

## 心臓-骨髄連関におけるエピジェネティクスを基軸とした心不全の新しい治療戦略

三阪智史

福島県立医科大学 循環器内科学講座

### 【研究の背景】

生体内では複数の臓器と細胞は情報を共有して緊密に連携している。心臓と他臓器とのネットワーク、そして心臓を構成する心筋細胞と非心筋細胞とのクロストークにより細胞レベルから個体レベルで恒常性を維持しているが、恒常性維持機構の破綻は疾患の発症と進展につながる。心臓の恒常性維持には、免疫細胞のネットワークを含む各臓器との連関が重要な役割を果たしており (Cell 2020; 183: 94-109. Nat Med 2017; 23:611-622)、これをターゲットとした新規治療開発が期待される。単球・マクロファージは、組織障害が起こると障害部位に浸潤して急性炎症を惹起し、その一方で回復期では骨髄由来マクロファージが浸潤して炎症抑制や組織修復に関連することが知られている (Cell 2014; 157:832-844)。つまり、心臓-骨髄間のネットワークによって、免疫血液細胞が骨髄から供給されて、病態の形成に関与すると考えられるが、心臓-骨髄連関が、心不全の病態においてどのように制御・調節されているか、その詳細については未解明である。

心不全は、環境要因と遺伝的素因が複雑に影響して発症する多因子疾患と考えられる。環境要因としてのエピジェネティクスは、DNA の塩基配列によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムであり、様々な疾患と関連する。エピジェネティクスの中で、DNA メチル化は、主に CG ジヌクレオチドの C5 位置のシトシン残基において起こり、遺伝子発現の制御に関与する。このエピジェネティックな制御は心疾患においても重要な役割を果たすと考えられるが、心臓マクロファージにおける DNA メチル化のダイナミクスはこれまで検討されておらず、心不全におけるその意義も不明である。

近年、次世代シーケンサーによる遺伝子解析技術により、血液疾患で認められる遺伝子変異が、65 歳以上の健常な集団で約 10%と高頻度に認められるクローン性造血の存在が明らかになり、加齢とともにその割合は増加することが明らかになってきた (N Engl J Med. 2014; 371: 2488-2498)。クローン性造血における遺伝子変異として、エピジェネティクス関連遺伝子が同定されているが、血液細胞のエピゲノム異常がどのように心不全の病態に関与しているかも明らかにされていない。

### 【目 的】

本研究では、心不全の発症と進展の過程において、心臓組織におけるマクロファージの DNA メチル化の意義を明らかにして、心臓-骨髄連関におけるマクロファージのエピジェネティクス制御機構について明らかにする。骨髄由来免疫細胞から心臓マクロファージへの分化の過程におけるエピジェネティクス:DNA メチル化に着目して、心不全の新しい治療戦略を構築する。

### 【方 法】

1. 大動脈縮窄による圧負荷心肥大・心不全モデルの作成と、心不全における心臓マクロファージの DNA メチル化解析  
マウスの大動脈弓部に狭窄を作成し左室に圧負荷をかけると、左室は肥大し、長期的には非代償性の心不全に陥る。術後 1 週を心肥大期および 4 週を心不全期のモデルとして研究を進める。それぞれ心エコーによる心機能を評価し、心臓を摘出し心重量・肺重量などを測定する。マウスの心臓を摘出してコラゲナーゼ処理後、ビーズで標識されたマクロファージ特異的抗体 (抗 CD11b 抗体) を用いて、磁気活性化細胞選別 (MACS) あるいは FACS によりマクロファージを選択的にソーティングする。また、骨髄細胞由来マクロファージの培養系を確立して、DNA メチル化の解析を行う。

## 2. クローン性造血マウスの圧負荷モデルにおける解析

クローン性造血マウスのモデルである Z マウスの大動脈縮窄術による圧負荷モデルを作成し、心エコーでの心機能の評価や免疫染色などによる病理学組織学的解析を行い、心臓における表現型を野生型マウスと比較検討する。また、同様のメチル化解析を行い、マクロファージにおける DNA メチル化異常が心不全の発症・進展に関与するかを明らかにする。

### 【結 果】

#### 1. 大動脈縮窄による圧負荷心肥大・心不全モデルの作成

マウスの大動脈縮窄術(TAC)による圧負荷モデルを作成した。手術 1 週後、シャム手術(Sham)群と比較して、心エコーでの心室中隔壁厚の有意な増加および心重量/体重比の増加を認めるが左室短縮率の低下を認めない「肥好心」を呈していた。4 週後では左室短縮率の有意な低下と肺重量の増加を認め、非代償性の「不全心」を呈していた。リアルタイム RT-PCR では心不全マーカーである BNP の増加を確認した。さらに、マクロファージ特異的抗体である抗 CD68 抗体による免疫染色では、TAC 後マクロファージの浸潤を多数認めた。

