

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10738

研究課題名(和文) 心臓M2型マクロファージによる心筋梗塞発症後の組織修復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Alternatively activated macrophages are essential to fibrotic repair of infarcted myocardium.

研究代表者

白石 学 (Shiraishi, Manabu)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10438658

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)：心筋梗塞発症の際、脆弱な組織修復が後の心破裂や心不全の発症に深く関わっている。しかしながら、不完全な組織修復による心破裂、心不全に陥る分子メカニズムは解明されていない。本研究では、虚血障害により線維芽細胞の老化が生じ、さらにマクロファージが障害を受けた線維芽細胞の保護作用を有することを明らかにした。また、同時にin vitroの線維芽細胞障害モデルを作成し、マクロファージが特定の分泌タンパク質を介して障害を受けた線維芽細胞の保護作用があることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年心筋梗塞後の心不全患者は増加傾向で、心破裂による死亡率も極めて高いことから、心破裂・心不全の根本的な病因究明と新たな治療の確立が急務である。本研究の特色は、心筋梗塞発症後の心筋修復のメカニズムを掘り下げ、心破裂を予防するために十分な組織修復を誘導し、かつ心機能確保のための梗塞後の線維芽細胞を保護するための主要調節因子を特定することである。梗塞時のダメージを抑制することによるメリットが本研究で明らかになれば、長期的予後に対する新たな戦略に繋がる可能性がある。従って、本研究によって得られる研究成果は、心破裂予防・心不全予後の向上に重要な意義を有している。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported that cardiac macrophages play the central role in cardiac repair post myocardial infarction (MI). However, the underpinning mechanism of this protective process is not fully understood. We hypothesized that reparative macrophages would protect fibroblasts from such damages and promote them to form fibrotic tissues. In the murine heart post-MI induced by coronary artery ligation, approximately one third of accumulated fibroblasts were apoptotic post-MI. Of note, this apoptosis was decreased when macrophages were further augmented by IL-4 administration. We further investigated this macrophage-mediated prevention of fibroblast damage in vitro. Hydrogen peroxide-induced apoptosis of cultured cardiac fibroblasts was markedly reduced by co-culture with bone marrow-derived macrophages. In conclusion, reparative macrophages protect cardiac fibroblasts from MI-related injury, which would support development of solid replacement fibrosis in the infarcted myocardium.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心筋梗塞 線維芽細胞 細胞老化 マクロファージ 組織修復

1. 研究開始当初の背景

心臓再生医療における主たる目標は、心筋梗塞発症後にいかにして心筋細胞の修復を増強させ、心不全患者の心機能を維持することである。これまで数十年にわたり心筋幹細胞やそれに代わる心筋細胞分裂増殖、非心筋細胞の心筋細胞へのリプログラミング及び細胞移植療法が研究されてきた(Laflamme MA *et al.* Nature 2011, Bersell K *et al.* Cell 2009)。心筋梗塞後の心臓修復において心筋幹細胞の寄与を明確に示した報告はないが、既存の心筋の分裂増殖により新しい心筋細胞が増加することは知られている(Jopling C *et al.* Circulation 2012)。一方、損傷した心筋の再生についてはゼブラフィッシュのような特定の脊椎動物において観察されている(Poss KD *et al.* Science 2002)。しかし、哺乳類に関して言えば、成人期には明らかにその心筋の分裂増殖能が失われてしまうことが報告されている(Porrello ER *et al.* Science 2011)。つまり、心筋梗塞で失われた心筋をその増殖や再生を促すことのみによって、再び心機能を回復させることは現時点では非常に困難な方法と言わざるをえない。そこで、心筋梗塞による組織障害を最小限にとどめ、心線維芽細胞による適切な心臓修復を促進させることにより予後の改善を図ることが重要と考えられてきている。

近年、M2 マクロファージは様々な臓器において、その組織修復や再生において重要な役割を果たしていることが報告されており(Gordon S *et al.* Immunity 2010, Wang G *et al.* PNAS 2015)、このM2 マクロファージによる線維芽細胞の制御機構が非常に注目されている。実際、申請者らは最近、心筋梗塞モデルにおいてM2 マクロファージ集積を選択的に抑制すると、線維芽細胞の組織修復能も同時に抑制されて心破裂が著しく増加し、心機能も低下することを明らかにした(図1)。また、インターロイキン4の投与によりM2 マクロファージを選択的に活性化すると、心線維芽細胞を介した組織修復能が著しく向上することを証明した(Shiraishi M *et al.* J Clin Invest 2016)。しかし、このような修復機構が存在していながら、心筋梗塞では、梗塞後の心筋菲薄化やリモデリングにより心不全に陥る患者も少なくない。これらの知見から、申請者は心線維芽細胞による心筋組織修復機能も心筋梗塞に伴う炎症により障害を受けているのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

