
研究助成業績報告集

第 29 回（2021 年度）バイエル循環器病研究助成
『心不全における慢性腎臓病』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	ケトン体が結ぶ心腎連関機構の解明	有馬 勇一郎	1
2	心筋梗塞で動員される新規ミエロイド細胞 サブセットが慢性腎臓病病態形成に与える影響	尾花 理徳	7
3	慢性腎臓病を合併した心不全における「腎-脳-心連関」の 機序解明	篠原 啓介	10
4	心不全時の造血幹細胞のエピゲノム変化が引き起こす慢性 腎臓病	中山 幸輝	13

ケトン体が結ぶ心腎連関機構の解明

熊本大学 国際先端医学研究機構 特任准教授
有馬 勇一郎

I. 緒言

心腎連関は代表的な臓器連関であり、心不全において腎機能障害が増悪因子となることはよく知られている。そのため、健康長寿社会の実現のためには、双方向で作用する臓器連関の分子実態を明らかにし、両臓器の保護を目指した予防・治療戦略の設定が必要である。

ケトン体は古くから空腹時のエネルギー源として知られてきたが、エネルギー基質以外にも多彩な作用があることが明らかとなってきた。ケトン体代謝の特徴として、ケトン体を賛成する臓器と消費する臓器が明確にわかれているという点があるが(図 1)、これらの違いは律速段階酵素の発現により制御されている(図 2)。

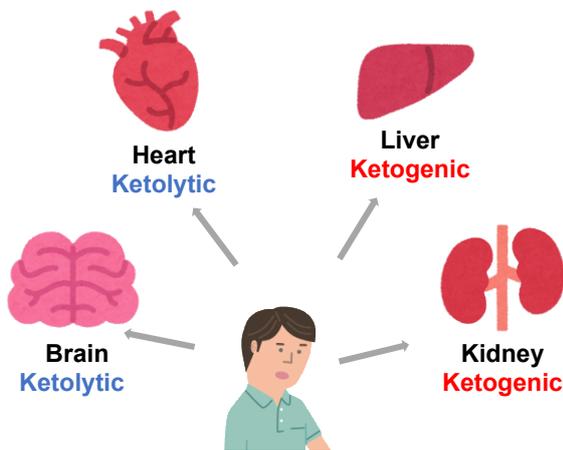


図1 ケトン体合成臓器と消費臓器
ケトン体を合成する臓器の代表として肝臓・腎臓、消費する臓器としては心臓・脳が代表的である。

研究代表者はケトン体合成の律速段階酵素である HMG-CoA synthase2(Hmgcs2)のノックアウトマウスを独自に樹立し、ケトン体合成にミトコンドリアタンパクの過剰なアセチル化を緩和し、機能を保護作用があることを初めて発見した(図 3:Arima et. al., *Nature Metabolism* 2021)¹⁾。

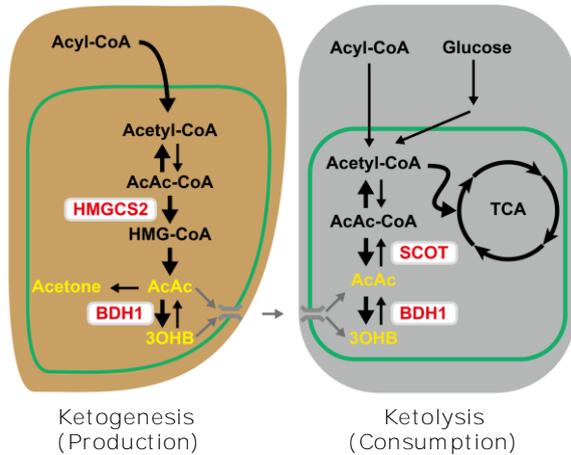


図2 ケトン体代謝

ケトン体代謝はケトン体を合成する Ketogenesis と、ケトン体を消費する Ketolysis に分かれる。この中で、Ketogenesis は Hmgcs2、Ketolysis は Scot がそれぞれの反応の律速段階酵素であり、これらの酵素発現によりケトン体合成・消費臓器の違いが区別される。

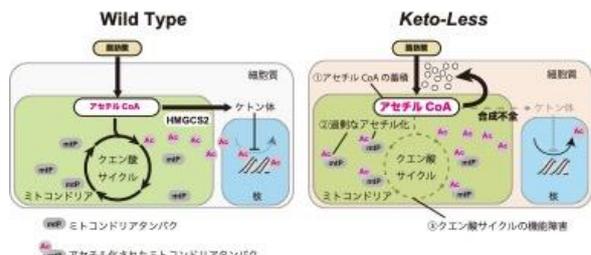


図3 ケトン体合成によるミトコンドリア保護

ケトン体合成不全状態では、基質となるアセチル CoA が蓄積し、ミトコンドリアタンパクに過剰なアセチル化を加えることで、クエン酸サイクルの機能が低下する。(Arima et. al., *Nature Metabolism* 2021)

我々はこの現象を新生児期の肝臓において見出したが、腎臓においてもケトン体合成は盛んに行われていることを確認しており、同様の機序が機能している可能性が示唆される。また、糖尿病性腎症を用いたモデルマウスにおいても、ケトン体が mTOR 活性の抑制を通じて腎保護作用を示すことが報告され (Tomita

et. al., *Cell Metabolism* 2020) 2)、ヒトにおいても1細胞核シーケンスの解析において糖尿病性腎症患者の腎臓では *Hmgcs2* の mRNA 発現が低下していることが確認された (図4:Wilson et al., *PNAS* 2019) 3)。

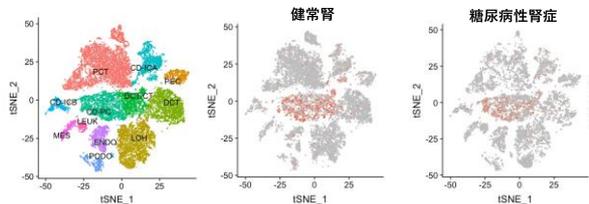


図4 一細胞核シーケンス(左)健康腎 (中央) と比較して糖尿病性腎症患者の腎臓(右)において *Hmgcs2* の発現が低下している(赤ドット)。

心臓は代表的なケトン体消費臓器であり、申請者はヒトの心臓で消費されるケトン体を実測し、心臓を通過する過程で3~4割のケトン体を利用される (Arime et. al., *JACC* 2019) 4)。また、心不全病態においても、血中ケトン体濃度の上昇とともにケトン体の利用率が上昇することが報告されている (Murashige et. al., *Science* 2020) 5)。

一連の研究結果は、ケトン体代謝が心・腎ともに保護的に作用する可能性を示しており、慢性腎臓病を合併した心不全において、負のサイクルを断ち切る因子として作用しうる可能性を秘めている。しかしながら現時点において、①心不全に伴うケトン体代謝の変化は腎機能に影響を及ぼすのか? ②腎臓におけるケトン体合成は、心臓に影響しうるのか? といった心腎連関に関わる分子メカニズムは不明である。そこで本研究提案では、腎臓内科を専門とする山梨大学の内村幸平先生との共同研究により、様々な臓器・時期特異的なケトン体合成不全マウスを駆使して、心不全における慢性腎臓病の中で、ケトン体代謝がどのような働きをもち、疾病進展の予防に有用であるかを検証した。

