

16. クローン性造血を介した心収縮能の保たれた心不全病態の解明

名古屋大学医学部附属病院循環器内科 病院助教 由良 義充

概要

研究目的

心収縮機能が保たれた心不全（HFpEF）は、病態生理が十分に解明されておらず、有効な治療薬が限定的な難治性疾患である。一方、造血幹細胞に後天的に遺伝子変異（体細胞変異）が生じ、加齢とともにその変異細胞が骨髄で増殖する状態「クローン性造血」は、疫学および実験的研究から心血管疾患の独立した危険因子であることが報告され、心血管病の病因解明における重要な新知見として大きな注目を集めている。本研究では、クローン性造血が HFpEF 病態に与える影響を基礎実験および疫学的解析から検討し、病態の解明と新規診断・治療の創出を目指す。

研究手法

野生型マウスに遺伝子変異を有するマウスから採取した骨髄を移植することで、血液細胞の一部にのみ遺伝子変異を持つクローン性造血モデルマウスを作成した。その後、このマウスに高脂肪食（HFD）と L-NAME（NOS 阻害剤）を投与し、HFpEF を発症させる病態モデルを用いた。変異免疫細胞が心臓に影響を与えるメカニズムについて調べるために、HFpEF を発症した心臓から変異細胞を FACS で分離し、RNA シークエンス解析を行った。さらに、エラー修正次世代シークエンス法を用いて、HFpEF 患者におけるクローン性造血の頻度や種類を明らかにし、クローン性造血が HFpEF 患者の予後に与える影響を検証した。

研究成果

クローン性造血モデルマウスでは、HFpEF の表現型が悪化し、心筋肥大および繊維化の増強が確認された。また、Tet2 変異細胞は HFD/L-NAME 刺激により末梢血、心臓、骨髄それぞれにおいて、強い増殖を示した（論文 1 Circulation 2023）。Tet2 遺伝子変異を有するマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームが活性化し、炎症性の強い表現型を呈することを確認した（論文 2 Circ Res 2024）。さらに新たに開発したエラー修正シークエンス法によって解析すると、HFpEF 患者において DNMT3A、TET2 遺伝子変異を有する患者が多く、クローン性造血を有する場合に、心血管疾患関連入院頻度が高いことが明らかとなった。

まとめ

このように本研究では、クローン性造血が HFpEF 病態を悪化させることを基礎実験および疫学的解析から明らかにした。引き続き、細胞間相互作用に着目し、詳細なメカニズムの解明に繋げる研究を進めており、今後はこれらの知見に基づく新規診断や治療法の開発が期待される。

背景および目的

心収縮機能が保たれた心不全（Heart Failure with preserved Ejection Fraction：HFpEF）は現在の心血管病診療における最大のアンメットメディカルニーズの一つであるとされている。心臓の機能障害が原因で息切れや倦怠感などの症状が現れる心不全患者の中で、左心室壁が菲薄化し、心収縮機能が低下するタイプ（HF_rEF）は古くから知られていた。しかし、2000 年代に入り、心収縮機能が正常であるにもかかわらず、心拡張機能が低下し、左心室壁が肥厚するタイプの心不全患者（HFpEF）の存在が初めて指摘され、その後、HFpEF は実臨床において

高齢者心不全の約半数を占める頻度の高い疾患であることが明らかになったが、HFpEF の病態生理は依然として十分に解明されておらず、有効な治療法も限られている。一方、造血幹細胞に加齢と共に体細胞変異が生じ適応性の高いクローンが増幅される現象「クローン性造血」は、動脈硬化、心不全の独立した危険因子であると報告されている。これは、造血幹細胞に生じた体細胞変異が分化した末梢血液細胞にも引き継がれ、機能変化を起こすことが原因と考えられている。代表研究者もこれまでに、クローン性造血が種々の心血管疾患の病態を増悪させることを報告してきた。しかし、クローン性造血と HFpEF の関連性を検証した報告はない。本研究では、クローン性造血が HFpEF 病態の発症に関連しているという仮説のもと、動物実験、疫学的な解析を通じて HFpEF の新たな病態生理を明らかにし、新規診断・治療の開発につなげることを目指す。