#### 2. 心不全マウスモデルにおける心臓マクロファージの DNA メチル化解析

次に、TAC 後のマウスの心臓を摘出してコラゲナーゼ処理後、MACS および FACS によりマクロファージの選択的にソーティングを行った。集団の Purity と DNA 収量の双方が DNA メチル化解析のために十分であるように繰り返しの検討を行った。結果、心臓マクロファージの集団を抽出できることが確認されたが、DNA メチル化解析に必要な収量を得ることに難渋した。

#### 3. クローン性造血の病態マウスモデルの作成と表現型の解析

クローン性造血におけるエピジェネティクスの意義と心不全進展の機序を明らかにするために、クローン性造血マウスモデルを作成した。レシピエントマウスに 9Gy の X 線照射により骨髄機能を破壊し、クローン性造血の Z マウスから採取した骨髄液を尾静脈から投与し骨髄移植を行った。コントロールとして野生型 littermates の骨髄を移植した。移植 4、8 週後、レシピエントマウスの血液を採取しフローサイトメリー法、リアルタイム PCR 法によりキメリズム解析を行い Z 由来細胞の生着率を評価した。その後、マウスの大動脈縮窄術(TAC)による圧負荷モデルを作成した。Z マウスの骨髄を移植されたレシピエントマウスでは大動脈縮窄術 4 週後、野生型マウスの骨髄を移植されたレシピエントマウスと比較して心エコー上左室内腔の拡大と左室収縮短縮率の低下を認め、大動脈縮窄術後心不全の増悪を来すことが示唆されており、解析を継続している。

#### 4. マクロファージの DNA メチル化解析

マクロファージの免疫応答に対する DNA メチル化の意義について、バイサルファイトシーケンスにより、網羅的に解析を行った。培養した骨髄細胞由来マクロファージから DNA を抽出して、バイサルファイト処理を行い、次世代シーケンサーを用いて網羅的なメチル化解析を行った。Z マウスの骨髄細胞由来マクロファージと野生型骨髄細胞由来マクロファージとで、differentially methylated regions を複数認め、これらが、免疫応答の差異に影響を与えている可能性が示唆された。さらに、Z マウスの骨髄細胞由来マクロファージでは、LPS 刺激に応答して増加した IL6、IL-1B、CCL2 といったサイトカインレベルは、野生型マウスの骨髄細胞由来マクロファージと比較して、有意に高値であり、DNA メチル化と炎症反応との関連性が示唆された。

### 【考 察】

単球・マクロファージを主体とする骨髄由来免疫細胞は心不全の発症・進展に関与するが、その制御機構は未解明であり、本研究のようなアプローチを応用した。骨髄造血幹細胞-単芽球-末梢単球-心臓マクロファージの全分化段階での DNA メチル化解析を行う独創的なアプローチを駆使して、鍵となる特異的な DNA メチル化を同定し、これを制御できれば新しい心不全治療につながる可能性がある。さらに、加齢に伴う「クローン性造血」と心臓マクロファージの DNA メチル化の関連性を明らかにして高齢者に多い心不全の治療ターゲットとなるか検討することで、修飾可能な遺伝子制御である DNA メチル化が、クローン性造血を有する個人に対して、新たな治療につながる可能性がある。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

超高齢社会のわが国では心不全患者が急増する一方で、心不全に対する有効な治療法は確立されておらず、病態解明に基づく新たな治療が望まれている。DNAメチル化は修飾可能な遺伝子制御と考えられており、マクロファージを主体とする骨髄由来免疫細胞のエピジェネティクスが心不全の新しい治療法となる可能性があり、今後の発展が期待される。さらに高齢者に多い「クローン性造血」を有する患者に有効な治療ターゲットとなり得る発展性も期待され、心臓-骨髄連関におけるエピジェネティクスを基軸とした心不全の新しい治療戦略を構築できる可能性が示唆され、さらなる研究が必要である。

### 【参考・引用文献】

1. Nicolas-Avila JA, Lechuga-Vieco AV, Esteban-Martinez L, et al. A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell*. 2020;183:94-109 e123.
2. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell*. 2014;157:832-844.
3. Fujii K, Shibata M, Nakayama Y, et al. A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nat Med*. 2017;23:611-622.
4. Shimizu T, Suzuki S, Sato A, et al. Cardio-protective effects of pentraxin 3 produced from bone marrow-derived cells against ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;89:306-313.
5. Suzuki S, Shishido T, Funayama A, et al. Long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload-induced left ventricular dysfunction. *PLoS One*. 2013;8:e53133.
6. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:2488-2498.