

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09569

研究課題名(和文) 心臓マクロファージと血管・心筋細胞との相互作用による心臓突然死抑制機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for the prevention of sudden cardiac death by interaction between cardiac macrophages, blood vessels and cardiomyocytes

研究代表者

杉田 純一 (Sugita, Junichi)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：70755694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞はギャップ結合を介して電気興奮を伝播し、心臓全体の周期的な拍動を生み出している。ギャップ結合を構成する主要な蛋白としてコネクシン43が知られている。本研究により、心臓マクロファージからの分泌因子がコネクシン43をリン酸化することでギャップ結合の安定化に寄与し、心臓の電気伝導が維持されていることが分かった。心臓マクロファージが除去された状態、もしくは、分泌因子が欠乏した状態では、ギャップ結合の構造が乱れ、自由行動下においても不整脈が生じる。さらに、交感神経負荷や心負荷がかかると、致死性の不整脈が生じ、突然死に至ることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

突然死の原因は大半が心臓性であり、社会的損失が大きく、その解決が望まれている疾患である。本研究により、心臓内に存在する免疫細胞の一種であるマクロファージが不整脈の発生を抑制していることが分かり、免疫細胞が心臓の電氣的興奮伝播に寄与しているという新しい概念を提唱した。免疫細胞と不整脈の関係が明らかになったことで、今後免疫細胞をターゲットとした新たな不整脈治療が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiac impulse conduction occurs through gap junctions between cardiomyocytes, and induces rhythmical pulsation of the whole heart. Connexin43 is a major protein that constitute gap junctions.

In this study, we revealed that a secretory protein derived from cardiac macrophages contributes to the stability of gap junctions by phosphorylating connexin43, and maintains cardiac impulse propagation. Deletion of cardiac macrophages or the secretory protein causes disorganized gap junctions, and induces arrhythmias even in the free-moving state. In addition, both sympathetic and pressure overload are able to induce malignant arrhythmias, finally resulting in sudden cardiac death.

研究分野：循環器内科

キーワード：コネクシン アンフィレグリン リン酸化 ギャップ結合 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白血球の一種であるマクロファージは胎生期に全身の各組織に供給され、それぞれの組織に定着する。マクロファージは古典的には病原体を貪食する細胞として知られているが、最新の研究では、それぞれの組織において貪食機能以外の組織特有の機能を持つようになることが分かってきていた。例えば、脾臓に分布する赤脾髄マクロファージは古くなった赤血球や感染赤血球を貪食し、鉄のリサイクルに関与しており、脂肪組織のマクロファージは脂肪の生成やインスリン感受性の制御に関与している。しかし、心臓におけるマクロファージの役割についてはまだ詳しく分かっていなかった。

2. 研究の目的

申請者の研究グループでは、左室圧負荷に対して、心臓マクロファージから分泌されるアンフィレグリンが適切なストレス応答に重要であることを報告していた。しかし、右室圧負荷モデルでの検討はなされていなかったため、本研究では心臓マクロファージの右室圧負荷モデルにおける役割について解析した。また、心臓マクロファージがどのようにしてその役割を果たすのか、介在する因子について検討した。

3. 研究の方法

心臓マクロファージ、または、その介在因子をノックアウトしたマウスを作製し、心エコーやテレメトリー心電図、オプティカルマッピングにより心機能を解析し、免疫組織染色により心筋構造を解析した。さらに、右室圧負荷モデルや薬剤投与モデルを作製して、検討した。新生仔マウスの心筋を培養し、マクロファージを除去した場合や薬剤を添加した場合の培養心筋を、色素移動法やライブセルイメージングシステムにより解析した。

4. 研究成果

初めに、右室圧負荷モデルとして、マウスの肺動脈を拘縮することで右室特異的に圧負荷をかけるモデルを作製した。このマウスモデルでは、肺動脈拘縮後3日目の解析で、右室特異的にマクロファージや顆粒球、T細胞、B細胞といった炎症細胞が集積し、右室特異的に線維化が起こっていた。炎症細胞の役割を解析するために、それぞれの細胞を除去した状態で肺動脈を拘縮すると、マクロファージを除去したマウスは半分以上が4時間以内に死亡した。他の細胞を除去したマウスは死亡しなかった。マクロファージを除去したマウスの心電図では、肺動脈拘縮後に房室ブロックを呈し、心突然死を来していた。肺動脈拘縮後、心エコーで野生型マウスと同様に右室に圧負荷がかかっていることを確認し、組織学的検討で右室の大きさも野生型マウスと比較して拡大を認めなかった。これらの結果から、マクロファージは、右室圧負荷モデルにおいて、心臓の電気伝導を維持する役割があることが示唆された。

