

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17088

研究課題名（和文）心不全における心臓-骨髄連関の意義：心臓マクロファージのエピジェネティクス制御

研究課題名（英文）Significance of heart-bone marrow coupling in heart failure: epigenetic regulation of cardiac macrophages

研究代表者

和田 健斗（Wada, Kento）

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：10865695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウスの心不全モデルを用いて、FACSにより心臓組織からマクロファージを単離してDNAメチル化模様の検討を行った。骨髄由来マクロファージの意義を明らかにするために、Ex vivoで骨髄細胞を培養しマクロファージに分化させた骨髄由来マクロファージでのバイサルファイトシーケンスにより、DNAメチル化の網羅的解析を行った。エピジェネティクスに関わるAマウスの骨髄細胞由来マクロファージと野生型骨髄細胞由来マクロファージとで、differentially methylated regionsを複数認め、これらが、免疫応答の差異に影響を与えている可能性が示唆され、今後の検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティクスは、DNAの塩基配列によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムであり、様々な疾患と関連する。心不全は、環境要因と遺伝的素因が複雑に影響して発症するが、エピジェネティクスは制御可能なターゲットと考えられる。本研究では、マクロファージを主体とする骨髄由来免疫細胞のエピジェネティクスに着目することで、拡張性心不全や難治性の心筋炎に対する新しいメカニズムの解明に貢献するものと考えている。さらには、近年のトピックスである「クローン性造血」においても、造血幹細胞レベルでのDNAメチル化異常が心不全の病態に関与しているかについても今後検討し臨床での治療に貢献しうることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, macrophages were isolated from cardiac tissue by FACS to examine DNA methylation patterns in a mouse model of cardiac hypertrophy and heart failure. To clarify the significance of bone marrow-derived macrophages, a comprehensive analysis of DNA methylation was performed by bisulfite sequencing in bone marrow-derived macrophages that were cultured and differentiated into macrophages in ex vivo. We found multiple differentially methylated regions in epigenetically related A-mouse bone marrow-derived macrophages and wild-type bone marrow-derived macrophages, suggesting that these regions may influence the differences in immune responses, which requires further investigation.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 DNAメチル化 エピジェネティクス 心臓マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が加速する我が国では、心不全パンデミックと言われるほど心不全患者が急増しており、心不全の新規メカニズムの解明と治療法の開発が求められている。心臓の恒常性維持には、免疫細胞のネットワークを含む各臓器との連関が重要である(Nat Med 2017; 23: 611-622)。心不全の発症・進展にマクロファージを主体とする炎症細胞が中心的な役割を果たすことは、我々の研究室でも明らかにしてきた(Shimizu T, et al. J Mol Cell Cardiol 2015, Suzuki S, et al. PLoS One 2013)。単球・マクロファージは、組織障害が起こると障害部位に浸潤して急性炎症を惹起し、その一方で回復期では骨髄由来マクロファージが浸潤して炎症抑制や組織修復に関連する(Cell 2014; 157: 832-844)。心臓-骨髄間のネットワークにより、目的に合致した免疫細胞が骨髄から供給されて、病態の形成に関与する。しかし、この心臓-骨髄連関が、心不全の病態においてどのように制御・調節されているか、その詳細については未解明である。エピジェネティクスは、DNAの塩基配列によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムであり、様々な疾患と関連する。心不全は、環境要因と遺伝的素因が複雑に影響して発症する多因子疾患である。エピジェネティクスの中で、DNAメチル化は、主にCGジヌクレオチドのC5位置のシトシン残基において起こり、遺伝子発現の制御に関与する。このエピジェネティックな制御は心疾患においても重要な役割を果たすと考えられるが、心臓マクロファージにおけるDNAメチル化のダイナミクスはこれまで検討されておらず、心不全におけるその意義も不明である。本研究では、心不全の発症と進展の過程において、心臓組織におけるマクロファージのDNAメチル化の意義を明らかにして、心臓-骨髄連関におけるマクロファージのエピジェネティクス制御機構について明らかにする。

