

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17107

研究課題名（和文）心臓マクロファージの分化機構の解析

研究課題名（英文）Differential mechanism of cardiac macrophages

研究代表者

松原 巧（Matsubara, Takumi）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60824836

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）：心不全は予後不良な疾患で心臓のストレスに対する代償機転が働かなくなると生じる。我々の予備的知見としてこのストレス応答にアンフィレグリンが必須であることを明らかにしており、本研究ではアンフィレグリンを分化マーカーとして心臓マクロファージの分化機構について検討した。本研究ではPla2g5によって心筋細胞の表面で産生された脂肪酸がGpr65を介して未分化マクロファージを心臓マクロファージに分化させることを明らかにした。不飽和脂肪酸は補充が容易な分子であり、簡便な方法で心不全治療の新たなアプローチになりうる可能性をもっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全治療の介入点として心臓マクロファージが重要であるという発想には新規性がある。心臓マクロファージの分化についてはその他の組織マクロファージの分化機構に比較しても明らかになっていないことが多く、本研究で明らかになった心臓内の環境に存在する脂肪酸によって未分化マクロファージが分化するという現象は新規性が高い。さらに脂肪酸は精製、投与が簡便な分子であり、投与も容易である。心不全に対する薬物療法は確立されたものだが未だ予後不良の疾患である。本研究の発見は治療の新たなアプローチになりうるもので社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Heart failure is a disease with a poor prognosis that occurs when compensatory mechanisms for cardiac stress fail. As our preliminary findings, we clarified that Amphiregulin is essential for this stress response, and in this study, we investigated the differentiation mechanism of cardiac macrophages using Amphiregulin as a differentiation marker. In this study, we found that fatty acids produced on the surface of cardiomyocytes by Pla2g5 differentiate undifferentiated macrophages into cardiac macrophages via Gpr65. Unsaturated fatty acids are molecules that are easily replenished, and have the potential to become a new approach to heart failure treatment in a simple manner.

研究分野：循環器内科

キーワード：心臓マクロファージ 脂肪酸

## 1. 研究開始当初の背景

近年高齢化に伴い心不全患者が増加傾向にある。本邦の後期高齢者では心不全に最も医療費が費やされているにも関わらず、心不全の5年生存率は50%と予後不良である。心不全とは心臓に圧負荷などのストレスが加わりポンプ失調をきたした状態を指すが、通常多少のストレスに対しては適応現象が生じ代償され、心不全は回避される。我々は、このストレス応答に心臓マクロファージが必須であることを明らかにした。さらに心臓マクロファージが特異的に発現しているアンフィレグリンがそのストレス応答に必須であることを見出し (Fujiu et al, *Nat Med*, 2017 and Matsubara unpublished data)、またアンフィレグリンは心臓マクロファージの機能的分化マーカーであることも同定した。加えて我々はAreg発現に関与する受容体が脂肪酸やプロトンを取り込む受容体Gpr65であることも同定しており、Gpr65ノックアウトマウスでは、単位心臓重量当たりの心臓マクロファージ数が減少していることを確認した (Matsubara unpublished data)。本研究ではGpr65を介した心臓マクロファージの分化機構を解明し、心不全の新規治療標的を同定に挑戦した。

これまでの心不全の新規治療法の開発は主に心筋細胞を中心にほとんどの解析が行われてきたが、我々は心臓を構成する細胞のうち1%に過ぎない心臓マクロファージが心機能を規定していることを見出した (*Nat Med*, 2017 and unpublished)。マウスの心臓マクロファージを除去しておく心臓への圧負荷時に心機能が著しく低下し、高率に心不全

死する。さらに心臓マクロファージが分泌するエフェクター分子として同定したアンフィレグリン (AREG) を投与すると心臓マクロファージがなくても心機能を回復させ圧負荷に対するストレス応答が可能になり野生型と同様に生存できるようになることを見出した (図1、*Nat Med*, 2017)。心臓マクロファージ-

