

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15197

研究課題名(和文) 内臓脂肪CD4 T細胞の免疫老化を標的とした糖尿病・心血管疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies for cardiovascular diseases by targeting immunosenescence

研究代表者

白川 公亮 (Shirakawa, Kohsuke)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・学振特別研究員(PD)

研究者番号：30626388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、オステオポンチン(OPN)が心筋梗塞後の組織修復時に、死細胞のクリアランスと菲薄化した梗塞巣の線維化の両方を促進するために不可欠な役割を果たし、心筋梗塞後梗塞巣特異的に増加するGalectin-3hiCD206+マクロファージが心臓におけるOPNの主な供給源であることを解明した。心筋梗塞後の心臓マクロファージにおけるSpp1(OPNをコードする遺伝子)転写活性化には、IL-10とM-CSFは相乗的に作用して心臓マクロファージのSTAT3とERKを活性化し、その結果、Galectin-3とMerTKの発現を上昇させて、OPN産生マクロファージの機能的成熟につながる事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性心不全をはじめとした心不全の予後は進行癌と同様にきわめて予後不良である。

本研究では、心筋梗塞後創傷治癒過程におけるオステオポンチンの役割や産生細胞及びその分化機序を解明した。また、オステオポンチンをコントロールすることにより心筋梗塞後創傷治癒を促進し、心不全の病態を改善させる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We clarified that osteopontin (OPN) plays an essential role in accelerating both reparative fibrosis and clearance of dead cells (efferocytosis) during tissue repair after myocardial infarction (MI) and galectin-3hiCD206+ macrophages is the main source of OPN in post-MI heart. IL(Interleukin)-10-STAT3-galectin-3 axis is essential for Spp1 (encoding OPN) transcriptional activation in cardiac macrophages after MI. Furthermore, we also clarified that IL-10 and M-CSF act synergistically to activate STAT3 and ERK in cardiac macrophages, which in-turn upregulate the expression of galectin-3 and MerTK, leading to the functional maturation of OPN-producing macrophages.

研究分野：循環器

キーワード：オステオポンチン 心筋梗塞 心不全 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患に伴う死亡率は全人口の15%以上を占め、悪性新生物に次ぐ第2位の割合である。特に虚血性心疾患は急性期には心筋壊死に伴う致死的不整脈や急性心不全を引き起こし、慢性期には心臓リモデリングが進行し慢性心不全・心不全死へと移行する。心不全の5年生存率は50%に満たず、進行癌の予後と同様に極めて不良である。心不全をはじめとした心血管疾患は肥満と加齢が共通の危険因子である。申請者は肥満と加齢の病態に関与するOsteopontinという物質の研究を行ってきた。過剰なOsteopontinは慢性炎症を惹起し生体に不利に作用するが、適切に分泌されれば創傷治癒においては有利に作用する。このOsteopontinの持つ二面性と産生制御機序を明らかにすることが、Osteopontin関連疾患の病態制御につながる。

2. 研究の目的

心不全を克服するためには、心臓に様々な損傷やストレスが加わった場合の適応・修復制御機構とその破綻メカニズムの解明が必要である。慢性期の心臓リモデリングは、急性期の代謝や免疫応答が大きな原因となるため、急性期の障害を受けた心臓における代謝や免疫応答の時空間軸に沿った変化の過程を捉え、治療介入ポイントを発見することは、慢性期の心筋リモデリングの改善に大きく関与する。Osteopontinは心筋梗塞後組織修復過程で必須の分子であり、Osteopontin欠損マウスでは適切な線維化が促進されず創傷治癒が遅延する。申請者は、心不全に対する新規治療開発のために、心筋梗塞後のオステオポンチン産生細胞の同定とその分化機序と制御機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