2. 研究の目的

マウスの心肥大・心不全モデルを用いて、細胞ソーティングシステムにより心臓組織からマクロファージを単離してDNAメチル化模様を明らかにする。これまで心臓のDNAメチル化に関して、特発性心筋症など特定領域のメチル化異常が報告されているが(Embo Mol Med 2013; 5: 413-429)、心筋細胞および非心筋細胞を含む全心臓組織の解析にとどまっている。その一方で、de novo DNAメチル化酵素であるDNMT3a・DNMT3b心筋細胞特異的ダブルノックアウトマウスは、圧負荷心不全モデルにおいて、野生型マウスと比べて心臓の表現型に差を認めず、心筋細胞におけるde novo DNAメチル化は心不全の発症・進展に関連性がないことが示唆された(PLoS ONE 2015; 10: e0131019)。一方、非心筋細胞であるマクロファージのDNAメチル化がダイナミックに変化して心不全の発症・進展に関与している可能性があるが、心臓マクロファージに着目してDNAメチル化の詳細は検討されていない。さらに、最近、血液学的には正常でも、後天的に血液細胞の遺伝子変異を有する高齢者が存在することが新しい概念(クローン性造血)として報告され、これが心血管疾患のリスクとなることが分かってきた(N Engl J Med 2017; 377: 111-121)。クローン性造血の原因遺伝子として、DNMT3aを始めとするエピジェネティクス関連遺伝子変異が報告され、単球・マクロファージのDNAメチル化の意義を解明することで、クローン性造血の心不全メカニズムの解明につながる可能性がある。

3. 研究の方法

1. 大動脈縮窄による圧負荷心肥大・心不全モデルの作成と、心不全における心臓マクロファージ

ジの DNA メチル化解析

マウスの大動脈弓部に狭窄を作成し左室に圧負荷をかけると、左室は肥大し、長期的には非代償性の心不全に陥る。術後 1 週を心肥大期および 4 週を心不全期のモデルとして研究を進める。それぞれ心エコーによる心機能を評価し、心臓を摘出し心重量・肺重量などを測定する。必要に応じて、カテーテルによる左室内圧測定を行う。心臓組織における抗 CD11b あるいは抗 CD68 抗体を用いた免疫染色によりマクロファージの浸潤を解析する。さらに、抗 CD86 抗体、抗 CD206 抗体を用いた免疫染色によりそれぞれ M1 型（炎症促進型）、M2 型（炎症抑制型）マクロファージの解析を行う。Masson-Trichrome 染色により心筋線維化の程度について解析する。心臓組織から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により炎症性サイトカイン（IL6、IL10 など）やケモカイン（Cxcl2 など）の発現について検討する。マウスの心臓を摘出してコラゲナーゼ処理後、ビーズで標識されたマクロファージ特異的抗体（抗 CD11b 抗体）を用いて、磁気活性化細胞選別（MACS）によりマクロファージを選択的にソーティングする。単離したマクロファージから DNA を抽出し、抗メチル化シトシン(5mC)抗体による ELISA により 5mC レベルを解析し、肥大心および不全心におけるマクロファージの全体の DNA メチル化の程度を明らかにする。さらに、特異的なメチル化部位の同定のため、抗 5mC 抗体による DNA 免疫沈降によりメチル化 DNA を特異的に回収する。PCR 増幅でライブラリを作製し、次世代シーケンサーによりプロモーター部位を中心に網羅的に解析する。必要に応じて、パイサルファイトシーケンシングによる解析を行う。M1 型、M2 型マクロファージに関しては、フローサイトメトリーによる細胞単離を行い、マクロファージのサブタイプでの関連性についても検討していく。さらに、末梢血および骨髄の単球を同様に分離し、心臓マクロファージとの差異についても明らかにする。

2. DNA メチル化による遺伝子発現およびプロモーター解析

単離したマクロファージから RNA を抽出し、DNA メチル化が確認された遺伝子についてリアルタイム RT-PCR で遺伝子発現を解析する。DNA メチル化と遺伝子発現の関連性について明らかにする。マクロファージ培養細胞（RAW 細胞）を用いて、プロモーター部位を挿入したベクターをメチル化処理し、これを用いたルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を *in vitro* で解析する。あるいは、DNA メチル化阻害剤（デシタピン）を用いて、遺伝子発現の解析を行う。DNA メチル化により特定部位の遺伝子発現制御について詳細な解析を行う。

