

急性心筋梗塞後病態における
プログラニュリンの役割に関する研究

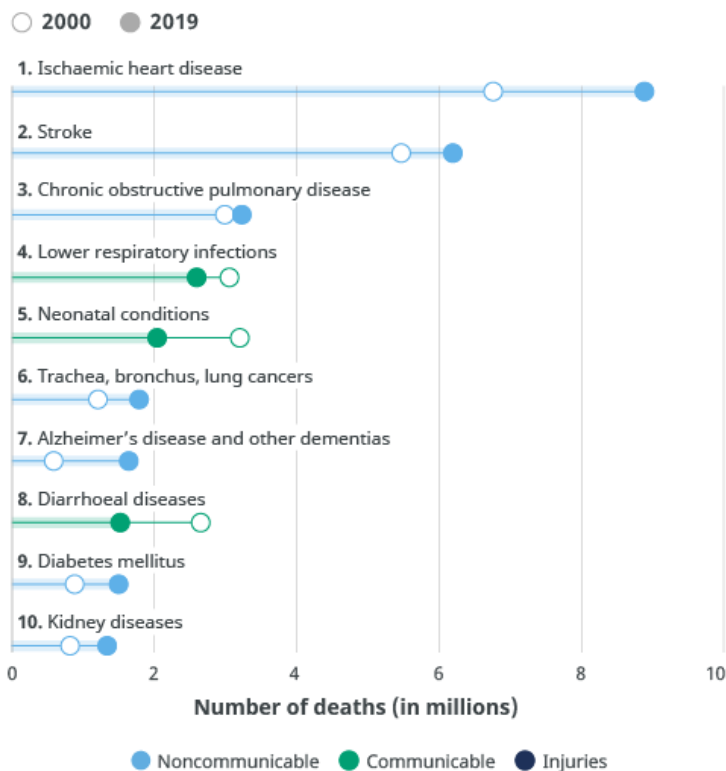
佐々木 貴寛

目次	
序論	2 頁
第 1 章 心筋梗塞後リモデリングにおけるプログラニュリンの関与	8 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料および方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 マクロファージにおけるプログラニュリンの関与	50 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料および方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 プログラニュリンの心筋虚血再灌流障害に対する保護作用	72 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料および方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括および結論	89 頁
謝辞	92 頁
引用文献	94 頁
略語一覧表	112 頁

序論

虚血性心疾患は世界における死因の第1位であり、世界総死亡者数の約16%を占める(1)。虚血性心疾患の罹患者数は、2020年の時点で2億4410万人と推定されている(2)。また、世界保健機関(World Health Organization: WHO)の世界医療統計(Global Health Estimates: GHE)において、虚血性心疾患による死亡者数は2000年から2019年までに200万人以上増加し、2019年には890万人に達したと報告されている(Figure 1)(1)。世界銀行の調査に基づく国民総所得別世界経済の分類別に着目しても、虚血性心疾患はいずれもトップ3の死因に位置しており、経済状況に依存せず非常に高い死亡者数を保持する(1)。加えて、虚血性心疾患に対する2016年の年間医療費は、米国で800億ドル、日本で7,399億円と推定されている(3, 4)。虚血性心疾患罹患者は、定期的な医療

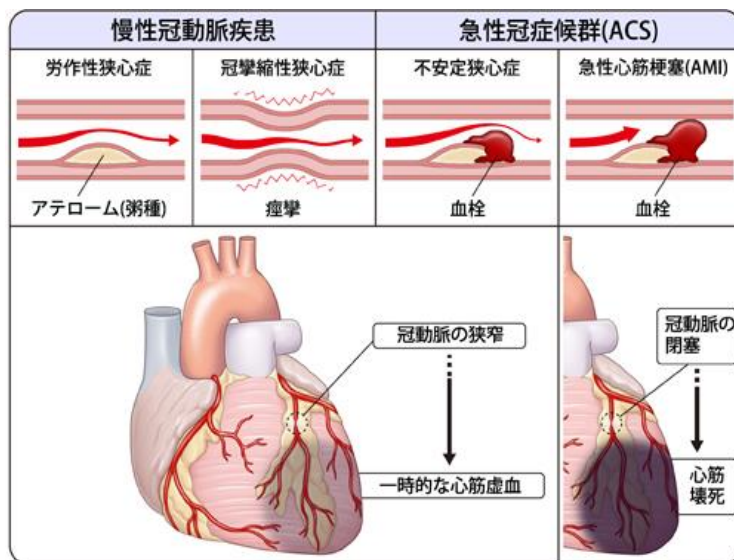
Leading causes of death globally



機関の受診、継続的な治療薬の服用、心機能障害に起因する運動耐容能の低下等により、身体的、精神的、経済的な負担が非常に大きく、生活の質を著しく低下させる。以上より、虚血性心疾患に対する治療法の発展は、超高齢社会の現代における平均寿命および健康寿命の延伸に寄与する。

Figure 1 The top 10 causes of death worldwide [世界保健機関 世界医療統計より引用]

虚血性心疾患は、急性冠症候群と慢性冠動脈疾患に分類される (Figure 2) (5)。前者は、不安定狭心症、急性心筋梗塞、虚血による心臓突然死を包括した疾患概念であり、後者は、労作性狭心症、冠攣縮性狭心症から成る疾患群を表す (6, 7)。急性冠症候群では、冠動脈粥腫 (プラーク) の破綻とそれに伴う血栓形成により冠動脈の高度狭窄または閉塞をきたし急性心筋虚血を呈する (6)。一方、慢性冠動脈疾患では、動脈硬化の進展に伴う冠動脈の狭窄または冠動脈の一時的な痙攣により血液循環が障害される (7)。慢性冠動脈疾患は、緩徐進行性あるいは一過性の病態であるため、急性冠症候群と比較して致死性は低い。また、不安定狭心症は一時的な心筋虚血を呈するが、心筋壊死には至らず心機能は維持される (8)。一方、急性心筋梗塞は不安定狭心症が進行した病態であり、心



筋虚血の遷延化により心筋壊死が誘導されるため、循環不全を含む致命的な経過をしばしば辿る。以上より、虚血性心疾患における主要な死因は急性冠症候群、特に急性心筋梗塞と考えられる。

Figure 2 Classification of acute coronary syndrome by pathological process

[慶応義塾大学病院 医療・健康情報サイトより引用]

急性心筋梗塞は、冠動脈の血栓閉塞に起因する心筋壊死によって特徴付けられる (9)。急性心筋梗塞では、ポンプ機能障害や致死性不整脈による心原性ショックをしばしば伴うため、突然死の最も主要な原因となる (10)。急性心筋梗塞に対する治療として、経皮的冠動脈形成術を含む再灌流療法が第一に選択される (6)。経皮的冠動脈形成術とは、血管内にカテーテルを挿入し、バルーン

またはステントを用いて冠動脈内を拡張する低侵襲的な治療法を指す。経皮的冠動脈形成術の発展および普及により、急性心筋梗塞発症後の救命率および院内予後は劇的に改善された (11, 12)。しかしながら、再灌流療法後に左室収縮機能が改善されても心不全や重篤な不整脈等の合併症は高率に生じる (13–15)。また、血流再開時には虚血再灌流障害と呼ばれる副次的かつ不可避な梗塞拡大を伴う機能障害が生じる (16)。左心室心筋の 20%以上が梗塞に陥ると心不全徴候が出現する (17)。以上の観点から、急性心筋梗塞における臨床課題は、急性期における梗塞拡大とその後の心不全進展および不整脈発生を抑制することである。

心不全は「なんらかの心臓機能障害、すなわち、心臓に器質的および／または機能的異常が生じてポンプ機能の代償機転が破綻した結果、呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し、それに伴い運動耐用能が低下する臨床症候群」と定義される (18)。心不全罹患者は、世界において急激に増加しており、2016 年時点で 6,000 万人を超える (19)。心不全罹患者の基礎疾患として、虚血性心疾患が 53% を占めており、心不全有病率の増加は急性心筋梗塞の救命率向上に関連している (20–22)。心不全罹患者は、入院治療が必要なため再入院を繰り返し、5 年以内に 50%程度が死に至る等、未だに生命予後が不良である (23–26)。急性心筋梗塞後には、心拍出量および組織統合性を維持するために、左室肥大化および線維化形成を含む心臓リモデリングが誘導される。しかしながら、それら代償機転の遷延化は左室収縮能を障害し心不全の進展に寄与する (Figure 3) (18)。また、左室収縮不全に合併する心臓伝導障害は、有害な心臓リモデリングを促進して生命予後を悪化させる (27)。急性心筋梗塞後には、レニン・アンジオテンシン系阻害薬や交感神経系 β 遮断薬等を含む薬物療法が継続的に実施される。しかしながら、現在の薬物療法では、心不全の発症および進展を完全には抑制

できないため、未だに致死的な経過をたどる患者も多い (28, 29)。したがって、急性心筋梗塞後病態の理解並びに新規治療標的の探索は、生命予後を改善する上で非常に重要である。

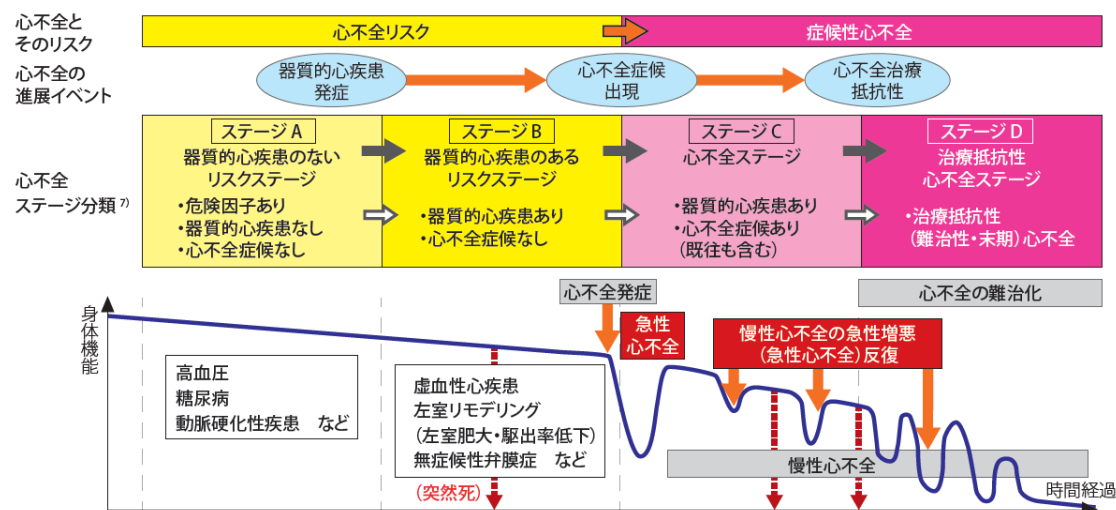


Figure 3 Progressive stages of heart failure

[急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017年改訂版) より引用]

マクロファージは、Metchnikoff によって異物を貪食する免疫細胞として発見された (30)。臓器に存在するマクロファージは、胎生期の卵黄嚢や肝臓に由来する組織常在性マクロファージと出生後の骨髄に由来するマクロファージが混在したヘテロな細胞集団として、恒常性維持および病態生理に関与する (31)。特に組織損傷後には、病変部位に動員された骨髄由来単球がマクロファージに分化し、その表現型を可塑的に変化させながら、炎症応答と次いで組織修復に寄与する (31)。マクロファージの表現型は、リポ多糖 (lipopolysaccharides: LPS) およびインターフェロン- γ (interferon- γ : IFN- γ) による古典的活性化を介して誘導される M1 型とインターロイキン (interleukin: IL) -4 および IL-13 による代替的活性化を介して誘導される M2 型に広義に分類される (Figure 4) (32–34)。M1 マクロファージは、炎症性サイトカインやプロテアーゼの産生を介して炎症応答を促進する (35)。M2 マクロファージは、抗炎症性サイトカインや線維化関連因子の産生を介して組織修復に貢献する (36)。急性心

筋梗塞後の病態は、単球の浸潤と死細胞の除去が起こる炎症期とコラーゲン沈着や血管形成等が亢進する修復期の過程を順に経て進行する (37)。両者共に心臓恒常性維持に必須であるが、炎症応答の遷延化および過剰な線維化は心臓リモデリングを増悪させる (38, 39)。マクロファージは、その亜集団を M1 型から M2 型へと変遷させ、炎症期から修復期への移行に寄与するため、急性心筋梗塞後の生命予後を左右する要因である。したがって、急性心筋梗塞後に有害な心臓リモデリングを緩和するためには、心臓マクロファージ亜集団の表現型を制御する因子を理解し、炎症応答及び組織修復の過程を適切に進行させることが重要である。

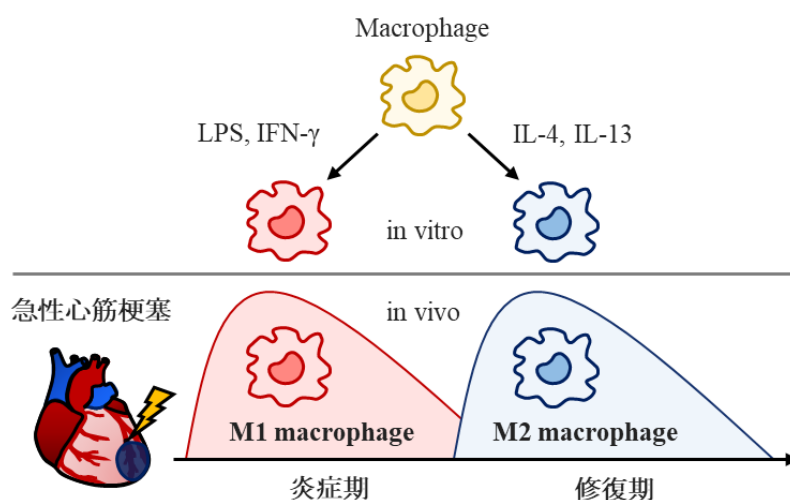


Figure 4 Macrophage polarization after acute myocardial infarction

[Vanessa Frodermann, and Matthias Nahrendorf., *Physiological Reviews.*, 2018 改変]

プログランニューリン (Progranulin: PGRN) は 593 アミノ酸で構成される糖タンパク質であり、12 個のシステイン残基から成るモチーフの 7 回半の繰り返し構造と、17 アミノ酸から成るシグナルペプチドを有する (40)。臨床的な関連性として、プログランニューリンの遺伝子変異は、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) の過剰な蓄積を誘導することから、前頭側頭型認知症 (frontotemporal lobar degeneration: FTL) や筋萎縮性側軸索硬化症 (amyotrophic lateral

sclerosis: ALS) の原因となることが報告されている (41–44)。また、プログラニュリンは、マクロファージや好中球、骨格筋、神経細胞等の様々な細胞に発現し、創傷治癒や炎症応答、腫瘍形成等を含む多様な病態生理に関与する (45)。プログラニュリンの受容体としては、腫瘍壊死因子受容体 (tumor necrosis factor receptor: TNFR)-2、エフリン受容体 A2 (ephrin type-A receptor 2: EphA2)、Sortilin などが報告されている (46–48)。プログラニュリンは Sortilin との結合を介して細胞内に取り込まれ、リソソーム機能の調節に関与する (49)。近年、プログラニュリンは虚血性疾患および炎症性疾患に対して保護作用を有することが示唆されている。当研究室における過去の報告において、プログラニュリンの投与は、マウス中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける梗塞体積を減少させ、神経学的機能を改善した (50)。他方、プログラニュリン欠損マウスでは、コラーゲン誘発関節炎における重症度スコアは増悪しており、プログラニュリンによる炎症制御機構が示唆される (51)。以上より、プログラニュリンは心筋虚血病態および炎症状態に対して保護的に関与すると考えられる。しかしながら、急性心筋梗塞後におけるプログラニュリンの病態生理学的役割については解明されていない。

本研究は、急性心筋梗塞後の心臓リモデリングおよび虚血再灌流障害におけるプログラニュリンの役割および保護作用を明らかにすることを目的とし、プログラニュリン欠損が心筋梗塞後リモデリングに及ぼす影響、プログラニュリン欠損がマクロファージの表現型に及ぼす影響、プログラニュリン投与が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響について、第1章、第2章、第3章のそれぞれで検討した。

第1章 心筋梗塞後リモデリングにおけるプログラニューリンの関与

第1節 緒言

急性心筋梗塞は冠動脈の閉塞に伴う心筋壊死を特徴とし、突然死および心不全発症の主な原因となる疾患である (9)。急性心筋梗塞後の救命率は、再灌流療法の発展により向上している。しかしながら、急性心筋梗塞患者の4人に1人は収縮機能障害を伴う梗塞後心不全に進展し、重症心不全患者の5年生存率は50%以下と予後不良である (25, 52)。既存薬は、急性心筋梗塞後の心不全発症および予後増悪を遅延させるが、心不全進展を完全には抑制できない。以上より、急性心筋梗塞後の病態生理を理解し、梗塞後心不全の予後改善に貢献する新規治療標的を探索することは重要である。

急性心筋梗塞後の心臓病態生理は、炎症期 (発症～3日目)、修復期 (4～14日目)、成熟期 (15日目～) の段階に区分される (53, 54)。炎症期から修復期への変遷に障害が生じると、有害な心臓リモデリングが誘導され、生命予後は悪化する。マクロファージは、炎症促進型 (M1) と組織修復型 (M2) の極性化を介して、急性心筋梗塞後の創傷治癒に貢献する (55)。M1 マクロファージは、腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α), IL-1 β , IL-6 を含む炎症性サイトカインを産生し、炎症応答を促進する (35)。M2 マクロファージは、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β : TGF- β), IL-10 を含む抗炎症性サイトカインを分泌し、パターン認識受容体である分化抗原群 206 (Cluster of Differentiation 206: CD206) を発現する (36)。また、マクロファージは myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase (MerTK) を介してアポトーシス心筋細胞を貪食除去し、創傷治癒に寄与する (56)。急性心筋梗塞後における M1 または M2 マクロファージ亜集団の異常な集積は、有害な心臓リモデリングの一因となる。クラス A スカベンジャー受容体欠損マウスでは、M1 マ

