

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0047

研究課題名（和文）生活習慣病におけるマクロファージの時空間多様性をもたらす作動原理の解明と医療応用

研究課題名（英文）Diversity of macrophages in noncommunicable disease

研究代表者

眞鍋 一郎（Manabe, Ichiro）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70359628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：マクロファージは極めて多彩な機能を発揮する。例えば、生活習慣病と癌の基盤病態である慢性炎症では、その開始から遷延化、組織機能障害まで、すべてのプロセスで主要な働きを示す。一方でマクロファージは組織の恒常性を維持する機能も持つ。そのため、マクロファージ機能の変調は、組織機能障害をもたらすことが想定される。本研究では、マクロファージの内因的（由来や老化）と外因的な要因との交互作用によってどのようにマクロファージの多様性がもたらされるかを、エピゲノムと1細胞レベルの変化を中心に解析した。また、老化や心不全に伴って、心臓組織マクロファージが心臓を保護する作用を失う可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在問題となっている心不全や糖尿病を始めとする生活習慣病全般に慢性炎症が寄与していることが明らかとなっている。また、加齢関連疾患も慢性炎症が推進することが示唆されている。本研究の成果は、マクロファージには多様性があること、その多様性は組織、疾患によって異なること、また老化も多様性を変化させることを明らかにした。多様性の変化は組織の機能を損なうと考えられる。多様性を制御するメカニズムの理解は、新たな加齢関連疾患の治療法開発へと結びつくと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Macrophages exhibit diverse phenotypes and functions. For instance, macrophages play pivotal roles from the beginning of chronic inflammation to the phase of tissue remodeling and dysfunction in noncommunicable diseases, including cardiovascular disease and cancer. It is likely that dysfunction in macrophages would lead to tissue dysfunction in aging and various diseases. In this study, we aimed to elucidate as to how macrophage diversity is regulated by intracellular and extracellular cues. We mainly focused on the changes in the epigenome and at the single-cell level. We found that aging-associated changes in tissue macrophages may alter tissue homeostasis in the heart.

研究分野：疾患生物学

キーワード：マクロファージ 生活習慣病 エピジェネティクス 慢性炎症 心不全 肥満

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は生活習慣病と癌に共通した基盤病態である。慢性炎症においてマクロファージは炎症の開始から遷延化、組織リモデリングまで、すべてのプロセスで重要な役割を果たす主要なエフェクター細胞である。我々はこれまでに、心血管系、脂肪組織、膵島、腎臓における慢性炎症でのマクロファージ機能の研究を行ってきた。その結果、マクロファージには慢性炎症の各段階で共通した機能を持つとともに、組織や病態において特異的な機能も示すことを見いだした。例えば腎臓マクロファージは、傷害応答の慢性期に線維化を進めるが、動脈硬化巣のマクロファージは線維の分解とプラークの不安定化を進める (JCI 2011)。またマクロファージは組織発生や恒常性の維持においても必須の役割を果たす。このようにマクロファージはその置かれる環境に応じて機能をダイナミックに調整することにより、多彩な役割を果たす。実際、マクロファージのトランスクリプトームはその存在場所と刺激によって大きく異なる。このようなマクロファージにおける遺伝子発現の多様性は、一つにはエピゲノムの微小環境への鋭敏な応答によってもたらされる (Cell 159:1327, 2014)。さらに、最近の研究によって組織マクロファージの一部は骨髄由来ではなく、胎児組織 (卵黄嚢、胎児肝臓) 由来の細胞が局所で自己複製によって維持されていることが明らかとなった (Immunity 44:439, 2016)。その上、心臓を含む一部の組織においては加齢とともに胎児組織由来から骨髄由来マクロファージへ置き換わる。さらに炎症等の病態がこのマクロファージの置換を促進することがわかってきた。つまり、マクロファージの機能は微小環境と発生 (起源) の両方に左右されることが推察される。我々はさらに老化がマクロファージのエピゲノム変化をもたらすことを見いだした。このように多方面の内在性・外来性の変化に応じたマクロファージ機能の制御機序とその生活習慣病における意義はよく分かっていない。

我々は、心臓組織マクロファージが、定常状態から心筋細胞のエネルギー代謝を制御して恒常性を維持していること、また心臓ストレスに対して心臓-脳-腎臓のネットワークによって活性化され、心臓保護的に働くことを見いだした (図 1、Nat Med 2017)。心臓組織マクロファージは若年マウスでは胎児肝臓由来であり、ストレス (圧負荷) に対して心臓内で増殖する。しかし、高齢マウスの心臓組織マクロファージの多くが骨髄由来のものに置き換わっていた。興味深いことに、ストレスや加齢は心臓組織マクロファージのエピゲノムを変化させる。このように、マクロファージの由来の変化 (胎児肝臓→骨髄) や加齢によるマクロファージの内在的な変化と外因的な変化 (微小環境) が合わさって、そのエピゲノムと機能を決定することが推察される。

