

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21575

研究課題名(和文) 梗塞後心筋組織に浸潤する新規骨髄由来炎症関連細胞の同定と細胞機能の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel myeloid cells that infiltrate into post-infarct myocardium

研究代表者

藤尾 慈 (Fujio, Yasushi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20359839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：心臓が心筋梗塞により傷害を受けると炎症が惹起され、骨髄由来細胞が心筋組織に浸潤する。これまで、好中球と単球/マクロファージが、梗塞後の心筋組織の修復/線維化に中心的な役割を果たすとされてきたが、近年、それらの細胞は多様な細胞集団からなることが明らかになった。研究代表者らは、梗塞後心筋組織から、骨髄由来細胞を調製し1細胞RNA seq解析を行い、好中球にも単球/マクロファージにも属さない新規の細胞集団を見出した。さらに、この細胞集団を調整してRNA seq解析を行い、遺伝子発現プロファイルから、これまで知られていない細胞集団であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化に伴い循環器疾患が増加し、その結果、心不全が急増している。心不全の中でも心筋梗塞後に発症する心不全は、薬物治療に抵抗性を示すため、その発症予防は喫緊の課題である。梗塞後心不全の発症には、心筋組織に浸潤する骨髄由来細胞が重要な役割を演じていることが知られているが、それらの細胞の多様性ゆえに、詳細なメカニズムの理解には至っていない。本研究では、従来報告されていなかった新たな細胞集団が梗塞後心筋組織に浸潤することを見出し、その機能解明を行っている。この細胞集団の機能制御を戦略とする、新規心不全治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Myocardial infarction results in the infiltration of myeloid cells into the heart, which modulates post-infarct inflammation of myocardium. So far, neutrophils and monocytes / macrophages have been believed to play important roles in this process; however, recently, accumulating evidence has demonstrated that myeloid cells are composed of wider ranges of cell populations than expected.

In this project, we performed the single cell RNA seq analysis using myeloid cells that infiltrated into post-infarct myocardium and identified a cell cluster that is different from the cluster of neutrophils or from that of monocytes / macrophages. Next, we prepared this cell population to examine gene expression profile by RNA seq assay and found that this cluster is a novel cell population.

研究分野：分子循環器学

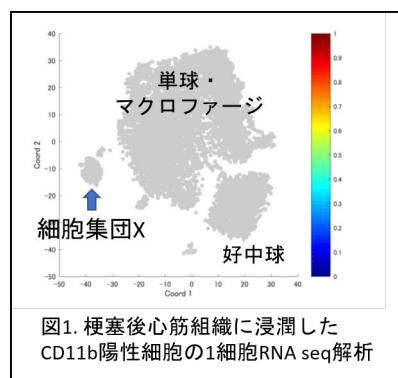
キーワード：心筋炎症 心筋梗塞 心筋リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓が心筋梗塞により傷害を受けると、骨髄由来の炎症関連細胞が浸潤し、炎症反応の制御を行う。これまで骨髄由来炎症関連細胞としては、好中球および単球・マクロファージが重要な役割を演じると考えられてきたが、近年、これらの細胞集団は決して均一ではなく多様な細胞集団のからなっていると考えられるようになってきた。

そこで、我々は、マウス心筋梗塞モデルを作製し、心筋組織から骨髄由来細胞として CD11b⁺細胞を調製し、1細胞 RNA seq 解析を行った。その結果、好中球とも単球・マクロファージとも異なる新規細胞集団 (以後、「細胞集団 X」と記載) を見出した (図 1)。細胞集団 X に属する細胞の多くが TGF-β の細胞表面ドッキング受容体である GARP を発現していることから、細胞集団 X を GARP⁺CD11b⁺細胞として解析することとした。



非常に興味深いことに GARP⁺CD11b⁺細胞は末梢血中にも存在し、心筋梗塞を作製すると末梢血中の細胞数が増加した。また、脾臓を摘出して、梗塞後の末梢血中 GARP⁺CD11b⁺細胞の増加は影響を受けなかったことから、心筋梗塞モデルでは、GARP⁺CD11b⁺細胞は骨髄から動員され心筋組織に浸潤するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、GARP⁺CD11b⁺細胞の病態生理学的意義を明らかにすることを目的とした。具体的には、次の2点を目的とした：

