

研究報告書

「マクロファージを軸とする細胞間・多臓器間連携による心臓恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 藤生 克仁

1. 研究のねらい

心臓にはさまざまな心ストレスがかかるが、通常、適応現象が生じるために、多少のストレスは代償され、生存が可能である。我々は、マクロファージを除去したマウスを用いて心臓ストレス応答を検討したところ、非常に興味深いことに、非常に高頻度に心不全死を生じた。このことは、心臓マクロファージは心臓の恒常性維持に必要であること、その破綻が心不全の発症の原因となっていることを示唆する。

さらに、慢性腎臓病で心不全リスクが高まることから心腎連関に注目が集まっているが、その分子機構はよく分かっていない。我々は、腎臓特異的にストレス応答遺伝子を欠失したマウスを作製し、心不全モデルを作成したところ、野生型マウスに比較して、腎臓特異的ストレス応答遺伝子ノックアウトマウスでは、低心機能から高率に心不全死することを見出した。その機序として、腎臓特異的ノックアウトマウスでは、心ストレス時に腎臓からの GM-CSF の分泌が減少しており、心臓マクロファージが増加しないことを見出し、その心不全死は GM-CSF の補充により改善することを見出した。さらに、心ストレス時にそのストレスを腎臓が感知するためには、心臓—脳—交感神経—腎臓経路が重要であることも見出した。以上のような知見から、我々は以下のようなモデルを考えた。

心臓ストレスに対して個体は、心臓マクロファージを軸とする心筋細胞、心臓繊維芽細胞との細胞間相互作用が重要であり、心臓内での恒常性維持、ストレス応答を行う。さらに、この心臓マクロファージの活性化・増加は、心臓・脳神経系・腎臓を含む多臓器間連携によっても、強く制御されており、長期の心臓ストレスに対しては、心臓のリモデリングのみならず、脳・腎臓の炎症性変化やリモデリングが生じ、臓器連関による恒常性維持機構が破綻し、心不全を発症させる。また、各組織のリモデリングも、免疫系、神経系、および液性因子によって仲介される臓器連関により促進される可能性がある。

この基本モデルのもとに、本研究計画では、(1) 心臓マクロファージによる細胞間相互作用および臓器間相互作用を介した心臓恒常性維持機構およびその破綻による心不全発症機序の解析を行い、その相互作用を司っている機構を同定すること、(2) マクロファージへの介入標的として心臓マクロファージ特異的に発現する long non coding RNA (lnc RNA) の同定と心臓恒常性維持におけるその意義を解析するとともに、(3) 同定した機序、因子、lnc RNA を心不全に対する新たな治療戦略の標的として検討することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

心不全発症を心ストレスに対する心臓マクロファージを軸とする心臓・脳・腎臓を含む多臓器連関による個体の恒常性維持機構の破綻として統一的に理解するとともに、特にその分子機構として、ストレスから細胞のエピジェネティック変化、転写ネットワークの変化、細胞内代

謝の変化を包括的に検討し、心不全を分子から個体レベルまで同時に検討する視点の確立をねらうとともに、恒常性破綻の機序の解明から根本的な心不全の原因を探り、根源的な治療法を開発することで、治療法へのトランスレーションの基盤を構築することを目指す。