クロファージ極性化の亢進を伴い、心筋梗塞後リモデリングが増悪している (38)。一方、カベオリン1欠損マウスでは、M2 マクロファージの過剰な集積を伴う有害な心臓リモデリングが観察されている (39)。したがって、急性心筋梗塞後の適切な心臓修復および心不全進展の予防において、マクロファージ亜集団の特徴を理解することは重要である。しかしながら、マクロファージ極性化の制御因子については十分に解明されていない。

プログラニュリンは、マクロファージに豊富に発現する糖タンパク質であり、M1 および M2 極性化の両者に関与する。LPS 刺激後において、プログラニュリン欠損マクロファージは、炎症性サイトカイン産生の増加を伴う M1 様表現型に誘導される (57)。他方、カルディオトキシン誘発骨格筋傷害後においては、CD206 を発現する M2 様表現型が観察される (58)。一見矛盾するようであるが、プログラニュリン欠損は、マクロファージを病態増悪に寄与する表現型に誘導する点で共通している。以上の観点から、プログラニュリン欠損は、急性心筋梗塞後のマクロファージ極性化を障害し、心臓リモデリングを増悪させると仮説を立てた。

本研究では、急性心筋梗塞後における内因性プログラニュリンの役割を明らかにするため、野生型マウスおよびプログラニュリン欠損マウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、心臓リモデリングについて評価した。

第2節 実験材料および方法

2-1 動物

雄性 ICR (8-12 週齢) マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した (Hamamatsu, Japan)。栢菅らの方法で作製したプログラニューリン欠損マウスは、理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) より入手し、C57BL/6J マウスで 10 世代以上戻し交配した (59)。野生型およびプログラニューリン欠損マウスは 8-16 週齢を使用した。実験動物のプロトコールは、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) の「実験動物の使用に関するガイドライン (Guidelines on the Use of Laboratory Animals)」に従って実施され、岐阜薬科大学および岐阜大学の施設動物管理使用委員会および施設バイオセーフティ委員会の承認および監視を受けた (岐阜薬科大学動物実験申請承認番号: 2019-046、2019-197、2020-005、2020-033、2020-050、2020-085、2021-029、2022-012、2022-022、岐阜大学動物実験申請承認番号: 29-113、2019-260、2020-179)。岐阜薬科大学および岐阜大学の動物実験施設では、全てのマウスを $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクルで飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。

2-2 実験材料

本実験に用いた薬物および試薬は、以下の通りである。

Recombinant mouse progranulin protein、recombinant mouse M-CSF protein、recombinant mouse IL-4 protein、recombinant mouse IFN-gamma protein は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630 は Merck Millipore (Billerica, MA, USA)、トリプシン (trypsin)、塩化カリウム [potassium chloride (KCl)]、塩酸 [hydrochloric

acid (HCl)], スクロース (sucrose)、エタノール (ethanol)、sample buffer solution (2ME+)(x4)、メタノール (methanol)、イムノスター®LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、6-アミノヘキサノ酸 (6-Aminohexanoic acid)、ミダゾラム (midazolam)、ブトルファノール酒石酸塩 (butorphanol tartrate) は Wako (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム [potassium dihydrogenphosphate (KH₂PO₄)]、リン酸水素二ナトリウム・十二水 [disodium hydrogenphosphate 12-water (Na₂HPO₄ · 12H₂O)]、リン酸二水素ナトリウム二水和物 [sodium dihydrogenphosphate dihydrate (NaH₂PO₄ · 2H₂O)]、Blocking One-P、ペントバルビタールナトリウム (pentobarbital sodium)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)、リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS)、Accutase は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、ペニシリン (penicillin)、ストレプトマイシン (streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、塩化ナトリウム [sodium chloride (NaCl)]、メデトミジン塩酸塩 (medetomidine hydrochloride) は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)、生理食塩水 (saline) は Otsuka Pharmaceutical (Tokushima, Japan)、BCA protein assay kit、Hoechst 33342、propidium iodide (PI)、lipopolysaccharide (LPS, serotype 026:B6)、ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS)、赤血球溶解バッファー [red blood cell (RBC) lysis buffer] は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC)、Masson's trichrome stain kit、ラテックスビーズ (latex beads, L3030)、ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase) は Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan)、コラゲナーゼ I (collagenase I) は Worthington biochemical (Vassar Avenue Lakewood, NJ, USA)、Deoxyribonuclease I (DNase-I) は Nippon Gene (Tokyo, Japan)、cell

staining buffer、Fc-receptor blocker [TruStain FcX™ PLUS (anti-mouse CD16/32) antibody] は BioLegend、アンジオテンシン II (angiotensin II: Ang II)、phalloidin 594 conjugate working solution は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、イソフルラン (isoflurane) は Pfizer (Tokyo, Japan)、tris-buffered saline (TBS) は Takara Bio (Shiga, Japan)、mouse on mouse (M.O.M.) blocking reagent、M.O.M. protein concentrate、normal horse serum は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、proteinase K solution は Qiagen (Duesseldorf, Germany)、can get signal solution 1、can get signal solution 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、Triton X-100、トリス塩基 (tris base) は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、vectashield fluorescent mounting medium は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、フルオロマウント (fluoromount) は Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、optimal cutting temperature (O.C.T.) compound、パラフィン (paraffin) は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

2-3 マウス心筋梗塞モデル

マウス左冠動脈永久閉塞モデルは、既報の方法に準じて以下のように作製した (60)。麻酔は 70%亜酸化窒素および 30%酸素存在下、2.0–3.0%イソフルラン吸入により導入し、1.0–1.5%イソフルラン吸入にて維持した。気管内にチューブを挿入し、マウス用人工呼吸器 (HARVARD APPARATUS, mouse ventilator, Massachusetts, USA) にて、7 mL/kg、140 strokes/min で陽圧換気を開始した。右側臥位左肋間開胸にて心臓を露出した後、7-0 絹糸 (alfresa, Tokyo, Japan) を用いて左冠動脈を結紮した。左冠動脈閉塞の成否は、結紮部以遠における心臓表面の局所的チアノーゼにより確認した。その後、3-0 絹糸 (Ethicon, Inc., Raritan, NJ) を用いて肋間閉胸および皮膚縫合を行った。自発呼吸の回復後、気管内チ

ューブを抜管し、マウスを覚醒させた。一連の処置の間は、ヒートパット (HEATINGPAD-2; Bio-research center, Co., Nagoya, Japan) を用いて体温を 37°C に維持した。Sham 群のマウスに対しては、左冠動脈の結紮以外は同様の処置を行った。

2-4 ウェスタンブロット法

マウスはペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔投与により安楽死させた。摘出した心臓は、細胞溶解バッファー [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、1% IGEPAL CA-630、1% Triton X-100、phosphatase inhibitor cocktail、protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO)] を添加後、ホモジナイザー (NS-310EIII; Microtec Co.) を用いて均質化した。ホモジネート溶液は 4°C、10,000×g、20 分間の条件で遠心分離し、上清のタンパク質濃度は bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc.) を用いて測定した。タンパク質濃度は、細胞溶解バッファーおよび sample buffer solution を添加して調製し、検体は 100°C、5 分間の煮沸処理により作製した。SuperSep Ace (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、タンパク質を分離してポリフッ化ビニリデン膜 (Immobilon-P; Millipore Corporation, Billerica, MA) に転写した。その後、ポリフッ化ビニリデン膜を 0.05% Tween-20 溶液を含む TBS (T-TBS: 10 mM tris, 40 mM tris hydrochloride, 15 mM NaCl) で洗浄し、Blocking One-P (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) で室温にて 30 分間ブロッキングした後、一次抗体に浸漬して 4°C で一晩インキュベートした。一次抗体は、sheep anti-PGRN (1:1,000; R&D systems Inc., Minneapolis, MN)、goat anti-MerTK (1:1,000; R&D systems Inc.)、rabbit

anti-CD206 (1:1,000; Abcam, Inc., Cambridge, UK)、rabbit anti-COX-2 (1:1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、rabbit anti-MMP-9 (1:1,000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-phosphorylated Akt (1:1,000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Akt (1:1,000; Cell Signaling Technology)、goat anti-CCL2 (1:1,000; R&D systems Inc.)、rabbit anti- α SMA (1:1,000; Abcam, Inc.) および rabbit anti-GAPDH (1:1,000; Cell Signaling Technology) を用いた。二次抗体は、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit (1:2,000; Pierce Biotechnology, Inc.)、HRP-conjugated rabbit anti-sheep IgG (1:2,000; Pierce Biotechnology, Inc.)、HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:75,000; Pierce Biotechnology, Inc.)、Immunoreactive bands were visualized by Immuno Star LD (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) および Amersham Imager 680 blot and gel imager (Cytiva; Marlborough, MA) を用いた。

2-5 免疫染色法

摘出した心臓は、4%paraformaldehyde (PFA) 溶液にて4°C、48時間固定した。その後、25%ショ糖に24時間浸漬し、optimal cutting temperature compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋した。クライオスタットビブラトーム (Leica CM 1,850; Leica Microsystems, Inc., Wetzlar, Germany) を使用して、厚さ10 μ m の横断面凍結切片を作製し、ガラススライド上に配置した。切片は phosphate-buffered saline (PBS) にて希釈した5%正常ウマ血清 (Sigma-Aldrich, Inc.) に浸漬し室温で1時間ブロッキングした。その後、Progranulin (1:100; R&D systems, Inc.)、CD68 (1:100; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)、Troponin-I (1:100; Abcam, Inc.)、NIMP-R14 (1:100; Abcam, Inc.)、CoraLite[®] 594-conjugated Cardiac Troponin-I monoclonal antibody (1:100; Proteintech, Inc.,

Rosemont, IL) の一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (1:1,000; Molecular Probes, Eugene, OR), Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG (1:1,000; Molecular Probes), Alexa Fluor 647 donkey anti-sheep IgG (1:1,000; Molecular Probes) の二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、Hoechst 33342 (1:1,000; Molecular Probes) で 10 分間インキュベートし、核を染色した。顕微鏡観察のために、Vectashield fluorescent mounting medium (Vector Laboratory, Burlingame, CA) を切片に添加し、カバーガラスにて封入した。切片は、共焦点顕微鏡 (Vector Laboratory, Burlingame, CA) を用いて、10、20、40 倍率で撮影した。蛍光強度は、画像処理ソフトウェア (Fiji-ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda MD, USA) を用いて測定し、少なくとも 3 つの切片画像の平均値として示した。梗塞領域、境界領域、非梗塞領域は、Cardiac Troponin-I の蛍光強度を指標として区別した。

2-6 線維化領域の定量

摘出した心臓は、4%PFA 溶液にて 4°C、48 時間固定し、パラフィンに包埋した。厚さ 6 μm のパラフィン包埋切片を作製し、Masson's trichrome stain kit (Sigma- Aldrich, Inc.) で染色した。画像はすべて蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence) を用いて撮影した。Masson's trichrome 染色後、Fiji-ImageJ を用いて青色に検出された線維化領域を測定した。線維化サイズは、心尖部から結紮部までの 5 切片の左心室総面積に占める線維化総面積の割合として算出し、3 回の平均値で表した。

2-7 梗塞領域の定量

マウスは左冠動脈結紮 24 時間後にペントバルビタールナトリウム (50mg/kg i.p.) の腹腔投与により安楽死させた。摘出した心臓は結紮部以下を横断面に 4 切片にスライスした。切片は生理食塩水にて希釈した 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) に浸漬し、室温で 20 分間インキュベートした後、10% 緩衝ホルマリン溶液で一晩固定した。デジタルカメラ (Coolpix 4,500 ; Nikon, Tokyo, Japan) で切片を撮影し、梗塞面積は Fiji-ImageJ を用いて測定した。梗塞サイズは、左心室総面積に占める梗塞総面積の割合として算出した。

2-8 心電図測定

心電図 (electrocardiogram: ECG) は既報の方法に準じて測定した (61, 62)。メドミジン (0.3 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg) の混合溶液の腹腔投与によりマウスに麻酔を誘導した。信号は 4 kHz で記録され、0.3 Hz のハイパス設定と 1 kHz のローパス設定でフィルタリングされた。第 II 誘導心電図の測定のため、左後肢、右前肢、右後肢の皮下に針を刺した。心電図記録の際は、ヒーティングパッドを用いてマウスの体温を維持した。平均信号心電図は 60 秒までの複合時間によって作製し、得られた信号は LabChart v8 ソフトウェア (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) を用いて解析した。等電位線は、T 波と P 波の間のセグメントとして定義された。心電図の波形から QT 間隔、RR 間隔、補正 QT 間隔を定量した。QT 間隔は心室の脱分極開始から再分極終了までの時間を示し、RR 間隔は心室の脱分極から次の脱分極までの時間を反映する。補正 QT 間隔 (corrected QT interval: QTc) は、Bazett の補正式 ($QT \text{ 間隔} / RR \text{ 間隔}^{1/2}$) を用いて算出した。

2-9 心臓由来の免疫細胞の調製

免疫細胞は、先行研究の方法を参照して以下のように獲得した (63)。マウスは、イソフルランによる過麻酔で安楽死させた。心臓を露出させ、左右の心房を切断し、18G の注射針を取り付けた 10 mL シリンジを用いて、冷生理食塩水 10 mL を左右 2 回ずつ灌流した。心臓を摘出し、心房と主要血管を剥離した。心臓をシャーレ上に置き、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai Tesque) 200 μ L を添加し、滑らかになるまでミンチにした。ミンチした心臓を DMEM 800 μ L に懸濁し、50 \times g、2 分間の条件で遠心分離し、上清を除去した。次に、collagenase I (450 U/mL; Worthington biochemical Co., Vassar Avenue Lakewood, NJ, USA), hyaluronidase (60 U/mL; Sigma-Aldrich, Inc.), DNase-I (60 U/mL; Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo., Japan) を含有する Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Nacalai Tesque) 2 mL を添加し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。その後、30 秒間ボルテックスし、ピペッティングして均一な懸濁液とし、HBB バッファー (HBSS, 2% FBS, 0.2% bovine serum albumin) 12 mL に濾過しながら添加した。懸濁液を 4 $^{\circ}$ C、400 \times g、5 分間の条件で遠心分離し、上清を除去した。ペレットを赤血球溶解バッファー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で溶血し、ボルテックスで再懸濁し、室温で 5 分間インキュベートした。この懸濁液を HBSS 5mL に添加し、4 $^{\circ}$ C、400 \times g、5 分間の条件で遠心分離した。上清の除去後、ペレットを Cell Staining Buffer (BioLegend Co, Inc., San Diego, CA, USA) 100 μ L に再懸濁した。

2-10 フローサイトメトリー解析

細胞懸濁液は、Cell Staining Buffer 100 μ L に対して 1.0×10^6 cells の細胞密度で調製した。この懸濁液を 0.25 μ g の Fc-Receptor Blocker [TruStain FcX™ PLUS

(anti-mouse CD16/32) Antibody; BioLegend Co, Inc.] と 10 分間インキュベートした。一次抗体は、FITC anti-Ly6C antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.)、PE anti-CD11b antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.)、APC anti-CCR2 antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.)、PerCP/Cyanine5.5 anti-CD206 antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.)、PE/Cyanine7 anti-MerTK antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.) を用いた。20 分間インキュベートした後、懸濁液に Cell Staining Buffer 2 mL を添加し、4°C、400×g、5 分間遠心分離した。ペレットを再懸濁し、4°C、400×g、5 分間遠心分離した。細胞を再懸濁し、1 mL の 4%PFA 溶液で 20 分間固定した。この懸濁液に Cell Staining Buffer 2 mL を加え、4°C、400×g、5 分間で 3 回遠心した。サンプルをフローサイトメーターとセルソーターソフトウェア (Cell Sorter SH800S; Sony Co., Inc., Tokyo, Japan) で解析した。

2-11 腹腔マクロファージ初代培養

マウス腹腔マクロファージは、滅菌した FBS 不含 DMEM 5mL の腹腔洗浄により回収した。採取した細胞は遠心分離後に FBS 不含 DMEM に再懸濁し、 5.0×10^4 cells/well の密度で 24-well プレートに播種した。播種 30 分後、付着していない細胞を FBS 不含 DMEM で洗浄し、10%FBS 含有 DMEM 中、加湿大気下 (95% air、5% CO₂) または低酸素下 (94% N₂、5% CO₂、1% O₂)、37°C で 24 時間培養した。

2-12 骨髄由来マクロファージ初代培養

マウスはイソフルランによる過麻酔で安楽死させた。大腿骨と脛骨を採取し、片側を切断し、10,000×g で 10 秒間、遠心分離した。骨髄ペレットを赤血球溶解バッファーで 30–60 秒間溶血し、10% FBS、100 U/mL penicillin (Meiji Seika

Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan)、100 µg/mL streptomycin (Meiji Seika Pharma) を含有する DMEM (10% FBS DMEM) 10 mL に懸濁後、200×g で 5 分間、遠心分離した。マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor: M-CSF; R&D Systems Minneapolis, MN, USA) 10 ng/mL を含む 10% FBS DMEM に再懸濁後、12-well プレートに 5.0×10^5 cells/mL の密度で播種し、37°C、95% air、5% CO₂ の加湿大気下で培養した。培地は 2 日毎に交換し、4 日間培養した。骨髄由来マクロファージに LPS (10 ng/mL) + IFN-γ (20 ng/mL) または IL-4 (20 ng/mL) を 48 時間処置し、M1 および M2 様マクロファージに誘導した (64)。

2-13 定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: RT-qPCR) 法

Nucleo Spin RNA II (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、腹腔マクロファージおよび骨髄由来マクロファージから RNA を抽出した。RNA 濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare, Chicago, IL) を用いて測定した。PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time; Takara Bio Inc.) を用いて逆転写を行い、RNA から一本鎖 cDNA を合成した。定量的リアルタイム RT-qPCR は、TB Green Premix ExTaq II (Tli RNaseH Plus; Takara Bio Inc.) と TP800 Thermal Cycler Dice RealTime System (Takara Bio Inc.) を用いて実施した。全ての手順は製造元の説明書に従った。サイクリング条件は、95°C で 5 秒、60°C で 30 秒を 1 サイクルとして、40 サイクルを行った。結果は β-actin 発現量で正規化した相対遺伝子発現量で示した。使用した PCR プライマー配列は Table 1 に示す。

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
<i>Mrc1</i>	CAAGGAAGGTTGGCATTGT	CCTTTCAGTCCTTTGCAAGC
<i>Il1b</i>	AACCTGCTGGTGTGTGACGTTT	CAGCACGAGGCTTTTTTGTGT

<i>Il6</i>	TCTGCAAGAGACTTCCATCCAGT	TCTGCAACTGCATCATCGTTGT
<i>Tnf</i>	GAGTGACAAGCCTGTAGCC	CTCCTGGTATGAGATAGCAAA
<i>Ccl2</i>	CTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCT	CAGGCCCAGAAGCATGACA
<i>Il10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>Il4r</i>	TGACCTCACAGGAACCCAGGC	GAACAGGCAAAACAACGGGAT
<i>Tgfb1</i>	CTGCTGACCCCCACTGATAC	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
<i>Grn</i>	CTGCCCGTTCTCTAAGGGTG	ATCCCCACGAACCATCAACC
<i>Actb</i>	CGA GGT GAC AGA GAC CAC AA	CTG GAG TCA AGC CAG ACA CA

Table 1. Sequences of primers (mouse) used for RT-qPCR.

