

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	東京大学医学部附属病院 循環器内科
氏 名	藤生 克仁
研究テーマ	心筋細胞と心臓マクロファージの相互作用による恒常性維持機構

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)

**研究目的** 心臓の恒常性維持機構に心臓の組織マクロファージが重要な働きをしているという仮説を証明し、心不全の新しい治療標的を同定すること。

**研究手法** 心臓マクロファージを除去した際に心機能が低下する。すなわち心臓マクロファージが心筋細胞と細胞間相互作用を行うことによって、心機能が維持されていることを見出していた。この心臓マクロファージ由来で心筋細胞の恒常性維持に必要なタンパクを、細胞間相互作用や遺伝子、タンパクの網羅的解析によって同定し、マウスを用いてその同定した因子の重要性を確認する。

**研究成果** 心臓に圧負荷が生じた際に、心筋細胞が肥大し、最終的に心肥大が生じることで、心臓は圧負荷に対してストレス応答を行い、心臓の恒常性が維持されマウスは生存することができる。この際に心臓・脳・腎臓を経由し、腎臓から分泌される CSF2 が重要であり、CSF2が心臓マクロファージを活性化していることを明らかにした(図1)。心臓マクロファージの存在およびその活性化は心臓の代償性肥大・心機能維持に必要であった。心臓マクロファージを除去、あるいは心臓・脳・腎臓間の臓器間ネットワークを切断した際にもこの恒常性維持機構が破綻し、心肥大が生じずに心不全死することを見出した。さらに、心臓マクロファージの活性化によりどのように心筋細胞の肥大が生じるかを検討したところ、心臓の中では心臓マクロファージ特異的に発現し、さらに、全身のマクロファージ・マイクログリアの中でも心臓マクロファージ特異的に発現しているアンフィレグリン(AREG)を同定した(図2)。このアンフィレグリンは心筋細胞を直接的に肥大させることができる。心臓マクロファージがあっても、アンフィレグリンを欠損させると心臓の恒常性が維持できないことも見出した。以上から心臓恒常性維持において心臓マクロファージの存在および心臓マクロファージが特異的に分泌するアンフィレグリンが重要であり、新しい治療標的である。

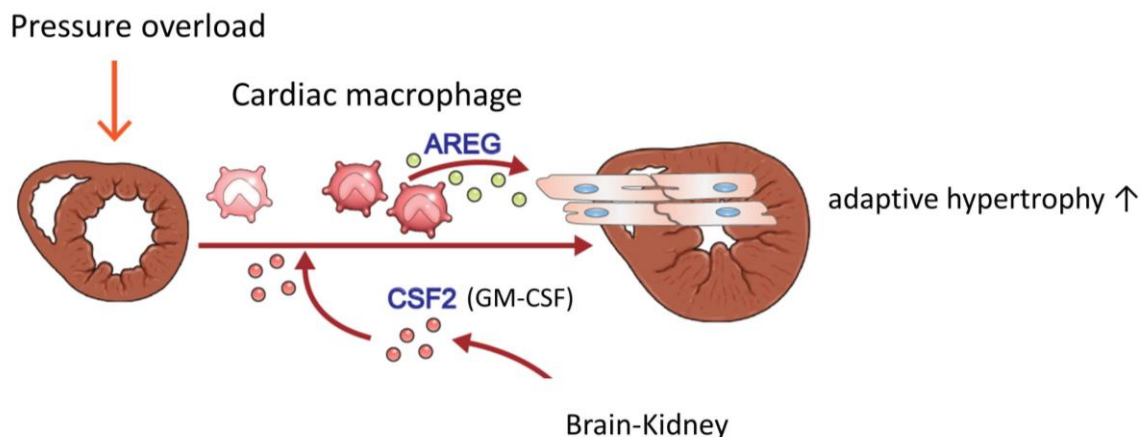


図1. 心臓への圧負荷時に脳・腎臓を介した新たな臓器間ネットワークによって、心臓マクロファージの活性化が生じ、AREG(アンフィレグリン)により心臓の恒常性が維持される

