

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08542

研究課題名(和文) 心臓リモデリングにおける抗線維化マクロファージの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of anti-fibrotic macrophage in the cardiac remodelling

研究代表者

砂河 孝行 (Isagawa, Takayuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40418637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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が、現時点で有効な治療法は存在せず臨床的に大きな問題となっている。その為、心線維化の病態・病理解明による治療戦略の確立が求められている。我々は心臓リモデリング過程において心臓組織内低酸素領域に低酸素誘導性転写因子HIF-1 依存的に炎症性マクロファージ(M1-M)が浸潤し、Oncostatin M(OSM)を誘導・分泌することで線維芽細胞活性化を強力に抑制することを見出した。以上の研究成果から、心不全の心臓組織では、HIF-1 を介して心臓組織に遊走、集積したM1-M が、OSMを分泌して心臓線維化を抑制的に制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、心臓拡張能の低下による心不全、いわゆる拡張不全が劇的に増加している。拡張不全の主たる病態の一つは心筋組織の過剰な線維化であるが、なぜ心臓で線維芽細胞が過剰に活性化するのか未だに不明である。それ故、拡張不全に対して有効な治療法は無く、その病態解明と治療法開発が強く求められている。本研究では心臓リモデリング過程において浸潤する炎症性マクロファージがOncostatin Mを分泌することで心臓線維化を強力に抑制することを見出した。本研究からは、拡張不全に対する新たな治療法開発の基盤となる可能性が期待できるものでその学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cardiac fibrosis is an independent poor prognostic factor for heart failure, but there is none of the therapies for cardiac fibrosis. It has become a major clinical problem. Therefore, elucidation of the molecular processes by which fibroblasts are activated or deactivated is critically important for the development of therapeutic approaches in the cardiac fibrosis. During cardiac remodeling, inflammatory macrophages accumulate in hypoxic areas in the dependent on a hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and suppresses cardiac fibroblast activation. As a molecular mechanism, we identify oncostatin-m (OSM) as a HIF-1 target gene, which directly inhibits the TGF-mediated activation of cardiac fibroblasts through extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent phosphorylation of the SMAD linker region. These results demonstrate that macrophage hypoxia signaling regulates fibroblast activation through OSM secretion in vivo.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マクロファージ 心不全 心臓リモデリング 心臓線維化 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病および高齢者人口の増加およびは現在、心不全症例の急激な増加(心不全パンデミック)を引き起こしている。心不全は、心筋梗塞などによる収縮能低下(収縮不全)と心室拡張能の低下(拡張不全)の2群に大別され、それぞれほぼ同数の患者が罹患している。経カテーテル治療や薬物治療の導入により収縮不全症例の予後が大きく改善した一方、拡張不全に対して有効な治療法は皆無であり、臨床的にその病態解明が強く求められている。拡張不全の主たる病態の一つは心筋組織の過剰な線維化である。しかしながらなぜ心臓で線維芽細胞が過剰に活性化するのか、その病態機構は未だ不明である。心臓リモデリングの過程では、心筋組織にマクロファージ(M₁)を含む炎症細胞が集積する。我々はこれまでマクロファージの活性制御機構につき、特に低酸素シグナルに着目して研究を行ってきた。引き続き心線維化プロセスを研究したところ、低酸素誘導性因子(Hypoxia-inducible factor, HIF-1)依存的に心臓線維化部に炎症惹起型 M₁ (M₁-M₁)が集積すること、集積した M₁-M₁ が抗線維化的に働いているとの知見をえていた。しかしながら、抗線維化マクロファージがどのように心線維化を制御しているのかについては不明であった。

2. 研究の目的

上記のような背景を基に、本研究では心臓に集積する抗線維化 M₁ の機能解析を通じて、1. 心臓線維芽細胞の活性制御機構を明らかにし、2. 拡張不全に対する新たな治療アプローチを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの横行大動脈を縮窄することで心臓線維化、リモデリングを誘導し心不全を引き起こす病態モデル(TAC)を用いて以下の2点について解明する。

- 1). 心臓マクロファージが心線維化を抑制する分子機構を明らかにする
本研究では分泌因子の産生を介して抗線維化作用を有しているとの仮説を構築している。炎症惹起型マクロファージ(M₁-M₁)において産生される分泌因子の機能解析を通じて、抗線維化 M₁ がどのように線維芽細胞を不活化しているかを明らかにする。
- 2). 低酸素シグナルを介する心線維化治療アプローチの開発
本研究では OSM を含め心筋組織内低酸素領域に浸潤する炎症惹起型マクロファージ(M₁-M₁)で産生される抗線維化サイトカインにつき、*in vivo* 心線維化モデルを用いてその治療有用性を検証する。特に M₁-M₁ 低酸素シグナルが抗線維化作用を発揮することに着目し、M₁ HIF-1 シグナル活性化の有用性を遺伝学的、薬理的に検証する。