2-14 食食アッセイ

骨髄由来マクロファージを 96-well プレートに 5.0×10^4 cells/well の密度で播種し、37°C、95% air、5% CO₂ の加湿大気下で 24 時間培養した。その後、骨髄由来マクロファージに 50 ng/mL LPS を添加し、1、6、24 時間後にラテックスビーズ (L3030; Sigma-Aldrich, Inc.) と 4 時間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。蛍光強度は、spectrophotometer (Varioskan; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) で励起波長 575 nm、蛍光波長 610 nm で測定した。細胞を Hoechst 33342 (1:1,000) と 15 分間インキュベートし、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence) で撮影した。食食活性は、蛍光強度を細胞数で補正して算出した。

2-15 H9c2 細胞株の培養

ラット心筋細胞株 H9c2 (European Collection of Authenticated Cell Culture, Wiltshire, UK) は、100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Meiji Co. Ltd., Tokyo, Japan), 10% fetal bovine serum (FBS; Valeant, Costa Mesa, CA, USA) を含

む DMEM high glucose (Sigma-Aldrich, Inc.) 中、37°C、95% air、5% CO₂ で培養した。

2-16 心筋細胞肥大の評価

H9c2 細胞株は、10% FBS を含む DMEM high glucose で 24-well プレートに 10,000 cells/well の密度で播種し、37°C、95% air、5% CO₂ で 24 時間培養した。その後、培地を DMEM 1% FBS に交換し、1 μM angiotensin II (Ang II; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), 250 ng/mL recombinant mouse PGRN (R&D systems, Inc.), PBS を 24 時間処置した。細胞を PBS で洗浄し、4%PFA 溶液にて室温で 20 分間固定した。PBS で 3 回洗浄し、phalloidin 594 conjugate working solution (1:1,000; Cayman Chemical Co.) に室温で 60 分間浸漬した。PBS で 3 回洗浄し、Hoechst 33342 (1:1,000) で 15 分間インキュベートした後、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence) を用いて撮影した。細胞表面積 (μm²) は Fiji-ImageJ を用いて測定した。

2-17 シングルセル RNA シークエンス解析

Grn mRNA レベルは、心筋梗塞後の心臓を対象としたシングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) の公共データセットを用いて解析した。EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) の ArrayExpress データベースに、アクセスコード E-MTAB-7376 および E-MTAB-7365 で寄託されているデータを用いた (Farbehi N. et al., eLife., 2019)。偽処置群、心筋梗塞後 3 日目および 7 日目において、各 1 例ずつのシングルセルデータをダウンロードした。シングルセルデータは、活性化線維芽細胞 (activated fibroblasts: F-Act)、線維芽細胞 -Sca1^{high} (fibroblast-Sca1^{high}: F-SH)、線維芽細胞-Sca1^{low} (fibroblast-Sca1^{low}: F-SL)、筋線維

芽細胞 (myofibroblasts: MYO)、Wnt 発現線維芽細胞 (fibroblasts expressing Wnt: F-WntX)、内皮細胞 (endothelial cells: EC)、壁細胞 (mural cells: Mural)、増殖性 EC (cycling EC: Cyc)、M1 マクロファージ (M1 macrophages: M1Mφ)、M1 単球 (M1 monocytes: M1Mo)、樹状細胞 (dendritic-like cells: DC)、IFN 誘導遺伝子を高発現するマクロファージ (macrophages showed strong upregulation of IFN-induced genes: MAC-IFNIC)、M2 マクロファージ (M2 macrophages: M2Mφ)、心臓組織常在性 Mφ (cardiac tissue-resident Mφ: MAC-TR)、T 細胞 (T-cells: TC)、B 細胞 (B-cells: BC)、ナチュラルキラー細胞 (natural killer cells: NKC)、グリア細胞 (glial cells: Glia) としてアノテーション済みであった。個々の細胞群における *Grn* 発現量の値を抽出し、統計学的に解析した。

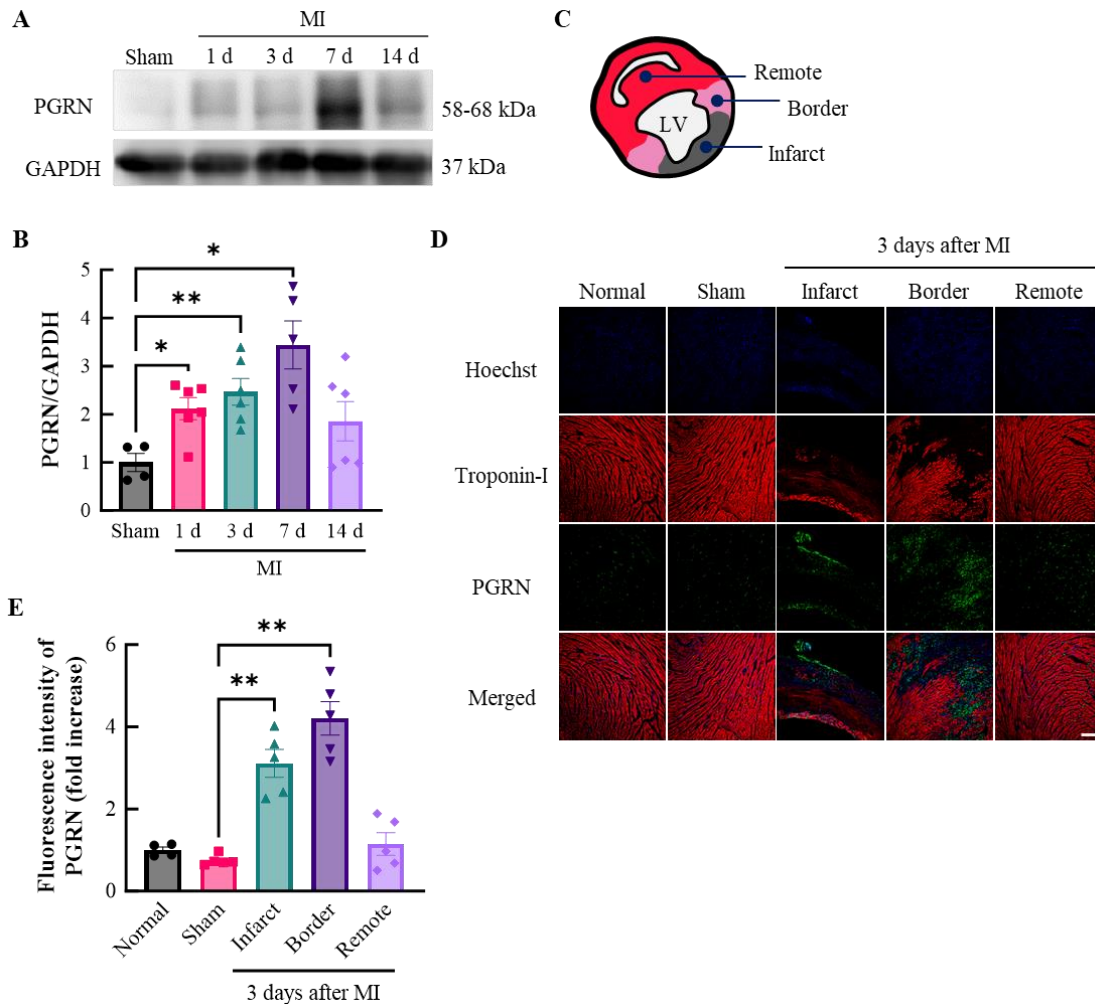
2-18 統計解析

データは平均値±SEM で示した。量的変数は、2 群間比較には Levene の検定後に Student または Welch の両側 *t* 検定を、多群間比較には一元配置分散分析後に Tukey または Dunnett 検定を用いて統計的に解析した。*P* 値<0.05 を統計的に有意差ありとした。すべての統計解析は、SPSS (version 24.0.0.0; IBM, Armonk, NY, USA) ソフトウェアと GraphPad Prism (version 9.5.1; Graphpad Software, Boston, MA, USA) を用いて行った。

第3節 実験成績

3-1 心筋梗塞後のプログラニュリン発現量および局在の検討

まず、心筋梗塞後の心臓全体におけるプログラニュリン発現レベルを検討した。プログラニュリン発現量は、心筋梗塞 1、3、7 日後に有意に増加した (Figure 5A, B)。また、心筋梗塞後のプログラニュリンの局在について、心臓横断切片の免疫染色により、梗塞部、境界部、非梗塞部において評価した (Figure 5C)。プログラニュリンの蛍光強度は、心筋梗塞 3 日後に境界部および梗塞部において有意に増加した (Figure 5D, E)。



(Continued on next page)

Figure 5 The expression and localization of PGRN after MI.

(A) Immunoblots exhibit PGRN (58-68 kDa) and GAPDH (37 kDa) in whole hearts at 1, 3, 7, and 14 days after myocardial infarction (MI). (B) Quantitative analysis of PGRN expression level normalized to GAPDH in the entire infarcted myocardium. Data are the means \pm SEM (Sham group: n = 5, MI groups; 1 d: n = 6, 3 d: n = 6, 7 d: n = 5, 14 d: n = 6). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. Sham group (one-way ANOVA followed by Dunnett T3 test). (C) Scheme of a myocardial transverse section after MI. The myocardium was classified into three different regions as follows: infarct, border and remote areas. (D) Confocal microscopic images ($\times 10$ magnification) of PGRN at 3 days after MI. Scale bar: 500 μ m. (E) Quantitative analysis of fluorescence intensity for PGRN at 3 days after MI. Data are the means \pm SEM (Normal: n = 5, Sham: n = 5, Infarct: n = 5, Border: n = 5, Remote: n = 5). ** p < 0.01 vs. Sham group (one-way ANOVA followed by Dunnett T3 test).

3-2 心筋梗塞後のプログランニューリン発現細胞の検討

プログランニューリン発現量の経時的変化は、マウス心筋梗塞モデルにおけるマクロファージの集積数と対応している (55)。そこで、主要なプログランニューリン発現細胞はマクロファージであると考え、マクロファージマーカーである CD68 とプログランニューリンを共免疫染色したところ、プログランニューリンは境界領域において CD68 と共局在した (Figure 6A)。CD68⁺細胞数および PGRN⁺ CD68⁺細胞数は、心筋梗塞後 3 日目の境界領域において顕著な増加を認めた (Figure 6B-D)。全 CD68⁺細胞に占めるプログランニューリンとの共陽性細胞の割合は、心筋梗塞群で約 79.6%、偽手術群で 68.5%であった (Figure 6E)。

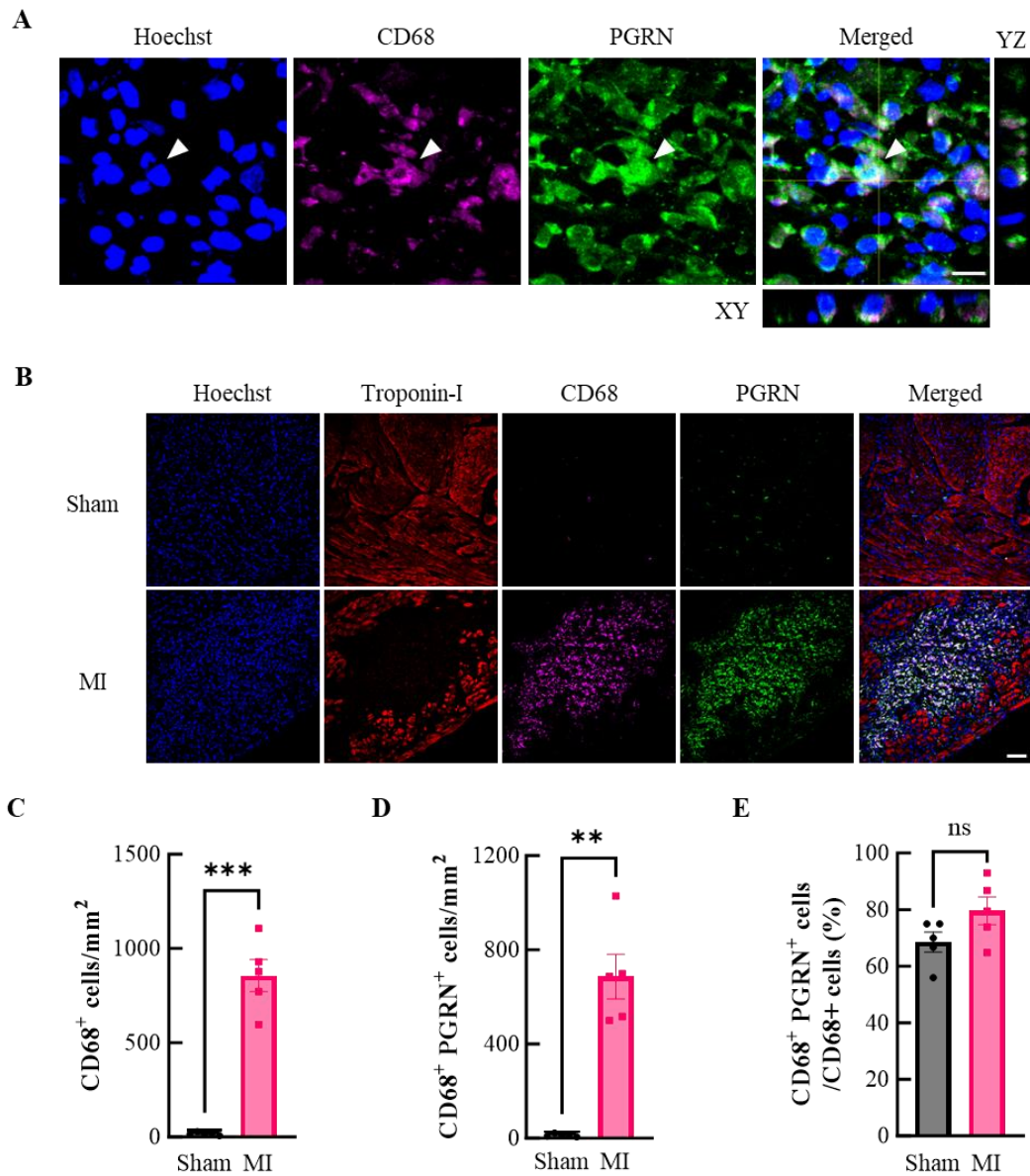


Figure 6 PGRN colocalizes with CD68⁺ cells after MI.

(A) Enlarged images of a cell expressing PGRN. The white arrows indicate one of the CD68⁺ PGRN⁺ cells. Scale bar: 10 μ m. (B) Typical confocal microscopic images ($\times 20$ magnification) of macrophages at border areas 3 days after MI. Blue: nuclei stained with Hoechst 33342, Red: Troponin-I, Magenta: CD68, Green: PGRN. Scale bar: 100 μ m. (C-E) Quantitative analysis of the number of CD68⁺ cells, PGRN⁺ CD68⁺ cells, and % of PGRN⁺ cells in CD68⁺ cells at border areas 3 days after MI. Data are the means \pm SEM (Sham: n = 5, MI: n = 5). ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. Sham-operated group (Levene's test followed by Student's or Welch's two-tailed t -test).

3-3 scRNA-seq 再解析に基づくプログラニュリン発現細胞群の検討

マクロファージにおけるプログラニュリンの高発現を裏付けるため、公開されている scRNA-seq データセットを用いて、プログラニュリンを発現する細胞群を解析した (65)。偽手術群の *Grn* 発現レベルを調べたところ、単球・マクロファージ細胞群で高値を示した (Figure 7A)。また、心筋梗塞後 3 日目および 7 日目の *Grn* の発現は単球・マクロファージ細胞群で高値を示した (Figure 7B, C)。以上より、心筋梗塞後におけるプログラニュリン発現量の増加は、主にマクロファージの存在量に相関することが示唆された。

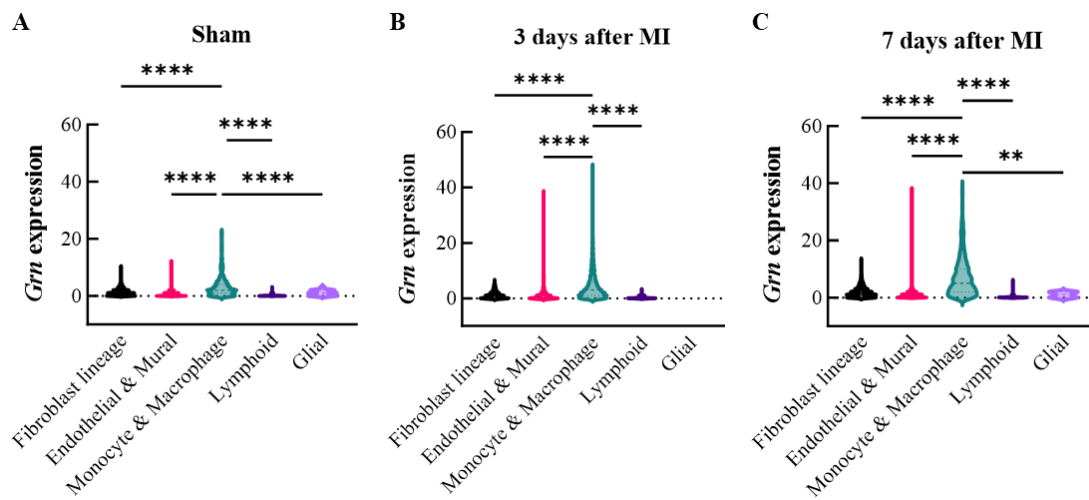


Figure 7 PGRN expressing cell clusters after MI.