II. 対象・方法

本研究計画では申請者の樹立した、*Hmgcs2* のノックアウトマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスを駆使して実験を進めた。まずは、心不全病態を再現するマウスモデルとして、高脂肪食負荷と高血圧処理を併用した収縮保持性心不全(Heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF)の作出を試みた (Schiattarella et. al., *Nature* 2019) 6)。その上で、心不全形成過程においてケトン体代謝がどのように

変化するかを検証した。

続いて、内因性のケトン体が心不全・腎不全にどのように影響するかを検証するため、有馬は *Hmgcs2* flox マウスと Alb-cre マウスを用いて、肝臓特異的なケトン体合成不全マウスを作成して検証した。研究分担者の内村は、*Hmgcs2* flox マウスと NDRG1-CreERT2 マウスを用いて、近位尿細管特異的なケトン体合成不全マウスを作成し、急性腎障害モデル(AKI)から慢性腎臓病(CKD)へ進展する過程(AKI to CKD)において、近位尿細管におけるケトン体合成不全が病態のどのように影響するのかが検証した。

III. 結果

高脂肪食負荷と高血圧処置の併用により病的な心肥大が生じる

HFpEF 病態を再現するため既報に則り (Schiattarella et. al., *Nature* 2019)、8週齢の野生型マウスに対して60%高脂肪食と0.5g/L γ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を15週間負荷した(2-Hit model)。15週後の時点において、対照群である通常食・通常飲水マウスと比較して、2-Hit modelを加えたマウスは有意に体重増加・血圧上昇を認めた (図5)。

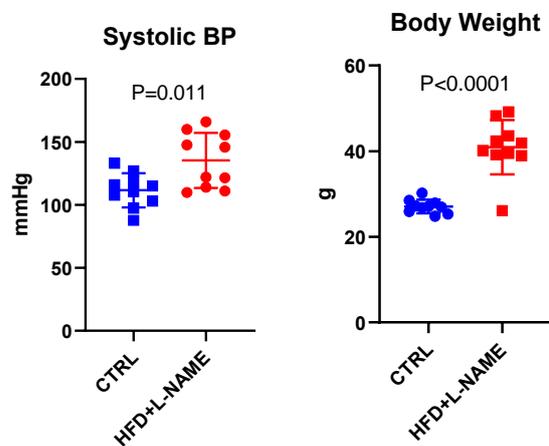


図5 2-Hit model

通常飼育群(CTRL)と比較して、60%高脂肪食と0.5g/L L-NAME含有水を投与した2-Hitモデルでは、有意な血圧上昇と体重増加を認め、高血圧と肥満を合併したモデルとして妥当であることが示された。

2-Hit model により病的な心筋肥大が生じる

2-Hit model を15週間加えた時点において、心臓超音波検査を実施すると、負荷群において有意な心室中隔壁肥厚を認めた (図6)。

加えて、採取した心臓組織を用いて免疫組織染色を

実施した結果、2-Hit model においては有意に心筋断面面積が拡大しており(図 7)、心筋肥大が生じていることが明らかになった。加えて血管密度の測定では 2-Hit model において血管密度の減少を認め、生理的心肥大ではなく病的な心肥大が生じていることが確認された。

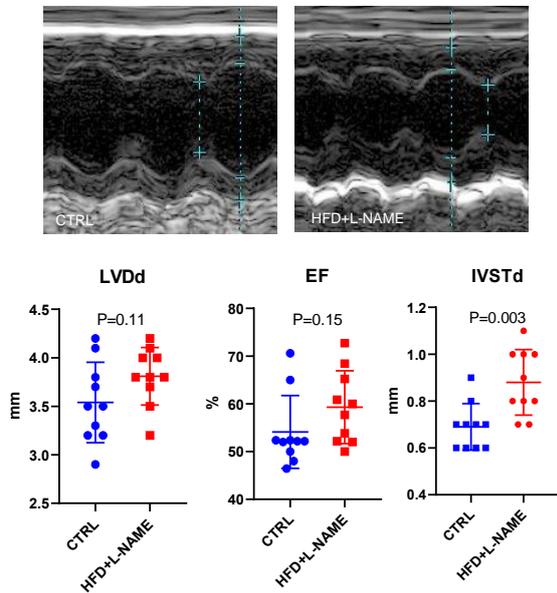


図6 2-Hit model は心室中隔壁の肥厚を生じる

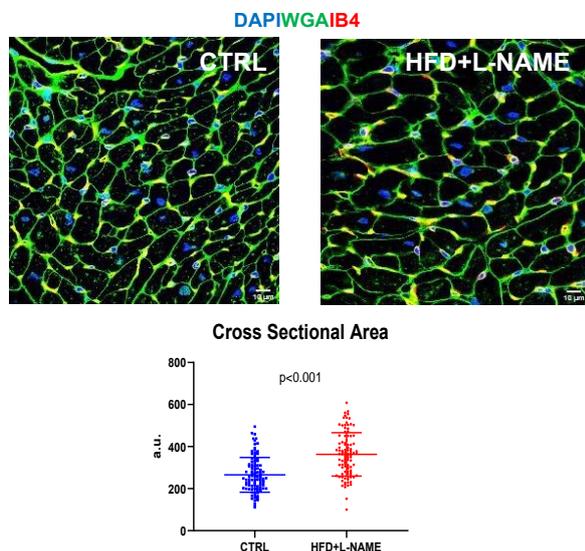


図7 2-Hit model は心筋細胞の肥大を生じる

2-Hit model ではケトン体合成が亢進する

病的な心筋肥大が生じていることが明らかとなった 2-Hit モデルにおいて、血中・組織中のβヒドロキシ酪酸濃度を測定すると、有意な上昇を認めた(図 8)。また採取した肝臓を用いて Hmgcs2 のタンパク量の発現を確認した結果、有意な上昇を認めた(図 9)。以上より、2-Hit モデルでは肝臓における Hmgcs2 の発現が亢進

し、ケトン体合成が亢進することが明らかとなった。

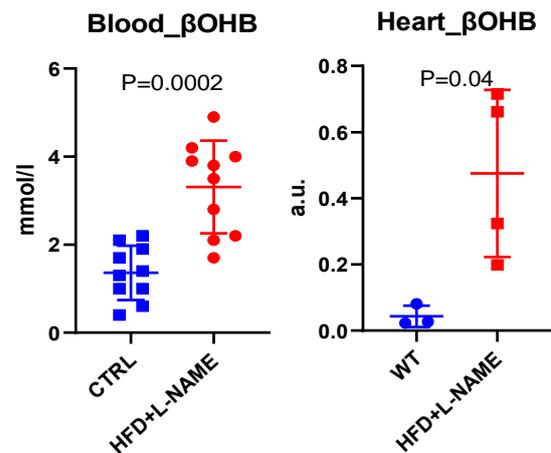


図8 2-Hit model では血中ケトン体濃度が亢進する

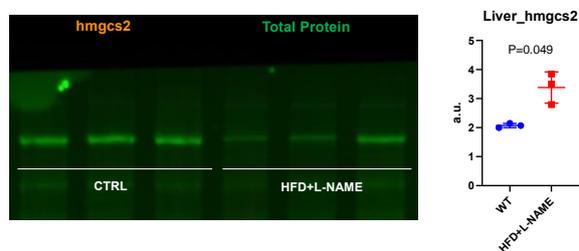


図9 2-Hit model では肝臓でのケトン体合成が亢進する

肝臓特異的なケトン体合成不全マウスの作成

一連の実験結果から 2-Hit モデルではケトン体合成が亢進することが明らかとなった。Hmgcs2 は肝臓だけでなく、腎臓や腸の幹細胞などでも発現しており、肝外性のケトン体合成と肝臓におけるケトン体合成の作用を区別するため、肝臓特異的なケトン体合成不全マウスの作成を試みた。

