

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15129

研究課題名（和文）虚血組織傷害後の炎症収束と組織修復におけるマクロファージと制御性T細胞の機能解明

研究課題名（英文）Function of tissue macrophages and regulatory T cells after ischemic heart injury

研究代表者

駒井 恭子（Komai, Kyoko）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：80574590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：組織のメンテナンスは常に行われており心臓における主役のひとつはLy6c低発現マクロファージ（Ly6clow Mac）である。横行大動脈縮窄（TAC; Transverse aortic constriction）圧負荷心肥大モデルにおいて顕著にT細胞の関与を観察したため、本研究はその炎症収束と組織修復過程におけるマクロファージとT細胞の役割の解明を目的とした。TAC1週後の心臓CD45陽性細胞解析ではLy6clow Macの増殖を確認した。T細胞、特にCD8陽性T細胞の欠損によりLy6clow Macはさらに増殖し、肥大大筋細胞の性質は変化し、慢性期の心不全が軽減されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環器疾患は我が国の死因の第2位であり、慢性の心不全状態となると、その5年生存率は50%とよくない。また、高齢化に従って患者数は今後益々増加することが予想されている。心不全状態の心臓では炎症が起こっているにもかかわらず、未だ有効な免疫療法がない。本研究は炎症の収束と組織修復におけるマクロファージとT細胞の役割を明らかにすることで、有効な免疫療法につなげることを目的とした。これまでにLy6clowMacとCD8陽性T細胞、および心不全の関係を示した研究は少なく、さらなる研究が進むことにより新たな治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tissue maintenance is a constant process, and one of the main players in the heart is Ly6clow macrophages (Ly6clow Mac). We aimed to clarify the role of macrophages and T cells in the process of inflammatory convergence and tissue repair in a pressure-loaded cardiac hypertrophy model of transverse aortic constriction (TAC; Transverse aortic constriction). In analysis of cardiac CD45-positive cells in TAC model, we observed a proliferation of Ly6clow Mac. The absence of T cells, especially CD8 positive T cells, leads to greater proliferation of Ly6clowMac, changes the nature of hypertrophic cardiomyocytes, and reduces heart failure in the chronic phase.

研究分野：免疫学

キーワード：組織マクロファージ CD8陽性T細胞 炎症 心肥大 組織修復

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループは脳虚血と炎症に関する研究をこれまで行ってきた。発症後 7 日以内の脳虚血急性期の自然免疫応答による炎症は大きく理解が進み、自然免疫を標的とした治療法の開発も注目されている(Fu et al. Nature Rev. Neurol. 2015)。しかし、これまで脳梗塞モデルで発症 1 週間以降の慢性期の免疫学的な解析はほとんど行なわれていなかった。申請者らは慢性期の脳梗塞マウスの脳内には急性期よりもはるかに多くの T 細胞が浸潤していることを発見し以下のことを明らかにしていた。(1) 脳虚血後 7 日目以降に脳梗塞巣へ T 細胞が浸潤しはじめ、IFN- $\gamma$  陽性の Th1 と CTL 細胞と Foxp3 陽性の制御性 T 細胞 (Treg) が T 細胞の大半を占める(2) Rag2 欠損マウスや Treg の除去ではアストロサイトの異常集積によるグリオシス(アストログリオシス)が認められる。過剰なアストログリオシスは神経圧迫や神経伸長阻害をもたらすとされる (Robel et al. Nat Rev Neurosci. 2011)。(3)脳梗塞慢性期にもう一度脳梗塞を起こすと、T 細胞依存的に脳梗塞症状が軽減される。また実験的脳脊髄炎(EAE)モデルにも抵抗性を示す。これらは、脳梗塞慢性期の神経修復に Treg が重要な役割を果たしていることを示唆している。

このような組織損傷に伴う免疫応答のダイナミックな変化は、特に発症初期で心筋梗塞モデルや肺損傷モデルでも認められる。心筋梗塞においても  $\gamma$  T 細胞からの IL-17 の重要性(Yan et al. J Am Heart Assoc. 2012) や M1 タイプから M2 タイプへのマクロファージへの転換が報告されている(Weirather et al. Circ Res. 2014)。しかし依然、発症 1 週間以降の慢性期の免疫学的な解析はほとんど行なわれていない。本研究では心筋梗塞亜急性期～慢性期の免疫学的解析を行ない炎症の収束と組織修復におけるマクロファージと Treg をはじめとする T 細胞の役割を明らかにする。

### 2. 研究の目的

心筋虚血をモデルに炎症亜急性期におけるマクロファージおよび慢性期に浸潤する Treg の分化誘導機構を明らかにし、炎症の終息と組織修復機序の解明を目的とする。そのために、

(1) 亜急性期～慢性期の心筋梗塞巣における炎症細胞の動態を把握する。

具体的内容として 亜急性期～慢性期の心筋梗塞巣における T 細胞、特に Treg の心不全心筋組織への影響を明らかにする。 で影響が認められた場合、慢性期の Treg の増殖・浸潤メカニズムを転写因子、サイトカインやケモカインに注目して解析する。 Treg 由来の心筋細胞再生因子を同定する。

(2)実験的心筋虚血モデルを用いて亜急性期に修復性マクロファージを誘導する因子および転写因子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

当初マウス心筋梗塞モデルを使用していたが、並行して実施していた横行大動脈縮窄 (Transverse aortic constriction; TAC)による圧負荷心肥大モデルにおいて、より顕著に T 細胞の関与が強く観察された。そこで計画を変更し、TAC 心肥大モデルにおける亜急性期～慢性期の免疫学的解析を行ない炎症の収束と組織修復におけるマクロファージと T 細胞の役割を明らかにすることを目的とした。