マクロファージが心臓の電気伝導に対して重要であるかを調べるため、マウス新生仔の培養心筋を用いて検討を行った。心臓の電気伝導はギャップ結合を介して行われる。最初に、ギャップ結合を介する色素の移動距離を測ることで、心筋間の電氣的なつながりの強さを評価した。心筋細胞のみの培養と比較して、マクロファージと心筋細胞を共培養した場合には、色素の移動度が有意に亢進した。次に、この作用を持つ因子が何であるかを検討し、既に同定していた候補蛋白であるアンフィレグリンの作用を調べた。すると、心筋細胞にアンフィレグリンを添加することで色素の移動度が亢進し、アンフィレグリンをノックアウトしたマクロファージではその作用がなかった。さらに、アンフィレグリンの受容体阻害剤でも、その作用が打ち消された。次に、ライブセルイメージングシステムにより心筋細胞の興奮伝播速度を計測することで、色素の移動度の亢進と興奮伝播速度に相関があるかを調べた。結果として、同様にアンフィレグリンにより心筋細胞の興奮伝播速度が亢進することを確認した。心筋細胞のギャップ結合は、主にコネクシン43というタンパク質により構成される。コネクシン43に緑色蛍光タンパクを付加することでギャップ結合の構成される過程を可視化した。この緑色蛍光タンパクを付加したコネクシン43を培養細胞に導入し、アンフィレグリンが実際にギャップ結合の形成に寄与しているかを検討した。結果、アンフィレグリンによりギャップ結合の形成が促進され、受容体阻害剤によりその作用が打ち消された。以上の培養細胞の実験結果から、心臓マクロファージは、アンフィレグリンを介してコネクシン43によるギャップ結合形成を促進し、心筋細胞の電気伝導を亢進させる作用があることが分かった。

次に、アンフィレグリンの生体内での役割を解析するため、アンフィレグリンをノックアウトしたマウスを用いて検討した。アンフィレグリンをノックアウトしたマウスを自由行動下にテレメトリー心電図を記録すると、野生型マウスでは見られない、房室ブロックや心室性期外収縮、洞停止が観察され、その頻度は覚醒前の時間帯に集中していた。交感神経の賦活化が不整脈に寄与しているかを検討するため、イソプロテレノール負荷を行ったところ、アンフィレグリンノッ

クアウトマウスは房室ブロックや心室性不整脈を起こし、突然死を来した。さらに、このマウスに肺動脈拘縮により右心負荷を与えると、マクロファージを除去したマウスと同様に、完全房室ブロックにより突然死した。心筋細胞のギャップ結合を免疫組織染色およびウェスタンブロッティングにより解析すると、アンフィレグリンをノックアウトしたマウスの心筋細胞ではコネクシン 43 の配列が乱れ、ギャップ結合の構造に異常があることが分かった。アンフィレグリンを腹腔内投与し 30 分後ギャップ結合の構造は正常化した。また、ウェスタンブロッティングではコネクシン 43 の蛋白量に変化はないもののリン酸化が阻害されていた。以上の結果から、アンフィレグリンは生体内においても心臓の電気伝導の維持に重要であることが示唆された。

心臓マクロファージ由来のアンフィレグリンが重要であるかを検討するため、アンフィレグリンノックアウトマウスから骨髄移植を行った野生型のマウスを作製した。このマウスでは、心臓中の免疫細胞がアンフィレグリンノックアウトマウス由来となる。右室圧負荷モデルを検討すると、同様に、房室ブロックによる突然死を来し、免疫組織染色では心筋細胞のギャップ結合に異常が見られた。さらに、心臓の免疫細胞のシングルセル解析を行うと、マクロファージがアンフィレグリンの由来であることが確認された。以上の結果から、心臓マクロファージ由来のアンフィレグリンが心臓の電気伝導の維持に重要であることが確認された。