予備実験で心筋梗塞発症後の心臓における炎症を炎症性サイトカインの発現量で評価したところ慢性期においても炎症が続いており、組織修復のために梗塞領域に集積した心線維芽細胞は炎症による障害を受け、アポトーシスを起こしていることが確認できた。さらに、*in vitro*の心線維芽細胞 DNA 障害モデルを確立し、M2 マクロファージと共培養したところ、興味深いことにM2 マクロファージが障害を受けた心線維芽細胞に対して、液性因子を介して細胞死と細胞老

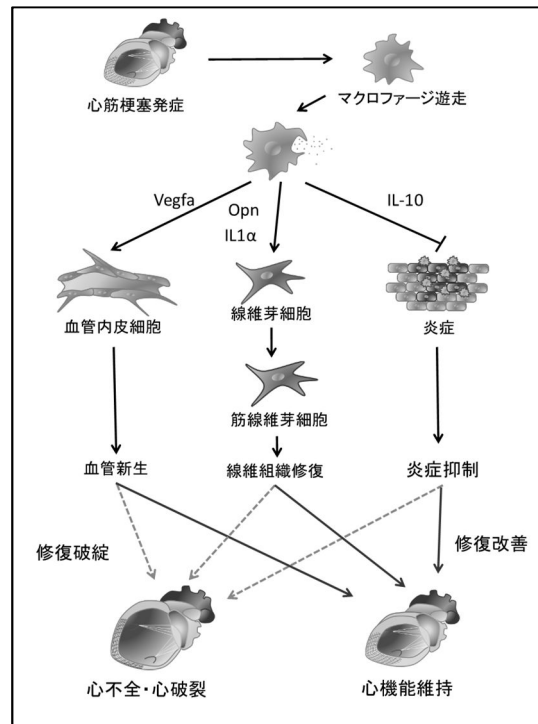


図1：心筋梗塞後には線維芽細胞を介したM2 マクロファージによる組織修復メカニズムが存在する

化を抑制し、増殖性を保つ役割を果たすことがわかった。これら予備実験による心線維芽細胞に対する保護作用は心筋にも適用できる可能性がある。また、慢性心不全の進行における心線維芽細胞の異常の積極的関与も指摘されていることを考慮すれば、M2 マクロファージが分泌する責任因子を同定することは、治療戦略上、極めて重要であると推測される。本研究の具体的な達成目標は、M2 マクロファージの組織修復メカニズムの解明である。本研究では、正常心筋及び心筋梗塞発症後の心臓から M2 マクロファージを単離し、マイクロアレイ法により遺伝子発現の違いを 2 群間で解析し、心筋梗塞発症後の M2 マクロファージで特異的に高発現する分泌蛋白遺伝子を選別する。発現を確認した分泌蛋白を用い、DNA 障害を受けた線維芽細胞と新生仔心筋のアポトーシスや細胞老化抑制・細胞増殖に関するシグナル伝達経路が活性制御されているかを検証する。

3 . 研究の方法

本研究を通じて重視する点は、急性心筋梗塞発症後における心筋梗塞後の M2 マクロファージによる組織修復の分子メカニズム解明である。平成 29 年度は DNA 障害を与えた線維芽細胞と M2 マクロファージを用いた *in vitro* 実験から、M2 型マクロファージがアポトーシス制御及び組織修復に関与することを証明する。さらに心筋梗塞モデルから取り出した M2 マクロファージの遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析することで、アポトーシス制御・組織修復に関与する遺伝子及びシグナル伝達経路を特定する。

(1) 障害を受けた線維芽細胞の救済を担う M2 マクロファージの分泌蛋白を特定する

正常心筋及び心筋梗塞発症後の心臓から M2 マクロファージを単離する。マイクロアレイ法により M2 マクロファージの遺伝子発現の違いを 2 群間で網羅的に解析し、心筋梗塞発症後の M2 マクロファージで特異的に高発現する分泌蛋白遺伝子を選別する。マイクロアレイ法により得られたデータを解析し、M2 マクロファージが心筋線維芽細胞の組織修復の分子メカニズム及びシグナル伝達経路に与える影響を明らかにする。バイオインフォマティクス分析で線維芽細胞のアポトーシスと細胞老化抑制・細胞増殖に関する遺伝子を同定し、同時にシグナル伝達経路が活性制御されていることを検証する。