我々が独自に樹立した Hmgcs2 flox マウスと、Albumin Cre マウス(Alb-cre マウス)を交配し、Hepatocyte 特異的なケトン体合成不全マウスを作成した(図 10 Hepatic Keto-less model; hKL)。



図10 肝臓特異的なケトン体合成不全マウス

hKL マウスは全身のケトン体合成不全マウスと同様、致死的な表現型は示さず、成獣まで生存可能であった。成獣組織の肝臓・心臓・腎臓を用いて免疫組織染色を実施すると、hKL マウスでは肝臓の Hmgcs2 の発現が消失する一方で、腎臓における発現は維持さ

れていることが確認された。また心臓ではコントロールマウス(Hmgcs2 flox/flox)でも Hmgcs2 タンパクの発現は確認されなかった(図 11)。

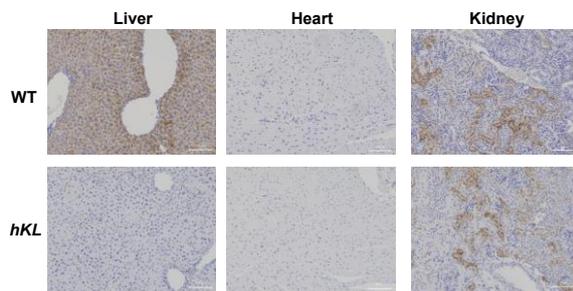


図 11 肝臓特異的なケトン体合成不全マウス(Hmgcs2 の免疫組織染色)

続いて、空腹時の血中濃度を測定すると、hKL マウスでは有意な血中ペーたヒドロキシ酪酸濃度の低下を認めた(図 12)。

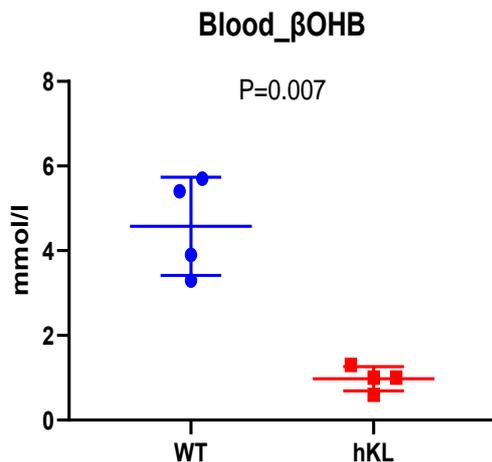


図 11 hKL マウスモデルでは血中ケトン体濃度が低下する

興味深いことに、肝臓特異的なケトン体合成不全マウスにおける血中ケトン体濃度は、全身のケトン体合成不全モデルとほぼ変わりなく、血中のケトン体濃度はほぼ肝臓でのケトン体合成により供給されていることが今回の研究で明らかとなった。

hKL マウスでは 2-Hit model による心筋肥大が増悪する

hKL マウスを用いて、高脂肪食+L-NAME 飲水負荷を 15 週間加えた。体重やテイルカフにて測定した血圧については、コントロールマウスと hKL マウスで明らかな差は認めなかった(図 12)。一方で、心臓重量は hKL マウスで増大する傾向を示し、脛骨長で補正すると有意な上昇を認めた(図 13)。

そこで、免疫組織染色法により心筋断面積を計測した結果、hKL マウスでは有意な心筋断面積の増加を

認め、心筋肥大が増悪することが確認された(図 14)。

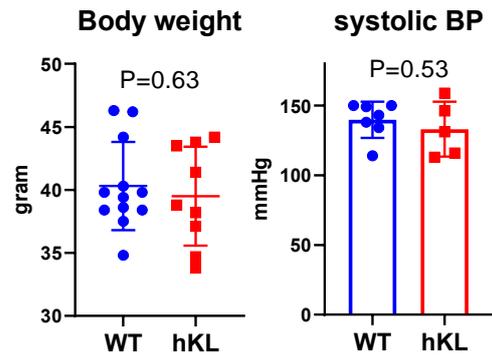


図 12 15 週負荷時点の体重・血圧

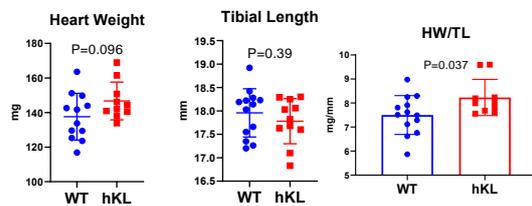


図 13 hKL マウスは心臓重量が増加する

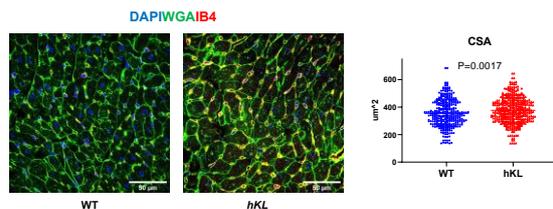


図 14 hKL マウスは心筋断面積が増加する

これらの変化がどの時期から確認されるかを検証するため、負荷期間を変えて表現型を検討した結果、5 週負荷後の時点において、理学所見上の差は認めないものの、心筋断面積にはすでに変化が生じていることが確認された。

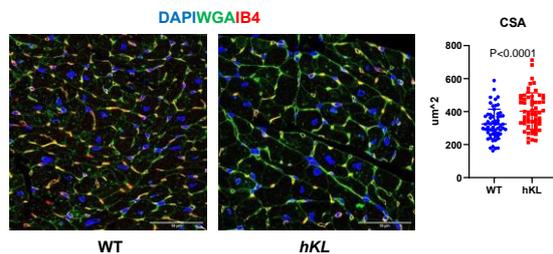


図 15 hKL マウスによる心筋肥大の増加は 5 週間負荷でも確認される。

2-Hit model における形態的に明らかな腎障害は認められない

2-Hit モデルが腎機能に与える影響を確認するため、15 週負荷後の腎臓組織についても切片による組織的検討を行った。しかしながら、組織所見上明らかな腎

障害所見は認められなかった。

2-Hit model における遺伝子発現変化の検討

一連の解析により、hKL マウスでは 2-Hit model による心筋肥大が増悪すること、負荷後 5 週の時点で心筋肥大の所見が確認されることを見出した。どのような遺伝子発現の変化がケトン体合成不全によりもたらされるかを確認するため、負荷後 5 週の心臓組織を用いて、RNA-sequencing 解析を実施した。

Hmgcs2 flox/flox の対照群(Ctrl)、Alb-cre:Hmgcs2 flox/flox の hKL マウスそれぞれ 3 検体を用いて、イルミナ社性 Nextseq500 による RNA sequencing 解析を実施した。解析により 21 種の Differentially expressed genes (DEGs) が同定されたが、これらの中で異なるサンプルセット及び 15 週負荷のサンプルでも同様の傾向を認める遺伝子を RT-PCR により確認し、最終的に 5 種の遺伝子が hKL マウスにおいて顕著に変化することを確認した(図 16)。

