

研究報告書

「心臓線維芽細胞活性制御を介する臓器恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 武田 憲彦

1. 研究のねらい

心不全は、心臓が個体および各臓器の生理的機能維持に必要な心拍出量を維持できない状態と定義される。高齢化と共に我が国においても心不全症例は年々増加の一途を辿っている。心不全の半数は、心筋梗塞などにより心室収縮能が低下した病態であり、収縮不全型心不全と呼ばれている。近年の経カテーテル治療および薬物治療の導入により収縮不全型心不全の治療は劇的な進歩を遂げてきた。一方、収縮不全型心不全とほぼ同数の症例が拡張不全型心不全、即ち収縮能が保持された心不全を発症する。拡張不全の病態の一つは心筋組織の線維化であると考えられるが、現在拡張不全型心不全に対して有効な治療アプローチは存在せず、その病態プロセスの解明と治療法開発が臨床的に強く求められている。

心臓リモデリングでは 2 種類の線維化が生じると考えられている。即ち心筋梗塞後に心筋脱落部を補完する置換型線維化(Replacement Fibrosis)と、心筋非脱落部に生じる過剰型線維化(Excessive Fibrosis)である。特に過剰型線維化は心室拡張能低下、拡張不全型心不全の原因になると考えられるものの、なぜ心筋非脱落部において線維芽細胞が活性化するのか、その分子機序はこれまで不明であった。心不全、心臓リモデリングは血行力学的病態であるにも関わらず、無菌性の炎症が生じることが知られている。これら炎症プロセスの活性化は組織線維化に大きく影響すると考えられることから、本さきがけ研究では特に心臓マクロファージが組織線維化において果たしている役割に着目することとした。近年、組織マクロファージには炎症惹起型(M1)と炎症抑制型(M2)など様々な亜集団が存在することが知られている。我々はこれまで低酸素誘導型転写因子(Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α)に着目した解析から、M1, M2 マクロファージにおいてそれぞれ HIF-1 α 、HIF-2 α が特異的に発現し、炎症プロセスの活性制御において中心的な役割を果たしていることを明らかにしている。本さきがけ研究では組織における低酸素シグナルと言う切り口から、無菌性炎症の発症機序と組織線維化の病態機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本さきがけ研究において、心筋組織の酸素イメージングおよび炎症細胞の挙動を解析した。これらの解析により、心臓リモデリングにおいて心筋組織の低酸素領域に炎症惹起型マクロファージが浸潤することを確認し、その組織線維化における役割を検証した。

上記炎症プロセスにおけるマクロファージ遊走能を解析する課程において、マクロファージが従来知られていなかった代謝様式を呈していることを見出した。以前から炎症局所は低酸素環境にあることが知られているが、細胞遊走に必要なエネルギーをどのように獲得しているのかは不明であった。我々は酸素濃度可変型チャンバーを用いてリアルタイムに細胞内代

謝解析を行った結果、マクロファージが HIF-1 α 依存的 Pyruvate dehydrogenase kinase1 (PDK1)発現誘導を介して解糖系へと代謝シフトしていること(Active Glycolysis)を見出した(#5 *Nat Commun* 2016として報告)。興味深いことにマクロファージ遊走に関わる細胞質 F-Actin と ATP 産生型の解糖系酵素 Pyruvate kinase, muscle (PK-M2)が共局在する一方、PDK 阻害薬である Dichloroacetate (DCA)投与によりマクロファージ遊走能は有意に抑制された。これらの知見から、Active Glycolysis を解糖系代謝リプログラミングが、ATP 産生部位を調節することで、炎症局所へのマクロファージ遊走を可能にしていることを明らかにした(#3. *JAT* 2017)。

引き続き組織リモデリングに関わる細胞固有の機能におけるグルコース代謝の役割を検証した。その結果、解糖系代謝、乳酸産生亢進が線維芽細胞を活性化すること(*AJRCMB* 2017)を見出した。加えてグルコース代謝が一部の肺がん細胞(Squamous Cell Carcinoma)の増殖に必須であることも同定している(#4 *Nat Commun* 2017)。併せて炎症細胞に着目したアプローチにより、血管内皮細胞増殖因子の適切な on/off 制御が局所への酸素供給を制御していることを明らかにした(#1 *Nat Commun* 2017)。

