

第7回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 – 研究成果報告書（追加助成） <概要>

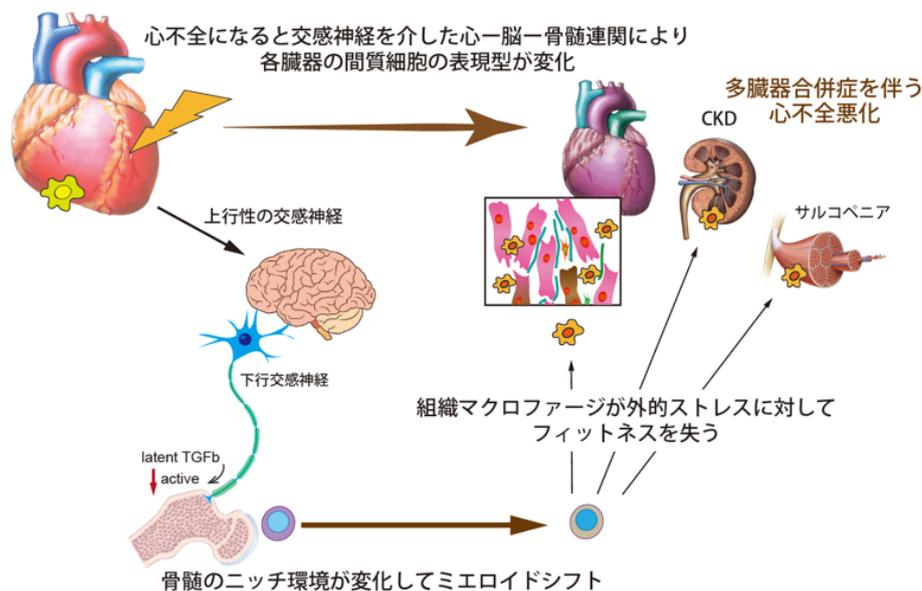
所 属	東京大学医学部 循環器内科
氏 名	中山 幸輝
研究テーマ	新たな心機能制御要素としての心臓マクロファージの機能解析

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）

先進国では高齢化に伴って心不全の罹患率はますます増加している。高齢者心不全は、多くの他臓器疾患を合併し、入退院を繰り返すため予後は不良である。外的ストレスに対する認容性が、加齢や一度心不全に罹患すると失われる。これまで、多くの神経内分泌物質を対象とした治療が収縮障害型心不全の予後を改善してきたが、拡張障害を主体とする心不全の予後を改善する治療はまだない。古くより、血液中に心臓の老化物質、抗加齢物質があることが動物実験的に示唆されているが、同定された血清蛋白質はない。我々はこれまで、心臓間質に常在するマクロファージが、細胞特異的にアンフィレギュリンを分泌して心保護的に作用することを報告した。老化や心不全といった病的状態において、心臓マクロファージが心保護効果の可塑性を失うことが、心機能低下の病態生理において重要と考えた。その機序を解明し、新たな治療標的や臨床マーカーを同定することを目的とした。高齢化に伴って心不全の罹患率は増加しているが、高齢者心不全は多臓器疾患を合併し、心不全入院を繰り返すため予後不良である。

心不全を起こしたマウスの骨髄を移植したところ、慢性期に心機能が低下し、心臓間質が線維化した。このことから、心不全を起こすと、造血幹細胞（HSC）レベルで記憶され、病態形成の一因となることが分かった。そこで、心不全時の HSC を解析すると、発症後から持続的に増殖シグナルが入ってエピゲノムが変化していることが示唆された。そこで、心不全時のマウス HSC の 1 細胞 RNA シーケンス、ATAC シーケンスによる網羅的解析を行ったところ、HSC レベルで TGFβシグナルが抑制されることが分かった。実際に骨髄ニッチ内で活性型 TGFβの量が減少しており、HSC のエピゲノム変化の原因の一つであると見出した。活性型 TGFβは HSC の未分化維持に重要な役割を担っており、交感神経周囲のシュワン細胞がその活性化を制御していることが報告されている。心不全において交感神経活動が長期的に賦活化されることが知られており、骨髄内でも慢性的な活性化による構造的リモデリングが起きていていると考えられた。

さらに、心不全 HSC を移植すると、慢性腎臓病モデル、骨格筋再生モデルにおいても増悪する表現型を示した。つまり、心不全になると交感神経を介して HSC のエピゲノムが変容し、組織マクロファージの表現型が変化することが、全身性の慢性炎症疾患の病態基盤になりうることを見出した。