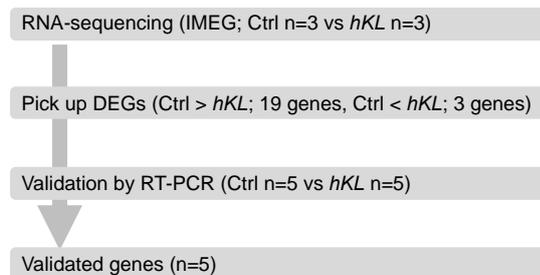


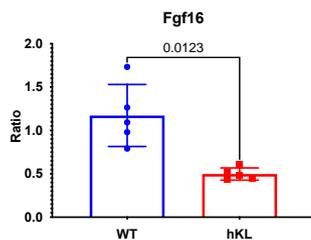
図 16 RNA-sequencing 解析を用いて変動遺伝子の同定

この中で、今回の心臓と腎臓をつなぐ鍵因子の同定という目的を達成するため、分泌型の因子に注目して検討を行った結果、FGF16 を候補遺伝子として同定した。

FGF16 の発現は hKL マウスにおいて低下する

FGF16 は FGF ファミリーの一つであり、心筋細胞より分泌されて心臓保護的に作用することが知られている (Khosravi et. al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021⁷⁾, Fujiu and Nagai, *JMCC* 2014⁸⁾。

我々は 5 週間負荷を加えた 2-Hit モデルにおいて、心臓における Fgf16 の発現が hKL マウスで有意に低



下することを確認した(図 17)。

図 17 hKL マウスでは Fgf16 の発現が低下する

同様の現象は負荷後 15 週目の時点においても確認され、ケトン体合成不全状態が Fgf16 の発現を転写レベルで抑制することが確認された。

βヒドロキシ酪酸投与により FGF16 の発現が上昇する

続いて、FGF16 の発現変化がケトン体による直接的なものであるかを検証するため、単離心筋細胞を用いた検討を行った。生後 2 日目の野生型ラットより心筋細胞を単離し、βヒドロキシ酪酸の存在・非存在下でフェニレフリン負荷刺激を行った(図 18)。

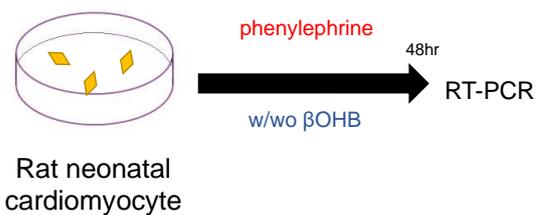


図 18 Rat 由来心筋細胞を用いた心筋肥大誘導

負荷後 48 時間の時点で RNA を回収し、RT-PCR 法により遺伝子発現を比較した結果、FGF16 の発現が 5mM の βヒドロキシ酪酸との共培養により上昇することが確認された。

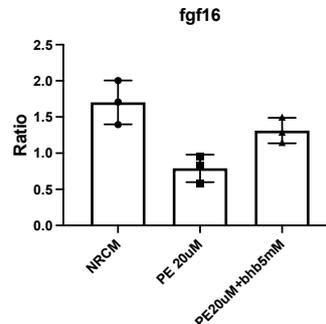


図 19 βヒドロキシ酪酸(bhb)の刺激により Fgf16 の発現は増加する

どのような機序でケトン体合成はケトン体濃度を測定すると、

近位尿管特異的なケトン体合成不全マウスの作成

心腎連間の腎臓側のケトン体合成の意義を明らかにするため、本研究では近位尿管特異的なケトン体合成不全マウスの作成も進めている。研究代表者の樹立した Hmgcs2 flox マウスの精子を研究分担者である内村幸平先生の所属する山梨大学へ送り、SPF グレードのマウス作成を進めている。現在 Hmgcs2 flox マウスのホモ接合体の樹立と、NDRG-1-CreERT2 マウスとの交配による近位尿管特異的なケトン体合

成不全マウスの樹立を進めている。

IV. 考察

一連の検討により、ケトン体合成不全状態では心筋肥大が増悪することが確認された。この現象は肝臓特異的なケトン体合成不全マウスで確認され、近位尿管で *Hmgcs2* の発現が残った状態でも全身の血中濃度低下は明らかであったことから、腎臓から産生されるケトンが心保護に作用する可能性は否定的な結果であった。

一方、ケトン体合成不全により複数の遺伝子群が心臓において転写レベルで発現変化を示すことが明らかとなった。この中でも *FGF16* は心保護的に作用するタンパクとして知られ、心筋細胞より分泌されることが知られている。既報では *FGF2* を介したシグナルを部分的に抑制することで心保護的に作用することが示されているが、今回用いた 2-Hit モデルにおいて *FGF16* がどのような機序で肥大を抑制しているのかは明らかでない。現在、*FGF16* がもたらす下流のシグナル伝達の変化と、*FGF16* の発現が変化する上流の転写制御機構について解析を進めている。特に転写制御機構については、ケトン体が内因性の HDAC 阻害作用を示すことや (Shimazu et. al., *Science* 2013)⁹、直接的なヒストン修飾をもたらすことが報告されており (Xie et. al., *Molecular Cell* 2016)¹⁰、今後 Chip-qPCR や Chip-sequencing 解析を進めて、ケトン体による転写制御機構を明らかにしたいと考えている。

また、研究当初は 2-Hit モデルにより腎臓においても障害が確認されることを予測していたが、15 週負荷の本モデルでは明らかな形態的な変化は確認できなかった。原因として、心臓の表現型も既報と比較すると軽度であることから、腎障害をもたらしには負荷が軽すぎる可能性が考えられる。現在腎臓でのケトン体合成不全マウスの作成を進めているが、2-Hit モデルに合わせて AKI を合併させるモデルなどを加えることで、より心腎連関をつなぐ働きを明らかにしたいと考えている。

V. 結論

ケトン体合成不全は、心肥大の進行を促進する。

VI. 研究協力者

山田敏寛・熊本大学循環器内科・大学院生
徐宇卿・熊本大学循環器内科・大学院生
辻田賢一・熊本大学循環器内科・教授

内村幸平・山梨大学腎臓内科・助教

VII. 参考文献

- 1) Arima Y, Nakagawa Y, Takeo T, et al. Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation. *Nat Metab.* 2021;3:196-210.
- 2) Tomita I, Kume S, Sugahara S, et al. SGLT2 Inhibition Mediates Protection from Diabetic Kidney Disease by Promoting Ketone Body-Induced mTORC1 Inhibition. *Cell Metab.* 2020;32:404-419.
- 3) Wilson PC, Wu H, Kirita Y, et al. The single-cell transcriptomic landscape of early human diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116:19619-19625.
- 4) Arima Y, Izumiya Y, Ishida T, et al. Myocardial Ischemia Suppresses Ketone Body Utilization. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73:246-247.
- 5) Murashige D, Jang C, Neinast M, et al. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart. *Science.* 2020;370:364-368.
- 6) Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. 2019;568:351-356.
- 7) Khosravi F, Ahmadvand N, Bellusci S, et. al. The Multifunctional Contribution of FGF Signaling to Cardiac Development, Homeostasis, Disease and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:672935.
- 8) Fujiu K and Nagai R. Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;70:64-73.
- 9) Shimazu T, Hirschey M, Newman J, et. al. Suppression of Oxidative Stress by β -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. *Science.* 2013;339:211-214.
- 10) Xie Z, Zhang D, Chung D, et. al. Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Mol Cell.* 2016;62:194-206.