AREG軸は新しい心臓恒常性維持機構である。この軸の異常が心不全発症の新しい機序、治療標的になると思われる。組織マクロファージは血中の単球が臓器内に入り、その臓器特有の環境因子から教育を受け、臓器特異的な分化をすることで、その臓器特異的な機能を有するようになる。本研究における「問い」は、心臓マクロファージは心臓からどのように教育を受け、心臓特異的な機能を獲得するか、でありすなわち心臓マクロファージ特異的な分化機構を明らかにすることである。予備的知見として心臓特異的な機能的および分化マーカーであるAreg発現が心臓に比較的特異的に豊富に存在する脂肪酸によって、その受容体であるGPR65を介して、マクロファージを心臓マクロファージらしく分化させていることを同定している。本研では

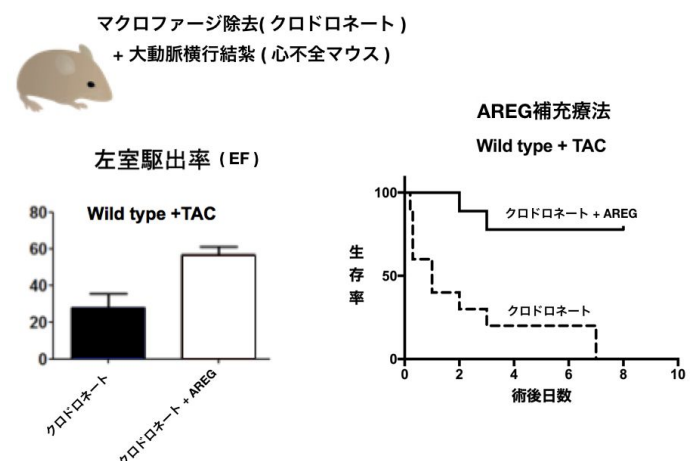


図1. 研究背景 心臓マクロファージが特異的に発現するアンフィレグリン (AREG) が心筋細胞に作用し、心機能を規定している。心臓マクロファージをクロドロネートで除去し、圧負荷心不全モデル (TAC: transverse aortic constriction) を作製すると心機能が低下し、早期に死亡するが (破線)、AREGを補充しておく心臓マクロファージおよびAREGが心臓のストレス応答に必須であることを示す。

Gpr65を介した分化機構に着目し、脂肪酸心臓マクロファージの分化機構について検討し、心不全の新規治療標的を同定することに挑戦した。

## 2. 研究の目的

心不全は悪性腫瘍と同等かそれ以上に予後不良な全身疾患で、現在日本人の死因の第2位を占めている。近年、心不全患者は増加傾向にあり心不全治療に反応しない極めて予後不良の患者も存在する。そこでさらなる心不全の病態解明、新たな治療法の開発が求められている。我々はこれまでに心不全においてこれまで生理的な機能が未知であった心臓マクロファージの重要な役割、すなわち心筋細胞に対して保護的な作用があることを明らかにした (*Nat Med* 2017)。このことは、心臓マクロファージから見る心機能といった新しい学術的なフィールドを与えたのと同時に、今後心臓マクロファージが治療標的になる可能性を示唆している。本研究では①心臓マクロファージがどのように分化成熟し、心臓特異的機能（心臓保護作用）を獲得するのか？②心臓特異的に分化したマクロファージは心筋細胞とどのようにcell-cell interactionし、心臓の恒常性を維持するのか？を詳細に検討し、新規治療標的、治療法の基礎的基盤を構築することを目的とした。

本研究計画では、正常心機能や心臓ストレス応答に必須な心臓マクロファージの生理的な分化にGPR65がどのように関わっているのかを検討する。GPR65の上流に存在し心臓マクロファージの分化・成熟を促しているシグナル経路を解析する。新たな心不全の病態解明や、治療介入可能な遺伝子を同定することにより心臓マクロファージと心筋細胞間の細胞間相互作用を介した新規心臓恒常性維持機構の解明を目指す(図2)。