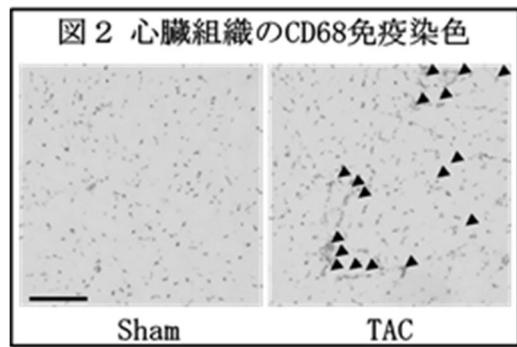
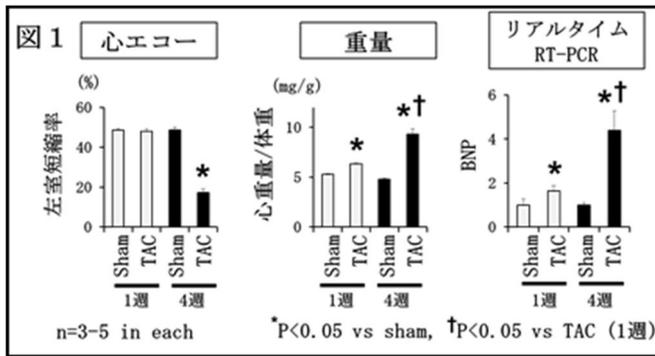
3. クローン性造血マウスの圧負荷モデルにおける解析

クローン性造血マウスのモデルである A マウスの大動脈縮窄術による圧負荷モデルを作成し、心エコーでの心機能を評価や免疫染色などによる病理学組織学的解析を行い、心臓における表現型を野生型マウスと比較検討する。また、同様のメチル化解析を行い、マクロファージにおける DNA メチル化異常が心不全の発症・進展に關与するかを明らかにする。

4. 研究成果

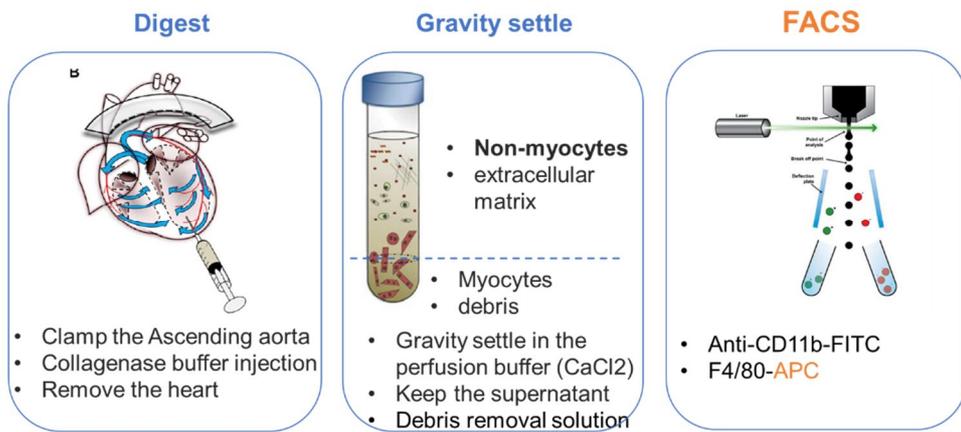
1. 大動脈縮窄による圧負荷心肥大・心不全モデルの作成

マウスの大動脈縮窄術（TAC）による圧負荷モデルを作成した。手術 1 週間後、シャム手術（Sham）群と比較して、心エコーでの心室中隔壁厚の有意な増加および心重量/体重比の増加を認めるが左室短縮率の低下を認めない「肥大心」を呈していた。4 週間後では左室短縮率の有意な低下と肺重量の増加を認め、非代償性の「不全心」を呈していた。リアルタイム RT-PCR では心不全マーカーである BNP の増加を確認した（図 1）。さらに、マクロファージ特異的抗体である抗 CD68 抗体による免疫染色では、TAC 後マクロファージの浸潤を多数認めた（図 2）。

