

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

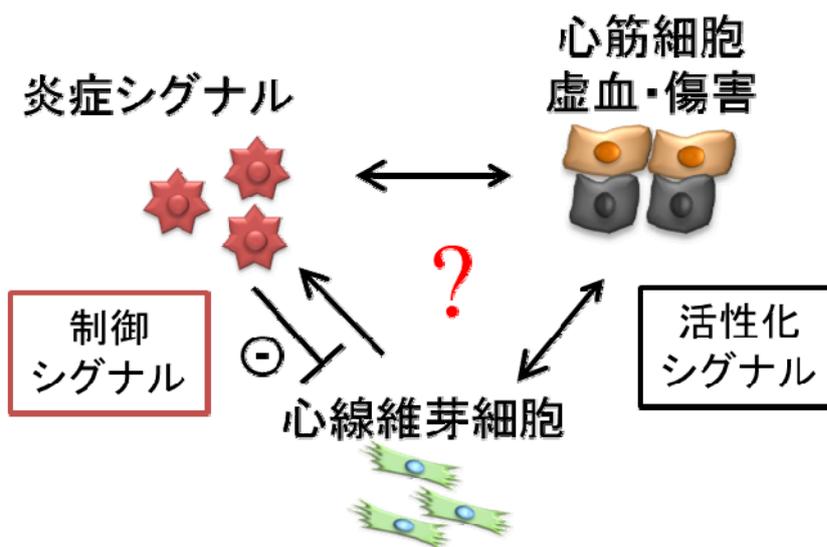
研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	東京大学 大学院医学系研究科 循環器内科
氏 名	武田 憲彦
研究テーマ	心血管リモデリングにおける低酸素シグナル

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

生活習慣病の増加および高齢化と共に我が国における心不全患者は増加している。特に心臓リモデリングに伴う心線維化は心臓突然死のリスクを増加させるだけでなく、心室拡張不全 (HFpEF) の主な原因となる。加えて心臓リモデリング過程では炎症細胞が浸潤することも明らかになってきた。しかしながら下記2つの疑問、即ち1. 血行力学的な病態である心不全において、なぜ炎症細胞が集積するのか、2. 炎症プロセスの活性化は心臓線維化の原因になるのか、についてこれまで明らかにはされて来なかった。

我々はこれまで低酸素誘導型転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α を介する細胞の低酸素応答に着目して研究を行ってきた。特に HIF- α の2つのアイソフォーム、HIF-1 α と HIF-2 α それぞれ固有の役割に着目することで、低酸素シグナルの on/off 調節機構について解析を進めてきた。この中で、マクロファージにおいて HIF-1 α を介する低酸素シグナルが炎症プロセスの活性化に重要であること。また HIF-2 α を介する低酸素シグナルが炎症制御に関わっていること (HIF- α スwitchング) を報告してきた (*Gene Dev.* 2010, *PNAS.* 2013)。



今回、我々はマクロファージにおける HIF-1 α シグナルが、その活性化のみならず炎症局所への遊走においても重要な役割を果たしている事を明らかにした (*Nat Commun.* 2016)。その分子機構として、HIF-1 α により誘導された Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) を介する解糖系への細胞内代謝シフトが重要であることを見出している。細胞遊走の過程では細胞骨格のアクチンフィラメント (F-actin) の重合・脱重合を介するダイナミックな構造変化が重要である。F-actin の重合過程において ATP の存在が不可欠であることが知られている。我々は解糖系経路における ATP 産生酵素、Pyruvate kinase, muscle (PKM2) はマクロファージにおける F-actin と共局在していることを確認した。即ち、解糖系代謝経路により ATP 産生の場所が細胞質へとシフトすることにより、より効率的に細胞骨格、F-actin へと ATP が供給されていると考えられた。興味深い事に、HIF-1 α -PDK1 経路を介して心筋組織へ浸潤するマクロファージは、心臓線維化を負に制御していることを確認した。

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京大学 大学院医学系研究科 循環器内科
氏 名	武田 憲彦
研究テーマ	心血管リモデリングにおける低酸素シグナル

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

研究の背景・目的

高齢化、生活習慣病の増加と共に我が国における心不全患者は著しく増加している。特に薬物治療抵抗性の重症心不全症例に対する新たな治療法開発は、現代の臨床医学において重要な課題になっている。心不全は血行力学的な病態であり病原体による感染症では無いが、最近の研究から心不全の病態に持続的な炎症プロセスの活性化が大きく関わる事が少しずつ明らかになってきた。しかしながら、1. 血行力学的な病態である心不全において、なぜ炎症プロセスが活性化するのか、2. 炎症プロセスを制御することにより心不全の病態が改善しうるのか、と言う疑問について、未だ明らかにはされて来なかった。