- (1) GARP⁺CD11b⁺細胞の遺伝子発現プロファイルの作製
- (2) GARP⁺CD11b⁺細胞の梗塞後心筋リモデリングにおける意義の解明

以下、(1)(2)に分けて記載する。

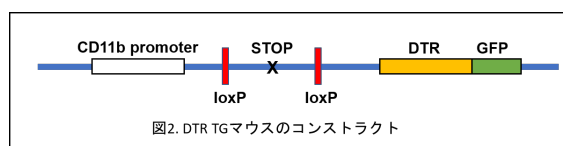
3. 研究の方法

- (1) GARP⁺CD11b⁺細胞の遺伝子発現プロファイルの作製

マウスに心筋梗塞モデルを作製後、末梢血を採取し、cell sorter により GARP⁺CD11b⁺細胞を調製した。CD11b⁺細胞と GARP⁺CD11b⁺細胞に関して、RNA seq 解析を行った。

- (2) GARP⁺CD11b⁺細胞の梗塞後心筋リモデリングにおける意義の解明

GARP⁺CD11b⁺細胞の機能を解明するために、GARP⁺CD11b⁺細胞を除去する実験系を作製した。具体的には、CD11b プロモーターの下流に loxP-Stop codon-loxP を介してジフテリア毒素受容体 (DTR) /GFP 融合タンパク質 cDNA を挿入した配列を持つトランスジェニックマウス (DTR TG マウス) を作製した (図 2)。



上記(1)の結果から GARP⁺CD11b⁺細胞特異的に発現する遺伝子として CXCL4 に着目した。DTR TG マウスと CXCL4-Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスとを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作製し、ジフテリア毒素を投与することにより GARP⁺CD11b⁺細胞欠損マウスを

作製する。

4. 研究成果

(1) GARP⁺CD11b⁺細胞の遺伝子発現プロファイルの作製

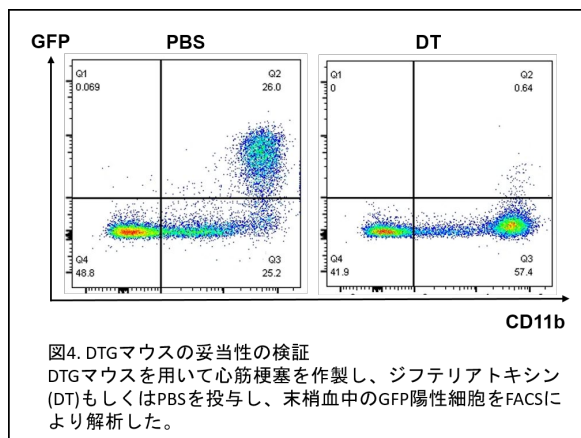
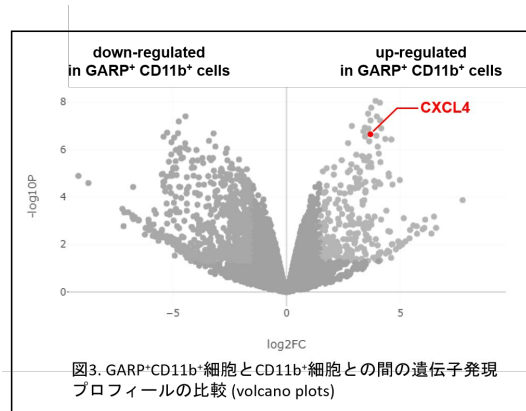
マウスの冠動脈を結紮し、末梢血からGARP⁺CD11b⁺細胞を調製し、RNA seq解析によりCD11b⁺細胞との比較の下、GARP⁺CD11b⁺細胞に特異的に発現する遺伝子を探索した(図3)。

(2) GARP⁺CD11b⁺細胞の梗塞後心筋リモデリングにおける意義の解明

従来、細胞機能を解明するにあたっては、その細胞に特異的に発現する遺伝子を欠失させることにより認められる表現型を検討することを方法としてきた。しかしながら、この方法では、発現する遺伝子の機能を解明することにはなるが、細胞の機能を解明することにはならない。そこで、この研究では、GARP⁺CD11b⁺細胞を欠損させる実験系の確立を目指すこととした。

そこで、CD11bプロモーターの下流にloxP-Stop codon-loxPを介してDTR/GFP cDNAを挿入したDTR TGマウスを作製した。次に、このマウスと骨髄由来細胞特異的にCre-リコンビナーゼを発現するLysM-Creマウスとを交配し、ダブルトランスジェニックマウス(DTGマウス)を作製した。次に、DTGマウスの冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製した後、ジフテリアトキシンを腹腔内に投与したところ、末梢血中のGFP陽性細胞が消失したことから、DTR TGマウスは計画通り機能していることが明らかになった(図4)。