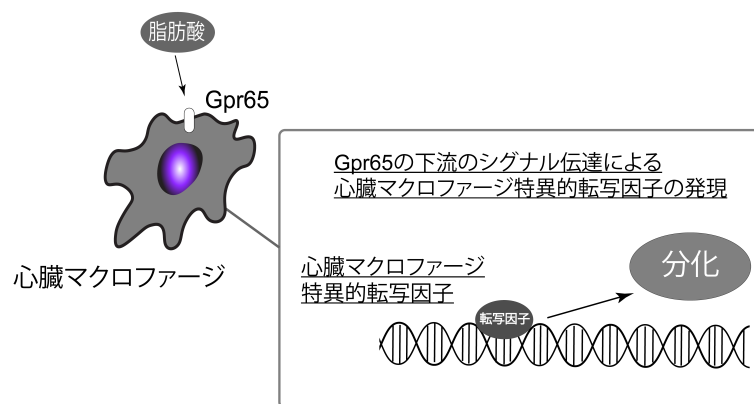


図2 研究目的

他の臓器に比較して心臓組織の特徴である脂肪酸をリガンドとする受容体GPR65が心臓マクロファージの分化マーカーである*Areg*の上流に存在する、GPR65の下流に存在するエピジェノミクおよび転写プログラムを明らかにし、心臓マクロファージにおけるGPR65の役割を明らかにし、心臓マクロファージの分化促進にという新しい治療標的、治療法の基盤を構築する

### 3. 研究の方法

我々の研究室では*Areg*を心臓マクロファージの分化マーカーと位置づけ、心臓マクロファージの分化に關与する受容体遺伝子として*Gpr65*を同定している（Matsubara unpublished data）。

*Gpr65*ノックアウトマウスのフローサイトメトリーによる心臓マクロファージの分化度の評価及びRNAシーケンスによる*Areg*の発現について解析した。

フローサイトメトリーでは野生型マウスに比較して*Gpr65*ノックアウトマウスでは単位心臓重量あたりの心臓マクロファージ数が20%低下していた。さらに心臓マクロファージをフローサイトメトリーで分取し、網羅的遺伝子解析を行ったところ、成熟心臓マクロファージの分化マーカーである*Areg*の発現が低下していた。

*Gpr65*ノックアウトマウスの骨髓細胞を放射線照射した野生型マウスに骨髓移植し、心機能を心臓超音波検査で評価したところ、2ヶ月程度の経過で心拡大と左室駆出率の低下を認めた。

*Gpr65*ノックアウトマウスの心臓マクロファージ数の減少および分化度の低下は、*Gpr65*が心臓マクロファージの増殖・分化・成熟に關与している可能性を示唆する所見と考えている。

予備的知見として*Gpr65*に脂肪酸が作用していることを*in vitro*で明らかにしており、心筋細胞表面で脂肪酸を供給する*Pla2g5*について検討した。具体的には -MHC-merCremerと*Pla2g5*のfloxマウスを交配させコンディショナルノックアウトマウスを作製し、心臓超音波検査による心機能とフローサイトメトリーで分化度を評価した。

心臓超音波検査では2ヶ月の経過で心拡大と左室駆出率の低下を認めた。

フローサイトメトリーでは単位心臓重量あたりの*Ccr2*陽性細胞すなわち未分化なマクロファージが増加していた。*Pla2g5*はオレイン酸とリノレン酸を供給するが、心臓内の脂肪酸濃度を測定したところ、オレイン酸、リノレン酸ともに低下していることを確認した。

### 4. 研究成果

心臓マクロファージの心臓保護的機能については、現在世界的にも我々の研究室が先駆的な状況にあり注目されている。さらに脂肪酸による心臓マクロファージの機能活性化については現時点では他に類がなく特徴でありかつ新規性が高く、論文上のインパクトも非常に高い。

本研究では心臓マクロファージの分化に必須であるリガンドの一つが不飽和脂肪酸であり、それを供給するのが*Pla2g5*であることを同定した。

*Pla2g5*によって供給された脂肪酸が*Gpr65*を介して作用し、心臓マクロファージを成熟させていることを明らかにした。さらに脂肪酸供給が減少し未分化マクロファージが増加することで心臓リモデリング、心機能低下をきたすことも明らかにした。心臓マクロファージが脂肪酸によって活性化され心臓機能を調節しているという新しいコンセプトを提供し、非常に高い影響力があると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------