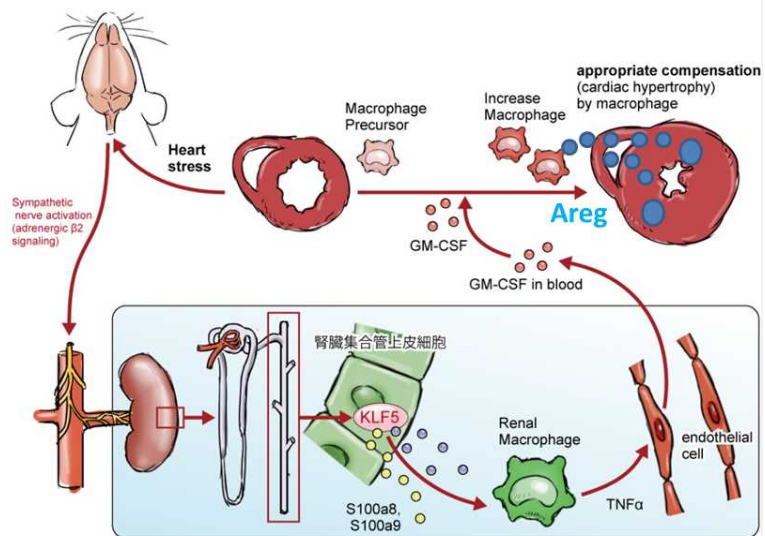
本研究計画では、心臓ストレスに対する個体の恒常性維持機構、またその破綻である心不全について、心臓マクロファージを軸とする心臓内の多種の細胞間コミュニケーションおよび多臓器が同時に臓器関連携を行いながら心臓マクロファージを最終エフェクターとして心臓恒常性維持を行っているとする観点から、心臓・脳・腎臓の三者を中心とする多臓器によるストレス応答を、時間的な変化を考慮しゲノムワイドで解析することにより明確にするとともに、心臓・脳・腎臓特異的遺伝子改変マウスを用いて、細胞間連携、臓器連関を司る重要な分子を同定し、恒常性と病態の両方における意義を解明することを目的とした。まず、心臓、脳、腎臓のマクロファージがどのような分子・機序を介して心機能に影響を与えているかを検討した(研究テーマA)、さらに、心臓のマクロファージ内でlncRNAがどのように、マクロファージの機能を修飾して、心機能に影響を与えているか検討した(研究テーマB)。最後に研究テーマA, Bから得られた分子が実際、心不全の治療に使用可能であるか動物モデルを用いて検討した(研究テーマC)。

(2) 詳細

(1) 研究テーマA: 心臓マクロファージによる cell-cell communication および inter-organ communication を介した心臓恒常性維持機構およびその破綻による心不全発症機序の解析

私はこれまでに、腎疾患の発症に腎臓集合管上皮細胞が新たな炎症惹起の鍵となる細胞であり、転写因子 KLF5 が同細胞内でストレス応答に働いていることを明らかにしていた(Fujiu et al, *JCI* 2011)。一方で腎疾患は心疾患の最も強力なリスク因子であることから、腎臓集合管上皮(collecting duct: CD)細胞特異的 Klf5 ノックアウトマウス(CD-KLF5KO)を作成し、圧負荷心不全モデル(Transverse Aortic Constriction: TAC)を行い、腎臓のストレス応答の欠損したマウスで心臓ストレスに対する心臓の反応がどのようになるか検討した。その結果、驚いたことに CD-KLF5KO は野生型マウスと比較して、本来生じるべき適応現象である心肥大が生じずに心機能が著明に低下し、心不全死した。心臓全体をフローサイトメーターで検討すると、野生型マウスの心負荷時に増加する心臓マクロファージが CD-KLF5KO では全く増加していないことを見出した。CD-KLF5KO の心臓に野生型マウスの心臓マクロファージを直接注射することで補うと心機能は改善し、心不全死が著明に改善した。さらに、クロドロネートリポソームを投与し、マクロファージを除去したマウスに心臓圧負荷を行っても、同様に圧負荷によって心機能が低下し、心不全死した。以上から、心負荷時に心臓マクロファージが増加することが心臓のストレス応答に必須であり、また、この増加は腎臓集合管上皮細胞を中心とした腎臓が臓器間連携を介して制御していることを示しており、心不全における心腎連関の存在を明確に示すことに成功した。

この新規臓器間連携の詳細は以下(右図)のとおりである。心臓に圧負荷が加わると迷走神経求心路および痛覚神経を介して脳にシグナルが伝わり、その後、交感神経遠心路(βシグナル)を介して腎臓に伝わる。CD cell 内の KLF5 が活性化し、その下流因子である S100A8, S100A9 が腎臓内に分泌され、腎