(2) 心筋梗塞発症時の M2 マクロファージによる線維芽細胞救済を評価する

申請者らはこれまでの研究により、心筋梗塞発症後は慢性期においても心臓内では持続的に炎症が増悪し、これに伴い障害を受けた線維芽細胞が心筋梗塞領域においてアポトーシスを起こしていることを確認している。そこで本研究の仮説である M2 型マクロファージが線維芽細胞のアポトーシス制御・組織修復に関与することを証明するため、*in vitro* での実験を計画した。正常心筋から線維芽細胞を回収し、1. 健全な線維芽細胞、2. 過酸化水素水を使用し DNA 障害を与えた線維芽細胞、3. M2 型マクロファージと共培養した DNA 障害を与えた線維芽細胞、4. マクロファージと共培養した DNA 障害を与えた線維芽細胞に実験 1 で特定したタンパク質 (Protein X) の中和抗体を加えた 4 群を作成する。線維芽細胞のアポトーシス、遊走、細胞分裂を免疫染色で評価する。さらに各グループの線維芽細胞から RNA を抽出し、アポトーシス制御・組織修復に関連する遺伝子の発現量を測定し、M2 型マクロファージが障害を受けた線維芽細胞の制御に関わることを証明する。これに加え、線維芽細胞の活性化、分裂、遊走の評価も行う。

4. 研究成果

(1) マウス心筋梗塞モデルにおける細胞障害の評価

心筋梗塞発症後のマウス (C57BL6/J) 心臓の組織切片を観察すると、心筋梗塞発症後 7 日目頃をピークに CD90⁺線維芽細胞が集積し、膠原線維の生成により梗塞領域の組織修復が行われていた。しかしながら、組織修復のために梗塞領域に集積した心線維芽細胞は障害を受け、アポトーシスを起こしていることを確認した(図 2)。アポトーシスを引き起こす原因として心筋梗塞後に生じる免疫応答による炎症が考えられた。そこで炎症性サイトカイン (TNF, IL-6) の遺伝子発現量を qRT-PCR で評価したところ、心筋梗塞発症後 28 日経過した慢性期においても炎症が続いていることが確認された(図 2)。

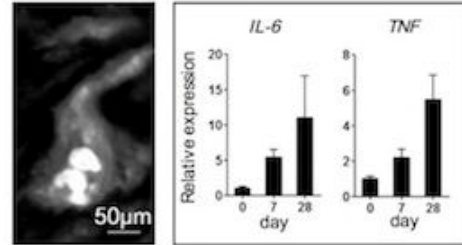


図 2:(左)アポトーシスを起こした線維芽細胞 (右)心筋梗塞後の炎症性サイトカ

(2) 障害を受けた線維芽細胞の救済を担うマクロファージの分泌蛋白を特定

正常心筋及び心筋梗塞発症後のマウス心臓から F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺マクロファージを FACS で単離した。マイクロアレイ法により M2 マクロファージの遺伝子発現の違いを 2 群間で網羅的に解析し、心筋梗塞発症後の M2 マクロファージで特異的に高発現する分泌蛋白遺伝子を選別した(図 3)。マイクロアレイ法により得られたデータをバイオインフォマティクス解析し、M2 マクロファージの心筋線維芽細胞の組織修復分子メカニズム及びシグナル伝達経路に關与する遺伝子の特定を行った(図 4)。またその遺伝子がコードするタンパク質 (Protein X) のレセプターが心筋線維芽細胞に発現していることを心臓組織切片の蛍光免疫染色で確認した。

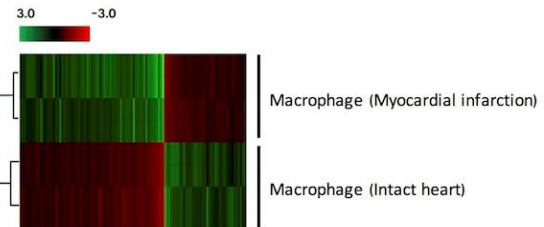


図 3: マイクロアレイ法により心筋梗塞後のマクロファージで特異的に発現が上昇する遺伝子を網羅的に解析

Figure 4: Scatter plot of Log signal (M2: MI) vs Log signal (M2: no MI). A red arrow points to a cluster of genes upregulated in the MI group, labeled as Protein X.

