

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19369

研究課題名(和文)心線維化におけるマクロファージ極性変化の役割

研究課題名(英文)The roles of polarization of macrophages in cardiac fibrosis

研究代表者

安部 元 (Hajime, Abe)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50746576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：心線維化は心不全の独立した予後不良因子であるにも関わらず、有効な治療方法が現時点では見つかっていない。心線維化の解明は臨床循環器領域において極めて重要な課題である。心臓リモデリングにおけるマクロファージの役割は現在でも不明である。マクロファージは近年M1マクロファージとM2マクロファージに分けられることが知られている。この研究では心臓リモデリングにおけるマクロファージの役割について研究を行った。

その結果、M1マクロファージが心臓リモデリングの抑制に働いていることが判明した。この研究により、M1マクロファージと心臓リモデリングにおける新規の相互関係が明らかとなり、さらに研究を進めていく。

研究成果の概要(英文)：While macrophages seem to play a key role in cardiac remodeling, their precise functions still remain unclear. In this study, we investigated the roles of cardiac macrophages in the process of cardiac remodeling using Transverse aortic constriction (TAC) model. Macrophages can be classified into 2 broad phenotypes, namely M1 macrophages and M2 macrophages. Most of the recruited cells at day 3 were M1 macrophages and day 7 were M2 macrophages. We have previously reported that the hypoxia response transcription factor, HIF-1a, plays an essential role in M1 macrophages activation. To verify the roles of M1 macrophages in cardiac remodeling, we subsequently generated macrophage specific HIF-1a knockout mice (mHIF-1a CKO). FACS analysis revealed that M1 macrophages accumulation was significantly decreased and more prominent cardiac fibrosis in mHIF-1a CKO mice after TAC. These results demonstrate a novel functional link between M1 macrophages and cardiac remodeling.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：心不全 炎症 マクロファージ 心臓リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

心線維化は独立した生命予後増悪因子であるにも関わらず、現時点でも有効な治療法は無く、心線維化の病態機構の解明と治療法の開発は臨床循環器において極めて重要な課題である。近年、心臓リモデリングの病態にマクロファージを中心とした炎症シグナルの活性化が関わることが判ってきたが、心臓の線維化進展および退縮におけるマクロファージの役割については未だ明らかにされていない。

マクロファージはサブタイプとして、炎症惹起型(M1)と炎症抑制型(M2)に大きく分類されることがわかっている。低酸素環境において、細胞や組織はそれぞれ固有の応答を示すが、その主要な反応は Hypoxia inducible factor(HIF)-1、HIF-2 と呼ばれる一群の低酸素応答転写因子群により調節されている。

## 2. 研究の目的

以上を背景として本研究では以下の未解決かつ重要な課題を明らかにすることを目指す。

- (1) M1 マクロファージの心臓線維芽細胞に対する役割を解明する。
- (2) M1 マクロファージ由来線維芽細胞活性化抑制因子の探索、同定を行う

心臓線維芽細胞の活性化、および不活性化のプロセスにおいて心筋細胞に集積する極性の異なるマクロファージを解析することで、心臓線維化形成期および退縮期における極性の異なるマクロファージの役割を解析する。さらに、マクロファージ由来の心臓線維芽細胞活性化制御因子を同定することを目的とする。さらに研究を進めることで、M1 マクロファージ由来線維芽細胞活性化抑制因子の探索、同定を行う

## 3. 研究の方法

心臓の線維化進展および退縮におけるマクロファージの役割については未だ明らかにされていない。その大きな原因の一つは、実臨床に即した適切な動物モデルがないことであった。横行大動脈縮窄モデル (Transverse aortic constriction, TAC) は圧負荷により心線維化を発症させる病態モデルとして一般的に用いられてきた。一方、TAC はヒト臨床病態を想定した心線維化・心不全の退縮プロセスを反映するモデルとして適切ではなく、心不全・心線維化の退縮過程を再現する病態モデルの開発を我々は行ってきた。その結果、心線維化を一度誘導した後に横行大動脈における縮窄を解除する

ことで、心線維化を軽減させるマウス病態モデルを樹立することに成功した。

この心線維化退縮モデルにおいて、圧負荷時に心筋組織に集積する M1 マクロファージ、そして圧負荷解除時に心筋組織に集積する M2 マクロファージについて、それぞれのサブタイプのマクロファージが心臓線維芽細胞の活性化に重要な役割を果たしているとの仮説に基づき、以下の解析を行う。

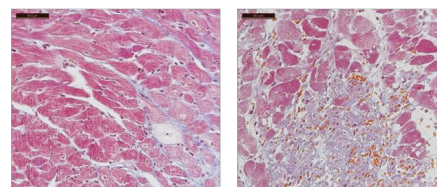
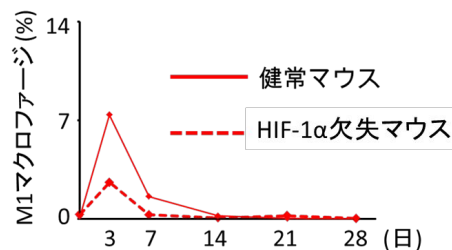
## 4. 研究成果