方法、結果

クローン性造血モデルマウスを作成し、そのマウスに HFpEF 病態を発症させることにより、クローン性造血が病態に与える影響を明らかにした。本研究では疫学的に最も高頻度に検出される遺伝子の一つである DNA 脱メチル化酵素 (Ten-Eleven Translocation-2:TET2) に着目し、クローン性造血モデルマウスの作成には、野生型マウスに、Tet2 遺伝子変異を有するマウスから採取した骨髄を大量かつ複数回 (5x10⁶、3 日間) 移植する手法を用いた。骨髄内には造血幹細胞が生着するわずかなフリースペースが存在すると言われており、少量の生着した Tet2^{-/-} 造血幹細胞は移植先骨髄内で競合優位的に増殖し、1 ヶ月後には変異細胞を 10-20% 有する Tet2 クローン性造血モデルマウスを作成できる。HFpEF モデルマウスに関しては、野生型マウスに高脂肪食 (HFD) と NO 合成酵素阻害剤 (L-NAME) を投与することで、マウスに糖尿病・脂質異常と高血圧をともに発症させると、心収縮力には影響を与えず、拡張障害を引き起こす (HFpEF モデルマウス) 手法を用いる。Tet2 クローン性造血モデルマウスに HFD+L-NAME 処理を行い、末梢血液における変異細胞の割合と心臓機能の経時的な変化を定量した。末梢血液のフローサイトメトリー解析を行うと、変異細胞 (ドナー由来細胞) は正常細胞 (レシピエント由来細胞) と比べて経時的に著明に割合が増加し、さらに HFD+L-NAME 処理により、さらに増強が確認された。

これらのマウスにおいて心臓機能を評価すると、両群において心臓の収縮能は変化しなかったが、拡張能 (E/e[']) が低下し、Tet2^{-/-} 群において Tet2^{+/+} 群と比べて強い拡張能障害が惹起された。このマウスでは、心筋間質繊維化 (%Fibrosis)、心筋細胞表面積 (CSA) 拡大が増強していることが確認された。これらの実験結果から、高血圧や糖尿病といった刺激によりクローン性造血が増強する可能性、クローン性造血が免疫・炎症を介して HFpEF の発症および進展に寄与する可能性が示唆された。

Tet2 クローン性造血が HFpEF の心臓における繊維化や拡張障害にどのように寄与するかを明らかにするため、Tet2^{+/+} および Tet2^{-/-} HFpEF モデルマウスの心臓から、CD45+CD64+Ly6G-Ly6C-のマクロファージを分離し、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を実施した。Tet2^{-/-} マクロファージでは、破骨細胞分化、IL-17 シグナル伝達経路、Toll 様受容体 (TLR) 経路、NF- κ B 経路を含む複数の炎症およびインフラマソーム関連遺伝子の発現変動が観察された。これらのシグナル伝達経路により、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 β の分泌が促進される。IL-1 β は、不活性型である ProIL-1 β から、NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) インフラマソームによって活性化された Caspase-1 により切断され、活性型 IL-1 β となる。そこで、Tet2^{-/-} 骨髄由来マクロファージを解析したところ、実際に Caspase-1 の活性が上昇していることが確認された。さらに、組織レベルでの遺伝子発現解析においても、Tet2 クローン性造血の HFpEF モデルマウスの心臓において、IL-1 β の発現が増加しており、アンジオテンシン II で刺激した Tet2 クローン性造血モデルマウスでは、血清中の IL-1 β タンパク質濃度が著しく上昇していた。これらの結果から、Tet2^{-/-} マクロファージが NLRP3 インフラマソームの活性化を介して炎症反応を引き起こし、組織傷害および線維化を助長し HFpEF を悪化させている可能性が示唆された。以上より、クローン性造血に由来する免疫細胞が炎症応答を変化させ、それが病態悪化に寄与している可能性が示された。

ここまでクローン性造血が HFpEF の表現型を悪化させることをマウスモデルから検証してきたが、今後これらの知見を臨床応用に繋げるためには、ヒトにおける検証が重要となる。そのため、我々は HFpEF 患者 (70 歳以上、57 人) の末梢血 DNA を新規開発したエラー修正次世代シークエンスの手法で解析した。この患者群にお