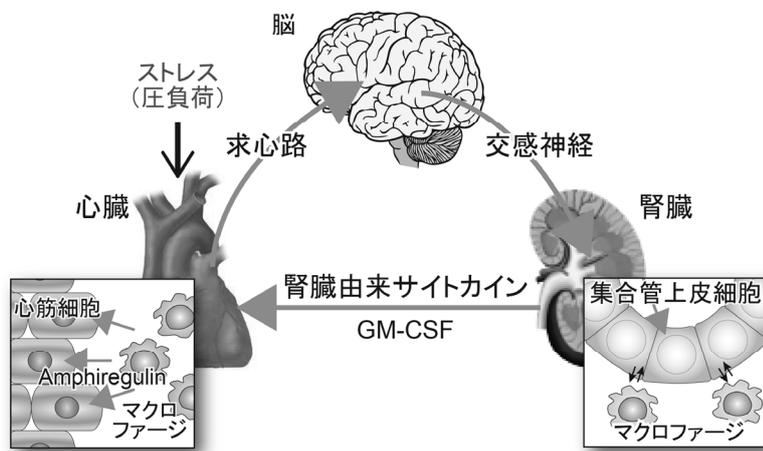


図 1 心臓-脳-腎臓ネットワークによる心臓恒常性の維持  
臓器間の連携機序が心臓へのストレスに対して適応的な応答を実現する。心臓へのストレスは脳→交感神経により腎臓からの GM-CSF 発現を誘導する。GM-CSF は心臓マクロファージを活性化する。この応答の中で、心臓や腎臓では組織マクロファージが各組織の応答プロセスを制御している。

2. 研究の目的

加齢やストレス (代謝・力学的ストレス等) によるマクロファージの機能変化は、組織恒常性の破綻と組織機能障害の基盤となる可能性がある。マクロファージの機能は、内在性 (由来や老化) と外来性 (微小環境) のメカニズムの相互作用の中で決まり、空間 (組織の相違) と時間 (年齢) で大きく変化する。本研究では、組織・疾患、年齢横断的にマクロファージの機能とエピゲノムを解析することにより、マクロファージの内在・外来性要因の複雑な相互作用による機能変化の原理を解明し、老化や代謝異常に伴う組織恒常性の変容と病態への寄与を明らかにすることを目的とする。そのため、①組織・疾患、年齢軸におけるマクロファージエピゲノムを解析し、②マクロファージ機能の多様性と共通性を支える転写・エピジェネティック制御機序を明らかにし、③微小環境と内因的な制御プログラムとのリンクを解き明かす。さらに、④加齢や代謝異常における組織恒常性の変容と病態への寄与を明らかにする。例えば、心臓では、加齢によりマクロファージの由来が変化するとともに、内在的なエピゲノムも変化する。このような変化の組織恒常性とストレス応答への影響を検討する。本研究では、多様な軸におけるマクロファージの変化を横断的に解析することにより、複雑な要因の連鎖がもたらすマクロファージ機能変化の作動原理を見だし、特に生活習慣病 (心血管代謝疾患等) 発症

