

平成30年6月15日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19387

研究課題名(和文) 心臓マクロファージの新たな分子制御機構の解明と心不全における機能解析について

研究課題名(英文) the novel molecular mechanism of the regulation of cardiac macrophages

研究代表者

中山 幸輝 (Nakayama, Yuki teru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70721885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心不全は依然として罹患率と死亡率が高く、病態生理の解明は急務である。我々はこれまでに、マウスの心臓マクロファージが心臓恒常性維持に必須であり、心臓マクロファージ由来の Amphiregulin が心筋細胞保護的作用を持つ事を示した。これら細胞特異的遺伝子発現の転写調節に関して、ATAC-seqで心臓マクロファージのエピゲノム解析を行った。心不全モデルや老化マウスを用いて比較解析し、心臓マクロファージの細胞起源が胎仔肝由来から骨髄由来に変わり、さらに骨髄が老化することで表現型が変化する事が分かった。これらのエピゲノム変化を起こす分子機構の解明と介入が、心不全の新たな治療ターゲットになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is still a disease with high morbidity and high mortality and the elucidation of the pathophysiology is imperative. We have previously revealed that murine cardiac resident macrophages are indispensable in homeostasis of heart, and Amphiregulin, which is expressed exclusively in cardiac macrophages has a cardio-protective role. I performed ATAC-seq of cardiac macrophages to analyze the transcriptional regulation of these cell-specific genes. As compared to heart failure model and aged mice, I found that the epigenome of cardiac macrophages has altered in the transition from fetal liver monocyte-derived to bone marrow monocyte-derived and with aging of bone marrow. I think the intervention to the molecular mechanism which led to these epigenomic changes could be the novel target of heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 マクロファージ 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

心不全は世界中で罹患率と死亡率の高い疾患であるが、依然として予後不良である。近年、心不全の病態形成に慢性炎症が関与することが示唆されている。心不全や心筋梗塞における炎症性免疫細胞の浸潤は、以前より増悪因子として報告され、過剰な炎症を標的とする治療戦略が検討されている。一方で心臓マクロファージは均一の集団ではなく、一部は外的ストレスに対して恒常性維持を図る保護的作用を示す。様々な環境の変化を検知し、可塑性に富んだ反応を示すための、心臓マクロファージ特異的な分子機構が存在していると考えられ、これらを明らかにすることで心不全という恒常性破綻の病態を形成する機序の解明を目指した。また、心臓組織の微小環境において心臓マクロファージのリガンドになるものは同定されておらず、細胞特異的な転写制御機構が存在することもこれまで報告されていなかった。

次世代シーケンサーによる心臓マクロファージの網羅的発現解析を行い、心臓マクロファージの新たな分子機構を同定して機能解析を行う。心臓マクロファージのダイナミズムを制御する新たな分子機構を明らかにすることで、心不全の病態解明と新規の治療標的の同定を目指す。

2. 研究の目的

組織マクロファージの細胞起源は臓器によって異なり、心臓マクロファージは胎児期に胎仔肝単球が心臓で分化し、増殖することで成年期まで細胞数を維持しているとされる。各臓器の組織マクロファージをフローサイトメトリーで単離し、次世代シーケンサーを用いてこれらの細胞集団の網羅的発現解析を行うと、臓器特異性が高い遺伝子様式を示した。組織マクロファージは、固有の微小環境微小環境に応じて組織環境のリガンドに依存した分子機構に基づいて転写制御が行われると考えられた。

我々はこれまでに、心臓マクロファージ特異的発現を示す Areg にコードされる、Amphiregulin が心保護的作用を持つことを明らかにした。Amphiregulin は EGF ファミリーの一つである分泌蛋白であり、心臓ではマクロファージのみが発現している。Amphiregulin の発現制御機構の解明は心不全治療の新たな戦略になりうると考えられた。そこで、心臓マクロファージのエピゲノムの網羅的解析とともに、細胞特異的な転写因子の同定を行い、細胞特異的な転写制御機構の解明を目的とする。さらに、心臓マクロファージの質的な変化が心臓の恒常性維持を破綻させ、心不全や老化に伴う心機能低下を引き起こすと考え、病態形成への関与について解析する。