心筋梗塞で動員される新規ミエロイド細胞サブセットが慢性腎臓病病態形成に与える影響

大阪大学大学院薬学研究科・准教授
尾花 理徳

I. 緒言

我が国では、社会の高齢化に伴い心不全患者が急増しており、心不全パンデミックとも称されている。他方、慢性腎臓病 (CKD) は、我が国の成人の 1,330 万人が罹患していると言われ、新たな国民病と言われている。言わずもがな、心腎連関と言われるように、心不全病態と CKD 病態は、互いの病態進展に影響を与えているが^{1,2}、その機序は十分に明らかにされていない。

心筋梗塞 (MI) 後心不全発症に至る過程 (心筋リモデリング) では、好中球やマクロファージなどから成るミエロイド細胞が炎症を制御していることが知られている³。申請者は、ミエロイド細胞における心筋リモデリング制御機構を、より詳細に理解するため、MI 後に心筋組織内に浸潤するミエロイド細胞に対してシングルセル RNA シーケンスを行った。その結果、遺伝子発現パターンから、ミエロイド細胞は 3 つの細胞集団に分類され、それらは好中球、マクロファージの細胞集団に加え、未知の細胞集団 (クラスター X) から成ることが明らかとなった。このクラスター X の細胞集団は Transforming Growth Factor- β (TGF- β)^{3,4} や TGF- β の活性化を担う膜結合型タンパク Glycoprotein A repetitions predominant (GARP)⁵ を高発現する。興味深いことに、MI 後の末梢血中に、クラスター X の細胞集団が、CD11b 陽性ミエロイド細胞中 36.2 \pm 5.2% 存在することが明らかとなり、これらは心臓に限らず他臓器へも何らかの影響を及ぼすと考えられる。そこで本研究では、心腎症候群の新たなメカニズムを追究するべく、MI 後に生体内で発現上昇する新規ミエロイド細胞群が、心筋リモデリング及び CKD 病態に与える影響を検討する。

II. 対象・方法

(1) 病態モデルマウス及び遺伝子改変マウスを用いた

検討

マウス MI モデルは、C57BL/6J マウスの左冠動脈を結紮することで作製した⁶。糖尿病性腎臓病モデルは、C57BL/6J マウスに、クエン酸バッファーに溶解したストレプトゾシン (STZ) を 50mg/kg/day の用量で 5 日間連続腹腔内投与した。STZ 投与 4 週間後、解析に供した。ミエロイド細胞特異的 GARP または TGF β 3 欠損マウスは、LysM プロモーター下 Cre 発現マウスと GARP flox または TGF β 3 flox マウスを交配させて作製した (それぞれ GARP cKO、TGF β 3 cKO)。

(2) 心機能の評価

心機能の評価は心エコー法を用いて行った。

(3) 組織学的評価

心筋線維化はマッソントリクローム染色により評価した。またアポトーシスは TUNEL 染色により、マクロファージは抗 F4/80 抗体を用いた免疫染色により検出した。

(4) 培養マクロファージ

マウスの骨髄細胞を単離し、マクロファージコロニー刺激因子によりマクロファージに分化させた。分化後、リコンビナント TGF- β 3 を作用させ、cleaved caspase3 発現をウェスタンブロットにより検出することでアポトーシスを評価した。

(5) タンパク発現解析

GARP タンパクの発現は、フローサイトメトリーまたはウェスタンブロットングにより解析した。

(6) 統計解析

2 群間の比較は Student's *t*-test、多群間では多重比較検定により解析し、*P*<0.05 を有意差ありと判断した。

III. 結果

(1) ミエロイド細胞発現 GARP が心筋リモデリングに与える影響の検討

ミエロイド細胞で発現する GARP が心筋リモデリングに与える影響を検討するため、GARP cKO マウスを作製した。本マウスに MI を施し、心筋線維化を評価した。マッソントリクローム染色及び心エコーの結果、GARP-cKO において心筋線維化が抑制され、心機能の低下が抑制されていた (data not shown)。現在、本実験結果の再現性の評価を実施している。

(2) TGF-β3 flox が心筋リモデリングに与える影響の検討

クラスター X で特異性高く発現する TGF-β3 が心筋リモデリングに与える影響を検討するため、MI 後マウスに TGF-β3 中和抗体を投与した。経時的な心エコー解析の結果、TGF-β3 中和抗体投与マウスにおいて心機能の低下が抑制された (図 1)。また MI14 日後において、マッソントリクローム染色の結果、抗 TGF-β3 抗体投与群で心筋線維化の抑制が認められた (図 2)。また、心臓組織を用いた TUNEL 染色及び免疫染色の結果、マクロファージのアポトーシスが TGF-β3 中和抗体投与群で減少していることが明らかとなった。さらに、培養マクロファージにおいて、リコンビナント TGF-β3 がアポトーシスを惹起させた。加えて、TGF-β3 cKO マウスを作製し、現在、ミエロイド細胞特異的な TGF-β3 の心筋リモデリングにおける役割を評価している。

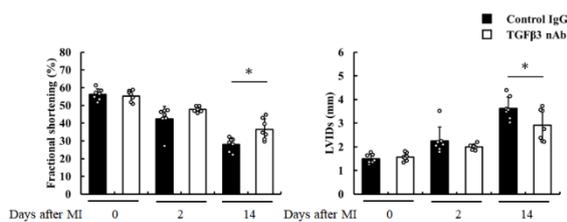


図 1: マウス MI モデルにおいて、TGF-β3 中和抗体は心機能の低下を抑制する。LVIDS: left ventricular end-systolic diameter



図 2: マウス MI モデルにおいて、TGF-β3 中和抗体は心筋線維化を抑制する。

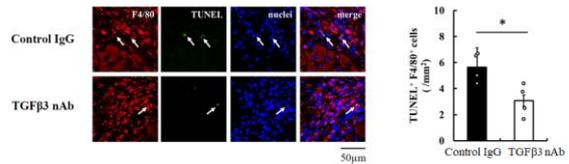


図 3: MI4 日目において、TGF-β3 中和抗体はマクロファージのアポトーシスを抑制する。

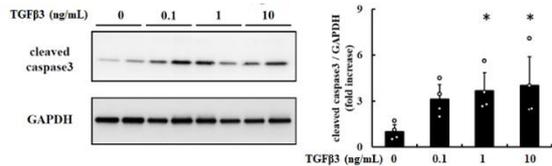


図 4: リコンビナント TGF-β3 により骨髄由来マクロファージの cleaved caspase3 発現が上昇する。

加えて、ミエロイド細胞特異的ジフテリア毒素受容体-GFP 融合タンパク発現マウスを作製した。今後、TRECK 法によりクラスター X を破壊したマウスを作製し、当該細胞の心疾患病態生理学的意義を追究する。

