

## オステオポンチン産生マクロファージを標的とした心不全治療法の開発

白川公亮

順天堂大学医学部 循環器内科

### 【研究の背景】

心不全は我が国の主要な死因であり、5 年生存率は 50%に満たず、進行癌と同様に極めて予後不良な病態である。心不全を克服するには、心臓に様々なストレスが加わった場合の破綻メカニズムの解明が必要である。私は以前、オステオポンチン(OPN)が心筋梗塞後の組織修復時に、死細胞のクリアランスと菲薄化した梗塞巣の線維化の両方を促進するために不可欠な役割を果たし、心筋梗塞後梗塞巣特異的に増加する Galectin-3<sup>hi</sup>CD206<sup>+</sup>マクロファージが心臓における OPN の主な供給源であることを報告した<sup>1)</sup>。心筋梗塞後の心臓マクロファージにおける *Spp1*(OPN をコードする遺伝子)転写活性化には、IL(インターロイキン)-10-STAT3-Galectin-3 経路の活性化が必須であるが、OPN 産生マクロファージの詳細な分化機序は明らかではない。

### 【目 的】

OPN 産生マクロファージの機能成熟に関わるより詳細なメカニズムを解明することを目的とする。また、OPN 産生マクロファージの分化成熟に介入することで心筋梗塞後の創傷治癒促進を標的とした新規心不全治療の開発を目的とした。

### 【方 法】

8 から 10 週齢の EGFP-*Spp1* ノックイン(KI)レポーターマウス、*Spp1* ノックアウト(KO)マウス、*Lgals3* KO マウス、C57BL/6 (B6)マウス、*Il10* KO マウス及び *Il10* KO/EGFP-*Spp1* KI レポーターマウスに左前下行枝結紮による心筋梗塞を作製した。心筋梗塞後 3 日目梗塞巣の CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>マクロファージをフローサイトメトリーで解析した。心筋梗塞後に Stattic (STAT3 阻害剤) (20 mg/kg)、抗 IL-10 抗体(JES5-2A5) (200  $\mu$ g)、抗 M-CSF(マクロファージコロニー刺激因子)抗体 (5A1) (200  $\mu$ g) を心筋梗塞作成 1 日前から心筋梗塞作成 3 日目まで腹腔内投与した。また、心筋梗塞作製直後から 3 日目まで 10 ng の recombinant M-CSF (rM-CSF) を腹腔内投与した。各々、心筋梗塞後 3 日目の梗塞巣マクロファージをフローサイトメトリーで解析した。各マウスの骨髄細胞由来 CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞を、rIL-10 (10 ng/mL)、rIL-4 (10 ng/mL) 及び rM-CSF (10 ng/mL) で刺激し、各々 10  $\mu$ M Stattic、100 pM Colivelin (STAT3 活性化剤)、5  $\mu$ M SCH772984 (ERK1/2 阻害剤) を付加した。また、*siLgals3* 及び *siMertk* を用いてノックダウンを実施した。培養後のマクロファージをフローサイトメトリーで解析した。

### 【結 果】

心筋梗塞後の心臓では、*Spp1* 転写活性化はほぼ独占的に MerTK<sup>+</sup>Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージで起こった。Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージにおける MerTK の誘導は、死細胞貪食や *Spp1* 転写活性を含む機能的成熟に不可欠であると考えられた。MerTK<sup>+</sup>Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージは、STAT3 と ERK1/2 の両方の強い活性化を示した。STAT3 阻害は OPN 産生 MerTK<sup>+</sup>Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージの分化を抑制したが、*Spp1* 転写活性の誘導には STAT3 活性化のみでは不十分であった。ERK1/2 の阻害は、MerTK や Galectin-3 の発現に影響を与えることなく、*Spp1* の転写活性化を抑制した。心筋梗塞を受

けた IL-10 ノックアウト/EGFP-*Spp1* ノックインマウスでは、OPN 産生マクロファージは減少したが、完全には消失しなかった。IL-10 と M-CSF は、STAT3 と ERK1/2 を相乗的に活性化し、骨髄由来マクロファージにおける OPN 産生 MerTK<sup>+</sup>Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージの分化を促進した。抗 IL-10 抗体と抗 M-CSF 抗体の併用投与により、心筋梗塞後の心臓において、OPN 産生マクロファージの数が抗 IL-10 抗体単独投与よりも大幅に減少した。さらに、心筋梗塞後の rM-CSF の投与は OPN 産生マクロファージを増加させ、創傷治癒を促進した。

## 【考 察】

本研究では、心筋梗塞後梗塞巣では MerTK<sup>+</sup>Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージが独占的に OPN を産生していることを明らかにした。MerTK<sup>+</sup>Galectin-3<sup>hi</sup> マクロファージの分化成熟には STAT3 の活性化が必須であったが、STAT3 の単独活性化では *Spp1* 転写活性を誘導するには不十分であった。また、*Spp1* 転写活性の誘導には、STAT3 依存的な Galectin-3 や MerTK の誘導と独立して ERK1/2 の活性化が必須であることが明らかになった。このように、IL-10 と M-CSF は STAT3 と ERK1/2 の経路を相乗的に活性化し、その結果、Galectin-3 と MerTK の発現を上昇させて、OPN 産生マクロファージの機能的成熟につながることを明らかになった。

OPN は心筋梗塞後の組織修復に不可欠な役割を果たしており、サイトカインの産生、マクロファージの遊走と生存、抗原のオプソニン化を介した効率化を促進している。心筋梗塞後の *Spp1* KO マウスでは死細胞のクリアランスが不十分なために炎症が遷延する。マクロファージの MerTK 発現は、アポトーシス細胞の結合・巻き込みに重要な役割を果たしており、本研究では、Galectin-3<sup>hi</sup>CD206<sup>+</sup>マクロファージにおける MerTK の発現が *Spp1* 転写活性を高め、効率的なエフェロサイトーシスを促進することを明らかにした。

また、ラットでは、M-CSF 投与により、心筋梗塞の修復が促進され、心筋梗塞後の左室機能の低下が抑制される。マウスでは、CSF-1R キナーゼのシグナル伝達を遮断することで、心筋梗塞後の心臓における M2 様マクロファージの数が減少し、炎症の収束が遅延することが報告されていた。M-CSF の有用性は以前より指摘されていたが、より詳細な機序は明らかではなかった。本研究では、M-CSF 治療が OPN 産生マクロファージの分化を誘導することにより、心筋梗塞後の修復を加速させることを実証した<sup>2)</sup>。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

創傷治癒を促進する OPN 産生マクロファージを標的とした新たな心不全治療法の可能性が示唆された。

## 【参考・引用文献】

1. Shirakawa K, Endo J, Kataoka M et al., IL (Interleukin)-10-STAT3-Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2018;138:2021-2035.
2. Shirakawa K, Endo J, Kataoka M et al., MerTK Expression and ERK Activation Are Essential for the Functional Maturation of Osteopontin-Producing Reparative Macrophages After Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*. 2020;9:e017071.