3. 研究の方法

(1) 心臓マクロファージの網羅的発現解析

とエピゲノム解析

マウスの心臓からフローサイトメトリーを用いて心臓マクロファージを単離し、RNA-seq によってさまざまな条件下での網羅的発現解析を行った。また ATAC-seq (Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing) によって網羅的にオープンクロマチン領域を同定し、野生型マウス、心不全モデル、老化マウスの心臓マクロファージに関して比較した。心臓マクロファージ特異的発現を示す遺伝子の転写調節領域に特に注目して、病態による変化を解析した。

また、初代培養である胎児肝由来マクロファージと骨髄由来マクロファージのエピゲノムを比較することで、細胞起源の変遷が心臓マクロファージの表現型に与える影響を解析した。

(2) 骨髄老化に伴う心臓マクロファージの変化が心機能に与える影響を解析する

心臓マクロファージが胎児肝由来から骨髄由来になり、骨髄が老化することでまた心臓の老化の表現型に与える影響があると考えた。若年マウスと老年マウスの骨髄移植を行い、心機能に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 心臓マクロファージのエピゲノムが病的モデルや老化によって変容する

心不全モデルや老化マウスの心臓マクロファージを単離して RNA-seq と ATAC-seq を行い、網羅的にオープンクロマチン領域を同定し、野生型マウスの心臓マクロファージと比較解析した。まずはその他の組織マクロファージのエピゲノムを比較したところ、心臓マクロファージの発現様式は組織特異的であり、エピゲノムも高い組織特異性を示した。細胞特異的発現を示す心保護的蛋白である Areg について、プロモーター領域のクロマチンがどれほど開いているのか、それぞれのモデルで比較検討した。すると老化に伴って Areg のプロモーター領域のクロマチンが閉じていくことが分かった。

マウスの心臓マクロファージは加齢に伴って細胞起源が変遷することが明らかになっている。そこで、出生時から成人期までの起源である、胎児肝由来マクロファージを作成した。一方で、成人期や心不全になると心臓に骨髄由来単球が浸潤して心臓マクロファージに分化すると言われている。そこで、骨髄由来マクロファージを作成し、それぞれのエピゲノムの比較検討を行うこととした。

すると、図1の通り、胎児肝由来マクロファージでは Areg のプロモーター領域がオープンになっているのに対して、骨髄由来マクロファージではクロマチンが閉じていることが分かった。このことが心臓マクロファージの加齢に伴うエピゲノムの変化に与える影響があると考えられた。

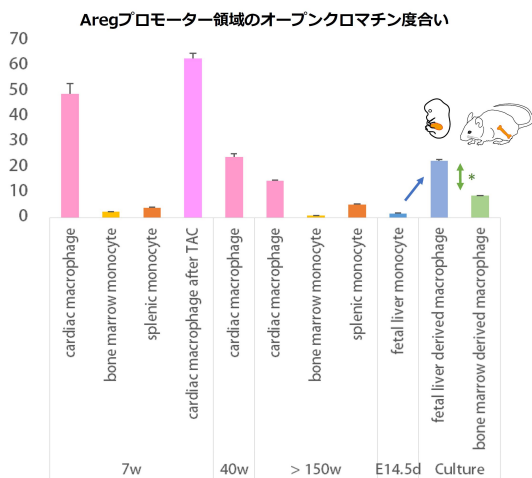


図1 各種細胞における Areg プロモーター領域のクロマチンの開度

(2) 老化骨髄の移植により心機能が悪化した

前述の通り、加齢に伴い心臓マクロファージは骨髄由来に置換されている。さらに老化した場合は、骨髄老化の影響を受けることが考えられた。そこで、若年マウスに対して放射線照射を行い、若年マウスの骨髄細胞を輸注する群と、老化マウスの骨髄細胞を静注する群に分けて、心機能の解析を行うこととした。すると図2の通り、老化した骨髄移植の群で心収縮力が低下しており、病理組織においては心臓間質の線維化が進行していることが分かった。