における意義を明らかにすることを目標とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、マクロファージの内因的な機序（発生学的由来、老化による変化）と外因的な要因との複雑な交互作用によって決まるマクロファージ機能の多様性の制御機序を明らかにすることを目的とする。マクロファージの由来は加齢や病態によって変動し、また、微小環境も変わる。特にマクロファージは、本質的にその置かれる環境の変化にダイナミックに応答して多彩な役割を果たすことから、時空間と病態といった多様な軸から解析することが、その作動原理（制御プログラム）を解明するために必須である。この点から本研究では、時間（年齢）、空間（複数組織）、組織の状態（定常状態と疾患）を横断的に解析する。具体的には以下の項目を並行して進め、由来や微小環境の変化に応じたマクロファージ側の制御機序と、マクロファージの変化が組織や病態に与える作用の両面を明らかにする。①マクロファージの時空間、疾患におけるエピゲノムの解析。若年と老化マウス、組織（脳、心臓、肝臓、脂肪組織等）、定常状態とストレス（心臓負荷、肥満）といった複数の軸における各組織マクロファージと骨髄単球、骨髄単球由来マクロファージのエピゲノムとトランスクリプトームを解析し、共通性と相違を明確にする。②微小環境に応答する分子機序の解明。特に転写・エピジェネティック制御機序を解明する。ゲノムワイドのエピゲノムの情報からバイオインフォマティクス解析で制御プログラムを推測し、実験的に検討する。各組織に固有なエピゲノムをもたらし、加齢や病態による変化を制御する転写プログラムに着目して研究を進める。③マクロファージの由来に固有な制御機序の解明。マクロファージの由来（胎児組織と骨髄）による相違が組織マクロファージの機能制御にどれだけ影響するかは分かっていない。心臓では成体で徐々に骨髄由来マクロファージへと置き換わることから、このような由来の変化がマクロファージ機能を変容させるとともに、組織機能の変調をもたらす可能性が高い。この由来の相違による組織恒常性やストレス応答の変化を明らかにする。④マクロファージの由来や微小環境に応じたエピゲノムの変動が、どのように組織の恒常性やストレスへの応答を変容させるかを検討する。⑤マクロファージのエピジェネティック制御機構への介入による治療法開発の可能性を検討する。

### 4. 研究成果

#### ①マクロファージの時空間、疾患による変化の解析

心不全や肥満、老化における脳、心臓、脂肪組織、肝臓マクロファージならびに骨髄由来マクロファージのトランスクリプトームやヒストン修飾、オープンクロマチン（chromatin accessibility）を RNA-seq、ChIP-seq、ATAC-seq によって解析した。これらを統合して解析することにより、組織マクロファージや単球マクロファージに共通して認められるマーカーや固有の転写プログラムの同定を進めた。例えば、老化で心臓マクロファージと骨髄単球に共通したエピゲノムの変化が誘導されることを見いだした（図2）。

また新たにシングルセル RNA-seq 解析を導入し、組織毎のマクロファージサブポピュレーションの相違、また、心筋梗塞や圧負荷といった心臓ストレスに対する一細胞レベルでの嘔吐の解析を進めた。これらの解析から、マクロファージには従来考えられていた以上の多様性があることを見いだすと同時に、サブポピュレーションに特有な遺伝子発現を制御する転写因子候補を同定した。

#### ②微小環境に応答する分子機序

心臓マクロファージについて心臓の微小環境からのシグナルがその特徴的なエピゲノムをもたらしている可能性を示唆するデータを得た。このシグナル・転写制御機構について解析を進めた。

#### ③マクロファージの由来に固有な制御機序

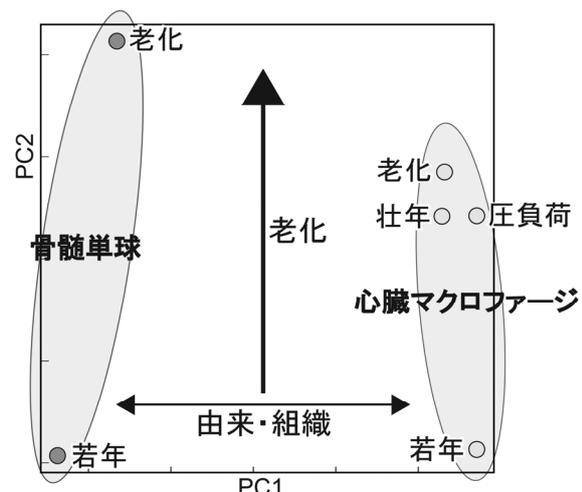


図2 老化は骨髄単球と心臓マクロファージのエピゲノムに類似した変化をもたらす ATAC-seq により同定したオープンクロマチン領域の主成分分析結果。骨髄単球と心臓マクロファージは異なるエピゲノムを持つ(PC1)。心臓ではストレス(圧負荷)と加齢が同方向の変化をもたらす。老化は骨髄単球と心臓マクロファージの両方で同方向性の変化(PC2)を誘導しており、共通したメカニズムによって老化に特徴的なエピゲノム変容がもたらされることが示唆される。

骨髄移植により本来胎児組織由来である心臓組織マクロファージを単球由来マクロファージと置き換え、RNA-seqによりその相違を検討した。その結果、単球由来マクロファージは心臓に定着し、自己複製する中で、もともと常在している組織マクロファージに類似したトランスクリプトームを獲得することを見いだした。しかし、全遺伝子の90%程度が発現変動2倍以内に入るものの、完全一致するようにはならない(図3)。つまり、一部細胞の由来(系譜)に依存したエピゲノムの相違が残存することを見いだした。このような細胞系譜固有なエピゲノムの保存は、機能的な違いをもたらす可能性がある。