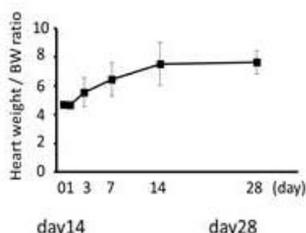
我々はこれまで、細胞の低酸素応答を司る転写因子、Hypoxia inducible factor (HIF)- α に着目して低酸素環境における細胞機能制御機構につき解析を行ってきた。HIF- α には主要なアイソフォームとして、HIF-1 α 、HIF-2 α の2つが知られている。我々はこれまで、HIF-1 α 、HIF-2 α 発現が細胞外環境により変動すること (HIF- α スイッチング) を同定し報告してきた。特にマクロファージにおける HIF- α スイッチングは炎症プロセスの活性化とその制御において重要であった (Gene Dev 2010)。HIF- α スイッチングはまた皮膚ケラチノサイトの機能を介して、

全身の血圧調節において必須の役割を果たしている事を明らかにしてきた (PNAS 2013)。更に最近、我々は低酸素プローブを用いた *in vivo* imaging 法により、心不全状態の心筋組織が低酸素環境に陥っている事を確認している。

このような背景から、我々は本研究において、“心不全組織における低酸素環境および低酸素シグナルが炎症プロセス活性化およびその慢性化の原因になっているとの仮説を構築した。本仮説を検証するために、低酸素シグナルが炎症細胞遊走に与える影響、およびその分子機構の解明に着手した。



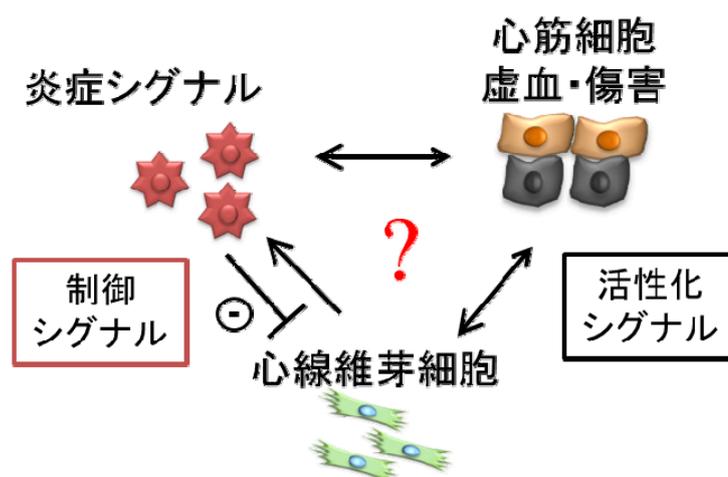
本研究で用いる
上行大動脈縮窄手術
(TAC)



研究の方法

我々はこれまで HIF- α を介する細胞の低酸素応答に関して研究を行ってきた。特に HIF- α の 2 つのアイソフォーム、HIF-1 α と HIF-2 α それぞれ固有の役割に着目することで、低酸素シグナルの on/off 調節機構について解析を進めてきた。この中で、マクロファージにおいて HIF-1 α を介する低酸素シグナルが炎症プロセスの活性化に重要であること。また HIF-2 α を介する低酸素シグナルが炎症制御に関わっていること (HIF- α スwitchング) を報告してきた (Gene Dev 2010)。HIF- α スwitchングはその後、血管内皮細胞 (Cancer Cell 2012)、皮膚ケラチノサイト (PNAS 2013) においても確認され、現在では低酸素シグナルにおける新たな概念として認められ、数々の総説でも引用されている (Nat Rev Cancer. 2011, 12(1):9-22)。

本研究では圧負荷心不全モデルとして、マウス上行大動脈縮窄モデル (Thoracic aortic constriction, TAC) を用いる。本モデルにおいては、圧負荷により持続的な心肥大および心機能の低下による心不全が引き起こされる。本研究では以下の 2 つのアプローチを用いて、心筋組織において炎症細胞が集積する機構を解明すると共に、心臓リモデリングにおける炎症細胞の役割を明らかにする。



1. 心筋組織に浸潤する炎症細胞の同定とその誘導機構の解明

TAC モデル後の心筋組織に浸潤する炎症細胞につき、フローサイトメーターを用いて経時的に解析する。心筋組織をコラゲナーゼ処理し、遊走してきた CD11b 陽性細胞を血球系細胞として解析する。マクロファージ、特に炎症惹起型 M1 マクロファージ (Ly6c^{high}, F4/80^{mid}) と、炎症抑制型 M2 マクロファージ (Ly6c^{low}, F4/80^{high}) の集積につき、TAC 術後 Day3, 7, 14, 28 日において解析する。我々はこれまでの予備的検討において、心臓リモデリング組織が低酸素環境に陥っている事を確認している。本研究において、我々は低酸素プローブ (pimonidazole) を用いた解析を施行する。TAC 術後に心筋組織に集積する細胞につき、Pimonidazole 陽性細胞の集団につきフローサイトメーターを用いて同定する。Cd11b, F4/80, Ly6c, Ly6G 染色性におり、低酸素領域に集積する細胞の表現型解析を行う。更に無菌的疾患である心臓リモデリング過程において、炎症細胞が集積する分子機構を明らかにする。