圧負荷心肥大、心線維化モデルである横行大動脈縮窄手術を行い、心臓に集積する炎症細胞につきフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、M1 マクロファージが Day3、M2 マクロファージが Day7 優位に心筋組織へ 2 相性の浸潤を示すことが分かった。また急性期に集積する M1 マクロファージはピモニダゾール陽性であり、低酸素環境に集積していると考えられた。そこで M1 マクロファージ活性化に必要な HIF-1 をマクロファージ特異的に欠失したマウス (mHIF-1 CKO) を作成し、心臓圧負荷手術を施行した。mHIF-1 CKO では急性期に心臓に集積する M1 マクロファージが著明に減少するだけでなく、心重量の増大、心筋収縮能の低下、心臓線維化の増強など心機能の有意な増悪、さらには生存率の低下が確認された (図 1)。

以上より急性期に心臓に集積する M1 マクロファージが心筋保護的に作用していることが確認された。

図 1. M1 マクロファージは心線維化を抑制する

さらに、心線維化形成期において集積する心臓線維化形成期に集積する M1 マクロファージが何らかの因子を分泌することで、心臓線



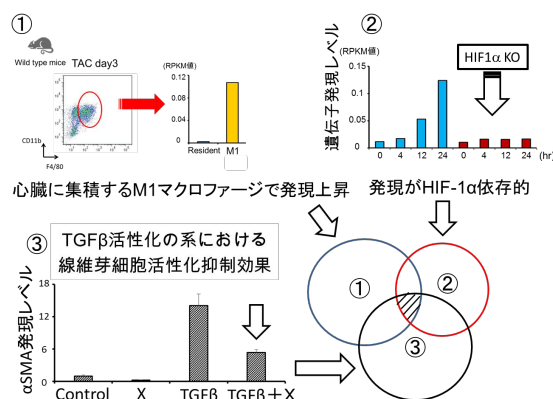
健常マウス マクロファージ特異的 HIF-1α 欠失マウス

維芽細胞の活性化を抑制しているとの仮説を構築し更なる解析を進めた。フローサイトメトリーを用いて、心線維化形成期に集積してくる M1 マクロファージを無菌的に採取し、その RNA 発現を RNA シークエンス法により網羅的解析を行った。その解析にあたり、M1 マクロファージ由来心臓線維芽細胞活性化抑制因子を同定するために、下記の 3 つの条件を同時に満たす因子の絞り込みを行うこととした。(図 2)

心筋組織に集積する M1 マクロファージにおいてレジデントマクロファージに比して発現が上昇する (RNA シークエンス法)

低酸素環境下において、HIF-1 依存的に発現が誘導される (RNA シークエンス法)  
TGF によるマウス心臓線維芽細胞活性化の系において活性化抑制作用をもつ

図 2. M1 マクロファージ由来の心臓線維芽細胞活性化制御因子の探索



今後、さらなる解析を進めることにより、未だに治療法のない心臓線維化の改善薬への臨床応用を目指した研究を進めていきたいと考えている。

#### 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 3 件)

- Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenborg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, Endo H, Inoue M, Xuan Z, Yoo H, Chen M, Ahn JM, Minna JD, Helke KL, Singh PK, Shackelford DB, Kim JW. Distinct Metabolic Phenotypes within Non-small Cell 1 Lung Cancer Define Selective Vulnerability to Glycolytic

Inhibition of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Nature Commun.* 2017 (in press). 査読有、

- Abe H, Iguchi N, Utanohara Y, Takada K, Hen Y, Machida H, Takeda N, Sumiyoshi T. Planimetry of the orifice area in aortic valve stenosis using phase-contrast cardiac magnetic resonance imaging. *Int Heart J.* 2017 (in press)
- Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R, Komuro I. HIF-1 $\alpha$ -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat Commun.* 2016 May 18;7:11635. doi: 10.1038/ncomms11635.

[学会発表](計 3 件)

- Abe H, Takeda N, Isagawa T, Semba H, Soma K, Koyama K, Wake M, Katoh M, Manabe I, Nagai R, Komuro I. Roles of Ly6Chi monocytes hypoxia signaling in cardiac remodeling, Keystone Symposium "Adaptations to Hypoxia in Physiology and Disease" (Whistler Conference Centre, Whistler, British Columbia, Canada, Feb. 2017)
- 安部 元, 武田 憲彦, 仙波 宏章, 相馬 桂, 小山 雄広, 和氣 正樹, 加藤 愛巳, 中釜 悠, 真鍋 一郎, 永井 良三, 小室 一成, 心臓リモデリングにおいて Ly6C high マクロファージは HIF-1-OncostatinM シグナルを介して心保護的に作用する、第 20 回 日本心血管内分 泌代謝学会学術総会「東京コンベンションホール(東京都) 2016/12/16」
- 安部 元, 武田 憲彦, 仙波 宏章, 相馬 桂, 小山 雄広, 和氣 正樹, 加藤 愛巳, 中釜 悠, 真鍋 一郎, 永井 良三, 小室 一成, 圧負荷後心臓リモデリングにおけるマクロファージ低酸素シグナルの役割、第 39 回日本高血圧学会「仙台国際センター(宮城県) 2016/10/2」

4. [図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6．研究組織

(1)研究代表者  
安部 元（ABE Hajime）  
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医  
研究者番号：50746576