

## 論文の内容の要旨

論文題目 心臓マクロファージは心臓圧負荷に対して保護的に作用する

氏名 柴田宗彦

心不全とは心臓ポンプ機能低下により主要臓器の需要に見合うだけの血液量を拍出できない状態である。その結果として肺または体静脈系にうっ血を来す。一般地域住民を対象としたフラミンガム研究によると年齢ごとの慢性心不全の有病率は50-59歳で800、60-69歳で2300、70-79歳で4900、80歳以上で9100人(人口10万人あたり)と報告されている。日本では100万人前後の慢性心不全患者がいると推定されている。心不全に陥ると息切れや易疲労感を来し、その生命予後は極めて悪い。心不全の主な原因として虚血性心疾患、高血圧性心疾患、心筋症、弁膜症、先天性心疾患が挙げられる。一方でレニン・アンジオテンシン系、自律神経系、炎症の関係も示唆されている。

近年、慢性炎症と臓器障害との関係が注目されている。肥満、耐糖能障害、発癌、動脈硬化、心房細動など様々な疾患と慢性炎症との関連が指摘されている。

心不全と炎症の関係に関して、1990年Levineらにより、初めて慢性心不全の患者血清中のTNF $\alpha$ 濃度が健康人と比較して有意に高いという報告がなされた。その後、血中TNF濃度が心不全の重症度と相関することやIL-6、TNF受容体、MCP-1、IL-1、IL-18などさまざまなサイトカインの血中濃度も心不全患者において上昇することが報告された。

一方でLIF、CT-1などgp130を介するサイトカインは心臓保護的とされている。gp130は、LIF (leukemia inhibitory factor)、OSM (oncostatin M)、CNTF (ciliary neurotrophic factor)、IL-11、CT-1 (cardiotrophin-1)といったIL-6ファミリーサイトカインの受容体の共通コンポーネントである。IL-6ファミリーサイトカインは、gp130を介して、T細胞・B細胞等の免疫細胞、造血細胞、肝細胞、神経細胞に対して、増殖・分化の促進、細胞死の抑制など多様な作用を示すことが知られている。gp130ノックアウトマウスは血球異常・胎盤異常・心室低形成のために胎生致死である。このことがきっかけとなり、心臓領域におけるgp130サイトカインの研究が始まった。1999年心室筋特異的gp130ノックアウトマウスは正常な発達を見せたが圧負荷後には2日目に心機能低下が観察され、1週間後に左室拡大とともに心不全による高い死亡率(90%)を示した。

このように炎症シグナルは、心不全に対して増悪因子であるとともに、状況によっては保護的にも働くことが考えられる。何れにしても、心疾患における炎症シグナルの重要性を支持する研究成果が次々と報告されており、心筋における炎症は、今後新たな治療ターゲットとなる可能性を秘めている。今後、炎症シグナルへの介入薬剤を臨床応用するためには心不全と炎症の関係について更なるメカニズムの解明が必要と考えられる。

炎症では、間質に存在する血管や免疫細胞、線維芽細胞等が主要な役割を果たす。心臓の恒常性の維持や病態に、心筋細胞のみならず、間質細胞も寄与することが明らかになりつつある。我々は心臓間質の線維芽細胞が心臓圧負荷において重要な役割を果たしていることを報告してきた。心筋特異的 **KLF5** ノックアウトマウスは圧負荷に対してコントロールマウスと同様に心肥大を起こすが、線維芽細胞特異的 **KLF5** ノックアウトマウスで心肥大は減弱する。

組織間質には線維芽細胞や血管に加えて、免疫細胞も存在することが報告されている。例えば脂肪組織間質には多くの **CD8 T** 細胞やマクロファージが存在する。心筋梗塞直後には **Ly6C<sup>high</sup>** 炎症性単球/マクロファージが梗塞巣へ浸潤し、壊死巣の除去に寄与する。そして亜急性期には **Ly6C<sup>low</sup>** マクロファージが心臓の線維化を起こすことが報告されている。これらマクロファージを除去した結果、心臓の線維化は抑制されるが心破裂を来しやすくなる。

以上のように従来の研究は、心不全の発症や進展に慢性炎症が寄与することを示唆するが、その詳細はまだ不明である。特に、圧負荷による心肥大や心不全における免疫細胞の寄与については、よく分かっていない。そこで、私は心臓の圧負荷への応答や心不全の発症に免疫細胞が寄与すると仮説を立て、まず、心筋組織中に存在する免疫細胞を検索した。