Banyu Foundation Research Grant 2015—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京大学医学部附属病院 循環器内科
氏 名	藤生 克仁
研究テーマ	心筋細胞と心臓マクロファージの相互作用による恒常性維持機構

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

背景

我々は、心臓に圧負荷が生じた際に心臓マクロファージが増加し、心筋細胞と相互作用し、圧負荷に対する代償性ストレス応答を行っていることを明らかにした。さらに、このマクロファージの増加不良は心不全を発症することをつきとめた。さらに心臓マクロファージを除去すると圧負荷時に心機能が低下し、心不全死した。このことは、心臓マクロファージによる心臓保護作用が圧負荷などのストレス応答に必須であることを示している。

目的

これまでの検討から心臓マクロファージが心筋細胞と相互作用し、心臓の機能、恒常性維持、疾患発症に関与するという大枠を示すことができたが、その詳細は不明であり、その詳細な機序を明らかにする。

方法

本研究計画では、心臓マクロファージがどのような分子を介して心筋細胞と相互作用するかという点に着目して検討し、心臓マクロファージに特異的発現し・分泌され心筋細胞に働く分泌蛋白を同定し、心臓恒常性維持、心疾患発症機序に関する役割を検討する。

結果・考察

心臓には生理的な状態でも圧負荷、容量負荷が加わるストレスが絶えず存在しており、そのストレスに対する恒常性維持機構によってわずかなストレスでは血行動態が破綻しないようになっている。血行動態は心拍出量、循環血液量、血管抵抗が規定している。これらの3因子の調節は、心臓・腎臓・血管と自律神経系および10種類以上におよぶ神経体液性因子によって恒常性が保たれている。我々は、マウスモデルを用いて、従来の心臓の恒常性維持機構に加えて、新たな系が存在することを報告した(Fujiu et al, Nat Med, 2017)。

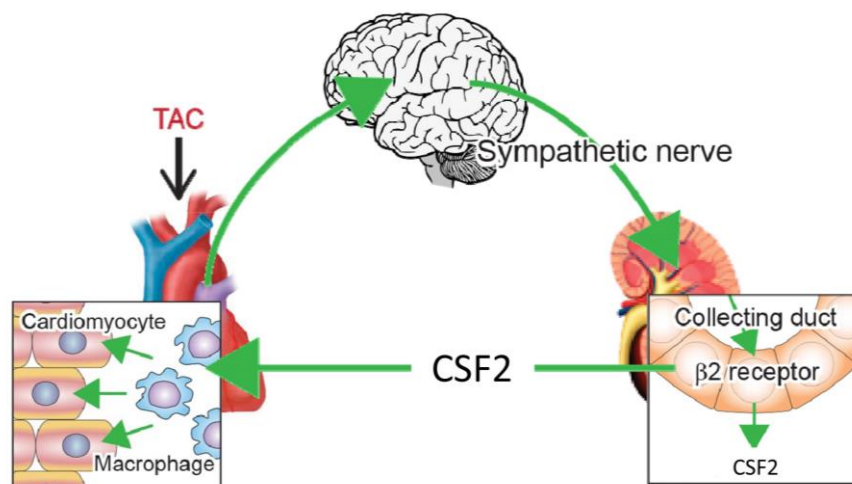


図2. 心臓への圧負荷刺激 (TAC)は迷走神経求心路・C繊維の両者を介して脳に伝達し、交感神経遠心路を介して腎臓集合管上皮細胞を活性化し、腎臓血管内皮細胞からCSF2が分泌される。CSF2は心臓マクロファージを増加・活性化させる。

すなわち、心臓に圧負荷が生じた際に、迷走神経求心路と痛覚神経の 2 系統を経由したシグナルが脳に入り、脳から腎臓へ交感神経遠心路を介して腎臓にシグナルが入る。交感神経末端からのノルエピネフリンによって、腎臓では集合管上皮細胞において交感神経  $\beta 2$  受容体を介し、転写因子 KLF5(Krüppel like factor 5)の活性化とその下流因子である S100A8/S100A9 が転写される。S100A8/S100A9 は分泌蛋白であり、腎臓内に分泌され腎臓の組織マクロファージを活性化させる。活性化した腎臓組織マクロファージは TNF(Tumor necrosis factor)を分泌し、TNF は腎臓血管内皮細胞から CSF2(Colony stimulating factor 2)を分泌させる(図3)。