アンフィレグリンは上皮増殖因子受容体に作用することが知られており、この受容体に作用する他のリガンドとしてヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HBEGF)、腫瘍細胞増殖因子- (TGF-) が知られている。これらのリガンドについても同様の作用があるかを検討したところ、共に、心筋の興奮伝播に関しての作用はなく、コネクシン 43 のリン酸化も誘導しなかった。次に、アンフィレグリンの上皮増殖因子受容体の下流のシグナル経路を検討した。ギャップ結合を構成するコネクシン 43 の複数のリン酸化修飾部位に対して変異を導入し、その遺伝子を含むプラスミドを培養細胞にトランスフェクションし、アンフィレグリンによるリン酸化が消失するかを検討した。結果として、アンフィレグリンの添加により野生型のコネクシン 43 では見られるリン酸化が、消失する変異部位が複数同定され、アンフィレグリンは上皮増殖因子受容体以下、複数の経路を介してギャップ結合の形成に寄与する可能性が示された。

最後に、アンフィレグリンが実際に心臓における電氣的興奮の伝導にどのように影響しているかを調べるために、マウスの心臓を取り出し、電位感受性色素を用いることで電氣的興奮を可視化して、高速カメラによるランゲンドルフ灌流心撮影を行った。アンフィレグリンノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて長軸方向の電気伝導速度は変化しなかったが、短軸方向の速度が低下していた。結果として、電気伝導の異方性が増加していた。さらに、ペーシングによる期外刺激や頻回刺激を行い、不整脈誘発を試みたところ、アンフィレグリンノックアウトマウスでは心室頻拍や心室細動が誘発され、不整脈が誘発されやすいことが分かった。以上の結果から、アンフィレグリンが、心臓において電気伝導を維持し、抗不整脈作用を有することが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sugita Junichi、Fujiu Katsuhito	4. 巻 1
2. 論文標題 Emerging Function of Cardiac Macrophages Ushers in a New Era for the Electrophysiology of the Heart	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 558 ~ 563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1253/circrep.CR-19-0103	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 Eiler Anne-Claire、Sugita Junichi、Ihida Satoshi、Toshiyoshi Hiroshi、Fujiu Katsuhito、Levi Timothy、Tixier-Mita Agnes	4. 巻 25
2. 論文標題 Bioelectrical Signal Analysis of Mouse Cardiomyocyte Culture recorded on Thin-Film-Transistor Sensor Arrays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of International Conference on Artificial Life and Robotics	6. 最初と最後の頁 163 ~ 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5954/ICAROB.2020.OS6-4	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 Sugita Junichi、Fujiu Katsuhito	4. 巻 59
2. 論文標題 Systemic Inflammatory Stress Response During Cardiac Surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 457 ~ 459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1536/ihj.18-210	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Junichi Sugita, Katsuhito Fujiu, Yukiteru Nakayama, Takumi Matsubara, Jun Matsuda, Tsukasa Oshima, Yuxiang Liu, Issei Komuro, Ichiro Manabe
2. 発表標題 Resident Cardiac Macrophages Maintain Electrical Impulse Propagation through Amphiregulin Secretion
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junichi Sugita, Katsuhito Fujiu, Yukiteru Nakayama, Takumi Matsubara, Jun Matsuda, Tsukasa Oshima, Ichiro Manabe, Issei Komuro
2. 発表標題 Impacts of brain remodeling on heart failure development
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junichi Sugita, Katsuhito Fujiu, Yukiteru Nakayama, Takumi Matsubara, Jun Matsuda, Tsukasa Oshima, Ichiro Manabe, Issei Komuro
2. 発表標題 Amphiregulin Derived from Cardiac Macrophages Prevents Lethal Arrhythmias
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junichi Sugita, Katsuhito Fujiu, Yukiteru Nakayama, Takumi Matsubara, Jun Matsuda, Tsukasa Oshima, Ichiro Manabe, Issei Komuro
2. 発表標題 Cardiac macrophage contributes to cardiac impulse conduction.
3. 学会等名 ESC CONGRESS 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	藤生 克仁 (FUJIU Katsuhito) (30422306)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	