第7回万有医学奨励賞 – 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 循環器内科
氏 名	中山 幸輝
研究テーマ	新たな心機能制御要素としての心臓マクロファージの機能解析

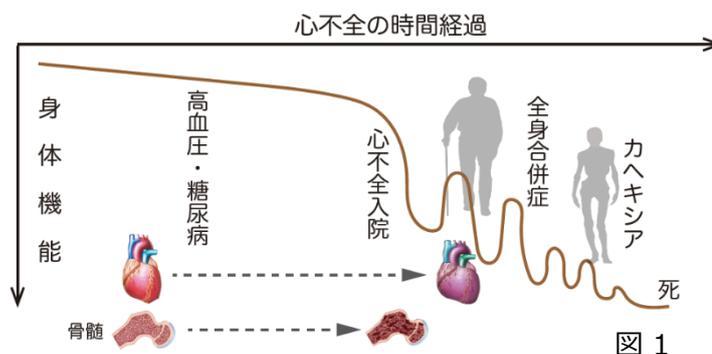
研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【研究目的】

高齢化に伴って心不全の罹患率は増加し、医療経済を逼迫させている。その特徴は、一度心不全を発症し入院すると、入退院を繰り返し、最終的には心不全悪液質の状態となることである（図 1）。いくつかの神経内分泌物質を対象とした薬物治療、冠動脈ステント術やバイパス術などの手術、植込みデバイス治療が収縮障害型心不全の予後を改善するが、特に高齢者に多い拡張障害を主体とする心不全の治療法はなく、その病態すら分かっていない。したがって、現在、心不全の予後は不良である。

下図で示したように、一度心不全を発症すると、その後、心不全全身合併症である腎不全やフレイルの進展や、悪液質に至る一連の病態生理はよく分かっていない。低心機能患者では、一度心不全を発症すると、死亡率は 8 倍、再入院確率は 9 倍に急激に上昇する。すなわち、臨床的に心不全で初回入院をしてしまうことがその後の予後に大きな爪痕を残すことが知られている。

我々はこれまで、マウス心臓に常在するマクロファージが、アンフィレギュリン（AREG）を分泌して心保護的に作用することを報告した（Nat Med 2017）。また、マクロファージが保護的に働くか、炎症惹起性に働くかは、細胞内代謝変化を介した細胞自律的なコントロールによって行われることを明らかにしてきた（PNAS 2020）。一方で、心臓保護的なマクロファージの保護的な働きは、細胞自律的な要素だけでなく、心臓・脳・腎臓の臓器間連携によっても制御されていることを見出してきた（Nat Med 2017）。老化や心不全といった病的状態において、心臓マクロファージが心保護効果の可塑性を失うことが、心機能低下の病態生理において重要と考えた。その機序を解明し、新たな治療標的や臨床マーカーを同定することを目的とした。



【研究方法、結果】

老化マウスの骨髄を移植すると、慢性期に心臓間質が線維化し、収縮能が低下した。老化骨髄移植後の心臓マクロファージの表現型を解析すると、若年骨髄移植後と比較して炎症性マクロファージの割合が高かった。心臓マクロファージの細胞起源は、出生時は胎児肝単球由来であるが、加齢や心不全になると骨髄造血幹細胞(HSC)由来単球から分化する。組織マクロファージはその微小環境で組織特異性を獲得するが、細胞起源の相違が組織マクロファージの機能に与える影響は分かっていない。HSC 老化が内因的にマクロファージ分化に与える影響を解析するため、若年マウスと老化マウスの HSC を競合的に移植したところ、同じ個体の中でも老化 HSC 由来の心臓マクロファージは細胞数も遺伝子発現も心臓保護的マクロファージへの分化が抑制されていた。つまり HSC 老化が、単球から心臓マクロファージへの分化において抑制的作用を与えることが分かった。