(2) 詳細

研究テーマ A「組織リモデリングにおける自然炎症発症の分子機構」

心臓リモデリングにおける炎症プロセス活性化の病態機序を解析した結果、組織低酸素とマクロファージ浸潤が密接に関係していることが確認された。本さきがけ研究では、心臓線維化における心臓マクロファージの役割を明らかにすると共に、マクロファージ遊走能の分子機構を解明し、新たなグルコース代謝変容様式を見出した(#5 *Nat Commun* 2016 として報告)。

細胞遊走は細胞質 F-Actin 重合・脱重合を繰り返すプロセスであり、細胞質で ATP が消費されることからエネルギー要求性の細胞応答であることが判る。マクロファージは炎症局所の低酸素領域へ集積するが、どのように細胞遊走に必要な ATP を確保しているのか、これまで明らかでは無かった。我々はマクロファージ遊走がグルコース代謝、特に解糖系代謝依存的であることを明らかにした。特に解糖系における ATP 産生酵素、PK-M2 が F-actin と共局在することを見出した。解糖系代謝は HIF-1 α を介する PDK1 発現誘導依存的に生じていることも判った。更に PDK 阻害薬である Dichloroacetate(DCA)により細胞遊走が抑制されることから、マクロファージにおける解糖系代謝が ATP 産生部位の調節を介して低酸素領域での細胞遊走を可能にしていると考えられた。興味深いことに、HIF-1 α -PDK1 はミトコンドリア電子伝達系よりもより鋭敏に酸素濃度を感知していることから、マクロファージは積極的に解糖系への代謝シフトを誘導することでその遊走能を保持していることが判った(Active Glycolysis, #3 *JAT* 2017)。

組織酸素濃度は成熟血管による灌流により大きく影響される。我々は上記組織リモデリングにおける炎症細胞の役割を解析し、炎症細胞(特に NK 細胞)による血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF-A)シグナル調節が組織酸素濃度の維持において重要であることを確認している(#1 *Nat Commun* 2017)。

研究テーマ B「線維芽細胞活性化における解糖系代謝の役割」

上述のマクロファージにおけるグルコース代謝の解析に引き続き、線維芽細胞活性化にお

けるグルコース代謝の役割につき検討を行った。その結果、活性化した線維芽細胞においてグルコース代謝、特に解糖系代謝が亢進していることが判った。更に肺線維化モデルを用いた *in vivo* モデルでの検証から、線維芽細胞が HIF-1 α 依存的に活性化することを確認した。更にその詳細な分子機構の解析を行い、HIF-1 α による PDK1 誘導が線維芽細胞を活性化する一方、DCA が *in vivo* における線維芽細胞活性化を抑制することを見出した(#2 AJRCMB 2017)。

これまでの解析により、HIF-1 α -PDK1 を介するグルコース代謝制御はマクロファージ遊走能、線維芽細胞活性化それぞれにおいて必須の役割を果たしていることが判った。これら知見から、グルコース代謝がそれぞれ細胞固有の機能発揮において重要であると考えられた。引き続きグルコース代謝と細胞増殖の関係を解析した結果、一部のがん細胞(Squamous Cell Carcinoma)において Glut1 依存的なグルコース取り込みが必須であることを見出した(#4 *Nat Commun* 2017)。

3. 今後の展開

本さがけ研究において、炎症細胞シグナルおよび代謝物に着目することで、線維芽細胞 on/off 活性化の調節において中心的役割を果たすシグナルを同定することが出来た。引き続きこれらのアプローチを継続することで、線維芽細胞が周囲の実質細胞(心筋細胞)および間質細胞(マクロファージ)をどのように感知し、どのように細胞間ネットワークが形成されているのか、その構成要素を明らかにすることが可能になると考えられる。今後、病態において線維芽細胞活性化の on/off 調節機構がどのように破綻しているのかにつき、上記シグナルに着目して解析することで、過剰型線維化の病態機構を解明できると期待される。これら線維芽細胞と実質細胞、間質細胞間のネットワーク解明は、異種細胞間における細胞間相互作用の実態を明らかにする研究としても有用、かつ重要な研究課題であると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究では、心臓リモデリングに関わる心臓線維芽細胞の on/off シグナルの解明目的として、特に無菌性炎症、代謝シグナルと言う切り口からの解析を行った。その結果、心筋組織に集積する炎症細胞の抗線維化作用とその分子実態を解明することに成功した(*Nat Commun* 誌へ投稿済み、revision 中)。これらの知見はヒト心不全症例においても確認されており、病態への理解のみならず、今後のバイオマーカーとしての臨床応用も期待できる。

