後の心臓には間質にマクロファージが集積していることを確認した。フローサイロメーターを用いてこの心臓マクロファージを単離し解析すると、TAC1 週間後の急性期には M1 マクロファージが集積していることが明らかになった。さらに、マクロファージ特異的 HIF-1α欠失マウスを用いて TAC モデル解析をおこなうと、TAC 後の M1 マクロファージ集積が減少しており、心臓線維化は増悪していることが分かった。以上より、TAC 後はマクロファージが HIF-1α を介して心臓組織に遊走、集積し、心臓の線維化を抑制していることが示唆された。

3）マクロファージ由来の線維化抑制因子

我々は上記知見から、マクロファージが低酸素シグナルを介して線維化抑制因子を分泌しているという仮説を立てた。これを検証すべく、我々は低酸素環境に置いたマクロファージの培養上清を回収し、TGF-β投与下の線維芽細胞（C3H/10T1/2）にこの上清を添加して線維芽細胞活性化を観察した。結果、低酸素マクロファージ上清添加によって線維芽細胞活性化は著明に抑制され、また培養上清を加温するとこの抑制効果は消失することが明らかになった。以上より、マクロファージは低酸素シグナルを介して線維化抑制効果を持つタンパクを分泌していると考えられた。

4）シークエンスデータから心臓線維化抑制因子の抽出

HIF-1α を介して M1 マクロファージから分泌される線維化抑制タンパク質を同定するために、我々はまず自験の RNA シークエンスを解析し、（1）心臓 M1 マクロファージで遺伝子発現が亢進している、（2）低酸素のマクロファージで HIF-1α依存的に遺伝子発現が亢進する、を満たす分泌タンパク質の候補をピックアップし、さらに 1～3 の実験系を用いて、（3）線維芽細胞活性化の抑制効果があることを検証した。以上（1）（2）（3）の 3 点を満たす因子を網羅的に探索した結果、インターロイキンファミリーに属する oncostatin M が唯一この条件を満たす分泌タンパクであることが明らかになった（図 2）。

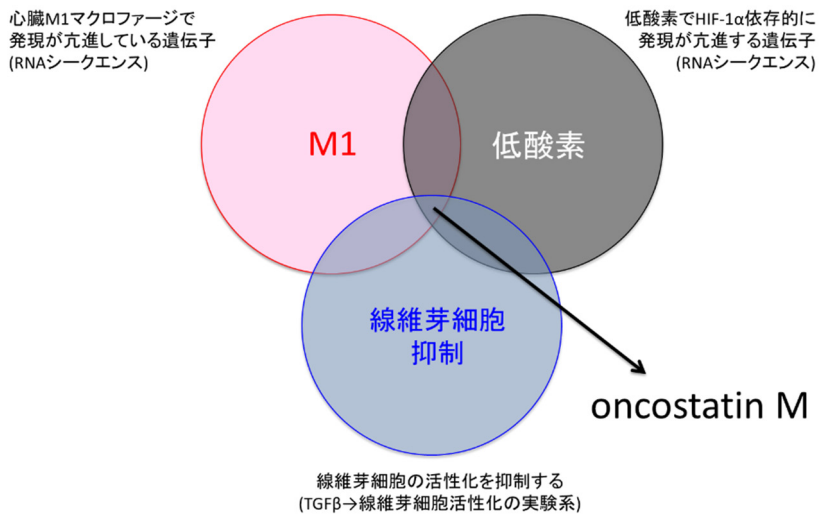


図 2. マクロファージ由来の心臓線維化抑制因子

2. oncostatin M による心臓線維化抑制の検証

1）oncostatin M の心臓線維化抑制効果（genetical な介入による検証）

我々は前述の研究から、心臓マクロファージから HIF-1α を介して分泌される oncostatin M が心臓線維化を抑制しているとの仮説を立てた。そこで、我々は線維芽細胞特異的な oncostatin M 受容体欠失マウス（Col-1a1 Cre ERT/OSMR flox）を作出し、同マウスを用いて TAC モデルの解析を実施した。結果、線維芽細胞特異的 oncostatin M 受容体欠失マウスでは TAC 後の線維化が著明に増悪していることが明らかとなった（図 3）[4]。

