

## 論文の内容の要旨

論文題目：心臓リモデリングにおけるマクロファージ低酸素シグナルの役割

The roles of macrophage hypoxic responses in cardiac remodeling

氏名：安部 元

心不全患者に対する治療はこの 20 年間で大きな進歩を遂げている。特に心臓収縮能が低下したことにより生じる心不全には心筋保護作用を有する薬剤により大幅に改善してきた。しかし、心不全には心臓収縮能低下を原因とするものに加えて、心線維化などにより心臓の拡張能が障害されることを原因とする病態（心臓拡張障害）が存在することが明らかになっている。心臓拡張障害は独立した生命予後増悪因子であるにも関わらず現在でも有効な治療法はなくその生命予後は現在に至るまでほとんど改善していない。心筋傷害後の心臓リモデリング過程では、心筋組織の低酸素環境と共に、炎症シグナルの活性化が引き起こされる事が知られている。炎症細胞浸潤および炎症シグナルの活性化は、ある場合には組織修復に、別の場合には臓器傷害性に働くと想定されているが、その詳細な機構は不明であった。炎症惹起型マクロファージ（M1）において Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ （HIF-1 $\alpha$ ）が、炎症抑制型マクロファージ（M2）において HIF-2 $\alpha$  が重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では心臓リモデリング過程において浸潤する炎症細胞の低酸素応答に注目することで、炎症シグナルの活性化が臓器リモデリングにおいて果たしている役割につき解析を行った。

まず始めに、圧負荷心肥大、心線維化モデルである横行大動脈縮窄手術を行い、心臓に集積する炎症細胞につきフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、心臓リモデリング過程において、CD11b, F4/80 陽性マクロファージが 2 相性(急性期 Day3, 慢性期 Day7) に心筋組織に浸潤することが分かった。興味深い事に急性期に浸潤するマクロファージは M1 が優位であるのに対し、慢性期に浸潤する細胞は M2 優位であった。また急性期に集積する M1 細胞は Pimonidazole 陽性であり、低酸素環境に集積していると考えられた。そこで M1 活性化に必要な HIF-1 $\alpha$  を骨髄球系細胞特異的に欠失したマウス (mHIF-1 $\alpha$  CKO) を作成し、大動脈縮窄術を施行したところ、mHIF-1 $\alpha$  CKO マウスでは急性期に心臓に集積する M1 が著明に減少するだけでなく、心重量の増大、心臓収縮能の低下、心臓線維化の増強など心機能の有意な増悪、さらには生存率の低下が確認された。以上より急性期に心臓に集積する M1 マクロファージが心筋保護的に作用していることが確認された。

M1 マクロファージが心臓に集積するメカニズムと急性期に心臓に集積した M1 マクロファージの機能についての 2 点が不明でありさらなる検討を加えることとした。心臓圧負荷手術後 3 日の病理所見を詳細に再度観察したところ、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で高度に傷害を受けた心筋細胞が認められた。これは心臓圧負荷手術後 7 日目には認

められない所見であった。しかし、一方で **mHIF-1 $\alpha$  CKO** マウスでは心臓圧負荷手術後 3 日目の病理所見では **Control** と同様であったが、術後 7 日目になっても障害を受けた心筋細胞が残っており、その部位の周囲にすでに心臓の線維化が亢進している様子が認められた。このことからマクロファージの **HIF-1 $\alpha$**  シグナルが障害された心筋の除去に必要であることが示唆された。

高度に傷害された心筋細胞のクリアランスの障害が起きていることから、2つの理由が考えられた。マクロファージの **HIF-1 $\alpha$**  シグナルが食欲能の低下に関係しているというもの、もうひとつが遊走能に関係しているというものである。まずは腹腔マクロファージとアポトーシスを起こした T 細胞を用いて **Phagocytosis assay** を行った。しかし、**Control** と **HIF-1 $\alpha$**  欠失マクロファージの間に食欲能の有意な差は認められなかった。次に遊走能をみるために腹腔マクロファージとラット新生児の心筋細胞を用いて **Migration Assay** を行った。そこでマクロファージが死細胞へと遊走するという、そしてそれは **HIF-1 $\alpha$**  依存的に行われるということが判明した。以上から、**M1** マクロファージが **HIF-1 $\alpha$**  依存的に傷害された心筋細胞を除去するために遊走していることが示唆された。

**Control** と **mHIF-1 $\alpha$  CKO** マウスにおいて、心臓線維化に有意な差が認められた。そして **Myofibroblast** のマーカーである  **$\alpha$  SMA** 染色において **mHIF-1 $\alpha$  CKO** マウスで優位に  **$\alpha$  SMA** 陽性細胞が集積していることが判明した。このことから、食欲を起こしたマクロファージが **HIF-1 $\alpha$**  依存的に心保護因子を分泌している可能性が考えられ、この点について解析を行うこととした。レジデントマクロファージと心臓圧負荷手術後 3 日に心臓に集積する **M1** マクロファージを採取し、**RNA** シーケンスを施行した。このデータと **Control** と **HIF-1 $\alpha$**  ノックアウトされた腹腔マクロファージの低酸素刺激に対する **RNA** シーケンスのデータから、**M1** マクロファージより分泌される心保護因子の候補を現在検索中である。

本研究では心臓マクロファージにおいて **HIF-1 $\alpha$**  が介在する役割に着目することにより、心臓の **M1** マクロファージが心臓リモデリング過程において心筋保護的に働くこと、そして心臓圧負荷後 **M1** マクロファージが心筋組織の低酸素領域に浸潤し、その機能に **Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$**  (**HIF-1 $\alpha$** ) が必須であることを明らかにした。今後は心臓リモデリングにおいて炎症プロセスが果たす機能の解明を行うために、さらなる **M1** マクロファージの分泌する **HIF-1 $\alpha$**  依存的な心保護因子の探索を続けていく。そうすることで今のところ治療法のない心臓線維化の改善に対する治療への新たな方法の開発につなげていきたいと考えている。