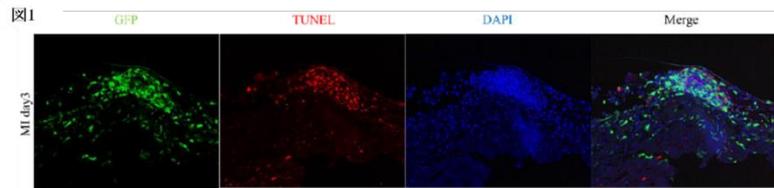
8から10週齢のC57BL/6(B6)マウス、EGFP-*Spp1*ノックインレポーターマウス、*Spp1*ノックアウト(KO)マウス、*Lgals3* KOマウス、*Il10* KOマウス及び*Il10* KO / EGFP-*Spp1* KIレポーターマウスに左前下行枝結紮による心筋梗塞を作成した。心筋梗塞後3日目梗塞巣のCD45⁺F4/80⁺Ly6G⁻マクロファージをフローサイトメトリーで解析した。心筋梗塞後にStattic (STAT3阻害剤), SCH772948 (ERK1/2阻害剤), 抗IL-10抗体 (JES5-2A5), 抗M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子)抗体 (5A1)を心筋梗塞作成後に腹腔内投与した。また、心筋梗塞作成直後から3日目まで10ngのrecombinant M-CSF (rM-CSF)を腹腔内投与した。各々、心筋梗塞後3日目の梗塞巣マクロファージをフローサイトメトリーで解析した。各マウスの骨髄細胞由来CD11b⁺Ly6G⁻細胞を、rIL-10 (10 ng/mL), rIL-4 (10 ng/mL)及びrM-CSF (10 ng/mL)で刺激し、各々10 µM Stattic, 100 pM Colivelin (STAT3活性化剤), 5 µM SCH772948 (ERK1/2阻害剤)を付加した。また、si*Lgals3*及びsi*Mertk*を用いてノックダウンを実施した。培養後のマクロファージをフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1) 心筋梗塞後day3のオステオポンチン産生細胞の同定

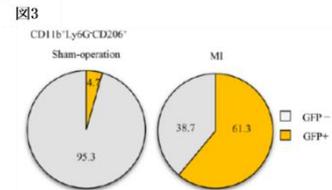
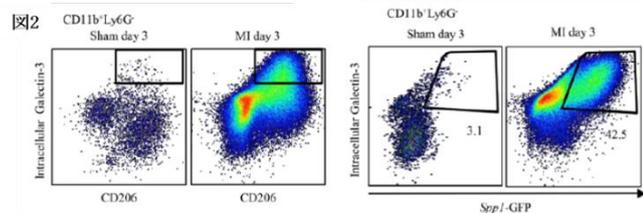
EGFP-*Spp1*ノックインレポーターマウスに心筋梗塞を作成し、心筋梗塞後(day1, day3, day7, day14)もしくはsham手術後の心臓、血液、骨髄、脾臓の細胞をFlow cytometryで解析した。心筋梗塞の*Spp1*転写活性はほぼ独占的に心筋梗塞巣のマクロファージで上昇していることが分かった。また、*Spp1*転写活性のピークは心筋梗塞後day3であった。免疫染色の解析で

は、*Spp1* 転写活性が上昇したマクロファージは TUNEL 陽性の死細胞が集積する梗塞巣に集積していることが分かった(図1)。



(2) *Spp1* 転写活性が上昇したマクロファージサブセットの解析

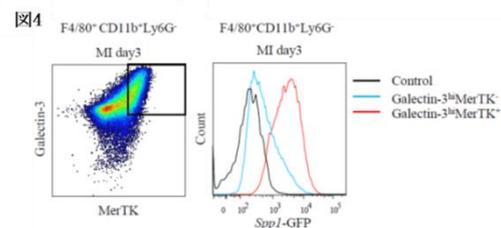
C57/6JB マウスに心筋梗塞を作成し、Sham operation, day1, day3, day7, day14 の心筋梗塞層マクロファージを FACS でソートして回収し、マイクロアレイにより遺伝子プロファイルの動態を解析した。*Spp1* 遺伝子の発現は、Flow cytometry の解析と同様に day1 から上昇し、day3 でピークを迎えた。*Spp1* 遺伝子と同様の挙動を示す遺伝子を約 50 個抽出し、その中から *Lgals3* に注目した。*Lgals3* は Galectin-3 をコードする遺伝子であり、Galectin-3 は臨床において線維化のマーカーとして認識されていると共に、組織修復過程においては線維化だけではなく壊死細胞のクリアランスにも重要な役割を担っている。Galectin-3 の発現を Flow cytometry で解析すると、Sham 手術後の心臓マクロファージに比して、心筋梗塞後マクロファージでは細胞内 Galectin-3 の発現が著明に上昇していることが明らかになった。さらに、*Spp1* 転写活性は心筋梗塞後心臓マクロファージの中でも、Galectin-3 を高発現したサブセットで著明に上昇していた(図2)。*Spp1* 転写活性上昇マクロファージはほぼ CD206 陽性のいわゆる M2 マクロファージであり、心筋梗塞後の M2 マクロファージの 60-70%程度で *Spp1* 転写活性が上昇していた(図3)。



(3) *Spp1* 転写活性上昇機序の解明

梗塞後の組織修復に寄与する M2-like macrophage はいわゆる M(IL4)が重要視されてきた。M2 サブセットの中には他にも M(IL-10)などが存在する。そこで、EGFP-*Spp1* ノックインレポーターマウスの骨髄の CD11b⁺Ly6G⁻細胞を回収して、IL4 及び IL10 で刺激すると、Osteopontin は IL-4 では誘導されず、IL-10 でのみ誘導された。以上の結果は、心筋梗塞後の組織修復においては M(IL-10)がより重要である可能性が示唆された。

