

審査の結果の要旨

氏名 松原 巧

本研究は近年増加傾向にある心不全と組織マクロファージの一つである心臓マクロファージの関連について検討している。心不全における心臓マクロファージの役割について、本研究では心臓マクロファージの機能的分化マーカーの同定と、その機能的分化マーカー発現に必須の環境因子および遺伝子を同定することを目的としており、下記の結果を得ている。

1. 大動脈横行結紮(TAC)による圧負荷心不全モデルを作成し、心不全における心臓マクロファージの機能解析を行った。Clodronate liposome の全身投与で心臓マクロファージを除去したマウスに TAC を行い心不全状態にしたところ、心臓マクロファージ非存在下ではマウスは心不全を代償できず死亡することが確認され、心不全の代償に心臓マクロファージが必須であることが明らかとなった。
2. この心臓マクロファージの機能発現に必要な遺伝子について、網羅的遺伝子解析で検討したところ、遺伝子〇〇が組織マクロファージの中では心臓マクロファージに特異的に発現していることを同定した。Clodronate liposome を投与した TAC マウスにタンパク質〇〇補充療法を行うことで心不全による死亡を抑制することが示され、TAC を行ったマウスに抗タンパク質〇〇抗体を投与しタンパク質〇〇を中和したところ心不全が代償できず clodronate liposome を投与した TAC マウス同様に心不全によってマウスは死亡した。これにより心臓マクロファージ特異的に発現している遺伝子〇〇が心臓マクロファージの機能発現に必要である、即ち遺伝子〇〇が心臓マクロファージの機能的分化マーカーであることが明らかとなった。
3. 遺伝子〇〇発現に必要な環境因子について、通常遺伝子〇〇が発現していない野生型マウス由来の骨髄由来マクロファージ(BMDM)を用いた実験で検証した。心臓組織の微小環境因子について検討し、心筋細胞との共培養、物質□×の投与、物質〇△の投与を行った。このうち物質□×の投与と物質〇△の投与によって遺伝子〇〇が BMDM で発現することを確認した。
4. 物質□×による遺伝子〇〇発現について、網羅的遺伝子解析の結果から心臓マクロファージと BMDM の両者に発現している物質□×受容体遺伝子を挙げ、これらについて BMDM で siRNA を用いた遺伝子ノックダウンによるスクリーニングを行ったところ、遺伝子〇〇をノックダウンした BMDM で物質□×による遺伝子〇〇発現が低下した。

5. 物質○△による遺伝子○○発現について、物質○△が作用しているマクロファージ上の物質○△受容体について検討した。網羅的遺伝子解析では心臓マクロファージおよび BMDM には□□受容体のみ発現していた。□□受容体遺伝子である遺伝子□□をノックアウトしたマウスの BMDM を用いて物質○△投与による遺伝子○○発現を確認したところ、遺伝子□□ノックアウトマウスの BMDM では遺伝子○○の発現は認められなかった。
6. 遺伝子□□ノックアウトマウスの骨髄を 9Gy の X 線照射を行った野生型マウスに移植し、心臓マクロファージにおける遺伝子□□の役割を *in vivo* で検証した。移植後 4 週間経過したところで fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて心臓マクロファージを心臓から採取し、この心臓マクロファージの RNA 解析を行ったところ、遺伝子□□ノックアウトマウスの骨髄細胞を移植した野生型マウスの心臓マクロファージでは遺伝子○○の発現が半減していた。*in vivo* で遺伝子□□が心臓マクロファージの遺伝子○○発現に関与していることが明らかとなった。
7. 遺伝子○□による遺伝子○○発現について *in vivo* で検証するため、レンチウイルスを感染させた造血幹細胞を用いた骨髄移植を行った。遺伝子□□ノックアウトマウスの骨髄から採取した造血幹細胞に遺伝子○□をノックアウトするレンチウイルスを感染させ、遺伝子○□と遺伝子□□がダブルノックアウトになった状態の造血幹細胞を作製し、これを 9Gy の X 線照射を行った野生型に移植した。移植後 4 週間で心臓から心臓マクロファージを FACS にて採取した。レンチウイルスは遺伝子○□以外に既知の物質○×の受容体遺伝子である遺伝子△△、遺伝子××についても作製し、前述の通りに造血幹細胞に感染させ骨髄移植を行った。コントロールは遺伝子ノックアウトを行わないレンチウイルスを用いた。遺伝子△△、遺伝子××をノックアウトした造血幹細胞を移植した野生型マウスの心臓マクロファージでは遺伝子○○の発現は低下せず、遺伝子○□をノックアウトした造血幹細胞を移植した野生型マウスの心臓マクロファージでは遺伝子○○の発現が低下した。レンチウイルスによる遺伝子のノックアウト効率が確認できていない点は本実験の *limitation* ではあるが、*in vivo* でも遺伝子○□が遺伝子○○発現に必須である可能性が示された。

以上、本論文ではマウス心臓マクロファージの機能的分化マーカーが遺伝子○○であること、遺伝子○○発現に必須の環境因子が物質○×と物質○△であり、それらの受容体遺伝子がそれぞれ遺伝子○□と遺伝子□□であることを明らかにした。これまで未知であった心臓マクロファージの分化に必須の環境因子と遺伝子が明らかになったこと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と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。