(3) 心腎症候群における GARP 陽性ミエロイド細胞の関与

心腎症候群における GARP 陽性ミエロイド細胞の関与を調べるため、MI4 日後、腎組織中の GARP 陽性ミエロイド細胞割合をフローサイトメトリーで評価した。その結果、MI 群の腎組織中の GARP 陽性ミエロイド細胞割合は、正常時の心臓と同程度であった (data not shown)。GARP 陽性ミエロイド細胞は傷害領域に遊走、浸潤することが示唆されたため、腎障害を誘発させるべく STZ 誘発糖尿病性腎臓病モデルを作製し、このマウスに MI を施した。腎組織中 GARP 発現をウェスタンブロット法により評価したところ、MI 群や糖尿病腎で GARP の発現上昇が認められた。一方、糖尿病に MI を付加しても腎組織中 GARP 発現の有意な変動は認められなかった。

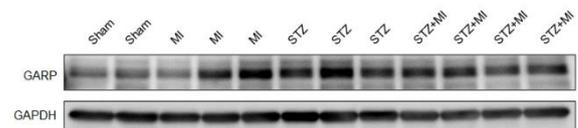


図 5: MI4 日の腎臓や糖尿病モデルマウスの腎臓で GARP タンパクの発現増加が認められた。

IV. 考察

本研究から、新規サブセットと考えられるミエロイ

ド細胞群が発現する GARP 及び TGF- β 3 が心筋リモデリング進展に寄与している可能性が示された。TGF- β 3 はマクロファージの細胞死に関与することを見出しつつあるが、GARP 及び TGF- β 3 の心筋リモデリング進展メカニズムについて、今後より詳細な検討が必要である。また、現状はミエロイド細胞に存在する分子の機能解析に留まっており、新規ミエロイド細胞サブセットとしての病態生理学的意義は不明である。我々はこれまでにミエロイド細胞特異的ジフテリア毒素受容体-GFP 融合タンパク発現マウスを作製してきた。また、GARP 陽性ミエロイド細胞について、より広範な網羅的解析を実施している。GARP または本サブセットをより特徴づける遺伝子のプロモーター下に Cre を有するマウスとミエロイド細胞特異的ジフテリア毒素受容体-GFP 融合タンパク発現マウスを交配させることで、当該サブセット欠失マウスを作製し、その病態生理学的意義を追究していく。

心腎症候群における当該サブセットの病態への関与は未だ不明である。我々のこれまでの検討から、MI 後 2~4 日と比較的早期に当該サブセットのミエロイド細胞が動員されていることから、急性傷害に反応性が高いと考えられる。そこで、まず急性腎障害における当該サブセットの関与を検討する。急性腎障害における当該サブセットの病態的意義が明らかになれば、心筋梗塞後心不全病態下における急性腎障害に与える影響を検討していく。他方、MI4 日後の腎臓では GARP 陽性ミエロイド細胞の割合は高くないものの、MI4 日後や糖尿病モデルマウスの腎臓で GARP タンパク発現の増加傾向が認められている。このことは、MI 後や糖尿病時に腎実質細胞で GARP が発現上昇している可能性を示唆する。GARP はヒト糸球体に特徴的に発現していることが知られている⁷。実際、我々もマウス糸球体、特にポドサイト（血液濾過における最終障壁を担う細胞）に GARP が発現していることを見出しているが、その機能は不明である。今後、心腎症候群における腎実質細胞の GARP の役割にも注目していく。

V. 結論

ミエロイド細胞に発現する GARP や TGF- β 3 が心筋リモデリング進展に影響を与えることが明らかとなった。今後、その詳細なメカニズムを追究するとともに、GARP や TGF- β 3 発現新規ミエロイド細胞サブセットの心・腎疾患や心腎症候群における役割などを解明していく。

VI. 研究協力者

藤尾 慈・大阪大学大学院薬学研究科・教授
富松 聖史・大阪大学大学院薬学研究科・大学院生
坂井 響・大阪大学薬学部・大学生

VII. 参考文献

1. Rangaswami J, Bhalla V, Blair JEA, Chang TI, et al. American Heart Association Council on the Kidney in Cardiovascular D and Council on Clinical C. Cardiorenal Syndrome: Classification, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Strategies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139:e840-e878.
2. Gembillo G, Visconti L, Giusti MA, Siligato R, et al. Cardiorenal Syndrome: New Pathways and Novel Biomarkers. *Biomolecules*. 2021;11.
3. Kumagai S, Nakayama H, Fujimoto M, Honda H, et al. Myeloid cell-derived LRG attenuates adverse cardiac remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2016;109:272-282.
4. Okamura T, Sumitomo S, Morita K, Iwasaki Y, et al. TGF- β 3-expressing CD4+CD25(-)LAG3+ regulatory T cells control humoral immune responses. *Nat Commun*. 2015;6:6329.
5. Wu BX, Li A, Lei L, Kaneko S, et al. Glycoprotein A repetitions predominant (GARP) positively regulates transforming growth factor (TGF) β 3 and is essential for mouse palatogenesis. *J Biol Chem*. 2017;292:18091-18097.
6. Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121:684-691.
7. Nystrom J, Fierlbeck W, Granqvist A, Kulak SC, et al. A human glomerular SAGE transcriptome database. *BMC Nephrol*. 2009;10:13.

慢性腎臓病を合併した心不全における「腎-脳-心連関」の機序解明

九州大学病院 ARO 次世代医療センター/循環器内科・特任助教
篠原 啓介

I. 緒言

心-腎連関と交感神経系

心臓病と腎臓病が互いに関連しあう「心-腎連関」という現象はよく知られているが、両臓器間の連携機序はいまだ不明な点が多い。心臓や腎臓のコントロールを含む循環調節には交感神経系が重要である。慢性的な交感神経活動の亢進は、心臓のリモデリング（心肥大や左室収縮能・拡張能の低下）や腎障害の進行、また腎臓からのレニン分泌増加を介したレニン・アンジオテンシン系の亢進などを引き起こし、心不全の病態を進展させる。

「腎→脳」を連携する腎交感神経求心路

交感神経系の調節において中心的な役割を果たすのは脳である。脳は末梢からの様々な入力を受け、その情報を統合・調節し交感神経活動を規定している。腎臓交感神経は遠心路と求心路から成り、脳から出力された交感神経活動は腎神経遠心路を介して腎臓に伝わる。一方、腎臓には感覚神経終末が存在し、感覚神経の神経活動は腎神経求心路を介して脳に入力される（図1）。腎交感神経求心路が腎障害により活性化することや、同求心路の急性刺激により、脳から末梢へ出力される交感神経活動が増加することが示唆されている。そこで我々は、「慢性腎臓病を合併する心不全において、腎交感神経求心路を介したさらなる交感神経活性化が心不全の悪循環の病態形成に寄与する」という仮説を立てた。

交感神経系調節の脳内機序

腎交感神経求心路からの神経活動は、視床下部の室傍核（PVN）に入力される[1]。腎交感神経求心路の刺激により PVN のバソプレシン産生ニューロンが興奮すること[2]、PVN のバソプレシン産生増加により同神経核に存在する交感神経調節ニューロンが興奮すること[3]が示されている。PVN の交感神経調節ニュー