(1) 亜急性期～慢性期の肥大心筋における炎症細胞の動態を把握

TAC 後の心臓 CD45 陽性細胞をフローサイトメトリー (FCM) および一細胞 RNA シークエンス(sc-RNAseq)で解析する。WT マウスの心臓と T 細胞を欠損する CD3 KO マウスの心臓における CD45 陽性細胞の比較により、T 細胞の役割を明らかにする。

## (2) 亜急性期に修復性マクロファージを誘導する因子の解明

(1) で得られた結果(T細胞欠損により Ly6c 低発現マクロファージ(Ly6clow Mac)が増加し、心肥大後の心機能の低下は抑制される)をもとに、その機序を解明するために次項目の4つの検討を進める。

Ly6clow Mac の増加によっておきる肥大の性質の違いの検討。CD3 KO マウスでは Ly6clow Mac が増加し、WT に比べ心機能を保つ代償的な肥大が起きている可能性が推測された。そこで、Ly6clow Mac が増加することによって起きる心筋細胞の肥大と通常の肥大の性質の違いについて詳しく検討するため、TAC2w の WT マウスと CD3 KO マウスの心筋細胞を RNAseq および sc-RNAseq で解析する。

肥大の性質の差を起こす新規因子の特定。TAC1w の心臓 CD45 陽性細胞の sc-RNAseq の結果を分析し、Ly6clow Mac から分泌される新規因子を同定する。

Ly6clow Mac の増加を抑制する T 細胞の心臓抗原特異性の検討。CD3 KO マウスに WT の CD8 陽性 T 細胞(WT-CD8+T)とオボアルブミン(Ovalbumin; OVA)にしか反応しない T 細胞受容体(T cell receptor; TCR)をもったマウス(OT1 マウス)から分離した CD8 陽性 T(OT1-CD8+T)細胞を移入し、解析する。

T 細胞欠損による Ly6clow Mac が増加する理由の解明。CD45 陽性細胞および心筋細胞の sc-RNAseq データからどの細胞やどのようなパスウェイに影響が出るのかを考察する。

## 4. 研究成果

### (1) 亜急性期～慢性期の肥大心筋における炎症細胞の動態を把握

これまで、組織修復は組織障害の炎症収束の過程で起きると考えられてきた。しかしながら、組織のメンテナンスは常に行われており、その主役のひとつは心臓においては Ly6clow Mac である。Ly6clow Mac は定常状態から心臓に存在し、TAC モデルにおいては早期に増殖し、炎症に対して保護的に働くことが知られている。本研究でも TAC1w の心臓 CD45 陽性細胞を FCM および sc-RNAseq で解析比較したところ、Ly6clow Mac の増殖を確認した。T 細胞を欠損する CD3 KO マウスの心臓においては、非 TAC 時、TAC 時とも WT に比べ Ly6clow Mac が多くみられることが分かった。これは予想に反して Treg を含む CD4 陽性 T 細胞ではなく主に CD8 陽性 T(CD8+T)細胞の欠損によることが示された。また、定常状態から Ly6clow Mac が多い CD3 KO マウスに TAC を行ったところ、早期の肥大の程度は進むものの、最終的な心不全は起こしにくいことが分かった。以上のことより、T 細胞、特に CD8+T 細胞が存在しないと、常在する Ly6clow Mac が増え、TAC 時にもその増殖がより大きく起き、慢性期の心不全が軽減されることが示された。

### (2) 亜急性期に修復性マクロファージを誘導する因子の解明

#### Ly6clow Mac の増加によっておきる肥大の性質の違いの検討

TAC2w 後の CD3 KO マウス、CD8+T 細胞を抗体で除去したマウスおよび WT マウスの心筋細胞を RNAseq および sc-RNAseq で解析したところ、肥大の程度だけでなく、心筋細胞の性質が異なっていることが示された。特に T 細胞を欠損させると心筋細胞においてインスリン様成長因子 1(Insulin-like growth factor 1; IGF1)受容体の発現が有意に上昇していることが示された。

#### 肥大の性質の差を起こす新規因子の特定

TAC1w の心臓 CD45 陽性細胞の sc-RNAseq の結果から、Ly6clow Mac から分泌されている因子を抽出した。実際に CD45 陽性細胞をソーティングし、mRNA を測定したところ、成長因子である IGF1 および Amphiregulin の上昇を確認した。これらが心筋細胞肥大の性質を変化させるか、個々についてさらなる検討が必要である。

#### Ly6clow Mac の増加を抑制する T 細胞の心臓抗原特異性の検討

CD3 KO マウスに WT-CD8+T 細胞と OVA にしか反応しない TCR をもったマウス(OT1 マウス)から分離した OT1-CD8+T 細胞を移入した。OT1-CD8+T 細胞移入に比べ WT-CD8+T 細胞移入では心筋の Ly6clowMac の減少には有意な差を認めなかったが、心臓の肥大は抑制された。このことから CD8+T 細胞は何らかの抗原を認識して代償性の心肥大にかかわっていることが示された。

T 細胞欠如により Ly6clow Mac が増加する理由の解明

心筋細胞の RNAseq や sc-RNAseq のデータから、T 細胞が存在しないと心筋細胞のコロニー刺激因子 1(Colony Stimulating Factor 1; Csf1)の発現が上昇することが示された。Csf1 の上昇が Ly6clow Mac 増加につながることを示唆されたが、メカニズムの解明にはさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Minako, Komai Kyoko, Mise-Omata Setsuko, Iizuka-Koga Mana, Noguchi Yoshiko, Kondo Taisuke, Sakai Ryota, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Nakatsukasa Hiroko, Chikuma Shunsuke, Shichita Takashi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 565
2. 論文標題 Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 246 ~ 250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-018-0824-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------