血中に増加した CSF2 は心臓マクロファージを活性化させていることを見出した。この心臓マクロファージの活性化とは、心臓マクロファージの数の増加とマクロファージの中では心臓マクロファージのみ発現しているアンフィレグリン(AREG: Amphiregulin)の発現増加である。アンフィレグリンは心臓の中では心臓マクロファージにのみ発現しており、またマクロファージの中でも心臓マクロファージに特異的に発現している(図4)。アンフィレグリンは心筋細胞を肥大させるのに十分な分泌蛋白であった。心臓への圧負荷ストレス時に臓器間連携を介した心臓マクロファージの活性化が生じ、圧負荷に対するストレス応答が生じ、心臓の恒常性が維持されていることが明らかになった。この複雑で長い系のいずれかを欠損させ心臓マクロファージが活性化できなくなったり、アンフィレグリンが分泌されても中和抗体によってブロックしたりすると、圧負荷時に心機能が低下し心不全死した。すなわち、心臓への圧負荷を乗り越え心機能を保持するための生理的な恒常性維持機構に、心臓マクロファージの活性化機構が必須であることを示している。

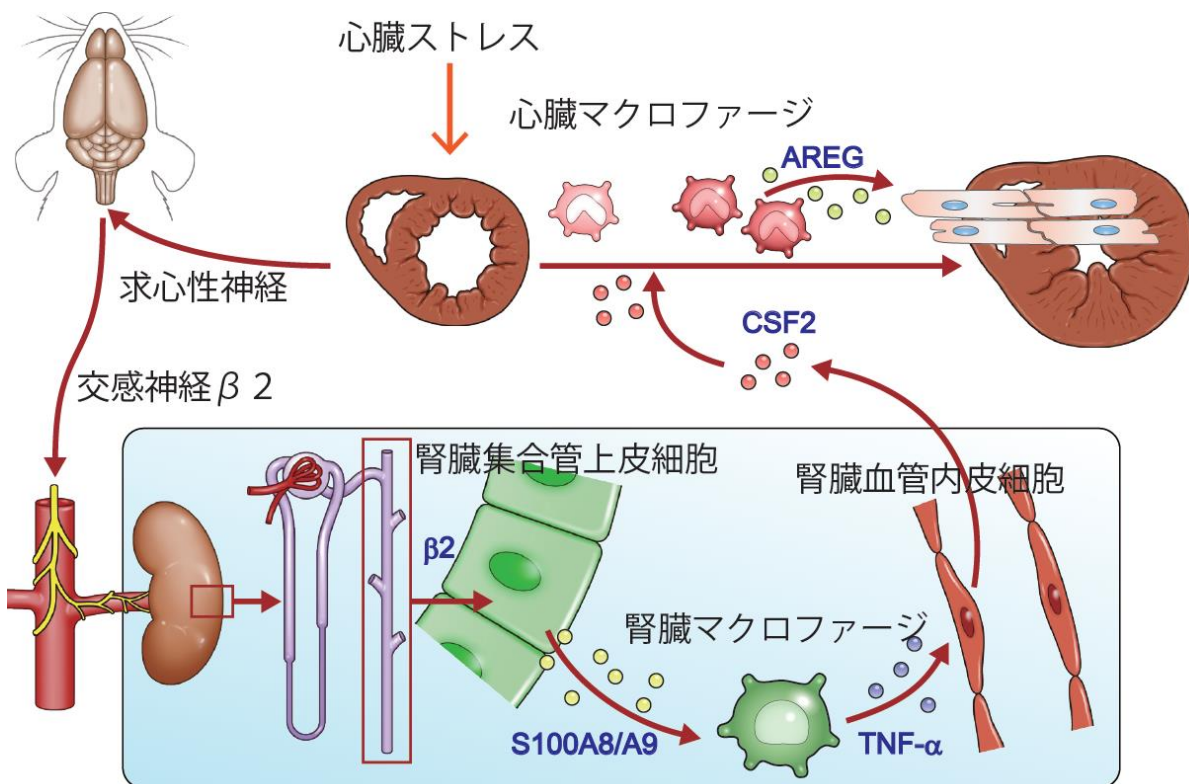


図3 心臓・脳・腎臓連関による心臓マクロファージ活性化機構

心臓への圧負荷によって、脳・腎臓との臓器間連携によって心臓の組織マクロファージが活性化され、アンフィレグリンが心臓マクロファージから分泌され、心筋細胞に代償性肥大を惹起し、圧負荷に対してストレス応答をする。このストレス応答機構によって圧負荷時での心機能が保持される

### 今後の課題

今回、心臓マクロファージが心機能を維持するための恒常性維持機構に必須であることを同定し、その鍵物質も同時に同定することができた。このことは、心臓の中で、心臓マクロファージも今後治療の標的となり得ることを示唆する。しかし、現時点では、心臓マクロファージの劣化などにより生じる疾患が同定されていないため、今後、そのような心不全が存在しているのかといった点を明らかにしていくことが必要である。さらに、ヒトの心不全では心臓マクロファージが増加していることは古くから知られているが、ヒトにおいて心臓マクロファージはどのような働きをしているのか？さらに、心不全で増加する意義は？などほとんどの点が不明であり、今後の課題となる。さらに、今回同定した心臓・脳・腎臓のネットワークがどのような状態で破綻するのか？人でも存在しているのか？など全く現時点では未知である。特に

cardiorenal syndrome といわれる腎臓が悪くなった際に心疾患が増えることがこの系を介しているのか？そうであればCSF2や AREG を補うことで解決できるのか？など今後明らかにしなければならない課題が山積みである。さらに、今回同定したネットワークには脳が入っているが、脳に何らかの変化が生じた際に、このネットワークに影響を与えるのか？心不全と痴呆が関係しているという臨床的のバックグラウンドがあるが、それはこの系を介しているのか？など脳