4. 研究成果

- 1). 心臓マクロファージが心線維化を抑制する分子機構を明らかにする
in vivo, *in vitro* 心線維化モデルを用いた解析から、以下の2点の知見を得られていた。
心筋組織の低酸素領域に炎症惹起型マクロファージ(M₁-M₁)が HIF-1 依存的に集積し、心線維化を抑制している。
低酸素環境で培養した M₁-M₁ 培養上清は線維芽細胞を不活化する。

以上の知見から心筋組織低酸素領域に集積する M₁-M₁、野生型及び HIF-1 欠損初代培養マクロファージを用いたのトランスクリプトームデータを取得し、マクロファージにおいて産生される分泌因子の同定を行った。その結果、M₁-M₁ は低酸素環境下で Oncostatin-M(OSM)を含む 11 因子を産生することが明らかとなった。線維芽細胞は、TGF- β シグナル経路を介して活性化し、SMA 発現や細胞外マトリックス(ECM)分泌といった筋線維芽細胞の特徴を示すことが知られている。そこで、間葉系幹細胞株である C3H10T1/2 細胞を用いて TGF- β 刺激による筋線維芽細胞への活性化を SMA 遺伝子の発現を指標として評価した。得られた 11 因子について検討を行ったところ、OSM でのみ強力な線維芽細胞活性化抑制活性をもつことが明らかとなった。さらに免疫組織化学的解析からマウス心不全モデルにおいて OSM が心筋組織内に浸潤したマクロファージで発現していることも確認した。次に、マクロファージにおける OSM 誘導の分子機序を明らかにするために野生型及び HIF-1 欠損初代培養マクロファージを低酸素に暴露し、遺伝子発現につき検討したところ OSM は低酸素により HIF-1 依存的に発現誘導することが明らかとなった。さらに HIF-1 に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降により HIF-1 は低酸素暴露により OSM 遺伝子のエンハンサー領域に結合し、OSM 遺伝子の発現を誘導していることが明らかとなった。

OSM は IL-6 ファミリーに属するサイトカインであり、IL-6 ファミリー共通の受容体サブユニットである gp130 と OSM 特異的受容体サブユニットである OSMR により形成される OSM 受容体に結合する。OSM が OSM 受容体に結合すると JAK や SHP を介して Stat シグナルや経路や Ras/ERK シグナル経路を活性化することが知られている。そこで OSM が線維芽細胞の活性化を抑制する作用機序について OSM 下流シグナル経路につき検討を行った。その結果、OSM は線維芽細胞において ERK (Extracellular signal-regulated kinase) 1/2 の活性化し、TGF- β 経路の主要なメディエーターである Smad2/3 のリンカー領域をリン酸化することで、Smad2/3 の核移行を抑制することが明らかとなった。

続いて、OSM シグナルが生体内で心臓線維化に関与しているかについて検討する為に OSM に対する中和抗体を心不全モデルマウスに投与したところ心臓線維化の悪化が誘導された。さらに、線維芽細胞における OSM シグナル経路が心臓線維化に関与するかについて検討する為に線維芽細胞特異的 OSM 受容体ノックアウトマウスを作成した。本マウスを用いて心不全モデルを作成したところ、OSM 受容体ノックアウトマウスでは心臓線維化の増悪化が見られた。さらに、心不全患者由来の検体を用いて OSM の免疫組織化学的解析を行ったところ OSM 陽性細胞数と心臓線維化領域に負の相関が認められた。

以上の知見から心臓に集積するマクロファージは Oncostatin-M を産生することで心臓の過剰な線維化を抑制していることが明らかとなった。

2). 低酸素シグナルを介する心線維化治療アプローチの開発

マクロファージ(M ϕ)における低酸素シグナルには抗線維化活性があることから HIF の負の制御因子である von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子をマクロファージで欠損するマウス(LysM-VHL)を作成した。本マウスは M ϕ で HIF が恒常的に活性化するマウスである。このマウスを用いて定常状態の心機能につき評価したところ野生型マウスと変わらず特に異常は認められなかった。