(A-C) scRNA-seq analysis of cell clusters expressing *Grn* after sham operation and at 3- and 7-days post-MI. Data are the means \pm SEM (Fibroblast lineage: $n = 262$, Endothelial & Mural: $n = 355$, Monocyte & Macrophage: $n = 3184$, Lymphoid: $n = 73$, Glial: $n = 1$). **** $p < 0.0001$ vs. Monocyte & Macrophage (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

3-4 プログラニュリン欠損が心筋梗塞後の心肥大に及ぼす影響

プログラニュリン欠損マウスを用いて、心筋梗塞後におけるプログラニュリンの病態生理学的役割を検討した。心筋梗塞後の重症度は、心臓の肥大化と関連しており、心臓重量/体重比が指標となる (66, 67)。心筋梗塞 14 日後におい

て、プログラニューリン欠損マウスでは野生型マウスと比較して心重量/体重比が有意に増加した (Figure 8A, B)。

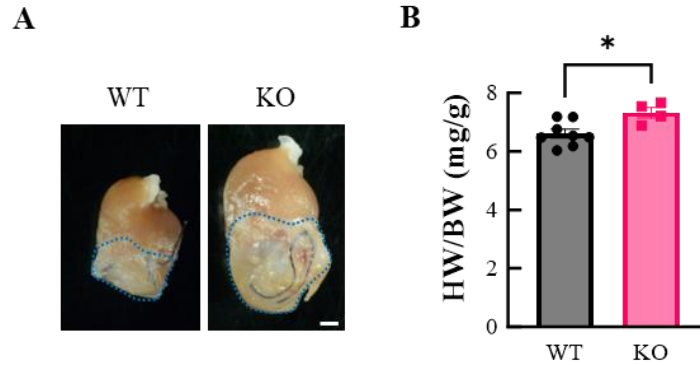


Figure 8 PGRN deficiency increases heart weight per body weight after MI.

(A) Typical images of the whole hearts in WT and PGRN-KO mice at 14 days post-MI. Scale Bars: 1 mm. (B) Quantitative analysis of heart weight per body weight (HW/BW). Data are the means \pm SEM (WT: n = 8, KO: n = 4). * $p < 0.05$ vs. WT (Levene's test followed by Student's two-tailed t -test).

3-5 プログラニューリン欠損が心筋梗塞後の線維化に及ぼす影響

過剰な線維化は、心室の硬直と心筋細胞の機械電氣的結合の障害を誘導するため、収縮機能障害と重篤な不整脈の一因となる (54, 68)。そこで、コラーゲンの豊富な線維化部位を青色に染色する Masson's trichrome 染色を用いて、左心室と右心室の線維化サイズを評価した (Figure 9A)。プログラニューリン欠損マウスにおいて、心筋梗塞 14 日後において左室および右室の線維化サイズが野生型マウスと比較して有意に増加した (Figure 9B, C)。

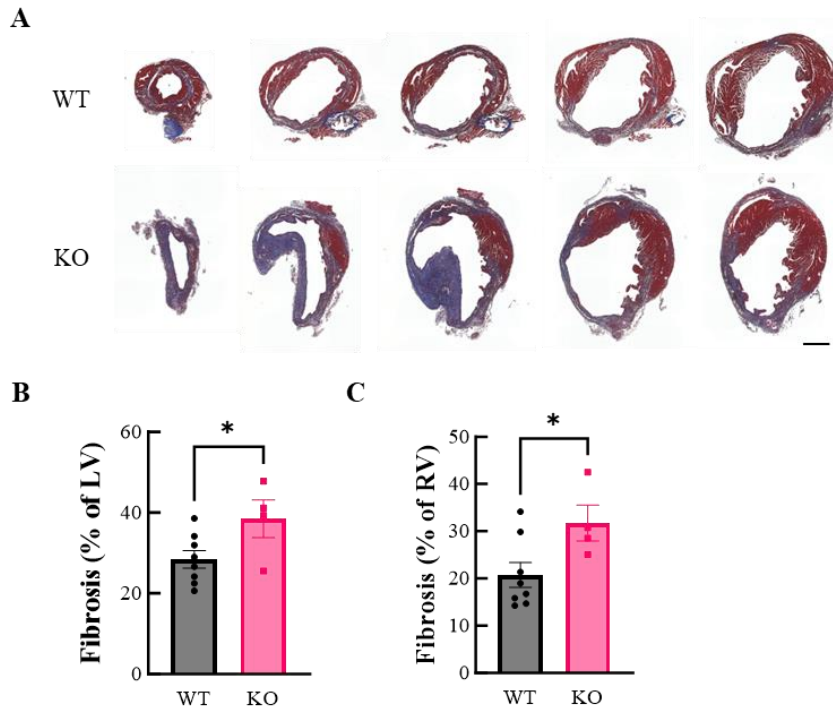


Figure 9 PGRN deficiency increases ventricular fibrosis after MI.

(A) Typical images of the myocardial transverse sections from apex to ligature visualized by Masson's trichrome staining in WT and PGRN-KO mice at 14 days after MI. Scale Bars: 1 mm. (B, C) Quantitative analysis of fibrosis size (%) in left and right ventricular (LV and RV). Data are the means \pm SEM (WT: $n = 8$, KO: $n = 4$). * $p < 0.05$ vs. WT (Levene's test followed by Student's two-tailed t -test).

3-6 プログラニューリン欠損が心筋梗塞後の生命予後に与える影響

マウス心筋梗塞モデル作製後 14 日目までの生存率を解析した。プログラニューリン欠損マウスは、心筋梗塞後の生存率が著しく低く、心臓破裂により早期に死亡した (Figure 10A, B)。また、心機能の指標として心電図を測定したところ、プログラニューリン欠損マウスでは、心筋梗塞 14 日後における QT 間隔および補正 QT 間隔 (corrected QT interval: QTc) が延長した (Figure 10C-E)。一方、RR 間隔は、野生型マウスと比較して延長傾向を示したが、有意差は認められなかった (Figure 10F)。QT 間隔は、心室の電氣的興奮から回復に必要な時間を反映する。QT 延長は、心臓の収縮と弛緩の効率を低下させ、致死的不整脈を

誘発する可能性がある (69)。したがって、プログラニュリン欠損は、心筋梗塞後に重篤な不整脈と間接的な心機能障害を誘発することが示唆される。以上の結果より、プログラニュリン欠損は心筋梗塞後の組織学的および電気生理学的に機能障害を引き起こす可能性がある。

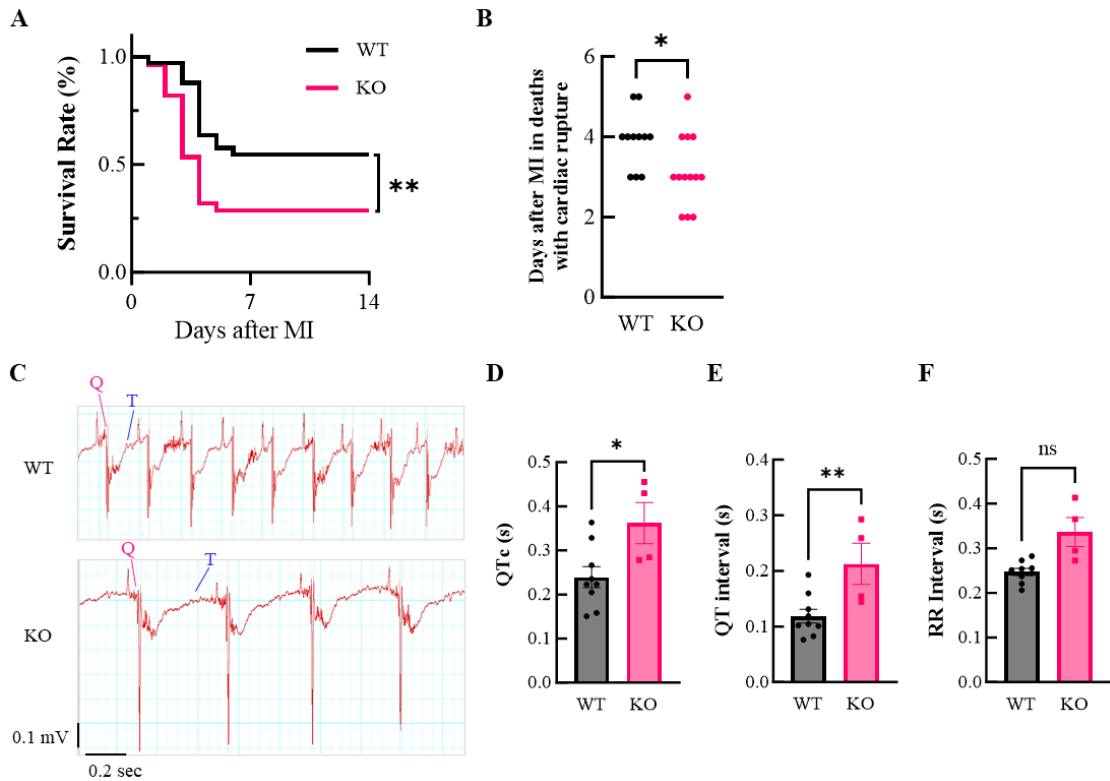


Figure 10 PGRN deficiency induces higher mortality and longer QT interval after MI.

(A) Kaplan-Meier survival curves in WT and PGRN-KO mice following MI. Data are the means \pm SEM (WT: $n = 33$, PGRN-KO: $n = 28$). ** $p < 0.01$ vs. WT (Log-rank test). (B) Observed days of cardiac rupture post-MI. Data are the means \pm SEM (WT: $n = 11$, PGRN-KO: $n = 13$). * $p < 0.05$ vs. WT (Mann-Whitney U test). (C) Electrocardiograms (ECGs) in WT and PGRN-KO mice at 14 days after MI. (D-F) Quantitative analysis of corrected QT interval (QTc), QT interval and RR interval, respectively. Data are the means \pm SEM (WT: $n = 9$, PGRN-KO: $n = 4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT (Levene's test followed by Student's or Welch's two-tailed t -test).

3-7 プログラニュリンの心筋梗塞後の梗塞サイズに及ぼす影響

次に、心筋梗塞後の心筋細胞死を評価するため、急性期における梗塞サイズ

を評価した。野生型とプログラニューリン欠損マウスの間で、急性期（心筋梗塞48時間後）における梗塞サイズに有意差は認められなかった（Figure 11A, B）。

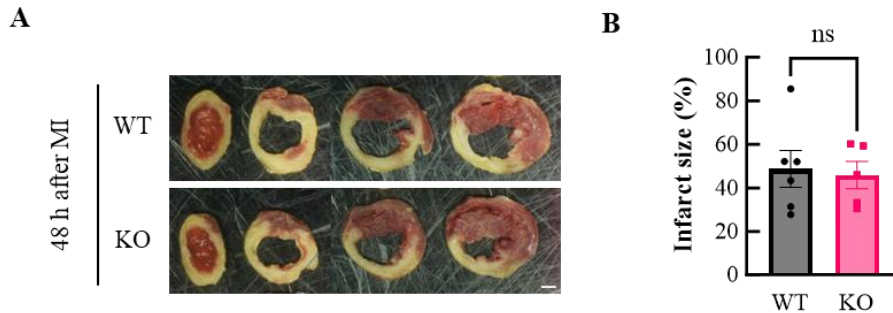


Figure 11 PGRN deficiency does not change infarct size after MI.

(A, B) Typical images of infarct myocardium and quantification of left ventricular (LV) infarct size in WT and PGRN-KO mice at 48 hours after MI. Data are the means \pm SEM (WT: $n = 5$, PGRN-KO: $n = 6$). N.S vs. WT (Levene's test followed by Student's two-tailed t -test).

3-8 プログラニューリンの心筋細胞肥大に対する作用

H9c2 心筋細胞株を用いて、アンジオテンシン II 誘発心筋細胞肥大に対するプログラニューリンの作用を評価した。プログラニューリンは、アンジオテンシン II により誘導される心筋細胞表面積の増加を有意に減少させた（Figure 12A, B）。以上の結果は、プログラニューリン欠損による有害な心臓リモデリングは、急性期の心筋細胞死の増加よりも、亜急性期以降の病理学的過程における心筋細胞の肥大化や線維化の亢進に起因することを示唆している。

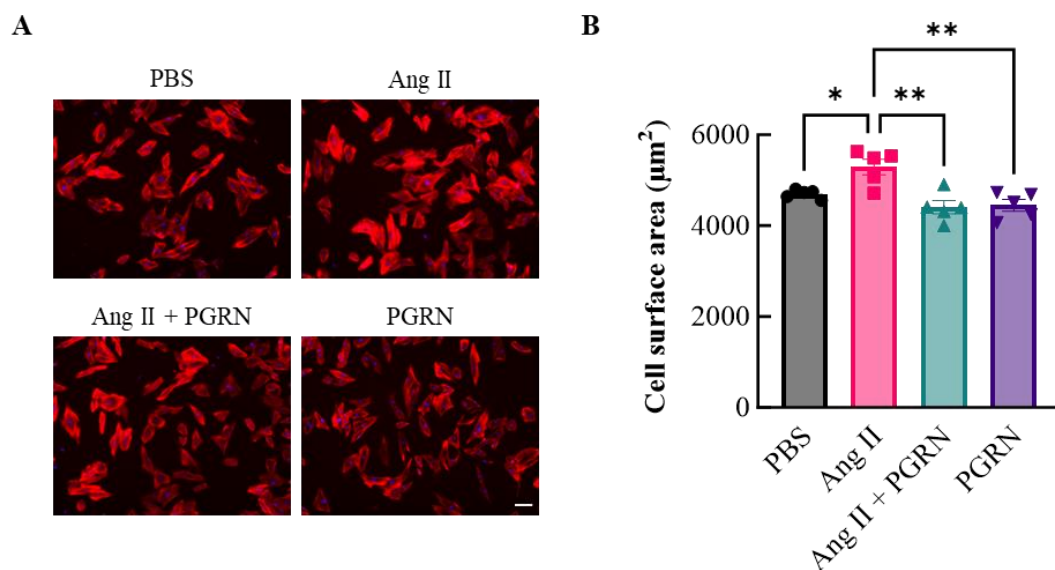


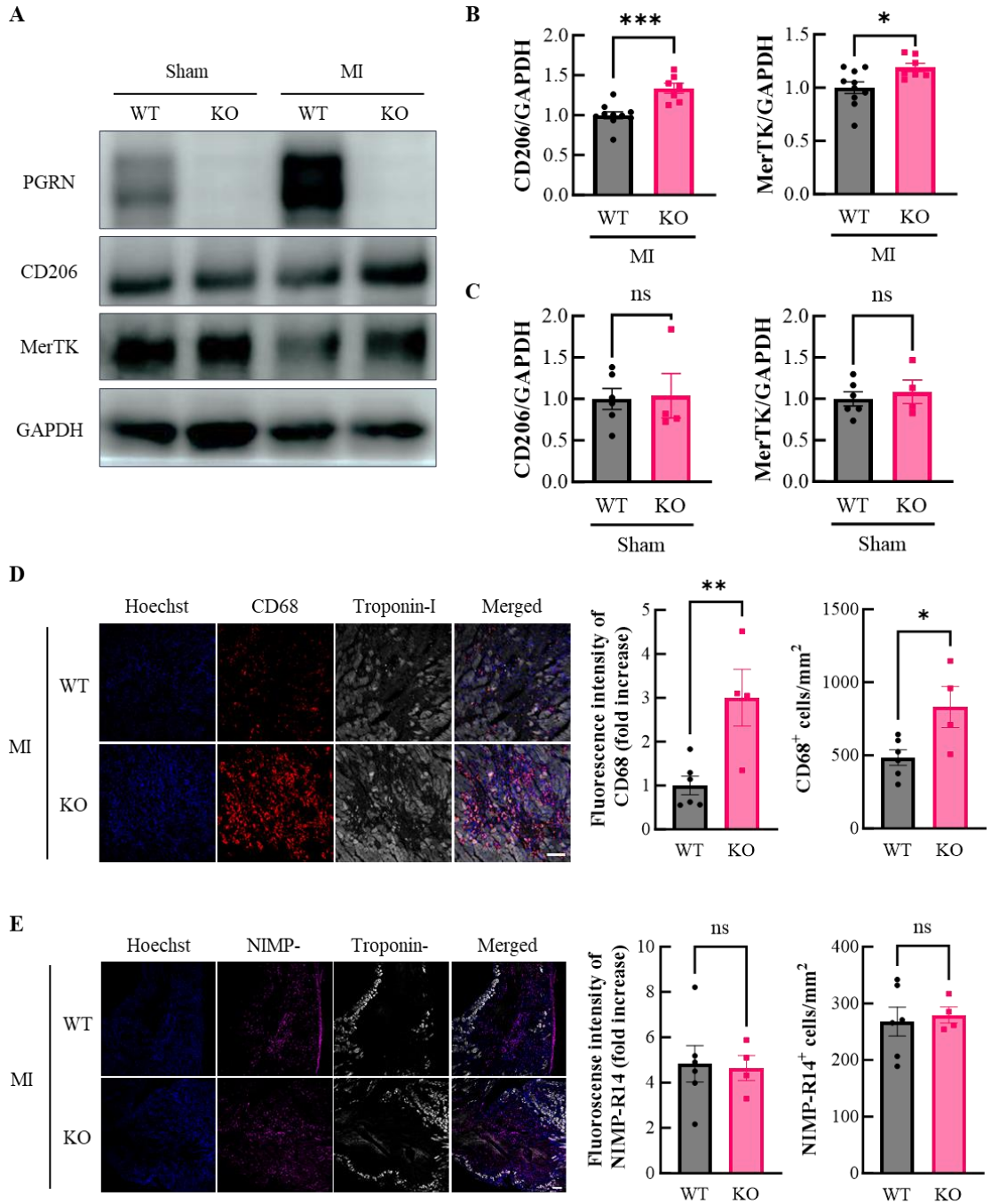
Figure 12 **Effects of PGRN on cardiomyocyte hypertrophy.**

(A, B) Representative images of rat cardiomyocyte H9c2 treated with Angiotensin II (Ang II) and PGRN for 24 hours. Blue: nuclei stained with Hoechst 33342, Red: Phalloidin. Scale Bar: 100 µm. Data are the means ± SEM (PBS: n = 5, Ang II: n = 5, Ang II+PGRN: n = 5, PGRN: n = 5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Ang II (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

3-9 プログラニューリン欠損により誘導される心筋梗塞後のマクロファージ関連タンパク質発現量の変化

プログラニューリン欠損マウスは、心筋梗塞後3日目から高い死亡率を示した。心筋梗塞3日後における病態生理の理解は、予後増悪の原因を解明する上で重要である。プログラニューリンの欠損により、カルディオトキシン誘発傷害後の骨格筋でCD206陽性M2様マクロファージが誘導されることが報告されている(58)。そこで、プログラニューリン欠損が心筋梗塞後のマクロファージの性質に及ぼす影響を検討した。プログラニューリン欠損マウスの心臓では、心筋梗塞後3日目においてCD206およびアポトーシス細胞の貪食に関わるMerTKの発現量が高値を示した(Figure 13A, B)。一方、偽手術群では、野生型とプログラニューリン欠損マウスの間でCD206およびMerTKの発現レベルに明らかな違いは認められなかった(Figure 13A, C)。次いで、心筋梗塞後3日目において梗塞境

界領域のマクロファージおよび好中球の集積を評価した。プログラニュリン欠損は CD68 の蛍光強度および CD68 陽性細胞数を有意に増加させた (Figure 13D)。一方、両群間において好中球マーカーである NIMP-R14 の蛍光強度および NIMP-R14 陽性細胞数に明らかな違いは認められなかった (Figure 13E)。



(Continued on next page)

Figure 13 Alteration of protein expression and macrophage accumulation affected by PGRN deficiency following MI.