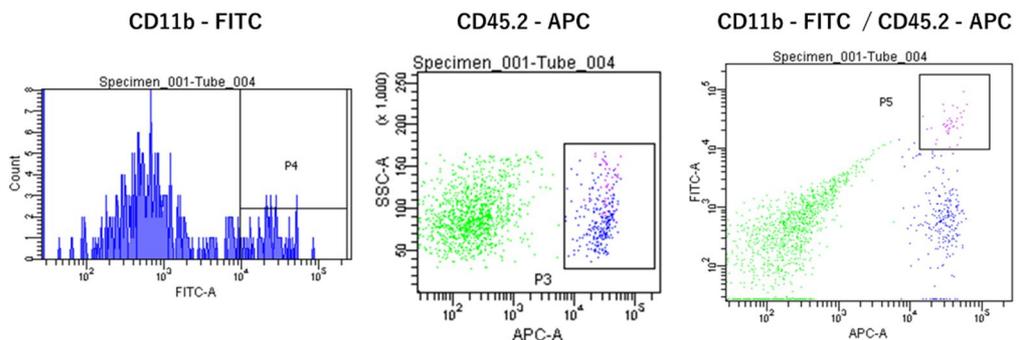


2. 心不全における心臓マクロファージの DNA メチル化解析

次に、TAC後のマウスの心臓を摘出してコラゲナーゼ処理後、FACSによりマクロファージの選択的にソーティングを行った(図)。

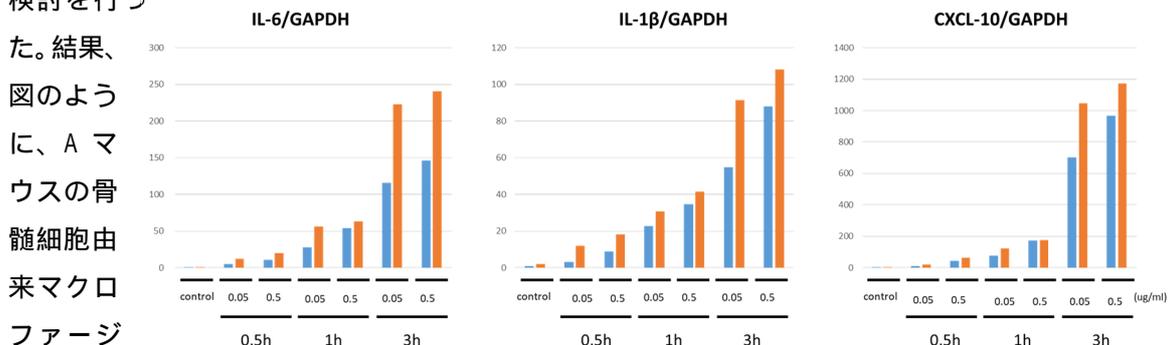


Purity と DNA 収量の観点から、心臓マクロファージの単離することに時間を要した。結果、図のような心臓マクロファージの抽出できることが確認されたが、DNA メチル化解析に必要な収量を得ることは難しかった。



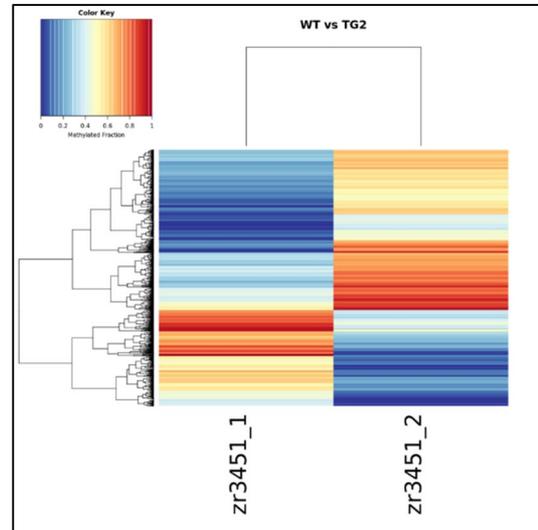
3. マウス骨髄細胞由来のマクロファージの機能的解析と DNA メチル化解析

クローン性造血のマウスモデルの骨髄細胞を単離して培養し、マクロファージに分化させ、骨髄由来マクロファージの培養を確立した。その後、LPS 刺激を行い、炎症性サイトカインについて検討を行った。結果、図のように、A マウスの骨髄細胞由来マクロファージ