同様に、心不全自体が HSC の表現型に影響を与えるか解析した。心不全マウスでも、野生型マウスの骨

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

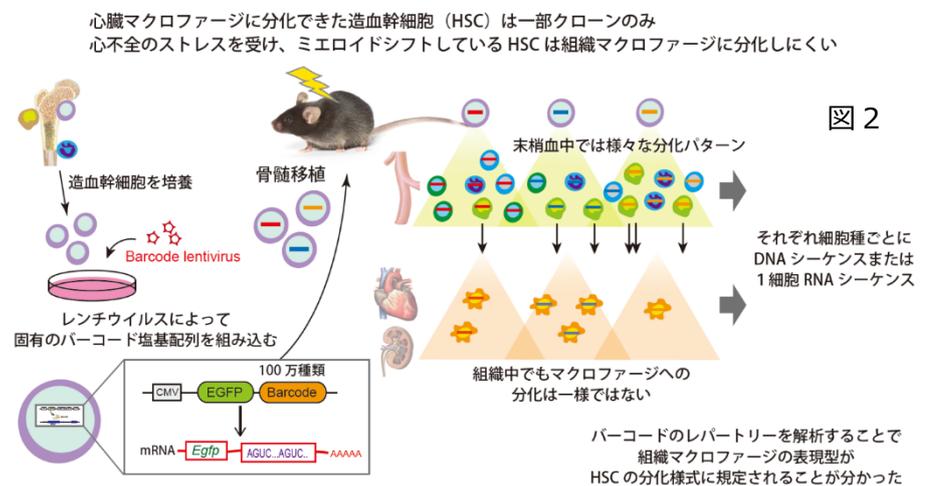
髄と競合的に移植したところ、心不全マウス由来の HSC が末梢血ではリンパ球系よりも骨髄球系に分化しやすくなる一方で、心臓保護的マクロファージへの分化がしにくいことが分かった。つまり、心不全状態での HSC の変化も心保護的マクロファージへの分化を抑制させ、より心不全が悪化する原因になりうると考えられた。

続いて、心不全になることで HSC にどのようなシグナルが入って表現型が変わるのかを解析した。個体の中でも HSC の分化様式は一樣ではないことが近年報告されているため、心不全マウスと野生型の骨髄中の造血幹細胞の一細胞発現解析を行った。心不全によって TGFβパスウェイに関わる遺伝子群の発現が抑制されていた。さらに、心不全後の HSC についてエピゲノム解析を行うと、リンパ球分化に関わる遺伝子群の近傍でクロマチンが閉じることが分かり、その領域のモチーフ解析では、リンパ球分化の主要転写因子の一つ GATA3 や、TGFβ パスウェイの Smad3 が有意に見られた。これらのことから、心不全になると、HSC において TGFβシグナルの抑制が起きていると考えられた。実際に、骨髄抽出蛋白の ELISA で活性型 TGFβの発現が心不全後に低下していることも確認した。骨髄中の交感神経周囲のシュワン細胞は、TGFβ1 を活性化することで HSC の未分化性を維持させていると報告されている。心不全状態が続くことで骨髄ニッチにリモデリングが起きて、TGFβの活性化が抑制されて HSC の未分化維持が変容し、単球から臓器マクロファージへの分化が影響を受けると考えられた。そこで、TGFβ阻害薬 (LY364947) を前投与したドナーから骨髄移植したマウスの表現型を解析した。移植後に心不全モデルを作成すると、Vehicle を前投与したドナー由来のレシピエントマウスに対して、心機能低下を認めた。これらのことから、HSC に対する TGFβシグナルの抑制は臓器保護的な組織マクロファージへの分化阻害によって、恒常性維持に破綻を生じさせることが分かった。

さらに、心不全後の HSC のエピゲノム変化は、心臓以外の臓器の組織マクロファージの表現型も変えうると考えられた。心不全骨髄を移植後の腎臓マクロファージの表現型は炎症型マクロファージの割合が増加した。慢性腎臓病モデルやサルコペニアモデルを作成すると、野生型マウスの骨髄移植後と比較して表現型が増悪することが分かった。つまり、心不全になると脳、交感神経、骨髄造血幹細胞、組織マクロファージの表現型の変化を介して全身性の慢性炎症疾患が増悪すると考えられた。

最後に、HSC にレンチウイルス感染によって DNA バーコードをゲノムに組み込み、移植後のマウスの末梢血、各臓器マクロファージのバーコードのレポトリーを解析することで、HSC 単クローンごとに分化様式を解析することができた。これにより、末梢血単球と組織マクロファージのバーコードレポトリーの相関性は必ずしも高くないことが分かり、単球が組織マクロファージへ様に分化するわけではないことが分かった (図 2)。このことは、組織マクロファージに分化しやすい HSC クローンとそうではないクローンが存在することを示し、老化や心不全の際に増える、ミエロイド

シフトしやすい HSC クローンは組織マクロファージに分化しにくい表現型を持つことを示した。これにより、心不全モデルの HSC で見られる分化様式の変化は HSC 内因的に本来備わった性質であり、心不全によってクローンの選択性が生まれることが、本質であると分かった。