(A) Immunoblots exhibit PGRN (58-68 kDa), CD206 (190 kDa) and MerTK (175 kDa) in whole hearts of WT and PGRN-KO mice at 3 days after MI. (B) Quantitative analysis of CD206 and MerTK expression levels normalized to GAPDH, in the entire myocardium at 3 days post-MI. Data are the means \pm SEM (WT: n = 10, PGRN-KO: n = 7). * p < 0.05, *** p < 0.001 vs. WT (Levene's test followed by Student's or Welch's two-tailed t -test). (C) Typical confocal microscopic images ($\times 20$ magnification) of macrophages at border areas in WT and PGRN-KO mice at 3 days after MI. Blue: nuclei stained with Hoechst 33342, Red: CD68, Gray: Troponin-I. Scale bar: 100 μ m. Quantitative analysis of fluorescence intensity of CD68 and the number of CD86+ cells at border areas in WT and PGRN-KO mice at 3 days post- MI. Data are the means \pm SEM (WT: n = 6, PGRN-KO: n = 4). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. WT (Levene's test followed by Student's or Welch's two-tailed t -test). (D) Representative confocal microscopic images ($\times 10$ magnification) of neutrophils at border areas in WT and PGRN-KO mice at 3 days after MI. Cyan: nuclei stained with Hoechst 33342, Magenta: NIMP-R14, Green: Troponin-I. Scale bar: 100 μ m. Data are the means \pm SEM (WT: n = 6, PGRN-KO: n = 4). N.S vs. WT (Levene's test followed by Student's two-tailed t -test).

3-10 プログラニューリン欠損がマクロファージ極性化に及ぼす影響

プログラニューリン欠損マクロファージの極性化状態を評価するために、野生型およびプログラニューリン欠損マウスから腹腔マクロファージを採取・培養した。野生型およびプログラニューリン欠損腹腔マクロファージ共に、*Mrc1* 発現レベルは正常条件下と比較して低酸素条件下で顕著に低下した。また、プログラニューリン欠損腹腔マクロファージは、正常および低酸素 (1% O₂) 条件下において野生型と比較して著しく高い *Mrc1* 発現レベルを示した (Figure 14)。

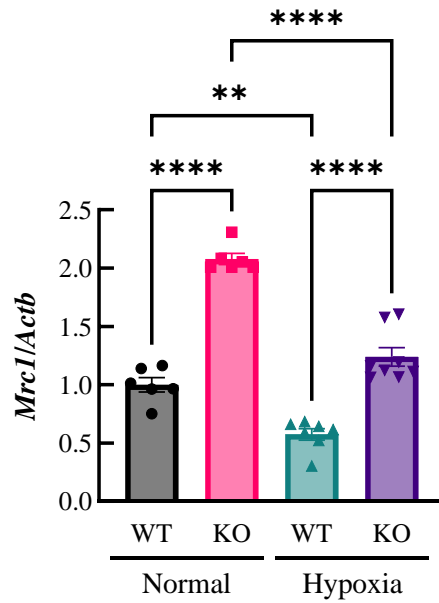


Figure 14 PGRN deficiency increases CD206 expression in peritoneal macrophages.

mRNA levels of *Mrc1* in peritoneal macrophages in WT and PGRN-KO under normal and hypoxic conditions. Data are the means \pm SEM (Normal; WT: n = 6, KO: n = 6, Hypoxia; WT: n = 7, PGRN-KO: n = 8). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. WT (one-way ANOVA followed by Dunnett T3 test).

3-11 scRNA-seq 再解析に基づくプログラニューリン発現細胞の解析

プログラニューリン発現とマクロファージ表現型との関係性を理解するために、公開されている scRNA-seq データセットを用いて、心筋梗塞後のプログラニューリン発現細胞を解析した (65)。心筋梗塞後 3 日目における *Grn* の発現レベルを解析したところ、M1 単球や M1 マクロファージ、樹状細胞を含む他の細胞と比較して、M2 マクロファージで高値を示した (Figure 15)。

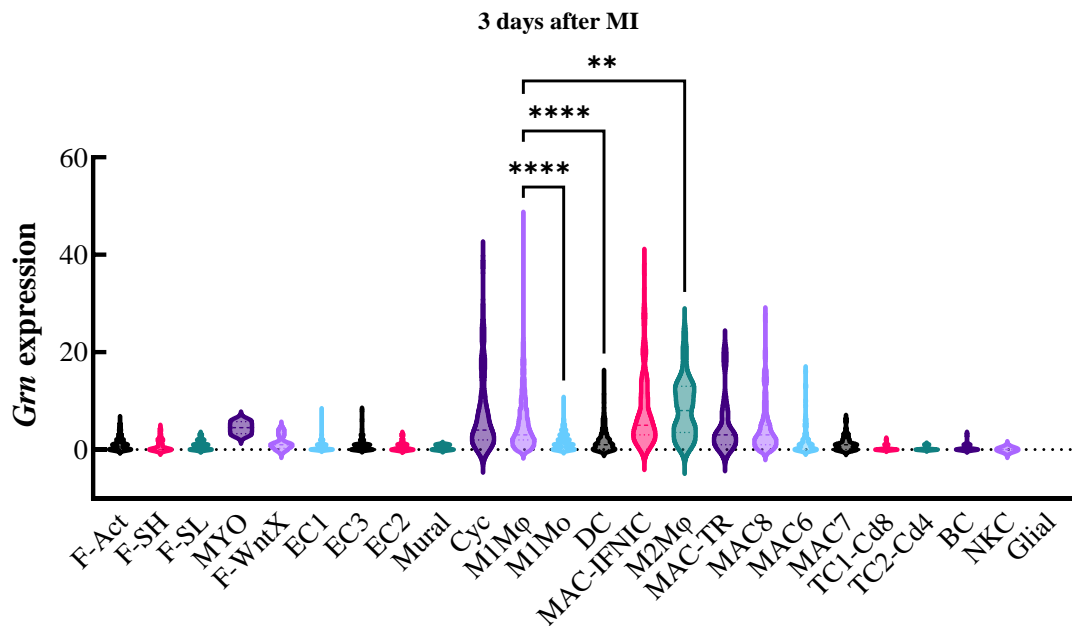


Figure 15 PGRN expressing single cell types after MI.

(A-C) scRNA-seq analysis of cells expressing *Grn* at 3 days post-MI. Data are the means \pm SEM (n = F-Act: 185, F-SH: 25, F-SL: 40, MYO: 4, F-WntX: 8, EC1: 162, EC2: 37, EC3: 75, Mural: 10, Cyc: 71, M1Mφ: 1964, M1Mo: 493, DC: 271, MAC-IFNIC: 125, M2Mφ: 49, MAC-TR: 23, MAC6: 110, MAC7: 43, MAC8: 106, TC1-Cd8: 28, TC2-Cd4: 16, BC: 27, NKC: 2, Glial: 1). ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. M1Mφ (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

3-12 プログラニュリン欠損によるマクロファージ浸潤と過剰な線維化の病態メカニズムの検討

マクロファージの梗塞部位への浸潤は、C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) により促進される。また、alpha-smooth muscle actin (α SMA) 陽性筋線維芽細胞によりコラーゲン線維を豊富に含む線維性癒痕が形成される。そこで、マクロファージ浸潤および過剰な線維化の病態メカニズムを理解するために、CCL2 と α SMA の発現量を評価した。プログラニュリンの欠損は、心筋梗塞後または偽手術後 3 日目において、CCL2 および α SMA の発現量に影響しなかった (Figure 16A-C)。

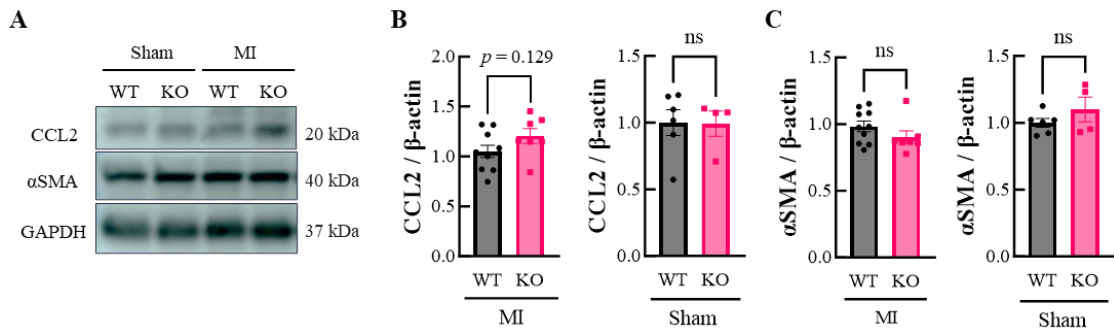


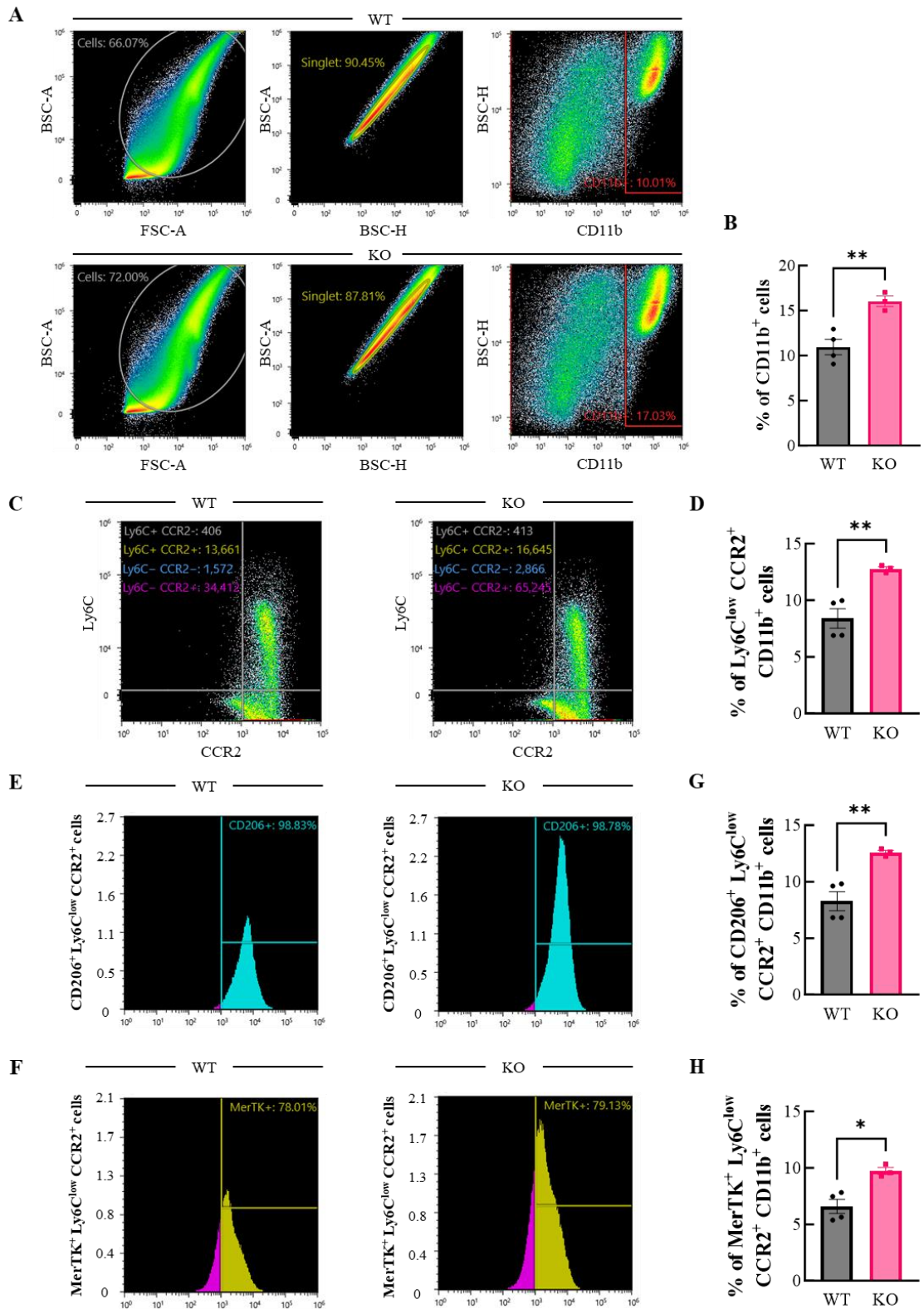
Figure 16 Protein expression in PGRN-deficient myocardium at 3 days after MI and sham-operation.

(A-C) Immunoblots of CCL2 (25 kDa) and α SMA (40 kDa), and quantification of their expression levels normalized to GAPDH in whole hearts of WT and PGRN-KO mice at 3 days following MI and sham-operation. Data are the means \pm SEM (MI: WT; n = 10, PGRN-KO; n = 7, Sham: WT; n = 6, KO; n = 4). * p < 0.05 vs. WT (Levene's test followed by Student's or Welch's two-tailed t -test).

3-13 プログラニューリン欠損マウスにおける CD206 および MerTK を発現する心臓マクロファージ亜集団の検討

心筋梗塞後のプログラニューリン欠損マウスの心臓における CD206 および MerTK の発現増加の要因を調べるため、マクロファージ亜集団における CD206 および MerTK 発現の関係性について、フローサイトメトリーを用いて解析した。プログラニューリン欠損マウスでは、全細胞に占める CD11b⁺細胞の割合が高い値を示した (Figure 17A, B)。C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) 陽性心臓マクロファージは骨髄由来循環単球より分化し、心臓傷害の初期には lymphocyte antigen 6 complex (Ly6C)^{high} 炎症性単球・マクロファージとして組織に浸潤し、次いで Ly6C^{low} 修復性マクロファージへと表現型を変化させる (70)。単球・マクロファージを CD11b、Ly6C、CCR2 を用いてより詳細に分類した結果、プログラニューリン欠損は、心筋梗塞後 3 日目の全細胞に対する Ly6C^{low} CCR2⁺ CD11b⁺の割合を顕著に増加させた (Figure 17C, D)。重要なことに、この亜集団に属する細胞の大部分は、CD206 と MerTK を同時に発現した (Figure

17E, F)。実際に定量した結果からも、全細胞における $CD206^+ Ly6C^{low} CCR2^+$ $CD11b^+$ および $MerTK^+ Ly6C^{low} CCR2^+ CD11b^+$ の割合も、心筋梗塞後のプログラニュリン欠損マウスの心臓において有意に増加することが明らかになった (Figure 17G, H)。



(Continued on next page)

Figure 17 Abnormal subpopulation of cardiac macrophages in PGRN-KO mice post-MI.

(A, B) Representative FACS plots of CD11b⁺ cells and quantified ratio of CD11b⁺ cells in total singlet cells in WT and PGRN-KO mice 3 days following MI. (C) Representative FACS plots of cells distinguished by expression levels of Ly6C and CCR2. (D) Quantified proportion of Ly6C^{low} CCR2⁺ CD11b⁺ cells in singlet cells. (E, F) Representative histograms of CD206⁺ and MerTK⁺ cells in Ly6C^{low} CCR2⁺ macrophages. (G, H) Quantified proportion of CD206⁺ Ly6C^{low} CCR2⁺ CD11b⁺ and MerTK⁺ Ly6C^{low} CCR2⁺ CD11b⁺ cells in singlet cells. Data are the means ± SEM (WT: n = 4, PGRN-KO: n = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. WT (Levene's test followed by Student's two-tailed t-test).