の心不全における変化については全く知見がなく、今後解析しなければならない。また、もしそのような変化があれば、新しい診断治療の標的になり得ると思われる。

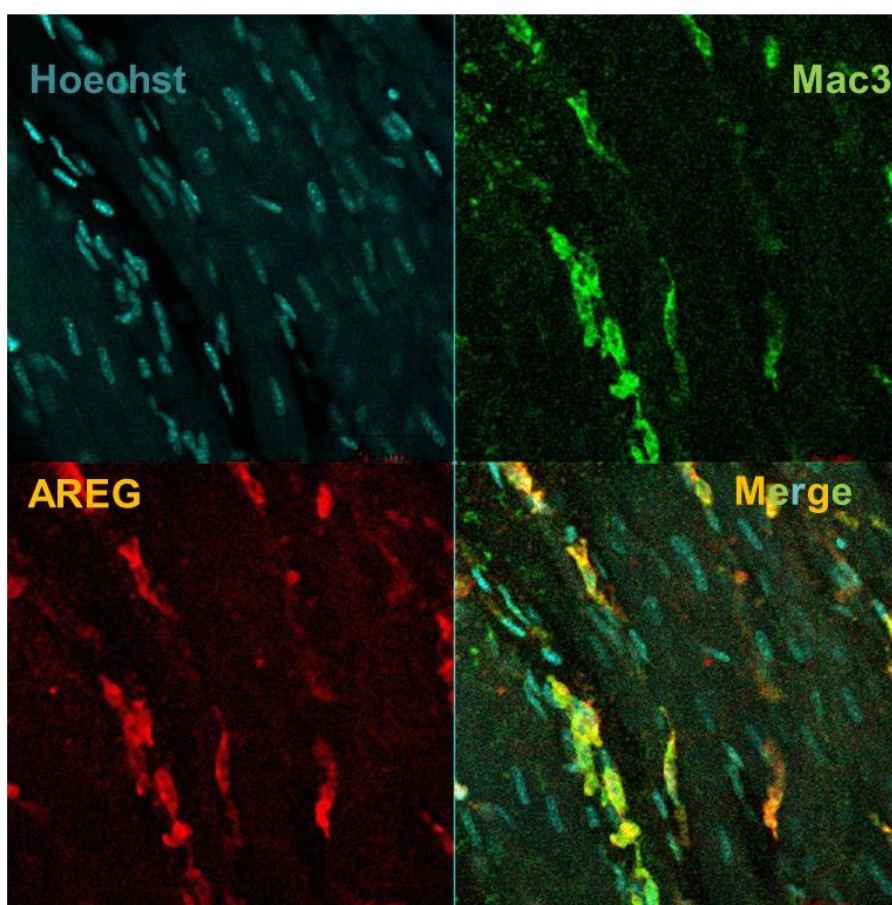


図4. 心臓の中では、心臓マクロファージだけがAREGを発現している。さらに、マクロファージの中では心臓のマクロファージにAREGは特異的に発現している。AREGはEGFファミリーの分泌タンパクである。AREGはマクロファージの細胞膜にアンカーされており、ADAM17で shedding されて分泌される。

さらに、創薬の観点から考えると、アンフィレグリンやCSF2に対する介入に加えて、新しい心臓・脳・腎臓の三者のネットワークに対する創薬といった臓器間ネットワークに対する創薬なども考慮されるが、どのように展開するとそのような介入が可能かなど検討していくべき点であると考えられる。

**Banyu Foundation Research Grant 2015—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	東京大学医学部附属病院 循環器内科
氏 名	藤生 克仁

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。</li> <li>・ 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。</li> <li>・ 国内外雑誌を問わない。</li> <li>・ 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。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	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. <i>Nature Medicine</i> , 23:611-622, 2017
2	Tan X, <u>Fujiu K</u> , 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. <i>PLOS ONE</i> , 11:e0160985, 2016
3	Ogata F, <u>Fujiu K</u> , Matsumoto S, Nakayama Y, Shibata M, Oike Y, Koshima I, Watabe T, Nagai R, Manabe I: Excess lymphangiogenesis cooperatively induced by macrophages and cd4+ t cells drives the pathogenesis of lymphedema. <i>Journal of Investigative Dermatology</i> , 136:706-714, 2016
4	Tan X, <u>Fujiu K</u> , Manabe I, Nishida J, Yamagishi R, Nagai R, Yanagi Y: Choroidal neovascularization is inhibited via an intraocular decrease of inflammatory cells in mice lacking complement component c3. <i>Scientific Reports</i> , 5:15702, 2015