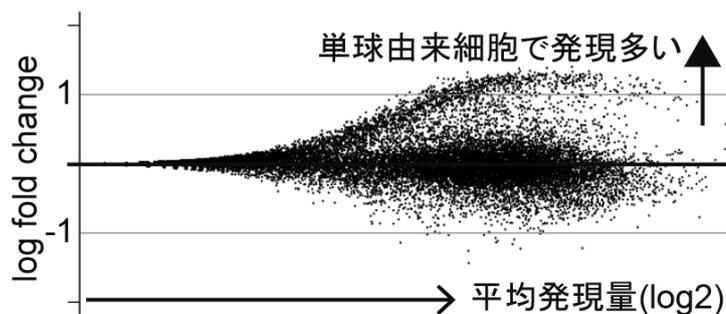


図3 胎児由来と骨髄移植後単球由来心臓マクロファージのトランスクリプトームの相違 RNA-seq結果のMA plot。10%程度の遺伝子発現の相違が残存する。

#### ④マクロファージの由来や微小環境に応じたエピゲノム変動の影響

トランスクリプトーム解析から、心臓組織マクロファージでは、老化に伴って *Areg* を始めとする心臓保護因子の発現が減弱することを見いだした。このような変化が、マクロファージが心臓保護作用を失う一因となっている可能性が高い。

#### ⑤マクロファージへの介入

シングルセル解析から同定したサブポピュレーションに固有の転写制御に対する薬理的介入を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Oishi Y, Manabe I	4. 巻 5
2. 論文標題 Kruppel-Like Factors in Metabolic Homeostasis and Cardiometabolic Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2018.00069	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 Oishi Y, Manabe I	4. 巻 30
2. 論文標題 Macrophages in inflammation, repair and regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 511-528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy054	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 Oishi Y, Manabe I	4. 巻 -
2. 論文標題 Organ system crosstalk in cardiometabolic disease in the age of multimorbidity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2020.00064	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 Nakayama Y, Manabe I, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 A long noncoding RNA regulates inflammation resolution by mouse macrophages through fatty acid oxidation activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 眞鍋一郎
2. 発表標題 組織マクロファージによる臓器連関と代謝恒常性の制御
3. 学会等名 第39回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabe I
2. 発表標題 Macrophages and Interorgan Crosstalk in Cardiac Adaptation
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Sciences 2018 Scientific Sessions（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabe I
2. 発表標題 NeuroImmunoMetabolic regulation of cardiac homeostasis and heart failure
3. 学会等名 3rd New Frontiers in Cell Death Signaling and Heart Failure Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manabe, Ichiro
2. 発表標題 A heart-brain-kidney network controls adaptation to stress
3. 学会等名 International Symposium: Advances in Heart Failure（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabe, Ichiro
2. 発表標題 Immunometabolic regulation of cardiac homeostasis and heart failure in aging
3. 学会等名 International Meeting on RECQ Helicases and Related Diseases 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabe I
2. 発表標題 Macrophages and Organ System Crosstalks in Cardiac Homeostasis and Disease
3. 学会等名 BCVR2019: The 3rd JCS Council Forum of Basic Cardiovascular Research (招待講演) (国際学会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 老化関連疾患における組織マクロファージ
3. 学会等名 第16回脳心血管抗加齢研究会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 Macrophages in cardiac biology and pathobiology
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 心腎脳連関と恒常性維持機構
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 肥満による臓器システム関連系の変調と心血管代謝疾患
3. 学会等名 第40回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 心臓組織マクロファージによるストレス応答と破綻
3. 学会等名 第92回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 免疫・代謝・神経連関とマクロファージによるストレス応答と修復
3. 学会等名 第40回日本・炎症再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 組織マクロファージと臓器連関によるストレス応答機構
3. 学会等名 第28回日本Cell Death学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋一郎
2. 発表標題 Macrophages in Cardiac Physiology and Disease
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://plaza.umin.ac.jp/manabe">http://plaza.umin.ac.jp/manabe</a>
---

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
研究協力者	松本 佐保姫  (Matsumoto Sahohime)  (80570184)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教    (12501)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	幸 龍三郎 (Yuki Ryuzaburo) (20779897)	千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員  (12501)	
研究協力者	中山 幸輝 (Nakayama Yukiteru) (70721885)	東京大学・医学部附属病院・助教  (12601)	