一方、Ly6C^{high} CCR2⁺ CD11b⁺、Ly6C^{high} CCR2⁻ CD11b⁺およびLy6C^{low} CCR2⁻ CD11b⁺で定義される3つの亜集団の割合は、両群間で顕著な変化は認められなかった (Figure 18A)。また、Ly6C^{low} CCR2⁺ CD11b⁺で定義される個々の細胞でのCD206およびMerTKの発現量についても、両群間に明らかな違いは認められなかった (Figure 18B)。以上の結果を踏まえると、心筋梗塞後3日目におけるプログラニュリン欠損マウスの心臓では、炎症性単球よりも分化したマクロファージが顕著に集積している可能性がある。すなわち、プログラニュリン欠損による梗塞後心臓のCD206およびMerTK発現量の増加は、個々のマクロファージにおける発現量の増加ではなく、M2様マクロファージ数の増加に起因することが示唆された。

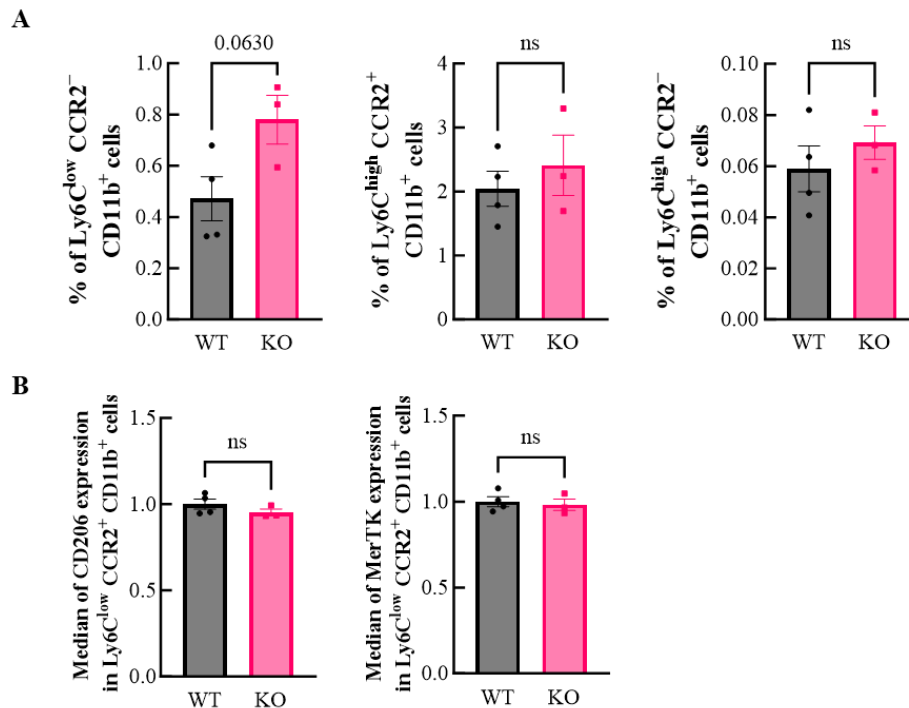


Figure 18 Flow cytometric analysis of macrophages at 3 days post-MI.

(A) Quantification of % of Ly6C^{low} CCR2⁻ CD11b⁺, Ly6C^{high} CCR2⁺ CD11b⁺ and Ly6C^{high} CCR2⁻ CD11b⁺ cells in singlet cells in entire myocardium of WT and PGRN-KO mice at 3 days post-MI. (B) Median of CD206 and MerTK expression levels in Ly6C^{low} CCR2⁺ CD11b⁺ cardiac macrophages in WT and PGRN-deficient myocardium at 3 days following MI. Data are the means \pm SEM (WT: n = 4, PGRN-KO: n = 3). N.S vs. WT (Levene's test followed by Student's or Welch's two-tailed *t*-test).

3-14 プログラニュリン欠損が炎症応答後のマクロファージ極性化に及ぼす影響

マクロファージは、炎症応答後に自己制御により M2 様表現型に自身を誘導する (71)。これまでの結果から、プログラニュリンはマクロファージの炎症応答性を制御すると考えられる。そこで、骨髄由来マクロファージを用いて、マクロファージ極性化に対するプログラニュリン欠損の影響を検討した。M1 および M2 マクロファージは、LPS+IFN- γ あるいは IL-4 の 48 時間処置にて誘導し、その後 RT-qPCR を実施した。まず、LPS+IFN- γ で処理した骨髄由来マク

ロファージでは、*Grn* 発現レベルが増加した (Figure 19A)。次いで、LPS+IFN- γ または IL-4 刺激後 48 時間における野生型およびプログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現レベルを評価した。プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージは、LPS+IFN- γ 処置後に野生型と比較して *Il1b* の発現レベルが低下した (Figure 19B)。*Il6*, *Tnf*, *Ccl2* 発現レベルは、LPS+IFN- γ 処置後の野生型とプログラニューリン欠損マクロファージの間に明らかな違いは認められなかった (Figures 19C-E)。また、M2 様マクロファージマーカーの発現レベルについても検討した。プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージでは、LPS+IFN- γ 刺激後 48 時間に野生型と比較して、*Il10* は低下し、*Tgfb1* および *Il4r* は増加した (Figure 19F-H)。また、LPS+IFN- γ 処置後の両群間において、*Il6*, *Tnf*, *Ccl2* および *Mrc1* の発現レベルに、明らかな違いは認められなかった (Figure 19C-E, I)。IL-4 刺激後の両群間においても、それらの mRNA 発現レベルに顕著な変化は認められなかった。

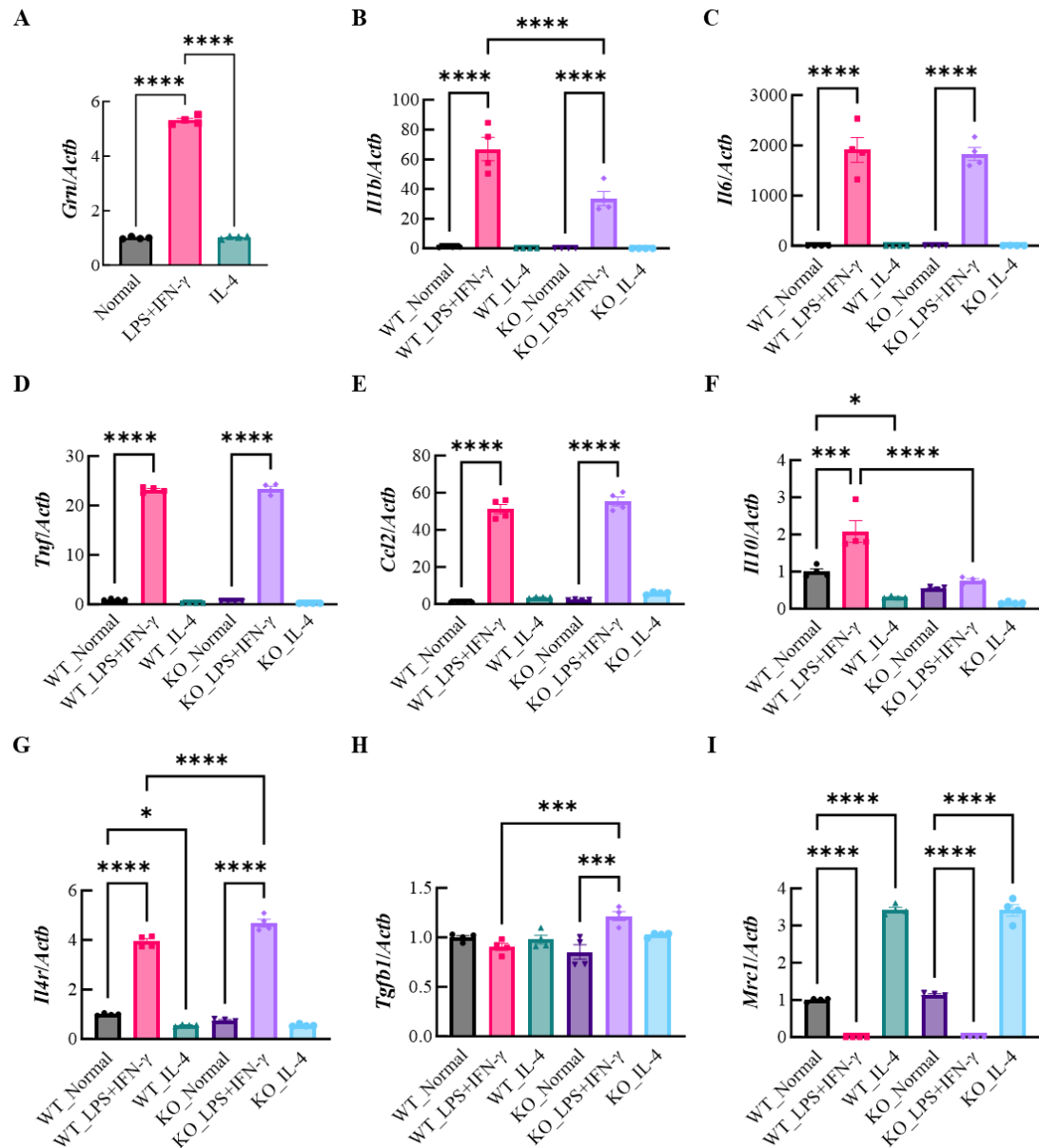


Figure 19 Abnormal polarization of PGRN-deficient bone marrow-derived macrophages in inflammatory responses.

(A) *Grn* mRNA levels in bone marrow-derived macrophages (BMDMs), treated with LPS+IFN- γ and IL-4 for 48 hours. Data are the means \pm SEM (Normal: n = 4, LPS+IFN- γ : n = 4, IL-4: n = 4). **** p < 0.0001 vs. LPS+ IFN- γ (one-way ANOVA followed by Dunnett T3 test). (B-I) mRNA levels of *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ccl2*, *Il10*, *Il4r*, *Tgfb1* and *Mrc1* in WT and PGRN-deficient BMDMs treated with LPS+IFN- γ and IL-4 for 48 hours, respectively. Data are the means \pm SEM (WT; Normal: n = 4, LPS+IFN- γ : n = 4, IL-4: n = 4, PGRN-KO; Normal: n = 4, LPS+IFN- γ : n = 4, IL-4: n = 4). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

3-15 プログラニューリン欠損が炎症応答後のマクロファージ貪食能に及ぼす影響

野生型およびプログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージにおいて、LPS 誘発貪食能に関する評価を実施した。野生型およびプログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージ共に、LPS 処置後 1、6、24 時間において貪食能は増加した。プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージでは、LPS 処置後 1 時間で野生型と比較して貪食能が増加した (Figure 20A)。LPS 処置後の両群間において、6 時間後および 24 時間後の貪食能に明らかな違いは認められなかった (Figure 20B, C)。通常条件下の両群間では、いずれのタイムポイントにおいても貪食能に有意な変化は認められなかった (Figure 20A-C)。プログラニューリン欠損は、マクロファージにおいて炎症応答後の早期に貪食能を亢進させる可能性がある。

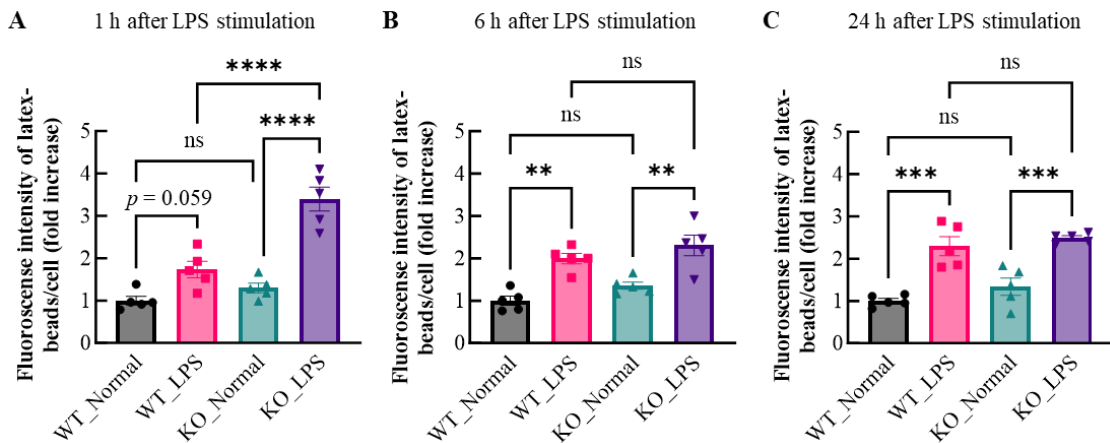
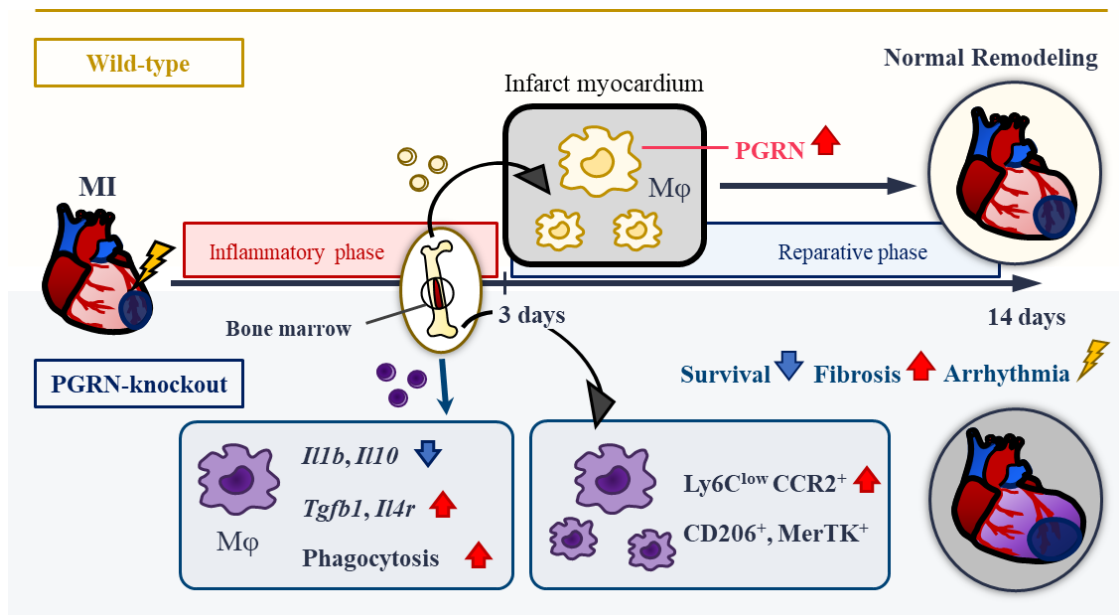


Figure 20 PGRN deficiency increases phagocytosis in macrophages early in the inflammatory response.

(A-C) Phagocytosis activities quantified by fluorescence intensity of latex-microbeads corrected by number of cells in WT and PGRN-deficient BMDMs treated with LPS for 1, 6 and 24 hours. Data are the means \pm SEM (WT; Normal: n = 5, LPS: n = 5, PGRN-KO; Normal: n = 5, LPS: n = 5). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

第4節 考察

本章では、プログラニュリン遺伝子欠損が急性心筋梗塞後の心臓リモデリングに及ぼす影響を検討した。プログラニュリンは梗塞後心臓のマクロファージにおいて豊富に発現した。プログラニュリン欠損は、心筋梗塞後における死亡率の増加、線維化の亢進、重篤な不整脈を誘発した。プログラニュリン欠損マウスの心臓では、CD206 および MerTK の発現量が高値を示し、それらは $Ly6C^{low} CCR2^+$ $CD11b^+$ 心臓マクロファージ亜集団の増加と相関することが明らかになった。他方、骨髄由来マクロファージにおけるプログラニュリンの発現は、LPS+IFN- γ 処置によって誘導された。プログラニュリン欠損は、LPS+IFN- γ で刺激した骨髄由来マクロファージにおいて、*Il4r* および *Tgfb1* の発現レベルを増加させ、*Il1b* および *Il10* の発現レベルを減少させた。また、プログラニュリン欠損により、炎症応答の早期において貪食活性が亢進した。以上より、プログラニュリンは心筋梗塞後の有害な心臓リモデリングに対して保護的に働き、その作用メカニズムの一部にマクロファージにおける炎症応答の制御機構が関連している可能性が示された (Figure 21)。



(Continued on next page)

Figure 21 Graphical abstract of the adverse cardiac remodeling after MI by PGRN deficiency.

Progranulin (PGRN) was abundantly expressed in macrophages post-MI. PGRN-KO mice showed higher mortality, increased fibrosis and severe arrhythmias following MI. PGRN deficiency induced abnormal cardiac macrophage subpopulation after MI, which involved Ly6C^{low} CCR2⁺ macrophages previously reported to accelerate ischemic injury. PGRN-deficient bone marrow derived-macrophages exhibited lower levels of *Il1b*, *Il10* and higher levels of *Tgfb1*, *Il4r* and increased phagocytosis following stimulation of LPS and IFN- γ . PGRN deficiency may exacerbate post-MI remodeling via recruitment of macrophages that exert abnormal inflammatory responses.