はじめに心臓には定常状態においても免疫細胞が存在し、とくにマクロファージは心臓全体の細胞数の 1% 程度を占めていることが明らかとなった。そしてその数はアンジオテンシン II 負荷や心臓圧負荷により増えることが明らかとなった。**TAC**(大動脈縮窄術)による圧負荷では、圧負荷の程度を変えることにより、心不全を誘導することができる。心不全におけるマクロファージ機能を解析するために、以下の検討では **TAC** による圧負荷を用いることとした。心臓マクロファージ機能を検討するため、私はクロドロネート-リポソームを用い、マクロファージの除去を試みた。クロドロネートはビスフォスフォネートの一種でリポソームとともにマクロファージに取り込まれ、マクロファージにアポトーシスを誘導する。

**C57BL6J** マウスにクロドロネートリポソームを 1 回腹腔投与した後、2 日後に **TAC** を行った。その結果、クロドロネート投与マウスでは著明な生存率の低下を認め、圧負荷後 48 時間以内にほぼすべて死亡した。圧負荷から 4-5 時間後の心機能を評価した結果、クロドロネート投与マウスでは著明な心機能低下を認めた。この結果は、マクロファージが心臓圧負荷に対して保護的な役割を果たしていることを強く示唆する。

マクロファージが心臓において保護的に作用している機序を探るため、私はメタボローム解析を行った。圧負荷なしで正常心臓とクロドロネート投与 2 日後の心臓を比較した。

その結果、クロドロネート投与によって正常状態と比較して心臓中のアセチル **CoA** の量が低下傾向にあることが分かった。一方で解糖系の代謝中間産物の量に差はなかった。したがってマクロファージは心臓中の解糖系には影響しないがピルビン酸からアセチル **CoA** への移行を調節していると考えられた。ピルビン酸からアセチル **CoA** への移行は **Pyruvate**

dehydrogenase (PDH) によって行われるが PDH は Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) および Pyruvate dehydrogenase phosphatase (PDP) により制御される。PDK は PDH を抑制し、PDP は PDH を亢進させる。クロドロネート投与群において PDK4 および PDP2 の遺伝子発現を調べたところ、コントロールと比較して PDK4 の発現は亢進し、PDP2 の発現は抑制されていた。従ってクロドロネート投与によって遺伝子発現も PDH を抑制する方向、すなわちアセチル CoA 産生を抑制する方向に働いていた。また、NADH の産生が低下していることからクエン酸回路が十分に機能していないことが推察された。これはクエン酸回路中でアセチル CoA 合流後のクエン酸からイソクエン酸までの代謝産物が低下していることから支持された。

クロドロネート - リポソームを用いたマクロファージの障害では薬剤そのものによる副次的な影響の可能性が否定しきれない。

心臓マクロファージのプロファイリングを行った結果、M2 マクロファージ様であることが確認されたため、次に遺伝的にその機能に介入することを試みた。M2 マクロファージの分化には PPAR $\gamma$  や STAT6 が必要であることが知られている。そこで、STAT6 についての検討を行った。

マクロファージでの STAT6 の機能を解析するため、私は STAT6 ノックアウトマウスの骨髄を野生型 C57BL/6J マウスへ移植し、骨髄細胞のみで STAT6 を欠損するマウスを作製し、骨髄移植 8 週後に TAC を施行した。TAC 3 日後に心機能を評価したところ、コントロールと比較して左室駆出率の低下を認めた。また心臓での遺伝子発現を評価したところ、マクロファージ障害マウスでは *Atp2a2* (SERCA2a) の低下、*Coll1a1* (Collagen, type1, alpha1) の上昇を認めた。SERCA2a は細胞質中のカルシウムイオンを小胞体内に再取り込みするのに必須のタンパクであり、不全心ではその発現が低下することが知られている。

以上の結果は、マクロファージにおける STAT6 が、その心筋保護作用の発現に重要であることを示唆する。

ここまでの結果は、心臓においてマクロファージは圧負荷への適応応答に必須の役割を果たしていることを明らかにした。また、心臓マクロファージへの障害によって心臓代謝も影響されることから、常時心筋細胞とマクロファージの間にコミュニケーションが存在することが考えられる。このコミュニケーションを仲介する分子を同定するために、培養系の確立を試みた。

新生仔ラット初代心筋細胞と腹腔マクロファージをトランスウェル (Coster transwell 0.4  $\mu$ m polyester membrane) にて共培養した。下層の 35mm プレートへ新生仔ラット初代心筋細胞、上層のトランスウェルへ腹腔マクロファージの非接触系で培養した結果、マクロファージと共培養した心筋細胞はコントロールと比較して心筋細胞の肥大を認めた。このことからマクロファージ由来の液性因子が心筋に対して肥大作用を生じると考えられた。

今後、マクロファージにおける STAT6 に対する ChIp-seq などにより、マクロファージ由来保護的因子の同定を試みていきたい。