臓内のレジデントマクロファージが活性化し、TNFαを腎臓内に分泌する。このTNFαは腎臓内の血管内皮細胞 (CD31+, VEcadherin+ cell) に作用し、GM-CSF を血中に放出する。GM-CSF は心臓マクロファージ特異的増加を引き起こし、増加したマクロファージが心肥大を惹起する。GM-CSF 中和抗体の投与実験や、*Adrb2* ノックアウトマウス、交感神経βブロッカー、腎動脈周囲の交感神経アブレーションなどによっていずれかの経路を遮断した際にも、心臓圧負荷時の心臓マクロファージの増加が生じずに心不全・心不全死が生じることから各ステップが必須な反応系と考えられた。心臓マクロファージからの心筋細胞への最終エフェクター分子はアンフィレギュリン(AREG)という分泌タンパクであり、適応現象としての心筋細胞肥大を惹起し、心臓のストレス応答が成立する。以上の結果をまとめ、*Nature Medicine* 誌に Article として採択された。

心臓圧負荷ストレス時に心臓から迷走神経求心路、痛覚神経を介してシグナルが脳に伝わり、交感神経遠心路(βシグナル)によって腎臓集合管上皮細胞が活性化し、転写因子 KLF5-S100A8/S100A9 経路によって、腎臓マクロファージが活性化し、腎臓マクロファージから TNFαが分泌され、最終的に腎臓内の血管内皮細胞から GM-CSF が血中に分泌される。この腎臓由来の GM-CSF によって心臓マクロファージが増加し、アンフィレギュリン(AREG)が分泌される、アンフィレギュリンの分泌が心臓圧力負荷時の生存に必須である。

3. 今後の展開

本研究を通じて、心臓の恒常性維持に心臓・脳・腎臓の臓器間連携が非常に重要であること、さらにその鍵分子の同定に成功した。今後は、実際に腎臓病が発生した際にこの新しい臓器間連携がどのように破綻するかを検討し、治療への展開を検討する。さらに、本研究を通じて、心臓内に存在するマクロファージが心筋細胞との相互作用によって心臓に対して保護的に働くことを見出し、その鍵分子を3つ同定した。今後は、さらなる鍵分子の同定を試みるとともに、治療への応用を検討する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究を通じて、当初予定していた実験計画は達成できたと考えている。また、本研究によって独立した研究チーム、研究室を形成することができた。主たる研究成果は現在、製薬企業との共同研究として検討を行っており、治療薬として社会に貢献できる可能性に加え、得られた科学的知見は心臓病の領域において今後の研究に新しいプラットフォームを提供するため波及効果を大きいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、心臓ストレスに対する個体の恒常性維持機構、またその破綻である心不全について、細胞間コミュニケーションならびに臓器間連携の観点から解明することを目指した。その結果、心臓に圧負荷が加わると、そのシグナルが脳を介して腎臓集合管上皮のKLF5を活性化し、血中のGM-CSFの上昇により心臓マクロファージの増加をきたすこと、更にこの心臓マクロファージがアンフィレギュリンを分泌し、心筋細胞肥大を生じることを見出し、論文として発表した。これ以外にも多数の論文、学会発表があり、それに加えて特許出願も行った。また、本さきがけ研究領域内、さらには他領域のさきがけ研究者と共同研究を行い論文発表するなど、研究の幅が広がった。以上から、本さきがけ研究が研究者としての飛躍につながったと考えられ、今後の更なる活躍が非常に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Fujiu K, Wang J, Nagai R, Cardio-Protective Function of Cardiac Macrophage, *Cardiovasc Res*, 102(2):232-9, 2014
2. Tan X, Fujiu K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi J, Nagai E, Yanagi Y, Choroidal neovascularization is inhibited via an intraocular decrease of inflammatory cells in mice lacking complement component C3, *Sci Rep*, 15702, 2015
3. Ogata F, Fujiu K, Matsumoto S, Nakayama Y, Shibata M, Oike , Koushima I, Watabe T, Nagai R, Manabe I, Excess lymphangiogenesis co-operatively induced by macrophages and CD4+ T cells drives the pathogenesis of lymphedema, *J Invest Dermatol*, 136, 706-714, 2016
4. Tan X, Fujiu K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi R, Terashima Y, Matsushima K, Kaburaki T, Nagai R, Yanagi Y, Choroidal Neovascularization Is Inhibited in Splenic-Denervated or Splenectomized Mice with a Concomitant Decrease in Intraocular Macrophage. *PLoS One*, 11(8):e0160985, 2016
5. Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, Iwami S, Nakae S, Komuro I, Nagai R, Manabe I, A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation and cellular communication, *Nat Med*, in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件