プログラニューリン欠損マウスでは、心筋梗塞後において左心室および右心室の線維化が増加した。一般に、心筋梗塞後の非梗塞部における心臓線維化は、筋線維芽細胞の活性化によって誘導される反応性線維化である (72)。また、プログラニューリンは肝線維芽細胞であるヒト初代星細胞において TGF- β 誘導性の *ACTA2* (α SMA) および *Colla1* の遺伝子発現を抑制することが報告されている (73)。これらの知見から、プログラニューリン欠損による過剰な線維化は、心筋梗塞後における線維芽細胞の活性化に対する負のフィードバック機構の減弱に起因すると考えられる。一方、プログラニューリン欠損は、心筋梗塞後 3 日目の α SMA 発現量を変化させなかった。線維芽細胞は、心筋梗塞後 3 日目に心臓内で活性化され、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に分泌する筋線維芽細胞へと分化する (74)。これらの知見を考慮すると、プログラニューリンは線維芽細胞の活性化を抑制し得るが、心筋梗塞後における線維芽細胞の初期活性化には影響を及ぼさないと考えられる。他方、プログラニューリンは、アンジオテンシン II 誘発心筋細胞肥大を抑制した。先行研究において、プログラニューリンのノックダウンは、新生児ラット由来初代心室筋細胞における肥大化を増加させている (75)。プログラニューリンは心筋細胞の肥大化を抑制する可能性がある。以上を踏まえると、プログラニューリン欠損による心筋梗塞後の心肥大は、

線維化瘢痕の肥厚化と心筋細胞の肥大化の両者に起因すると考えられる。

冠動脈閉塞による心筋壊死後、炎症応答は迅速に開始され、単球・マクロファージが梗塞部位に動員される (76)。単球・マクロファージは、CCL2 を含むケモカインに誘引される (77, 78)。scRNA-seq データ解析により、マクロファージにおけるプログラニュリンの高発現を明らかにした。心筋梗塞後のプログラニュリン欠損マウスの心臓では、CCR2⁺骨髄由来マクロファージに起因するマクロファージ浸潤が増加した。しかしながら、プログラニュリン欠損により、CCL2 発現量は増加傾向を示したが、有意な変化は認められなかった。先行研究において、CCL2 mRNA 発現量は、心筋梗塞後 4 および 10 時間という早期に増加している (79)。以上を踏まえると、CCL2 は心筋梗塞後 3 日目より早期において単球・マクロファージの動員を促進する可能性がある。プログラニュリン欠損によるマクロファージ浸潤の増加は、サイトカインおよびケモカイン等の総合的な影響に起因する可能性があるため、包括的な解析を用いた研究が将来的に必要である。

マクロファージに発現し食食機能に関わる MerTK の欠損は、アポトーシス細胞の除去を障害し、心筋梗塞後における炎症応答の遷延化、心臓線維化の増加、心機能の低下につながる (56)。今回、プログラニュリン欠損は、MerTK 発現量と共に、心筋梗塞後における死亡率も増加させた。また、プログラニュリン欠損骨髄由来マクロファージでは、炎症応答後 6 時間および 24 時間ではなく、1 時間でのみ食食能の亢進が観察された。プログラニュリンの欠損により、骨髄由来マクロファージおよびミクログリアにおける食食作用を増強させることが報告されている (80, 81)。すなわち、プログラニュリンは炎症応答の早期における食食活性を制御することが示唆される。他方、本研究においてプログラニュリン欠損マウスは、心筋梗塞後の早期に心破裂により死亡する個体

が散見された。先行研究において、Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) 欠損はマクロファージによる心筋死細胞の貪食除去を遅延させ、心筋梗塞後の心破裂を減少している (82)。以上の結果を考慮すると、プログランニューリン欠損によるマクロファージの貪食活性の早期亢進は、アポトーシス細胞の除去と瘢痕形成の不均衡を誘導し、心臓組織の脆弱化と心破裂の発生に寄与する可能性が考えられる。

プログランニューリン欠損マウスの心臓および腹腔マクロファージでは、CD206 発現量の増加が観察された。先行研究において、プログランニューリン欠損マウスでは、カルディオトキシン誘発骨格筋傷害後に CD206 陽性 M2 様マクロファージが増加している (58)。これらの知見を踏まえると、プログランニューリン欠損は、組織傷害や環境因子に応答して M2 様マクロファージ極性を促進する可能性がある。また、マクロファージは炎症応答後に M1 様表現型から M2 様表現型に極性変化を自己制御することが報告されている (71)。実際、炎症応答後の後期にある腹腔マクロファージは、M1 マーカーと M2 マーカーを同時に発現する (83)。また、プログランニューリン欠損は、LPS 刺激後に炎症性サイトカインを豊富に分泌する M1 様マクロファージを誘導するという報告も存在する (57)。今回、プログランニューリン欠損骨髄由来マクロファージは、炎症応答後に IL-4R 発現量の増加を示した。IL-4R シグナルは、マクロファージの M2 極性を促進する要因である (84)。以上の観点から、プログランニューリン欠損により、マクロファージにおける炎症応答に対する抑制的フィードバック機構が早期に働き始めることが推察される。一方、プログランニューリン欠損マクロファージでは、炎症応答後に IL-10 発現量が低下し、通常条件下においても低下傾向にあった。IL-10 はマクロファージにおける Toll-like receptor 4 (TLR4) 誘導性の活性化を抑制する (85)。プログランニューリン欠損による IL-10 の機能不全は、マクロファ

ージにおける炎症応答の感受性と極性化の自己制御に部分的に影響する可能性が考えられる。以上より、プログラニュリン欠損はマクロファージにおける炎症応答後の極性化に対する自己制御機構を障害することが示唆される。

CD206 陽性 M2 様マクロファージは、一般に心臓の組織修復を促進し、予後改善に寄与する (84)。しかしながら、プログラニュリン欠損マウスでは、心筋梗塞後において心臓の CD206 発現量は増加したが、死亡率の増加、線維化の亢進および重篤な不整脈を示した。また、CD206 の発現は、骨髄由来抗炎症性の表現型に分類される CCR2⁺ Ly6C⁻マクロファージ亜集団において観察された。先行研究では、虚血傷害後の腎臓において、骨髄由来 Ly6C⁻マクロファージは線維化を促進し、病態悪化に寄与している (86)。したがって、プログラニュリン欠損は、心臓 CCR2⁺ Ly6C⁻マクロファージ増加を介して、虚血性傷害後の心臓線維化を悪化させ、生存率を低下させる可能性がある。他方、TGF- β の発現レベルは、炎症応答後のプログラニュリンを欠損したマクロファージにおいて増加した。マクロファージは、心筋梗塞後の線維性瘢痕形成においても重要な役割を担う。実際、先行研究において、CCL2 欠損に伴う浸潤マクロファージの減少は、虚血再灌流障害後 7 日目の心臓線維化を減少させることが報告されている (87)。したがって、プログラニュリンは、虚血傷害に伴う炎症応答後に、マクロファージの過剰な線維化反応を抑制する機能を有する可能性が考えられる。

結論として、プログラニュリンはマクロファージの機能調節を介して、心筋梗塞後の有害な心臓リモデリングを抑制することが示唆された。プログラニュリンは、心筋梗塞後の心不全発症を予防するために重要な役割を担う可能性がある。本章では、プログラニュリンの全身的な欠損により心筋梗塞後に有害な心臓リモデリングが誘導されることを明らかにした。しかしながら、プログラ

ニューリン欠損マクロファージが心臓リモデリングの増悪に直接的に関与するか否かについては不明である。そこで第2章では、プログラニューリン欠損マクロファージが心筋虚血病態に及ぼす影響について検討した。

第2章 マクロファージにおけるプログラニュリンの関与

第1節 緒言

急性心筋梗塞に対する救命率は向上した一方で、その後心不全に進展し致命的な経過を辿る患者は未だ多い。不整脈は急性心筋梗塞後における重篤な合併症かつ主要な死因であり、生命予後を左右する重大な要因である (88)。心電図において観察される QT 間隔は、心室の電氣的興奮から回復までに必要な時間を反映している。持続的な QT 間隔の延長は、致死性不整脈の発生リスクを高めるため、急性心筋梗塞後における突然死の原因となる (89)。しかしながら、急性心筋梗塞後の心臓電気生理学的変化は十分に解明されていない。

マクロファージは、心臓電気生理の恒常性維持において重要な役割を担う。不整脈発生は、マクロファージによる炎症性サイトカインおよび活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の産生に関連する (90)。急性心筋梗塞後に心室性不整脈を呈する患者では、炎症性サイトカインや炎症性単核球の血中レベルが高いことが報告されている (91)。また、マクロファージを含む骨髄細胞内ミトコンドリア ROS (mitochondrial ROS: mtROS) 産生量の亢進は、マウス心筋梗塞モデルにおける生存率を著しく低下させる (92)。すなわち、急性心筋梗塞後において不整脈の増悪に寄与するマクロファージの表現型を明らかにすることは病態解明において重要である。

プログラニュリン欠損マクロファージは、複数のマウス疾患モデルにおいて異常な炎症応答を示し、組織傷害の増悪に寄与している (57, 93)。当研究室における過去の報告では、プログラニュリンのノックダウンは低酸素条件下におけるマクロファージの炎症性サイトカインの産生を促進することを明らかにした (94)。また、第1章で示したように、プログラニュリンの全身欠損は、マウス心筋梗塞モデルにおいてマクロファージの過剰な集積を誘導し、有害な心

臓リモデリングを促進した (95)。しかしながら、プログラニューリン欠損マクロファージが低酸素条件下において心筋障害の増悪に関与するか否かについては不明である。

本研究では、プログラニューリン欠損マクロファージが、マウス心筋梗塞モデルの心臓電気生理に及ぼす影響を検討した。また、プログラニューリン欠損マクロファージが心筋細胞死に及ぼす影響とその作用機序を検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 動物

雄性C57BL/6Jマウス (6-8週齢) は、日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Japan) から購入した。プログラニューリン欠損マウスは、理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) より入手し、C57BL/6Jマウスで10世代以上戻し交配した (59)。野生型およびプログラニューリン欠損マウスは8-16週齢を使用した。実験動物のプロトコールは、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) の「実験動物の使用に関するガイドライン (Guidelines on the Use of Laboratory Animals)」に従って実施され、岐阜薬科大学および岐阜大学の施設動物管理使用委員会および施設バイオセーフティ委員会の承認および監視を受けた (岐阜薬科大学動物実験申請承認番号: 2022-012、2022-022、岐阜大学動物実験申請承認番号: 2020-179)。マウスは、動物飼育施設において、 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12時間の明暗サイクルのもとで、餌と水を自由に摂取できる状態で維持された。外科手術および心電図記録中は、ヒートパットを用いて体温を一定に維持した。

2-2 実験材料

本実験に用いた薬物および試薬は、以下の通りである。

Recombinant mouse M-CSF protein、recombinant mouse IFN-gamma protein は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS)、Accutase は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、ペニシリン (penicillin)、ストレプトマイシン (streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、イソフルラン (isoflurane) は Pfizer (Tokyo, Japan)、ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS)、Hoechst 33342、propidium iodide (PI)、RNAlater-ICE、DMEM ([+] L-Glutamine、[-] D-Glucose、[-] Sodium

Pyruvate)、赤血球溶解バッファー [red blood cell (RBC) lysis buffer] は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、ROS assay kit は Dojindo Molecular Technologies (Rockville, MD, USA)、seahorse XF DMEM、seahorse XF glucose solution、seahorse XF pyruvate solution、seahorse XF glutamine solution、oligomycin A (Oligo)、carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)、rotenone/antimycin A (Rot/Ant) は Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)、メデトミジン塩酸塩 (medetomidine hydrochloride) は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)、ミダゾラム (midazolam)、ブトルファノール酒石酸塩 (butorphanol tartrate) は Wako (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。

2-3 マウス心筋梗塞モデルの作製

マウス心筋梗塞モデルは、前述の通り左冠動脈を結紮して作製した (95)。簡潔に記述すると、麻酔は、70% N₂O および 30% O₂ 存在下で 1.0–3.0% イソフルランにてマウスに導入・維持し、気管内挿管後に人工呼吸器に接続した。左冠動脈を露出し、陽圧換気下 (7 mL/kg、140 strokes/min) で 7-0 絹糸を用いて結紮した。偽手術マウスでは、左冠動脈を結紮せず、同様の外科的処置を行った。

2-4 心電図測定

心電図は前述の方法で測定した (95)。メデトミジン (0.3 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg) 混合溶液を腹腔投与し、マウスに麻酔を誘導した。信号は 4 kHz で記録され、0.3 Hz のハイパス設定と 1 kHz のローパス設定でフィルタリングした。第 II 誘導心電図の測定のため、左後肢、右前肢、右後肢の皮下に電極針を刺した。平均信号心電図は 60 秒までの複合時間によって作製し、得られた信号は LabChart v8 ソフトウェア (ADInstruments,

Dunedin, New Zealand) を用いて解析した。心電図の波形から QT 間隔、QTc、RR 間隔、T-peak T-end 間隔を定量した。T-peak T-end 間隔は心室の再分極の不均一性を反映し、その延長は不整脈の発生や死亡の予測因子になる (96)。

2-5 初代培養骨髄由来マクロファージの培養

骨髄由来マクロファージの培養は、前述の通り実施した (95)。簡潔に記述すると、イソフルラン過剰麻酔によりマウスを安楽死させ、大腿骨と脛骨を採取した。赤血球溶解バッファーにて骨髄を溶血した。ペニシリン (100 U/mL) とストレプトマイシン (100 µg/mL) を含む low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-low) に懸濁した。遠心後、10%FBS と M-CSF (10 ng/mL) を含む DMEM-low に再懸濁し、100 mm シャーレに播種し、37°C、95% air、5%CO₂ の加湿大気下で培養した。その後、5-7 日間培養して骨髄由来マクロファージに分化させた。

2-6 骨髄由来マクロファージの投与

骨髄由来マクロファージは、PBS にて 2 回洗浄し、Accutase (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) で 20 分間インキュベートした後、セルスクレーパー (Corning Incorporated, NY, USA) を用いて剥離した。細胞を 10%FBS 含有 DMEM-low に再懸濁し、遠心分離した。細胞懸濁液 (1.0×10^6 cells/mL) を、心筋梗塞後 2 日目に 3.0×10^5 cells/mouse で右頸静脈内に投与した。偽手術群と Vehicle 群には 10%FBS 含有 DMEM-low 0.3 mL を静脈内に投与した。

2-7 骨髄由来マクロファージの濃縮培養上清の調製

骨髄由来マクロファージは、6-well プレートに 1.0×10^6 cells/well の密度で播

種し 24 時間培養した。細胞を PBS で 1 回洗浄し、窒素ガスで 20 分間バブリングした M-CSF (10 ng/mL) を含む無血清 DMEM-low に培地交換した。その後、細胞を通常または低酸素条件下 (94% air、5%CO₂、1%O₂) に暴露した。培養 24 時間後に上清を回収し、Amicon Ultra-15 ユニット (分子量カットオフ : 3,000 ; Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて 2,600×g で遠心濃縮した。

2-8 ROS アッセイ法

骨髄由来マクロファージは、96-well プレートに 5.0×10^4 cells/well の密度で播種し 3 時間培養した。培地を 10% FBS と M-CSF (10 ng/mL) を含む DMEM-low に交換し、窒素ガスで 20 分間バブリングした。LPS および IFN- γ を最終濃度 10 ng/mL および 20 ng/mL でそれぞれ添加し、細胞を通常または低酸素条件に曝露した。培養 24 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、highly sensitive 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) working solution (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) に 1 時間浸漬した。蛍光強度は、spectrophotometer (Varioskan; Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) を用いて、励起波長 490-520 nm および発光波長 510-540 nm の設定で測定した。

2-9 細胞外フラックス分析

Cell Mito Stress Test (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を、製造業者の指示に従って実施した。簡単に説明すると、骨髄由来マクロファージを 40,000 cells/well で Seahorse XF HS 8 well plate (Agilent Technologies) に播種した。3 時間培養後、ROS アッセイ法と同様に培地交換した。その後、培地を 10mM グルコース、1mM ピルビン酸、2mM l-グルタミンを含む Seahorse XF DMEM 培地 (Agilent Technologies) に交換し、非 CO₂ インキュベーター内で 37°C、1

時間インキュベートした。プレートを Seahorse XF HS Mini Analyzer (Agilent Technologies) に移し、1.5 μM oligomycin A (Oligo)、2.0 μM carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)、および 0.5 μM rotenone と 0.5 μM antimycin A の混合物 (Rot/Ant; Agilent Technologies) を用いて Cell Mito Stress Test を行った。データは Agilent Seahorse Analytics (Agilent Technologies) を用いて解析し、酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) および細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate: ECAR) を定量した。

2-10 H9c2 細胞株の培養と細胞死アッセイ

ラット心筋細胞株 (H9c2; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) は、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した 10% FBS 含有 high-glucose DMEM (DMEM-high) で維持した。細胞を 24-well プレートに 2.0×10^3 cells/well の密度で播種し、48 時間培養した。培地は窒素ガスで 20 分間バブリングした無血清・グルコース不含 DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に交換した。酸素グルコース欠乏負荷 (oxygen-glucose deprivation: OGD) 群では、無血清・グルコース不含 DMEM 中で低酸素条件 (1% O_2) に曝露した。正常群では、1%FBS 含有 DMEM-high 中、正常酸素下にて培養した。24 時間培養後、細胞を Hoechst 33342 (1:1,000) と PI (1:500) で 20 分間染色し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710 ; Keyence) を用いて撮影し、細胞数をカウントした。骨髄由来マクロファージの濃縮培養上清は、OGD 開始直前に添加した。

2-11 RNA-seq 解析

総 RNA は、心筋梗塞後 3 日目の野生型およびプログラニューリン欠損マウス

の心臓から、RNAlater-ICE (Thermo Fisher Scientific) および Maxwell Rapid Sample Concentrator (Promega Promega Corporation, WI, USA) を用いて抽出した。RNA 品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて評価した。RNA integrity number > 8.0 の RNA サンプルを RNA-Seq 解析に供した。RNA ライブラリーは、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Takara Bio, Mountain View, CA, USA) を用いて、50 ng の総 RNA から、製造業者の指示に従って調製した。調製したライブラリーは、paired-end 150-bp reads を用いて NovaSeq 6000 装置 (Illumina, San Diego, CA, USA) で配列決定した。配列リードは、2016 年1月18日にNCBIから取得したファイルの RefSeq アノテーションを用いて、STAR v2.5.3 (Dobin et al., 2013) を用いて two-pass mode で GRCm38.p3 (mm10) に整列した。Takara Bio 社によるコントロール解析により、各遺伝子の QC 指標と正規化リードカウントを獲得した。IPA のデータは、Subio platform (Subio, Kasugai, Japan) を用いて、Log₂ fold-change > 1.5 で抽出した。機能濃縮解析は、Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) を用いて、各遺伝子の中で過剰に発現する Gene Ontology (GO) term および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway に含まれる因子を同定した。

2-12 統計解析

データは平均値±平均値の標準誤差で表した。量的変数は、2 群間比較には Levene 検定後に Student の両側 *t* 検定または Welch の両側 *t* 検定を、多群間比較には一元配置分散分析後に Tukey 検定を用いて統計的に解析した。統計的有意性は $P < 0.05$ とした。全ての統計解析は、SPSS (version 24.0.0.0; IBM, Armonk, NY, USA) および GraphPad Prism (version 10.0.3; GraphPad Software, Boston, MA, USA) を用いて実施した。

第3節 実験成績

3-1 プログラニュリン欠損マウスの心臓における RNA-seq 解析

プログラニュリン欠損が心筋梗塞後の病態生理に及ぼす影響、特にマクロファージ関連遺伝子の変動を理解するために、梗塞後心臓について RNA シーケンスデータを用いた KEGG パスウェイ解析を実施した。プログラニュリン欠損マウスでは、心筋梗塞後3日目において「cytokine–cytokine receptor interaction」および「TNF signaling pathway」に関連する遺伝子群の発現が増加した (Figure 22A)。また、cytokine–cytokine receptor pathway に関連する遺伝子には、*Ccl3*、*Ccl8*、C-X-C motif chemokine ligand-5 (*Cxcl5*)、*Il6*、oncostatin M (*Osm*) 等のマクロファージ関連サイトカインやケモカインが含まれた (Figure 22B)。次いで、biological process に関連する GO (Gene ontology) 解析を実施した。プログラニュリン欠損マウスでは、「positive regulation of I- κ B kinase/NF- κ B signaling」に関連する遺伝子群の発現増加が認められた (Figure 22C)。以上より、プログラニュリン欠損は心筋梗塞後の病態生理において、マクロファージを介した炎症応答を誘導する可能性がある。

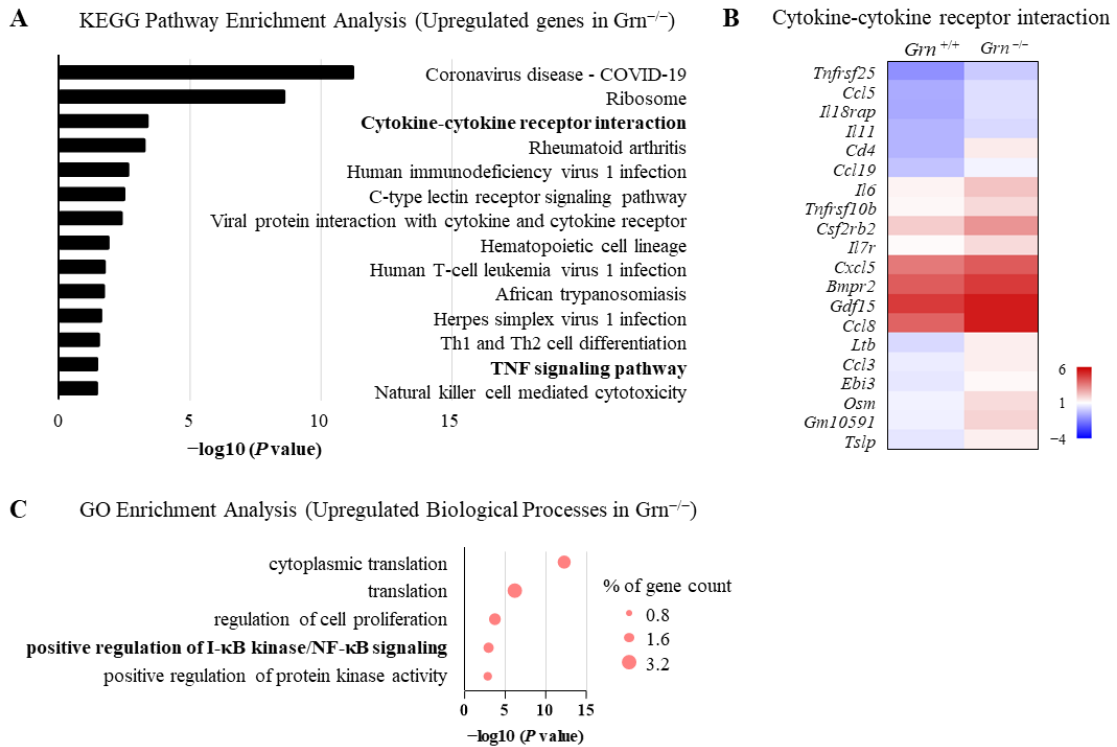


Figure 22 RNA sequencing analysis of the infarcted heart in PGRN-KO mice.