5	Ogata F, <u>Fujiu K</u> , Koshima I, Nagai R, Manabe I: Phenotypic modulation of smooth muscle cells in lymphoedema. <i>British Journal of Dermatology</i> , 172:1286-1293, 2015
② <論文 PDF 添付なし>	
1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 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。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2018/1	<u>Fujiu K</u> , Cardiac Macrophages Contribute to Heart Failure and Arrhythmia, The 1st JCS Council Forum on Basic Cardio Vascular Research, 2018/1/7, Tokyo, ( <u>invited speaker</u> )
2	2018/1	藤生克仁、組織マクロファージの活性化を介した心臓恒常性維持機構、第 6 回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research)、( <u>invited speaker</u> )
3	2017/10	藤生克仁、心臓マクロファージを標的とした新規心不全治療標的検索、第 21 回日本心不全学会学術集会、2017/10/14, 秋田、( <u>invited speaker</u> )
4	2017/9	<u>Fujiu K</u> , Cardiac Macrophage is a Novel Target of Regenerative Medicine on Arrhythmia, Regenerative Medicine and Arrhythmias, The joint meeting of the 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHRs 2017) and the 64th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society (JHRS2017), 2017/9/16, Yokohama, Japan,
5	2017/5	<u>Fujiu K</u> , Manabe I, Komuro I, Cardiac Macrophage is Required to Avoid Heart Failure and Cardiac Sudden Death after Pressure Overload, Keystone Symposia Conference: Mitochondria, Metabolism and Heart, 2017/5/12, Santa Fe, USA,
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		