研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【考察】

これまで心不全の治療標的としては神経体液因子を中心に長年研究がされてきたが、依然有効な治療のない拡張不全型心不全、高齢者心不全に対しては新たな治療基盤が必要と考えられた。さらに、高齢者心不全では多臓器合併症を伴うことでより予後を悪くしているが、個々の臓器の加齢性の機能低下が原因と考えられている。本研究によって、心不全になると、視床下部、骨髄内の交感神経支配のリモデリングに伴うニッチの変化が起きることによって、HSC のエピゲノムが変化し、多臓器にわたって常在する組織マクロファージの機能障害を起こすことが分かった。つまり、病因になりうる HSC を同定し、改善することが出来れば、これまで加齢として説明された合併症の一部が臓器横断的に治療することが出来ると考えられた。また、心不全骨髄特異的な単球の表現型の同定は、ヒトの心不全の予後予測や前臨床的評価としても有用と考えられた。

近年の研究により、組織マクロファージは胎児期から臓器の特異性に合わせた機能を持つように分化することが分かってきた。我々はこれまでに、心臓マクロファージが AREG を介して心筋細胞の代謝や伝導機能に重要な役割を担うという組織特異的な作用を見出した。心不全や加齢といった様々な外的ストレスに対しても、恒常性を維持するための特異的な役割を担っていると考えられる。一方で、組織マクロファージの細胞起源や細胞特異性に関する解析がされるようになったが、心臓マクロファージに関して微小環境に存在するリガンドとなる物質や、それに伴う細胞内シグナルは分かっておらず、細胞分化の分子機構は未知である。加齢やストレスによって心臓マクロファージの細胞起源は、胎児肝由来単球から HSC 由来単球に変遷することが報告されているが、これに伴う心臓マクロファージエピゲノムの変化についても解析されていない。このことは、他臓器においてもあまり分かっていない。老化による造血異常や造血幹細胞の不均質性については近年注目を集めているが、本研究提案の中核をなす末梢臓器の組織再構築に HSC のエピゲノム変化が関与するという視点は新規性が高い。造血幹細胞のエピゲノムを変動させる骨髄の変化には神経系の関与も考えられ、心臓、脳、造血幹細胞という新たな臓器連関を示す事で、その様々な臓器の組織再構築の解明への発展も期待される。

第7回万有医学奨励賞 – 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 循環器内科
氏 名	中山 幸輝

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 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	<u>Nakayama Y, Fujiu K, Yuki R, Oishi Y, Morioka MS, Isagawa T, Matsuda J, Oshima T, Matsubara T, Sugita J, Kudo F, Kaneda A, Endo Y, Nakayama T, Nagai R, Komuro I, Manabe I.</u> A long noncoding RNA regulates inflammation resolution by mouse macrophages through fatty acid oxidation activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jun 23;117(25):14365-14375. doi: 10.1073/pnas.2005924117 査読あり
2	<u>Nakayama Y, Fujiu K.</u> Effects of Adipocyte Expansion on Cardiovascular System and Ongoing Debate over Obesity Paradox. Int Heart J. 2019;60(3):499-502. doi: 10.1536/ihj.19-140. 査読あり
3	<u>Nakayama Y, Fujiu K.</u> Maladaptive Alterations of Autonomic Nerve System in Cardiovascular Disorders. Int Heart J. 2019;60(1):4-6. doi: 10.1536/ihj.18-677. 査読あり
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	2020 年 12 月	第 43 回日本分子生物学会年会 Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Issei Komuro Heart failure induces systemic vulnerability via alteration of hematopoietic stem cells
2		
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	2021 年 3 月	第 85 回日本循環器学会学術集会 Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Issei Komuro Heart failure induces systemic vulnerability via alteration of hematopoietic stem cells
2	2021 年 3 月	第 37 回 ISHR 日本部会総会 Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Issei Komuro Heart failure induces systemic vulnerability via alteration of hematopoietic stem cells
3	投稿中	Heart failure promotes multimorbidity through hematopoietic stem cells Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Tsukasa Oshima, Jun Matsuda, Junichi Sugita, Takumi Matsubara, Liu Yuxiang, Yujin Maru, Eriko Hasumi, Toshiya Kojima, Soh Ishiguro, Nozomu Yachie, Satoshi Yamazaki, Ryo Yamamoto, Fujimi Kudo, Mio Nakanishi, Atsushi Kaneda, Ryozo Nagai, Ichiro Manabe, Issei Komuro
4		