現在、DTGマウスとCXCL4-Creマウスを交配し、GARP⁺CD11b⁺細胞特異的にDTR/GFPを発現するマウスを作製している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamamoto Ayaha, Morioki Hitomi, Nakae Takafumi, Miyake Yoshiaki, Harada Takeo, Noda Shunsuke, Mitsuoka Sayuri, Matsumoto Kotaro, Tomimatsu Masashi, Kanemoto Soshi, Tanaka Shota, Maeda Makiko, Conway Simon J., Imaizumi Kazunori, Fujio Yasushi, Obana Masanori	4. 巻 35
2. 論文標題 Transcription factor old astrocyte specifically induced substance is a novel regulator of kidney fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001820R	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 Shimizu Kahori, Sakurai Fuminori, Iizuka Shunsuke, Ono Ryosuke, Tsukamoto Tomohito, Nishimae Fumitaka, Nakamura Shin-ichiro, Nishinaka Toru, Terada Tomoyuki, Fujio Yasushi, Mizuguchi Hiroyuki	4. 巻 206
2. 論文標題 Adenovirus Vector?Induced IL-6 Promotes Leaky Adenoviral Gene Expression, Leading to Acute Hepatotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 410 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000830	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 Kametani Yusuke, Tanaka Shota, Wada Yuriko, Suzuki Shota, Umeda Ayaka, Nishinaka Kosuke, Okada Yoshiaki, Maeda Makiko, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Obana Masanori, Fujio Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Yes associated protein activation potentiates glycogen synthase kinase 3 inhibitor induced proliferation of neonatal cardiomyocytes and iPS cell derived cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30724	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 Miyake Yoshiaki, Obana Masanori, Nakae Takafumi, Yamamoto Ayaha, Tanaka Shota, Maeda Makiko, Okada Yoshiaki, Fujio Yasushi	4. 巻 571
2. 論文標題 PKNOX2 regulates myofibroblast functions and tubular cell survival during kidney fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 88 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.067	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 Wahyuni Tri, Kobayashi Arisa, Tanaka Shota, Miyake Yoshiaki, Yamamoto Ayaha, Bahtiar Anton, Mori Shota, Kametani Yusuke, Tomimatsu Masashi, Matsumoto Kotaro, Maeda Makiko, Obana Masanori, Fujio Yasushi	4. 巻 321
2. 論文標題 Maresin-1 induces cardiomyocyte hypertrophy through IGF-1 paracrine pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C82-C93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00568.2020	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 Nakae Takafumi, Obana Masanori, Maeda Takahiro, Ikeda Akari, Miyazaki Hiroshi, Tanaka Shota, Maeda Makiko, Yamashita Kunihiro, Terai Kazuhiro, Obika Satoshi, Fujio Yasushi	4. 巻 788
2. 論文標題 Title: Gene transfer by pyro-drive jet injector is a novel therapeutic approach for muscle diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145664 - 145664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145664	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Fujio Y
2. 発表標題 Molecular mechanisms of myocardial reverse remodeling after myocarditis
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Science 2020 Scientific Sessions (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山尚希、亀谷祐介、和田祐理子、鈴木翔大、梅田綾香、前田真貴子、田中翔大、尾花理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 Activation of YAP is essential for the myocardial recovery from myocarditis
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 翔太、田中翔大、前田真貴子、尾花理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 Cardioprotective roles of novel cell death inhibitor, defender against cell death 1 (Dad1)
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐竜太、富松聖史、前田真貴子、田中翔大、尾花理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 CXCL10 is an anti-angiogenic factor downstream of p53 in cardiomyocytes
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyake Y, Obana M, Yamamoto A, Noda S, Tanaka K, Tanaka S, Maeda M, Asanuma K, Fujio Y.
2. 発表標題 Increased Old Astrocyte Specifically Induced Substance (OASIS) in podocytes leads to the progression of nephrotic syndrome
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富松 聖史、横田 洸成、小南 春祐、田中 翔大、前田 真貴子、岡田 欣晃、尾花 理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 TGF- β 3は梗塞後心筋リモデリングを増悪させる
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀谷祐介、田中翔大、鈴木翔大、梅田綾香、前田真貴子、岡田欣晃、尾花理徳、藤尾慈
2. 発表標題 培養心筋細胞における内因性YAP活性は、GSK3阻害剤による増殖誘導効果を増強する
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田 祐理子、亀谷 祐介、鈴木 翔大、梅田 綾香、西中 康介、田中 翔大、前田 真貴子、岡田 欣晃、尾花 理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 細胞周期感受性タンパクFucciを用いた新規心筋増殖関連因子の網羅的探索
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科・薬学部 http://www.phs.osaka-u.ac.jp/

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	尾花 理徳	大阪大学・薬学研究科・准教授	
	(Obana Masanori) (50745883)	(14401)	

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