2. 心臓リモデリングにおいて炎症細胞が果たす役割の解析

炎症細胞における低酸素 (HIF- α シグナル) が、心臓リモデリング病態において果たしている役割について解析を行う。我々は既に、骨髄系細胞特異的 HIF-1 α (HIF-1 α 欠損マウス) および HIF-2 α 欠損マウス (HIF-2 α 欠損マウス) を樹立している。本研究では、HIF-1 α 欠損マウスを用いて、TAC 後の心肥大 (心重量および病理組織学的解析)、および集積する炎症細胞についての FACS を用いた解析を行う。

結果

圧負荷により誘導される心肥大において、心筋組織が低酸素環境に陥っている事を確認した。興味深い事に炎症惹起型 M1 形質を有するマクロファージが、心臓リモデリング過程において心筋組織の低酸素領域に集積していることが判った。また、低酸素領域への炎症細胞集積は HIF-1 α シグナル依存性であることを同定した。

引き続き、HIF-1 α を介する炎症細胞遊走の分子機構の解析を行った。特にグルコース代謝、解糖系の役割に着目してアプローチを行った結果、HIF-1 α により誘導される Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) を介する解糖系への細胞内代謝シフトが低酸素領域への炎症細胞集積に重要であることを見出した。細胞遊走の過程では細胞骨格のアクチンフィラメント (F-actin) の重合・脱重合を介するダイナミックな構造変化が重要である。F-actin の重合過程において ATP の存在が不可欠であることが知られている。我々は解糖系経路における ATP 産生酵素、Pyruvate kinase, muscle (PKM2) はマクロファージにおける F-actin と共局在していることを確認した (*Nat Commun.* 2016 として報告)。即ち、解糖系代謝経路により ATP 産生の場所が細胞質へとシフトすることにより、より効率的に細胞骨格、F-actin へと ATP が供給されていると考えられた。

上記アプローチにより同定した炎症細胞の集積機構は、心臓リモデリングにおいても機能していると考えられた。即ち HIF-1 α 欠損マウスでは、圧負荷後の低酸素領域における M1 マクロファージ集積が有意に減少していた。興味深い事に、M1 マクロファージを欠損したマウスでは心筋組織の線維化が増加していることが判った。これらの知見は、心筋組織集積する炎症細胞の一部においては、心筋保護的に作用することを示唆していると考えられた。

考察・今後の課題

低酸素領域に炎症細胞が集積する過程において、グルコース解糖系代謝経路が重要な役割を果たしている事を明らかにした。これらの知見は、炎症細胞のグルコース代謝経路が炎症プロセス制御における治療標的となりうることを示している。実際に我々は解糖系代謝を抑制するジクロロ酢酸 (Dichloroacetate) 投与により、敗血症性ショックのみならず、マクロファージ遊走能が有意に抑制されることを確認している。今後、解糖系代謝がどのように細胞遊走を促進するのか、特に細胞骨格における ATP 分布などに着目することにより解析することが可能になると考えられる。

心臓リモデリングにおける炎症細胞の役割についても興味深い知見が得られた。これまでの予備的知見では、心筋組織への M1 マクロファージ集積は心臓線維化を負に制御していることを示している。今後、マクロファージがどのように心臓線維化を抑制するのか、その分子機構の解明を進める必要がある。併せて今回の検討から、心筋組織において炎症シグナル以外に心臓線維化を促進するプロセスが働いている事が示唆された。心筋細胞、心臓線維芽細胞間における細胞間相互作用を検討することで、心臓リモデリングにおける分子機構をより詳細に解析できると考えられた。

**Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所 属	東京大学 大学院医学系研究科 循環器内科
氏 名	武田 憲彦

1. 論文発表実績

- ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	Semba H, <u>Takeda N</u> , Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R and Komuro I. HIF-1 α -PDK1 axis induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. Nature Communications 7,Article number:11635, 2016(査読有)
2	
3	
4	

② <論文 PDF 添付なし>

1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016 年 10 月 8 日	第 37 回日本肥満学会シンポジウム(イムノメタボリズムと肥満症) 武田憲彦 HIF-1 α -PDK1 経路を介した代謝リプログラミングはマクロファージ遊走能を促進する
2	2016 年 7 月 14 日	第 48 回日本動脈硬化学会総会学術集会 武田憲彦 心血管リモデリングにおける炎症細胞・低酸素シグナルの役割
3		
4		
3. 投稿、発表予定(投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		