ロンは延髄の頭側腹外側野（RVLM）に伝わり、同部位の神経興奮によって最終的に交感神経活動が規定される（図1）。したがって、腎交感神経求心路からの入力を受けて交感神経活動を制御する脳内機序として、PVN のバソプレシン産生増加を介した交感神経調節ニューロンの神経興奮が関与する可能性がある。

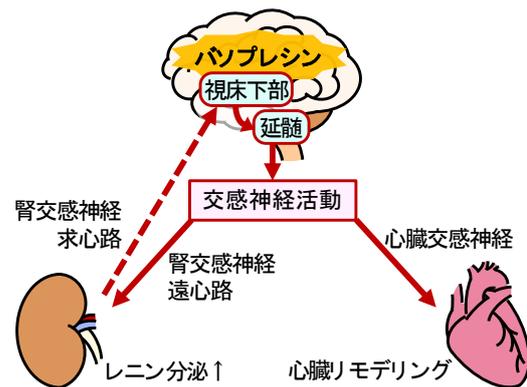


図1 「腎→脳→心」の臓器連携

研究の目的

慢性腎障害を伴う心不全モデル動物において、以下を明らかにする。

- (1) 腎交感神経求心路の選択的除神経により、全身の交感神経活動が低下し心不全が改善するか（＝腎交感神経求心路の心不全病態への寄与）
- (2) 腎交感神経求心路を介した脳への入力が、視床下部バソプレシン産生を介して交感神経出力を調節するか（＝「腎→脳→心」の連携における脳内機序：視床下部バソプレシン産生の寄与）

II. 対象・方法

(1) 腎障害を伴う心不全モデルにおける腎交感神経求心路の心不全病態への寄与の検証

Dahl 食塩感受性ラットは、腎障害を伴う高血圧性

心疾患による心不全モデルとして広く用いられている。Dahl 食塩感受性ラットに 6 週齢より高食塩負荷 (high salt: HS) を行い、血圧上昇や心肥大、腎障害を来している 9 週齢時に、腎神経遠心路・求心路ともに除神経する total RDN (HS-TRDN 群)、腎神経求心路を選択的に除神経する afferent RDN (HS-ARDN 群)、または sham 手術 (HS-sham 群) を行う。対照群は低塩食 (low salt: LS) を与え sham 手術を行う (LS 群)。

血圧、心機能 (心エコー) を経時的に測定し、左室収縮能の低下を伴う心不全期にあたる 16 週齢時に、心不全の表現型の評価を行う。

(2) 「腎→脳→心」の連携に関わる交感神経系の脳内制御機構の解明：視床下部バソプレシンの寄与の検証

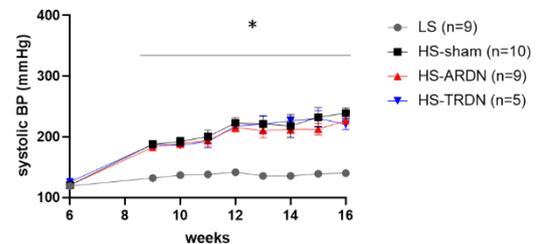
上記(1)で ARDN により心不全の改善が得られる場合においても、心不全の改善の結果として視床下部のバソプレシン産生や交感神経調節ニューロンの興奮が抑制されるのか、腎交感神経求心路を介した交感神経活動亢進の原因として視床下部のバソプレシン産生ニューロンの活性化が寄与するのか、は不明のままである。そこで、まだ心不全を呈していない心肥大期である 12 週齢時に、対照群 (低塩食+sham 手術)、sham 群 (高塩食+sham 手術)、ARDN 群 (高塩食+ARDN 手術) の 3 群で評価を行い、腎交感神経求心路-視床下部-交感神経出力の連携を明らかにする。特に、脳組織を用いて、交感神経出力に重要な神経核である PVN と RVLN における神経興奮と、PVN のバソプレシン産生ニューロンの活性を評価する。

III. 結果

(1) 心不全進展における ARDN の効果

高食塩負荷により血圧は上昇し、ARDN ならびに TRDN による降圧効果は見られなかった (図 2)。左室重量および肺重量は高食塩負荷により増加したが、ARDN、TRDN により肺重量は同等に抑制された (図 3)。左室の ANP mRNA の発現は、高食塩負荷で増加し、ARDN で有意に抑制された。心エコーでは、LS 群と比較し、HS-sham 群、HS-ARDN 群、HS-TRDN 群ともに左室壁厚 (左室中隔+後壁) は増加した。左室内径短縮率で表される左室収縮能は、高食塩負荷により低下したが、ARDN ならびに TRDN で同等に低下が抑制された (図 4)。組織学的評価による左室の線維化は、高食塩負荷により有意に増加したが、ARDN、TRDN ともに同等に抑制された。

これらの結果より、腎障害合併の高血圧性心不全モデルラットにおいて、ARDN による心不全改善効果が示唆された。さらに、ARDN と TRDN の心不全改善効果が同等であったことから、TRDN による効果の機序として、腎交感神経求心路の除神経の寄与が大部分を占めることが示唆された。



P<0.001 two-way repeated measured ANOVA
*p<0.05, sham, ARDN, and TRDN vs LS

図2 収縮期血圧の推移

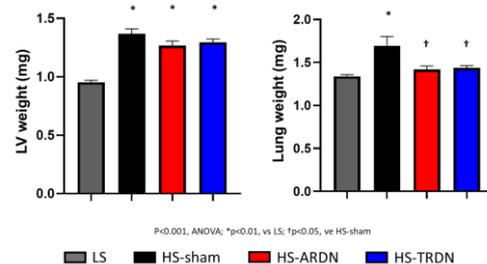


図3 左室重量と肺重量の変化

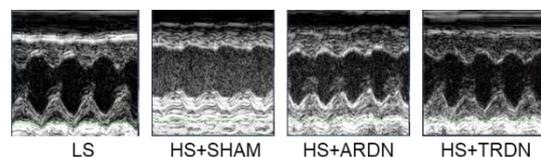


図4 16 週齢時の心エコー (左室 M モード)

(2) 腎求心性神経入力を介した交感神経活動亢進における視床下部バソプレシン産生ニューロンの関連

心肥大期の 12 週齢時に、心臓と神経体液性因子、脳の評価を行った。心エコーでは、LS 群と比較し、HS-sham 群、HS-ARDN 群ともに左室壁厚は増加した。左室内径短縮率は、HS-sham 群と HS-ARDN 群とで有意差はなかった。血漿ノルエピネフリンは、LS 群と比較し、HS-sham 群で有意に増加したが、HS-ARDN 群では有意な増加を認めなかった。血清浸透圧は高食塩負荷により HS-sham 群、HS-ARDN 群ともに増加した。高食塩負荷により、PVN のバソプレシン産生ニューロンは著明に活性化したが、ARDN により有意に活性化が抑制された (図 5)。PVN の交感神経調節ニューロンも、高食塩負荷により活性化したが、ARDN により有意に活性化が抑制された。PVN

の交感神経調節ニューロンからの入力を受ける RVLN においても、高食塩負荷により神経活性が亢進し、ARDN により活性化が抑制された。

これらの結果より、腎障害合併の高血圧性心不全モデルラットにおいて、心不全を呈する前の心肥大期に交感神経活性化が起こっていることが示唆され、その活性化機序に腎交感神経求心路一視床下部 PVN のバソプレシン産生ニューロンが寄与している可能性が示唆された。