近年、腎性貧血を標的とした薬として HIF の VHL と異なる負の制御因子 PHD (Prolyl hydroxylase inhibitor)の阻害剤が注目されている。PHD 阻害薬は PHD を阻害し HIF を安定化することで造血にかかわるエリスロポエチン(EPO)を誘導することで貧血を改善する。そこで、PHD 阻害剤をリポソームで封入したものをマウスに投与することでマクロファージに取り込ませることでマクロファージ内の HIF を活性化させることができると期待される。現在、リポソーム作成装置を整備し、PHD 阻害剤の封入条件について検討しているところである。

上記のような遺伝学的・薬理的 HIF 活性化の手法を用いて M ϕ HIF-1 シグナル活性化の有効性を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sueyoshi Kuniyo, Komura Daisuke, Katoh Hiroto, Yamamoto Asami, Onoyama Takumi, Chijiwa Tsuyoshi, Isagawa Takayuki, Tanaka Mariko, Suemizu Hiroshi, Nakamura Masato, Miyagi Yohei, Aburatani Hiroyuki, Ishikawa Shumpei	4. 巻 24
2. 論文標題 Multi-tumor analysis of cancer-stroma interactomes of patient-derived xenografts unveils the unique homeostatic process in renal cell carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103322 ~ 103322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103322	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 Harada Masamitsu, Nagai Jun, Kurata Riho, Cui Xiaofeng, Isagawa Takayuki, Semba Hiroaki, Yoshida Yasuhiro, Takeda Norihiko, Maemura Koji, Yonezawa Tomo	4. 巻 22
2. 論文標題 Establishment of Novel Protein Interaction Assays between Sin3 and REST Using Surface Plasmon Resonance and Time-Resolved Fluorescence Energy Transfer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2323 ~ 2323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052323	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 該当する

1. 著者名 Wei Shuoyu, Isagawa Takayuki, Eguchi Masamichi, Sato Daisuke, Tsukano Hiroto, Miyata Keishi, Oike Yuichi, Takeda Norihiko, Ikeda Satoshi, Kawano Hiroaki, Maemura Koji	4. 巻 8
2. 論文標題 Febuxostat, a Xanthine Oxidase Inhibitor, Decreased Macrophage Matrix Metalloproteinase Expression in Hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 470 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8110470	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 Yukiteru, Fujiu Katsuhito, Yuki Ryuzaburo, Oishi Yumiko, Morioka Masaki Suimye, Isagawa Takayuki, Matsuda Jun, Oshima Tsukasa, Matsubara Takumi, Sugita Junichi, Kudo Fujimi, Kaneda Atsushi, Endo Yusuke, Nakayama Toshinori, Nagai Ryoza, Komuro Issei, Manabe Ichiro	4. 巻 117
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 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 14365 ~ 14375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2005924117	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 -

1. 著者名 Abe H, Takeda N, Isagawa T, Semba H, Nishimura S, Morioka MS, Nakagama Y, Sato T, Soma K, Koyama K, Wake M, Kato H, Asagiri M, Neugent ML, Kim JW, Stockmann C, Yonezawa T, Inuzuka R, Hirota Y, Maemura K, Yamashita T, Otsu K, Manabe I, Nagai R, Komuro I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2824-2833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10859-w	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 該当する

1. 著者名 Wake M, Takeda N, Isagawa T, Sato T, Nakagama Y, Morioka MS, Hirota Y, Asagiri M, Maemura K, Manabe I, Tanabe K, Komuro I.	4. 巻 60
2. 論文標題 Cell Cycle Perturbation Induces Collagen Production in Fibroblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 958-963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.18-710	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 -

1. 著者名 Okamura K, Nakagama Y, Takeda N, Soma K, Sato T, Isagawa T, Kido Y, Sakamoto M, Manabe I, Hirata Y, Komuro I, Ono M	4. 巻 141
2. 論文標題 Therapeutic targeting of mitochondrial ROS ameliorates murine model of volume overload cardiomyopathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 56-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.09.005	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 魏 碩俣, 砂河 孝行, 江口 正倫, 佐藤 大輔, 池田 聡司, 河野 浩章, 前村 浩二
2. 発表標題 低酸素シグナルによる動脈硬化プラーク脆弱化の分子機構
3. 学会等名 第42 回日本分子生物学会年会
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
研究 分担者	武田 憲彦 (Takeda Norihiko) (40422307)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究 分担者	前村 浩二 (Maemura Koji) (90282649)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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
---------	---------