いては一般健常者集団よりも高い割合である約半数（27人）にクローン性造血を検出した。変異遺伝子の種類は、DNMT3A、TET2、ASXL1といったクローン性造血によく見られる遺伝子が検出されたが、その中でもTET2の遺伝子変異が高頻度に検出された。そしてこれらの患者を前向きにフォローしたところ、クローン性造血を有する場合に、心血管疾患関連入院の頻度が高いことが確認された。特にDNMT3AまたはTET2変異を持つHFpEF患者の場合、心血管疾患関連の入院リスクが4倍以上となることが判明した。このように動物実験から得られた知見をヒトにおいても検証することで、強固に仮説を検証することができた。

結果とまとめ

本研究では、クローン性造血がHFpEFの病態を悪化させるという仮説を基礎実験および疫学的解析に基づいて検証した。これまでの研究では、クローン性造血が動脈硬化や虚血性心不全の進展に寄与することが報告されていたが、我々は世界に先駆けて、クローン性造血がHFpEFの病態も悪化させることを明らかにした（Graphical Abstract）。HFpEFの病態生理は依然として解明途上であるが、最近では糖尿病、脂質異常症、高血圧などのメタボリック症候群に伴う全身性の慢性炎症がその病態に重要な役割を果たしていると提唱されている。本研究では、クローン性造血に着目することで、これらの知見に新たな視点を加え、HFpEFの病態を理解する上で新しい病態生理の枠組みを示した。この知見に基づき、HFpEF患者における予後不良群の同定や新規治療法の開発が期待されるため極めて重要な成果であると考えている。本研究期間中には、変異を持つ免疫細胞が他の免疫細胞群や心臓の構成細胞（線維芽細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞）にどのように影響を与え、病態に関与しているかを完全には解明することはできなかったが、現在はHFpEF心臓におけるシングルセル解析を進めており、細胞間相互作用に基づくさらなる知見が得られることが期待される。

本研究は、免疫細胞における体細胞変異という新しい視点から心血管病の病態生理を解明することで、将来の循環器疾患治療においてゲノム医療の新たな展開を促す可能性がある。具体的には、HFpEF患者においてクローン性造血の有無や程度を確認し、リスクの高い群を特定することで、個別化医療の導入が検討される。これまで循環器領域におけるゲノム医療は、主に遺伝性変異（生殖細胞変異）を解析し、遺伝性心筋症や不整脈の病態理解を深めてきたが、後天的に獲得される体細胞変異に着目した研究はまだ始まったばかりであり、今後さらに大きな発展が期待される。

(完)

発表論文

- 1) Cochran JD, Yura Y, Thel MC, Doviak H, Polizio AH, Arai Y, Arai Y, Horitani K, Park E, Chavkin NW, Kour A, Sano S, Mahajan N, Evans M, Huba M, Naya NM, Sun H, Ban YH, Hirschi KK, Toldo S, Abbate A, Druley TE, Ruberg FL, Maurer MS, Ezekowitz JA, Dyck JRB, Walsh K. Clonal Hematopoiesis in Clinical and Experimental Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2023 Oct 10;148(15):1165-1178.
- 2) Polizio AH, Marino L*, Min KD*, Yura Y*, Rolauer L, Cochran JD, Evans MA, Park E, Doviak H, Miura-Yura E, Good ME, Wolpe AG, Grandoch M, Isakson B, Walsh K. Experimental TET2 Clonal Hematopoiesis Predisposes to Renal Hypertension Through an Inflammasome-Mediated Mechanism. *Circ Res*. 2024 Sep 5.
- 3) Hiraiwa H, Yura Y, Okumura T, Murohara T. Interplay of the heart, spleen, and bone marrow in heart failure: the role of splenic extramedullary hematopoiesis. *Heart Fail Rev*. 2024 Sep;29(5):1049-1063.
- 4) Yoshida S, Yoshida T, Inukai K, Kato K, Yura Y, Hattori T, Enomoto A, Ohashi K, Okumura T, Ouchi N, Kawase H, Wettschureck N, Offermanns S, Murohara T, Takefuji M. Protein kinase N promotes cardiac fibrosis in heart failure by fibroblast-to-myofibroblast conversion. *Nat Commun*. 2024 Sep 12;15(1):7638.