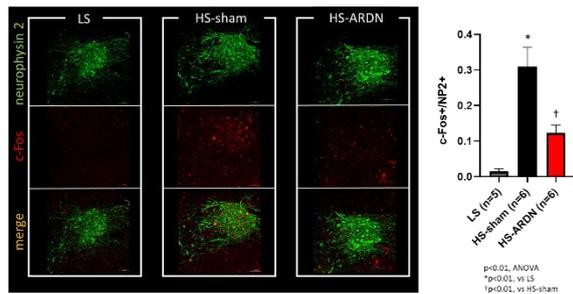


図5 PVN のバソプレシン産生ニューロン活性
neurophysin 2 : バソプレシン代替マーカー
c-Fos : 神経興奮マーカー

IV. 考察

本研究により、慢性腎臓病合併の高血圧性心不全モデルにおいて、腎交感神経求心路の活性化が脳からの交感神経出力を亢進させ心不全の病態進展に寄与することが示唆された。さらに、腎交感神経求心路の入力先である PVN でのバソプレシン産生ニューロンの活性化が、交感神経調節ニューロンの神経興奮に関連する可能性が示唆された。

腎交感神経除神経を行い、心不全における腎交感神経の役割を示した既報はある。しかし、従来の腎交感神経除神経では腎神経遠心路と求心路の両方が除神経されるため、腎神経求心路のみの役割は不明のままであった。腎神経遠心路の興奮は、腎臓でのレニン分泌増加を介したレニン・アンジオテンシン系の亢進や、尿細管での Na 再吸収、腎血流低下などを引き起こし、主に体液貯留の病態と関連するため、従来の腎交感神経除神経では遠心路の除神経による効果が心不全改善に大きく寄与している可能性が高い。すなわち、腎障害から心不全増悪に至る「腎・心の臓器連関による病態形成機序」に迫ることはできていない。我々は、近年開発された腎神経求心路を選択的に除神経する ARDN の手技を用いて[4]、本研究により「腎→脳→心」の臓器連関機序を明らかにした。

PVN のバソプレシン産生ニューロンにより産生さ

れたバソプレシンは、軸索輸送によって下垂体後葉に運ばれ、血中に分泌される。軸索輸送されるバソプレシンは、同じく PVN に存在する交感神経調節ニューロンに発現するバソプレシン受容体に作用し、同ニューロンを興奮させ交感神経活性化を引き起こす[3]。本研究では、腎交感神経求心路を介した PVN バソプレシン産生ニューロンの活性化が、PVN の交感神経調節ニューロンの活性化と関連することを示したが、実際にバソプレシン受容体を介して交感神経調節ニューロンの活性化が起きたかは明らかにできていない。今後のさらなる研究でこの点を明らかにしていきたい。

V. 結論

慢性腎臓病合併の高血圧性心不全において、腎交感神経求心路の活性化は、脳からの交感神経出力を亢進させ心不全の病態進展に寄与する。さらに、腎交感神経求心路の入力先である PVN でのバソプレシン産生ニューロンの活性化が、交感神経調節ニューロンの神経興奮に関連する可能性が示唆された。本研究により、「腎-脳-心連関」の機序の一部が明らかとなった。さらに研究を進展させ、多臓器連関に着目した心不全の進展予防・治療法開発につなげたい。

VI. 研究協力者

なし

VII. 参考文献

- Osborn JW, Foss JD. Renal Nerves and Long-Term Control of Arterial Pressure. *Compre Physiol.* 2017;7(2):263-320.
- Ciriello J. Afferent renal inputs to paraventricular nucleus vasopressin and oxytocin neurosecretory neurons. *Am J Physiol.* 1998;275(6):R1745-1754.
- Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, et al. Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. *Neuron.* 2013;78(6):1036-1049.
- Foss JD, Wainford RD, Engeland WC, et al. A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;308(2):R112-122.

心不全時の造血幹細胞のエピゲノム変化が 引き起こす慢性腎臓病

東京大学医学部附属病院・循環器内科 助教
中山 幸輝

I. 緒言

高齢化に伴って心不全の罹患率は増加し、医療経済を逼迫させている。一度心不全を発症し入院すると、入院退院を繰り返し、慢性腎臓病をはじめとする全身合併症を伴って最終的には心不全悪液質の状態となる。神経内分泌物質を対象とするこれまでの薬物治療に加えた新規の治療標的の同定が望まれている。

II. 対象・方法

マウスの圧負荷心不全モデルを用いて、その骨髄を移植したマウスの心機能を評価したところ、慢性期に心機能が低下し、線維化が進行した。心不全後に骨髄造血幹細胞 (HSC) のエピゲノムが変化し、間質の免疫細胞の表現型が変わることで、心筋実質との相互作用を介した恒常性維持が破綻するのではないかと仮説を立てた。①心不全 HSC 由来の心臓マクロファージの分化様式を解析し、心機能低下の分子機序を解明する。②また、腎臓を含めた、心臓以外の臓器における機能解析を行うこととした。

III. 結果

①心不全マウスの HSC と、コントロールマウスの HSC を移植した場合と比較して、心臓保護的な組織マクロファージへの分化様式¹⁾が変化するかを解析した。1細胞発現解析において、心不全 HSC 由来の心臓マクロファージは、より未分化な領域に集まり、炎症性遺伝子群の発現が亢進した (図 1)。心不全後の HSC の発現解析、エピゲノム解析では TGF β シグナルが低下しており、TGF β 阻害薬投与後の HSC の発現様式は心不全後の HSC と近似していた。以上のように、エピゲノムが変化した心不全後の HSC は末梢血でミエロイドシフトする一方で、心臓間質においては保護的役割を失い、炎症性サイトカインの発現が亢進することで、心臓線維化を進めることが分かった。

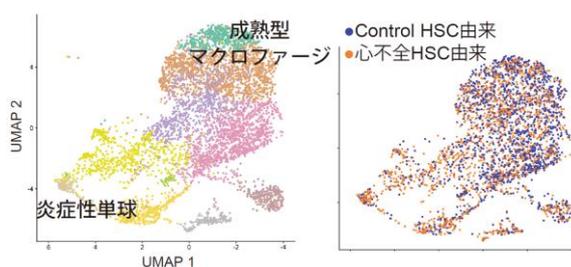


図 1 左: クラスターに分けた、移植後心臓マクロファージの 1細胞発現解析. 右: 細胞起源に分けた表記, 心不全 HSC 由来細胞は炎症性単球に多くプロットされた

②心不全マウスの骨髄移植後に尿管結紮モデルを作成すると、コントロールマウスの骨髄移植後と比較して炎症性マクロファージがより多く集まり線維化が進行した。また、レシピエントマウスの心不全モデルの腎臓で尿細管障害と線維化マーカー亢進を認めた。

IV. 考察

心不全を起こすと HSC のエピゲノムが変化して、末梢血、組織内でのマクロファージ分化においても、表現型が変化する。心不全時の骨髄ニッチを解析することは心不全の病態解明に繋がる可能性があった。

V. 結論

心不全に伴う腎臓を始めとする全身合併症の共通基盤として、HSC の表現型が変わることが分かった。

VI. 研究協力者

藤生克仁・東京大学大学院医学系研究科・特任准教授
小室一成・東京大学大学院医学系研究科・教授

VII. 参考文献

1) 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.