2）oncostatin M の心臓線維化抑制効果（chemical な介入による検証）

さらに oncostatin M による心臓線維化抑制効果を検証するため、健常型マウスに抗 oncostatin M 抗体を投与下に TAC モデルを実施し解析した。結果、抗体投与下のマウスでは TAC 後の線維化が著明に増悪していることが明らかとなった（図 4）[4]。

3）ヒト心筋組織における oncostatin M 発現の解析

当院における心不全症例に対して診断のため行われた心筋生検組織について、免疫染色の手法を用いて心筋組織の線維化および oncostatin M 発現陽性の細胞を解析した。結果、線維化の重症度と oncostatin M 発現強度は負の相関を示すことが明らかとなった（図 4）[5]。

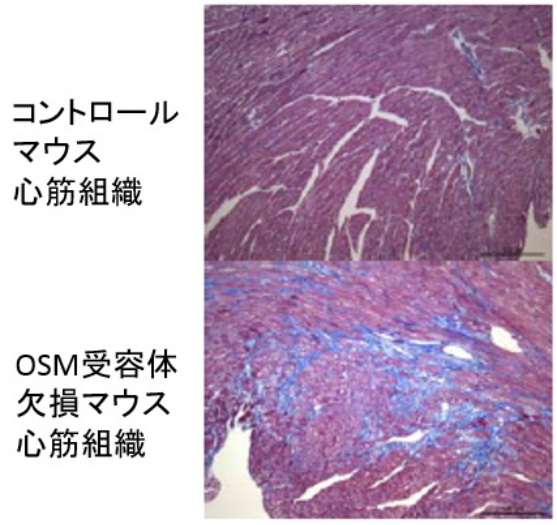


図 3. KO マウスを用いた TAC モデルの解析
Masson Trichrome 染色、scale bar = 100 μm。

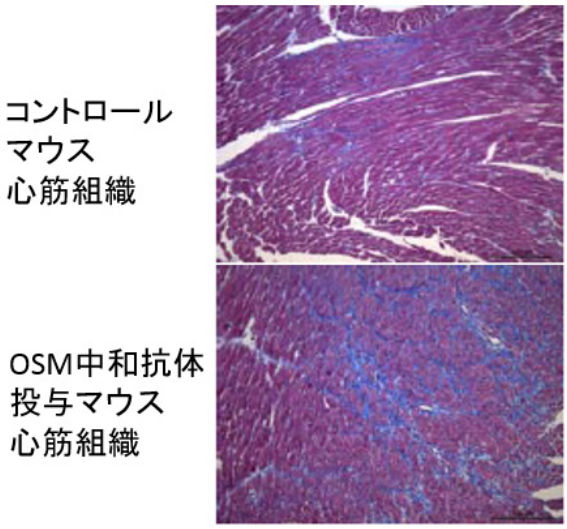


図 4. 中和抗体を用いた TAC モデルの解析
Masson Trichrome 染色、scale bar = 100 μm。

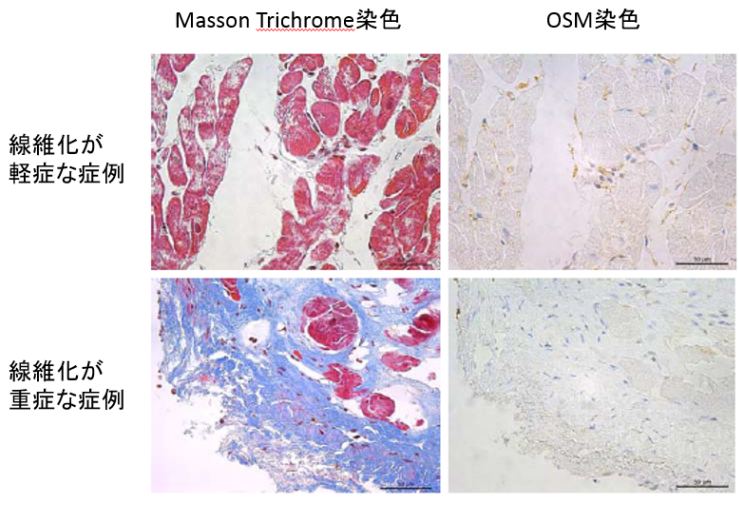


図5. ヒト心筋組織の解析

考　察

以上の研究成果から、心不全の心臓組織では、HIF-1 α を介して心臓組織に遊走、集積したマクロファージが、oncostatin M を分泌して心臓線維化を抑制的に制御していること示唆された（図 5）。

今後はさらにヒト臨床検体における解析を推進する予定である。具体的には、心房細動症例において治療として切除された左心耳組織についても、oncostatin M の発現と組織線維化の相関関係を観察し、ヒトの心血管疾患における oncostatin M の役割をさらに研究するべく解析を開始している。

心筋保護作用を有する薬物療法の確立によって心臓収縮障害の心不全患者は近年飛躍的に予後の改善が得られたのとは対照的に、心臓線維化による拡張障害の心不全には有効な治療法が未だに存在していない。すなわち、本邦だけでも約 100 万人とも推定される心臓拡張不全患者は未治療の状態であると言える。本研究は未解明の心臓線維化機構について、炎症×低酸素というこれまでに無い新たな視点から解明を試みるもたである。その研究成果は拡張障害の心不全に対する新たな治療開発へ直接的に寄与することができ、これまで治療介入が困難であった心臓拡張不全患者にとって大きな福音となる。