上記解析を行う課程で、新たなグルコース代謝応答システム、Active Glycolysis を同定、報告した。Active Glycolysis は HIF-1 α -PDK1 を介する解糖系への代謝シフトであるが、個々の細胞機能において重要な役割を果たしていることを見出した。即ちマクロファージにおいては ATP 産生部位を制御することでその遊走能維持に貢献する一方(#5 *Nat Commun* 2016, #3 *JAT* 2017 として報告)、線維芽細胞の活性化を直接的に促進する事を明らかにすることが出来た(#2 *AJRCMB* 2017 として報告)。またグルコース代謝が一部のがん細胞増殖に必須であることも確認した(#4 *Nat Commun* 2017 として報告)。更に組織酸素化において VEGF を介する血管恒常性が重要であること(#1 *Nat Commun* 2017 として報告)も同定している。

また乳酸を介する細胞間相互作用を解析する課程で、心臓・骨格筋間における当初予想していなかった臓器連関システムを確認することが出来た。

このように炎症プロセス、細胞間代謝シグナルに着目することで、研究目的である線維芽細胞活性化の on/off 制御機構の実態解明と言う当初の目的について、ほぼ順調に研究を遂行できたと考えている。今後、これら on/off シグナルが相互にどのように制御され恒常性維持に貢献しているのか、また病態において破綻しているのかにつき、より大きなシステムとしての理解を進めたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

収縮不全型心不全とほぼ同数の症例が拡張不全型心不全、即ち収縮能が保持された心不全を発症する。拡張不全の病態の一つは心筋組織の線維化であると考えられますが、現在拡張不全型心不全に対して有効な治療アプローチは存在せず、その病態プロセスの解明と治療法開発が臨床的に強く求められている。武田憲彦研究者は、心筋組織の酸素イメージングおよび炎症細胞の挙動を解析し、これらの解析により、心臓リモデリングにおいて心筋組織の低酸素領域に炎症惹起型マクロファージが浸潤することを確認し、その組織線維化における役割を検証した。その結果、炎症プロセスにおけるマクロファージ遊走能を解析する課程において、マクロファージが従来知られていなかった代謝様式(Active Glycolysis)を呈していること、そしてこの代謝様式がマクロファージの炎症局所への遊走に関与していることを見出した。これらの成果は心臓の繊維芽細胞活性制御にたいして有効な病態への理解のみならず、今後のバイオマーカーとしての臨床応用も期待できると考えられる。以上のように本研究者はさきがけ研究期間中に成果を上げ、Physician scientist としての地位を確立できたと評価出来る。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Krzywinska E, Kantari-Mimoun C, Kerdiles Y, Sobocki M, Isagawa T, Gotthardt D, Castells M, Haubold J, Millien C, Viel T, Tavitian B, Takeda N, Fandrey J, Vivier E, Sexl V and Stockmann C. Loss of HIF-1 α in Natural Killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis
Nature Communications. 2017 Nov 17;8(1):1597.
2. Goodwin J, Choi H, Hsieh MH, Nuegent ML, Ahn JM, Hayenga HN, Singh PK, Shackelford DB, Lee IK, Shulaev V, Dhar S, Takeda N, Kim JW. Targeting HIF-1 α /PDK1 Axis by Dichloroacetate (DCA) Suppresses Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2017 (in press)
3. Abe H, Semba H, Takeda N
The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases.
J Atheroscler Thromb. 2017 Sep 1;24(9):884-894.

4. Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenborg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, Endo H, Inoue M, Xuan Z, Yoo H, Chen M, Ahn JM, Minna JD, Helke KL, Singh PK, Shackelford DB, Kim JW. Distinct Metabolic Phenotypes within Non-small Cell Lung Cancer Define Selective Vulnerability to Glycolytic Inhibition of Lung Squamous Cell Carcinoma.
Nature Communications. 2017 May 26;8:15503.
5. Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R and Komuro I. HIF-1 α -PDK1 axis induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity.
Nature Communications 7, Article number:11635, 2016

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

高血圧関連疾患モデル学会 第一回 永井賞
(2016年9月22日 東京)