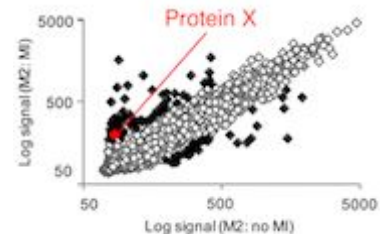


図 4: バイオインフォマティクス解析により線維芽細胞救済に關与が疑われる

(3) *In vitro*でマクロファージによる線維芽細胞救済を評価

心筋梗塞発症後は慢性期においても心臓内では持続的に炎症が増悪し、これに伴い障害を受けた線維芽細胞が心筋梗塞領域においてアポトーシスを起こしていることを確認した。そこで本研究の仮説であるマクロファージが線維芽細胞のアポトーシス制御・組織修復に關与することを証明するため、*in vitro*での実験を計画した。正常心筋及から線維芽細胞を回収し、1. 健全な線維芽細胞、2. 過酸化水素水を使用し DNA 障害を与えた線維芽細胞、3. マクロファージと共培養した DNA 障害を与えた線維芽細胞、4. マクロファージと共培養した DNA 障害を与えた線維芽細胞に実験 2 で特定したタンパク質 (Protein X) の中和抗

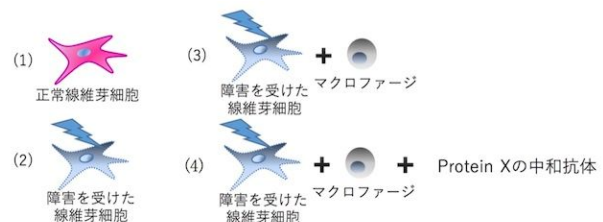


図 5: Protein X を介した線維芽細胞の救済機構を *in vitro* の実験で証明

Figure 5: Schematic diagram of the *in vitro* experiment. (1) Normal fibroblast cell. (2) Fibroblast cell treated with H₂O₂. (3) Fibroblast cell treated with H₂O₂ + Macrophage. (4) Fibroblast cell treated with H₂O₂ + Macrophage + Protein X neutralizing antibody.

体を加えた 4 群を
作成した(図 5)。
線維芽細胞のアポ
トーシス、遊走、細
胞分裂及び活性化
を免疫染色で評価し
た。その結果、マク

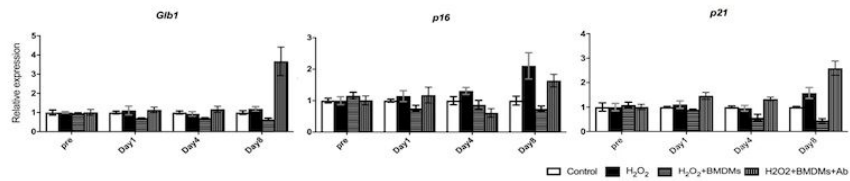


図 6 : マクロファージから分泌される Protein X により障害を受けた線維芽細胞の
アポトーシスや細胞老化が抑制された

ロファージと共培養した群においては線維芽細胞のアポトーシス抑制、遊走能増加、細胞分裂の
増加及び活性化が確認され、さらに中和抗体を加えた群ではマクロファージによるこれらの効
果が抑制された。

さらに各グループの線維芽細胞から RNA を抽出し、アポトーシス制御・組織修復に関連する遺
伝子の発現量を測定し、M2 型マクロファージが障害を受けた線維芽細胞の制御に関わることを
証明した。コントロール群と比較してマクロファージと DNA 障害を受けた線維芽細胞を共培養
した群ではアポトーシス・老化関連遺伝子の発現が低下することを確認した(図 6)。

考察

本研究では、心筋梗塞発症後に遷延する炎症反応により組織修復のために集積する線維芽細
胞が障害を受けアポトーシスを起こし、十分な組織修復が阻害されている可能性が示唆された。
またマクロファージが障害を受けた線維芽細胞の救済に関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Manabu Shiraiishi, Atsushi Yamaguch and Ken Suzuki.
2. 発表標題 Reparative macrophages contribute to development of solid replacement fibrosis through protecting cardiac fibroblasts
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 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
--	---------------------------	-----------------------	----