

論文の内容の要旨

論文題目 心臓マクロファージの分化機構の解析

氏名 松原 巧

組織マクロファージは生体内で最も多い抗原提示細胞で、定常状態で各々の臓器にマクロファージが分布しており、免疫や組織修復や恒常性維持に関わっている。組織マクロファージは胎生期の卵黄嚢と胎児肝に由来しており、成体では骨髄由来の単球が組織へ入った後にマクロファージへと分化する。組織マクロファージには大きく分けて M1 と M2 の 2 つのサブタイプがあり、M1 は炎症性マクロファージ、M2 は組織修復や恒常性維持に関与していると考えられている。定常状態の臓器では M2 マクロファージが優位に存在し、恒常性維持に関わっているが、感染や組織障害などの炎症が生じた場合は M1 マクロファージが増加し障害組織の貪食、除去を行う。この組織マクロファージの分化には特定の微小環境因子と転写因子が必要と考えられている。マクロファージの分化に共通している転写因子として PU.1 が同定されており、PU.1 はマクロファージに分化するための遺伝子群のクロマチン構造を開き、組織マクロファージへの分化誘導に必須の特異的転写因子と共に作用する。微小環境因子と転写因子の関係については腹

腔マクロファージのレチノイン酸と *Gata6*、脾臓マクロファージの中でも赤脾髄マクロファージのヘム鉄と *Spi-C* が報告されている。

心臓マクロファージは固有心筋細胞間や房室結節内に存在し、定常状態では心筋細胞とギャップ結合を形成し、心筋細胞間の伝導を調整している。発生段階においても心臓マクロファージが必須とされ、yolk sac 由来の心臓マクロファージのうち C-C chemokine receptor 2 陰性の population によって冠動脈形成が起こる。またマウス心筋梗塞モデルでは心臓マクロファージは増加し、壊死心筋の貪食や組織修復に関与している。

心臓マクロファージの分化に必須の環境因子及び遺伝子は同定されていない。本研究では心臓マクロファージ特異的に発現している遺伝子に着目し、心臓マクロファージの分化に必須の環境因子と遺伝子を同定することを目的とした。肺、肝臓、脾臓、腎臓、脳の組織マクロファージと心臓マクロファージの RNA シーケンスから、タンパク質○○が心臓マクロファージ特異的に発現していることを明らかにした。Clodronate liposome を投与し全身の組織マクロファージを除去した状態のマウスに大動脈横行結紮(TAC)を行い心臓に圧負荷をかけると心機能が低下し心不全を発症し死亡した。タンパク質○○中和抗体を投与したマウスでは TAC によって心機能が低下し心不全を発症し死亡した。遺伝子○○ノックアウトマウスの骨髄を移植したマウスは定常状態では野生型マウスの骨髄を移植したマウスと比較しても心機能や生存率は低下しな

いが、TACを行うと心機能は著明に低下し、心不全を発症して死亡する。タンパク質〇〇は圧負荷心不全モデルマウスにおいて心不全代償に必要であると考えられ、組織マクロファージの中でも心臓マクロファージ特異的に発現していることから、遺伝子〇〇は心臓マクロファージの機能的分化マーカーと考えられた。

本研究では遺伝子〇〇を分化マーカーとして、心臓マクロファージへの分化に必要な因子について検討した。心臓組織の液性因子として臓器△△から分泌される物質〇△と物質〇×に着目した。生体では骨髄由来の単球が臓器内で組織マクロファージへ分化するため、培養細胞は骨髄由来マクロファージ(BMDM)を使用した。臓器△△の関与についてBMDMに物質〇△を投与し遺伝子〇〇発現を確認したところ、遺伝子〇〇発現が物質〇△の投与で確認された。RNAシーケンスからマクロファージに発現している物質〇△の受容体はタンパク質□□であることを同定した。遺伝子□□ノックアウトマウスをドナー、C57BL6/J野生型マウスをレシピエントとして骨髄移植を行い心臓マクロファージにおける遺伝子□□の役割を解析したところ、レシピエントマウスの心臓マクロファージの遺伝子〇〇発現が減少することを確認し、遺伝子□□が遺伝子〇〇発現に必要であることを明らかとした。

物質□×の関与について骨髄由来マクロファージに物質×を投与し遺伝子〇〇発現を確認したところ、用量依存性に遺伝子〇〇の発現が誘導された。RNAシーケンスから物質□×受容体

で心臓マクロファージに発現しているものについて検討し siRNA によるノックダウンでスクリーニングしたところ、遺伝子〇〇のノックダウンで骨髄由来マクロファージに置いて物質×による遺伝子〇〇の発現が低下した。*in vivo* での検証は遺伝子〇〇をノックアウトするレンチウイルスを感染させた遺伝子〇〇ノックアウトマウスの造血幹細胞を C57 BL6/J 野生型マウスに骨髄移植し、レシピエントマウスの心臓マクロファージ分画の変化と遺伝子〇〇発現について検討した。遺伝子〇〇と遺伝子〇〇をダブルノックアウトした心臓マクロファージでは遺伝子〇〇発現が減少することを確認した。

心臓マクロファージは心臓の恒常性維持に必要であり、その機能低下は心不全を発症させる。今回、新規に同定したタンパク質〇〇、タンパク質〇〇を介した心臓マクロファージの分化機構は心臓の恒常性維持、心不全発症機序の解明の基盤になる。