また、本研究で着目している炎症プロセスの重要性は心不全に留まらず、動脈硬化などの他の心血管疾患、がん、肥満症、糖尿病、など多様な疾患に共通する病態基盤であると考えられている。これらの慢性疾患は全世界的に増加しており、世界保健機構では生活習慣病やがん等を総称して非感染性疾患 non communicable disease（NCD）と定義し、医学、保健衛生における重要課題であると提言している。よって、本研究によって得られる炎症プロセス×低酸素シグナルの新たな分子生物学的知見は、心不全のみならずあらゆる NCD への応用までも期待でき、臨床医療全体への貢献度も高いものと考えられる。

さらに線維化という観点で考察すると、本研究は心臓の線維化に焦点を当てたものであるが、組織の線維化は肺、肝臓、腎臓、皮膚などあらゆる臓器で終末期に生じ得る共通の病態である。本研究で確立したシステムは、他臓器における線維芽細胞活性調節の解明においても非常に有用であると考えられ、将来的な汎用性が極めて高い。以上の点から本研究は高い期待が持たれる有意義な内容であると考えられ、我々はさらにこれを推進、発展させていく所存である。

共同研究者・謝辞

本研究は、公益財団法人心臓血管研究所所長の山下武志先生の御指導の下、東京大学大学院医学系研究科循環器内科の安部元先生、武田憲彦先生をはじめとした多くの共同研究者から御協力を頂きながら進められたものである。ここに深い感謝の意を表する。

文　献

1) Abe, Hajime, Hiroaki Semba, and Norihiko Takeda. "The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases." Journal of atherosclerosis and thrombosis 24.9 (2017): 884-894. DOI: 10.5551/jat.RV17009

2) Takeda, Norihiko, et al. "Differential activation and antagonistic function of HIF-α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis." Genes & development 24.5 (2010): 491-501. DOI: 10.1101/gad.1881410

3) Semba, Hiroaki, et al. "HIF-1α-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity." Nature communications 7 (2016): 11635. DOI: 10.1038/ncomms11635

4) Abe Hajime, Takeda Norihiko, Isagawa Takayuki, Semba Hiroaki, et al. "Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M." Nature communications. (in press) DOI: 10.1038/s41467-019-10859-w