1.

発明者: 藤生克仁、真鍋一郎、柴田宗彦、永井良三、大村智、中野洋文、砂塚敏明、廣瀬友靖、山地賢三郎、木戸博

発明の名称: 新規 PDK4 阻害薬を有効成分として含有する心不全の治療および予防薬

出願人: 国立大学法人 東京大学、学校法人北里研究所、国立大学法人徳島大学

出願日: 2014年2月27日

出願番号: 2014-037339

発明者: 太田禎生、堀崎遼一、佐藤一誠、藤生克仁、山口聡子、脇嘉代、板橋踊子

発明の名称: 機械学習により自動的に高速・高感度・高精度化する次世代多次元情報フローサイトメリーの要素機構、及びその統合システム

出願人: 国立大学法人東京大学、大阪大学

出願日: 2015/10/28

出願番号: 2015-212356

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

中山 幸輝、真鍋 一郎、藤生 克仁、永井 良三、小室 一成、炎症性マクロファージにおける機能的長鎖ノンコーディング RNA、日本分子生物学会、神戸、2015

藤生克仁、臓器連関を介した心血管の恒常性維持機構、第31回日本糖尿病合併症学会、仙台、2016/10/8, (invited speaker)

藤生克仁、心臓のマクロファージによる心臓老化制御、脳心血管抗加齢研究会 2016、秋葉原、(invited speaker)

藤生克仁、臓器間連携による心臓恒常性維持機構、第20回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(CVME2016)、東京、(invited speaker)

Makimoto H, Fujiu, K, Shimizu K, Amiya E, Kojima T, Daimon M, Meyer C, Komuro I, Diverge Responses of Cardiac Autonomic Function to Beta-blocker Therapy Depending on Chronic Kidney Disease, ESC, 2015

Sugita J, Fujiu K, Nakayama Y, Matsubara T, Matsuda J, Manabe I, Komuro I, Cardiac Macrophage is Required to Avoid Atrioventricular Block After Right Heart Pressure Overload, Annual Scientific Session of American Heart Association, New Orleans, USA, 2016

著作物

藤生克仁、心腎連関による心臓リモデリング機序、最新医学、最新医学社、Vol. 70, No. 6, 1130-1135, 2015

藤生克仁、心腎脳ネットワークと慢性炎症制御、別冊 BioClinica, vol.4 No.2, 91-96, , 北隆館 2015

藤生克仁、真鍋一郎、臓器連関、5. 心腎連関の機序の最新の知見、腎・高血圧の最新治療、14(1)、フジメディカル出版、2016

藤生克仁、心不全における細胞間および臓器間の相互作用、細胞、48(12)、14-17、2016

藤生克仁、心臓マクロファージによる心臓老化制御, Anti-aging Science, 8(1), P53, 2016

受賞

平成 25 年 10 月 Banyu Foundation Research Grant 2013 受賞

平成 27 年 9 月 第 4 回万有医学奨励賞受賞

平成 27 年 11 月 第 4 回万有医学奨励賞 最優秀賞受賞

アウトリーチ活動

平成 26 年 2 月 14 日、日本科学未来館、サイエンティスト・クエスト、心臓を動かす驚きの最強チーム！、藤生克仁