骨髄老化に伴う心臓マクロファージの表現型の変化が、心臓の恒常性維持を破綻させるモデルと考え、その分子機構について解析を行っている。

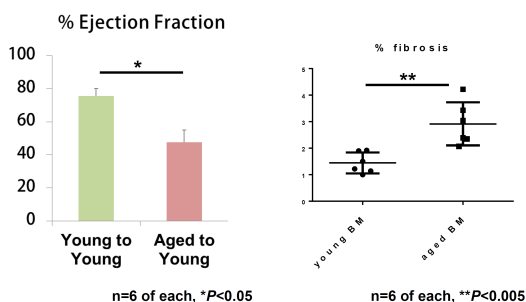


図2 移植後の心収縮能と線維化の程度

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu. Can Anti-inflammatory Therapy Prevent Atrial Fibrillation in Myocardial Infarction Patients? International Heart Journal. 査読無 2018;59(1):3-5

Katsuhito Fujiu, Munehiko Shibata, Yukiteru Nakayama, Fusaa Ogata, Sahohime Matsumoto, Issei Komuro, Ryozo Nagai, Ichiro Manabe. A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. Nature Medicine. 査読有 2017;23(5):611-622.

Hachiya R, Shiihashi T, Shirakawa I, Iwasaki Y, Matsumura Y, Oishi Y, Nakayama Y, Miyamoto Y, Manabe I, Ochi K, Tanaka M, Goda N, Sakai J, Suganami T, Ogawa Y. The H3K9 methyltransferase Setdb1 regulates TLR4-mediated inflammatory responses in macrophages. Scientific Reports. 査読有 2016;6:28845

Ogata F, Fujiu K, Matsumoto S, Nakayama Y, Shibata M, Oike Y, Koshima I, Watabe T, Nagai R, Manabe I. Excess Lymphangiogenesis Cooperatively Induced by Macrophages and CD4(+) T Cells Drives the Pathogenesis of Lymphedema. J Invest Dermatol. 査読有 2016;136:706-14.

[学会発表](計 7 件)

Yukiteru Nakayama the Roles of long noncoding RNA expressed in pro-inflammatory macrophages. 第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (2016 年 6 月 4 日 東京)

中山幸輝 心臓組織マクロファージの心保護作用とその制御機構 第 20 回日本分子生物学会年会 (2016 年 12 月 2 日横浜)

中山幸輝 心臓組織マクロファージの心機能に与える影響と機能制御の解明 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会 (2016 年 12 月 16 日 東京)

中山幸輝 the Protective roles of Cardiac macrophages in Cardiac Function and the Mechanism of Regulation. 第 81 回日本循環器学会学術集会 (2017 年 3 月 17 日 金沢)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Issei Komuro. the protective role of cardiac macrophages in cardiac function and the mechanism of regulation. Keystone symposia; Aging and Mechanisms of Aging-related Disease (2017 年 5 月 15 日 横浜)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Issei Komuro. the protective role of cardiac macrophages in

cardiac function and the mechanism of regulation. 第34回 国際心臓研究学会日本部会 (2017年12月8日 大阪)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Issei Komuro. the protective role of cardiac macrophages in cardiac function and the mechanism of regulation. 第1回 日本循環器学会基礎研究フォーラム (2018年1月6日 東京)

〔図書〕(計 1 件)

中山幸輝, 藤生克仁 マクロファージの老化と心疾患 アンチ・エイジング医学 2017;13(3):360-5

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/manabe/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 幸輝 (NAKAYAMA, Yukiteru)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70721885

(2) 研究分担者

藤生 克仁 (FUJIIU, Katsuhito)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 30422306

眞鍋 一郎 (MANABE, Ichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 70359628

小室 一成 (KOMURO, Issei)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30260483