は、LPS 刺激に反応して増加したサイトカインレベルは、野生型マウスの骨髄細胞由来マクロファージと比較して、有意に高かった。

次いで、このマクロファージの免疫応答に対する DNA メチル化の意義について、パイサルファイトシーケンスにより、網羅的に解析を行った。結果、A マウスの骨髄細胞由来マクロファージと野生型骨髄細胞由来マクロファージとで、differentially methylated regions を複数認め、これらが、免疫応答の差異に影響を与えている可能性が示唆された。



4. クローン性造血マウスの圧負荷モデルにおける解析

レシピエントである野生型 C57BL/6 マウスに 9Gy の X 線照射を行い骨髄機能を破壊し、A マウスから採取した骨髄液を尾静脈から投与し骨髄移植を行った。コントロールとして野生型 littermates の骨髄を移植した。移植 4、8 週後、レシピエントマウスの血液を採取しフローサイトメトリー法、リアルタイム PCR 法により A 細胞の生着率を評価した。その後、マウスの大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷モデルを作成した。A マウスの骨髄を移植されたレシピエントマウスでは大動脈縮窄術 4 週後、野生型マウスの骨髄を移植されたレシピエントマウスと比較して心エコー上左室内腔の拡大と左室収縮短縮率の低下を認め、大動脈縮窄術後心不全の増悪を来することが示唆されており、解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kimishima Yusuke, Misaka Tomofumi, Yokokawa Tetsuro, Wada Kento, Ueda Koki, Sugimoto Koichi, Minakawa Keiji, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Shide Kotaro, Shimoda Kazuya, Iwama Atsushi, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 12
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension with ALK1 upregulation in lung neutrophils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26435-0	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 Wada Kento, Misaka Tomofumi, Yokokawa Tetsuro, Kimishima Yusuke, Kaneshiro Takashi, Oikawa Masayoshi, Yoshihisa Akiomi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 10
2. 論文標題 Blood Based Epigenetic Markers of <i>FKBP5</i> Gene Methylation in Patients With Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e021101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.021101	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 Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Wada Kento, Minakawa Keiji, Kaneshiro Takashi, Yoshihisa Akiomi, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 3
2. 論文標題 Clonal Hematopoiesis and JAK2V617F Mutations in Patients With Cardiovascular Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: CardioOncology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacc.2021.01.001	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 Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Wada Kento, Minakawa Keiji, Sugimoto Koichi, Ishida Takafumi, Morishita Soji, Komatsu Norio, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 106
2. 論文標題 Crucial role of hematopoietic <i>JAK2</i> V617F in the development of aortic aneurysms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2020.264085	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 該当する

1. 著者名 Minakawa Keiji, Yokokawa Tetsuro, Ueda Koki, Nakajima Osamu, Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Wada Kento, Tomita Yusuke, Miura Saori, Sato Yuka, Mimura Kosaku, Sugimoto Koichi, Nakazato Kazuhiko, Nollet Kenneth E., Ogawa Kazuei, Ikezoe Takayuki, Hashimoto Yuko, Takeishi Yasuchika, Ikeda Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Myeloproliferative neoplasm-driving Calr frameshift promotes the development of pulmonary hypertension in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hematology & Oncology	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13045-021-01064-8	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 1. Wada K, Misaka T, Yokokawa T, Kimishima Y, Kaneshiro T, Oikawa M, Yoshihisa A, Takeishi Y.
2. 発表標題 Blood-based epigenetic markers of FKBP5 gene methylation in patients with dilated cardiomyopathy.
3. 学会等名 Cardiovascular and Metabolic Week 2021: The 38th Annual Scientific Meeting of the Japanese Section of the International Society for Heart Research (ISHR)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 3. Wada K, Misaka T, Yokokawa T, Kimishima Y, Kaneshiro T, Oikawa M, Yoshihisa A, Takeishi Y.
2. 発表標題 Blood-based epigenetic markers of FKBP5 gene methylation in patients with dilated cardiomyopathy.
3. 学会等名 . American Heart Association Scientific Sessions 2021
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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