さらに、IL-10 で刺激分化した骨髄由来マクロファージは Galectin-3 の発現が上昇し、Galectin-3 を発現した細胞は MerTK を共発現することが分かった。MerTK はマクロファージの Efferocytosis 機能に必須の分子であり、実際に心筋梗塞後の心臓マクロファージの *Spp1* 転写活性はほぼ独占的に MerTK⁺Galectin-3^{hi}サブセットで上昇していた (図4)。さらに、MerTK⁺Galectin-3^{hi}マクロファージは、STAT3 と ERK1/2 の両方の強い活性化を示した。

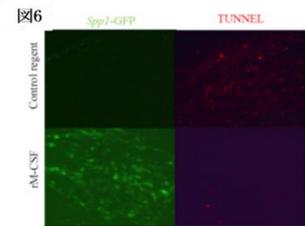
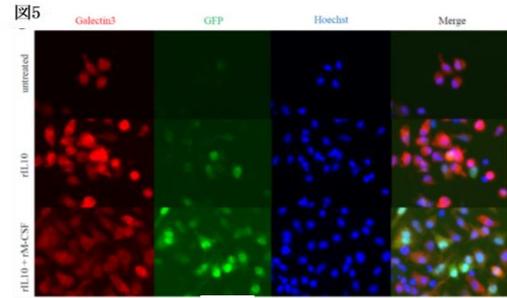


心筋梗塞後マウス及び骨髄由来マクロファージへの STAT3 阻害剤投与は Osteopontin 産生 MerTK⁺Galectin-3^{hi}マクロファージの分化を抑制した。しかし、STAT3 活性化剤である Colivelin 単独では *Spp1* 転写活性を誘導しなかった。さらに、心筋梗塞後マウス及び骨髄由来マク

ファージへの ERK1/2 の阻害は、MerTK や Galectin-3 の発現に影響を与えることなく、*Spp1* の転写活性化を抑制した。

(4) *Spp1* 転写活性には IL10 と M-CSF が協調的に働くことが重要である

心筋梗塞を受けた IL-10 ノックアウト / EGFP-*Spp1* ノックインマウスでは、Osteopontin 産生マクロファージは減少したが、完全には消失しなかった。IL-10 と M-CSF は、STAT3 と ERK1/2 を相乗的に活性化し、骨髄由来マクロファージにおける OPN 産生 MerTK⁺Galectin-3^{hi}マクロファージの分化を促進した(図 5)。抗 IL-10 抗体と抗 M-CSF 抗体の併用投与により、心筋梗塞後の心臓において、OPN 産生マクロファージの数が抗 IL-10 抗体単独投与よりも大幅に減少した。さらに、心筋梗塞後の rM-CSF の投与は OPN 産生マクロファージを増加させ、創傷治癒を促進した(図 6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kohsuke Shirakawa	4. 巻 20
2. 論文標題 Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors Correct Metabolic Maladaptation of Proximal Tubular Epithelial Cells in High-Glucose Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular science	6. 最初と最後の頁 7676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207676.	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 -

1. 著者名 Kohsuke Shirakawa	4. 巻 18
2. 論文標題 MerTK Expression and ERK Activation Are Essential for the Functional Maturation of Osteopontin-Producing Reparative Macrophages After Myocardial Infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e017071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.017071. Epub 2020 Aug 31.	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 -

1. 著者名 Kohsuke Shirakawa	4. 巻 18
2. 論文標題 IL (Interleukin)-10-STAT3-Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2021-2035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035047.	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 -

1. 著者名 Kohsuke Shirakawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Influence of long term administration of tofogliflozin on chronic inflammation of visceral adipose tissue in mice with obesity induced by a high-fat diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0211387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0211387	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 -

1. 著者名 Kohsuke Shirakawa, Wataru Yano, Keisuke Inoue, Yoshinori Katsumata, Jin Endo, Motoaki Sano	4. 巻 14
2. 論文標題 Influence of long term administration of tofogliflozin on chronic inflammation of visceral adipose tissue in mice with obesity induced by a high-fat diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0211387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211387	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kohsuke Shirakawa
2. 発表標題 Targeting Residual Inflammatory Risk: Promising Future for Cardiovascular Diseases ?
3. 学会等名 ISHR 2020
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白川 公亮
2. 発表標題 肥満関連疾患とオステオポンチン
3. 学会等名 CVMW 2019
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------