(A) KEGG pathway enrichment analysis data for upregulated genes in $Grn^{-/-}$ heart post-MI. (B) Heatmap of genes in the KEGG pathway of cytokine-cytokine receptor interaction upregulated in $Grn^{-/-}$ heart post-MI. (C) GO enrichment analysis data for upregulated biological processes in $Grn^{-/-}$ heart post-MI.

3-2 プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージがマウス心筋梗塞モデルの心臓電気生理に及ぼす影響

プログラニューリン欠損マクロファージが、心筋梗塞後の心機能に及ぼす直接的な影響を理解するために、マウス心筋梗塞モデルに野生型またはプログラニューリン欠損マクロファージを投与し、心筋梗塞 14 日後に心電図を評価した。心筋梗塞群では、偽手術群と比較して QT 間隔、補正 QT 間隔、T-peak T-end 間隔および RR 間隔が延長した (Figure 23A-E)。プログラニューリン欠損マクロファージの投与は、野生型マクロファージの投与と比較して、心筋梗塞後の QT 間隔、補正 QT 間隔、T-peak T-end 間隔を延長させた (Figure 23B-D)。RR

間隔は、野生型およびプログラニュリン欠損マクロファージの投与により著明な変化は認められなかった (Figure 23E)。以上の結果より、プログラニュリン欠損マクロファージは、心筋梗塞後において重篤な不整脈発生に寄与する可能性が示された。

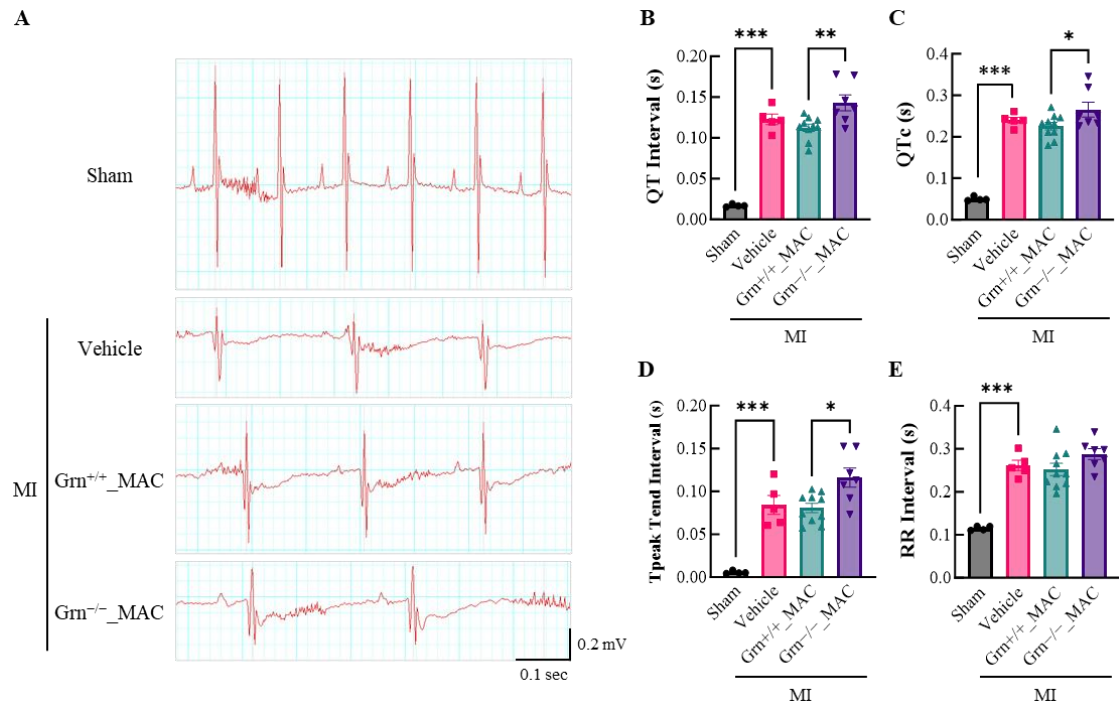


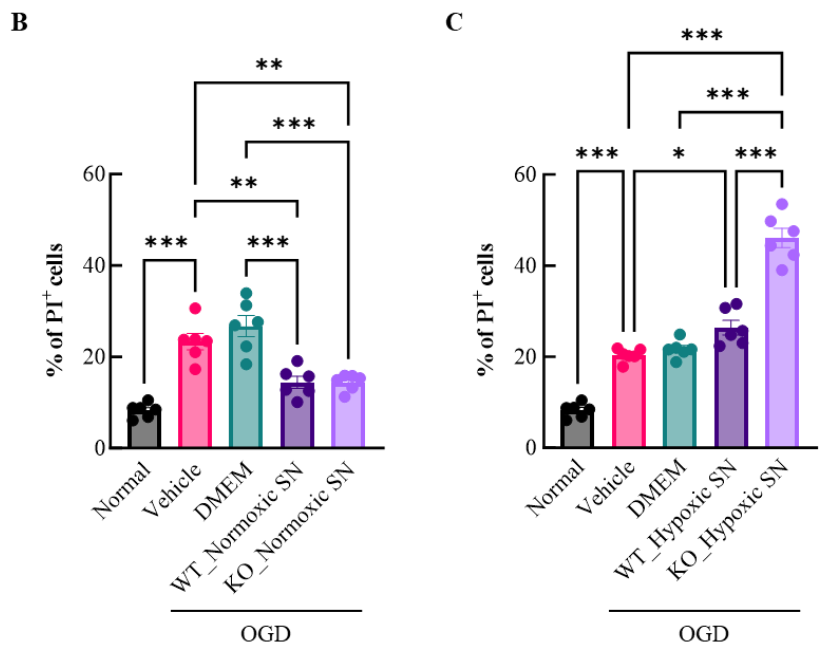
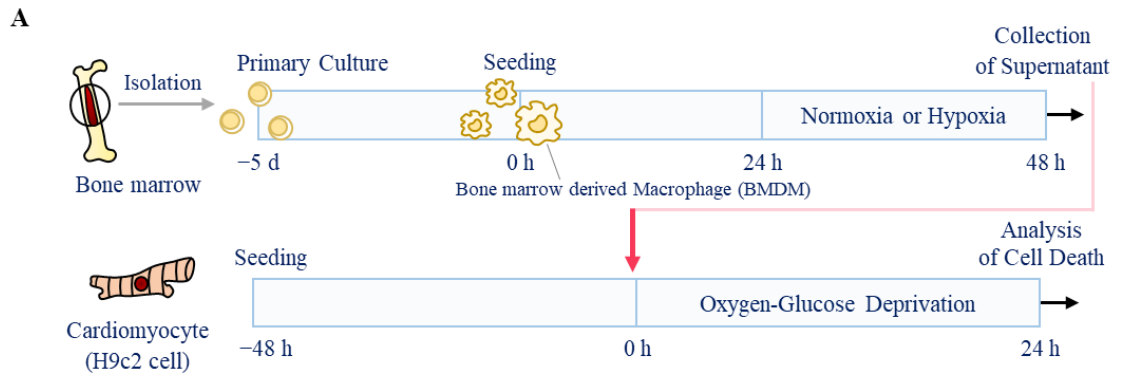
Figure 23 PGRN deficient macrophages exacerbate cardiac dysfunction after MI.

(A) Typical electrocardiography (ECG) images of mice 14 d after sham operation and MI. MI groups were intravenously injected with vehicle, Grn^{+/+} bone marrow-derived macrophages (BMDMs), and Grn^{-/-} BMDMs. (B–E) Quantitative data of QT, QTc, T-peak T-end, and RR intervals. Data are represented as the mean ± standard error of the mean (SEM; n = 4–10). **p* < 0.05 vs. Grn^{-/-} MAC (Student’s two-tailed t-test), **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 (Tukey’s test).

3-3 骨髄由来マクロファージ培養上清が、低酸素グルコース欠乏負荷後の心筋細胞死に及ぼす影響

正常酸素または低酸素誘導 24 時間後に、野生型またはプログラニュリン欠損マクロファージの培養上清を採取した。濃縮した培養上清を H9c2 心筋細胞

株に添加し、OGD 条件に 24 時間暴露した (Figure 24A)。野生型およびプログラニュリン欠損骨髄由来マクロファージにおける正常酸素条件下の培養上清は、OGD 誘発 PI 陽性死細胞の割合を減少させた (Figure 24B)。一方、低酸素条件下プログラニュリン欠損マクロファージ培養上清では、野生型と比較して細胞死率が顕著に増加した (Figure 24C)。以上より、プログラニュリン欠損骨髄由来マクロファージの分泌物は、低酸素条件下で特異的に心毒性を誘導することが示唆された。



(Continued on next page)

Figure 24 Oxygen–glucose deprivation (OGD)-induced cardiomyocyte death is accelerated by the secretory components of Grn^{-/-} macrophages.

(A) Scheme of experiments to investigate the effects of the Grn^{+/+} and Grn^{-/-} BMDM supernatants on H9c2 cardiomyocytes under normal and OGD conditions. (B–C) Quantifying the percentage of PI⁺ cells in cardiomyocytes treated with the normoxic and post-hypoxic supernatants from Grn^{+/+} and Grn^{-/-} BMDMs. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 (Tukey’s test).

3-4 プログラニュリン欠損が骨髄由来マクロファージにおける ROS 産生に及ぼす影響

マクロファージは、細胞死を誘導する反応性酸化物質の放出を介して、組織傷害を促進する (97)。そこで、DCFH-DA 蛍光強度の測定により、マクロファージにおける ROS 産生量を評価した。低酸素および LPS+IFN-γ 刺激から 24 時間後において、プログラニュリン欠損骨髄由来マクロファージは野生型と比較して ROS 産生量が増加した (Figure 25A, B)。以上より、プログラニュリン欠損骨髄由来マクロファージは、虚血および炎症条件下で心筋傷害を促進する可能性がある。

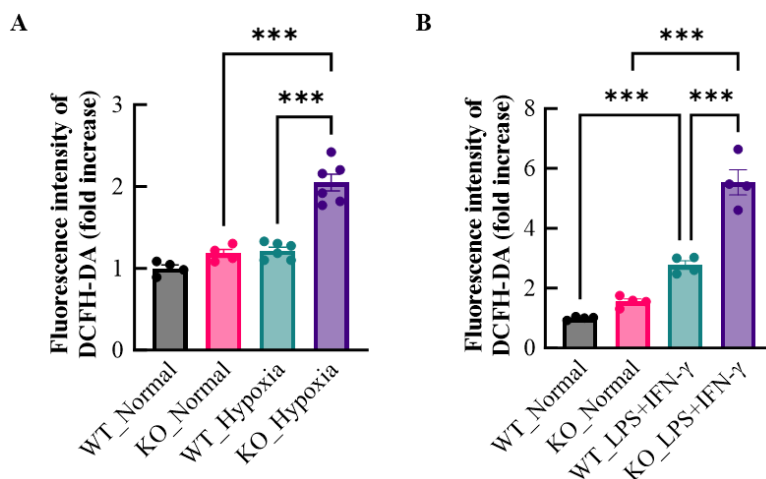


Figure 25 Grn^{-/-} macrophages increase the production of reactive oxygen species under ischemic and inflammatory conditions.

(A, B) Quantifying the fluorescence intensity of DCFH-DA in Grn^{+/+} and Grn^{-/-} BMDMs 24 h after hypoxia and LPS plus IFN-γ stimulation. Data are represented as the mean ± SEM (n = 6). ****p* < 0.001 (Tukey’s test).

3-5 プログラニュリン欠損が低酸素後のマクロファージにおけるミトコンドリア機能に及ぼす影響

ミトコンドリアは活性酸素の主要な供給源である。ミトコンドリアの酸化リン酸化 (oxidative phosphorylation: OXPHOS) を介して発生した活性酸素は、マクロファージにおける炎症反応を促進する (98)。酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) は、ミトコンドリア機能に関連するミトコンドリア OXPHOS を反映する。そこで今回、培養 7 日目の野生型およびプログラニュリン欠損マクロファージを用いて、低酸素 24 時間後における OCR を評価した (Figure 26A)。野生型およびプログラニュリン欠損マクロファージのいずれにおいても、24 時間の低酸素障害は基礎呼吸、最大呼吸、ATP 産生関連呼吸、プロトンリークおよび非ミトコンドリア酸素消費を低下させた (Figure 26B-F)。プログラニュリン欠損マクロファージは、野生型と比較して、低酸素障害 24 時間後の基礎呼吸、最大呼吸、ATP 産生関連呼吸および非ミトコンドリア酸素消費量が増加した (Figure 26B-D, F)。また、正常酸素条件下において、プログラニュリン欠損マクロファージは野生型と比較して最大呼吸の増加を示した (Figure 26C)。

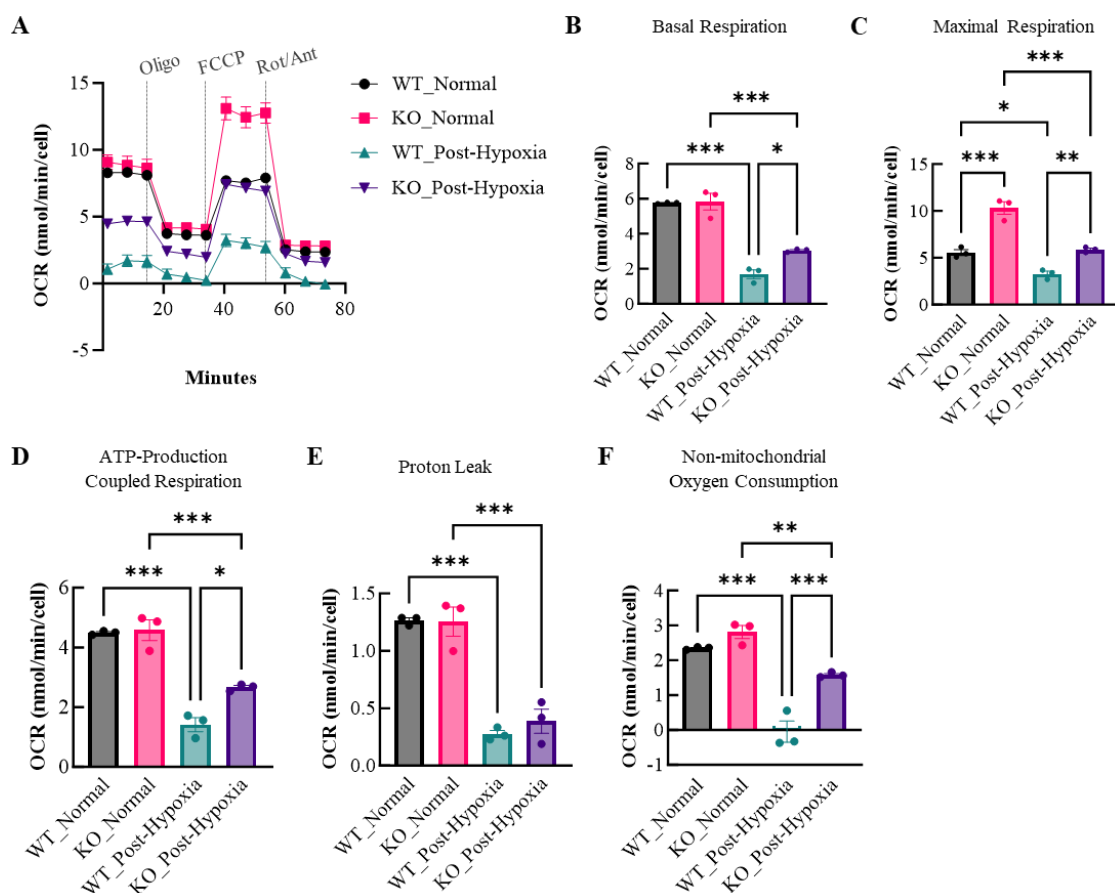


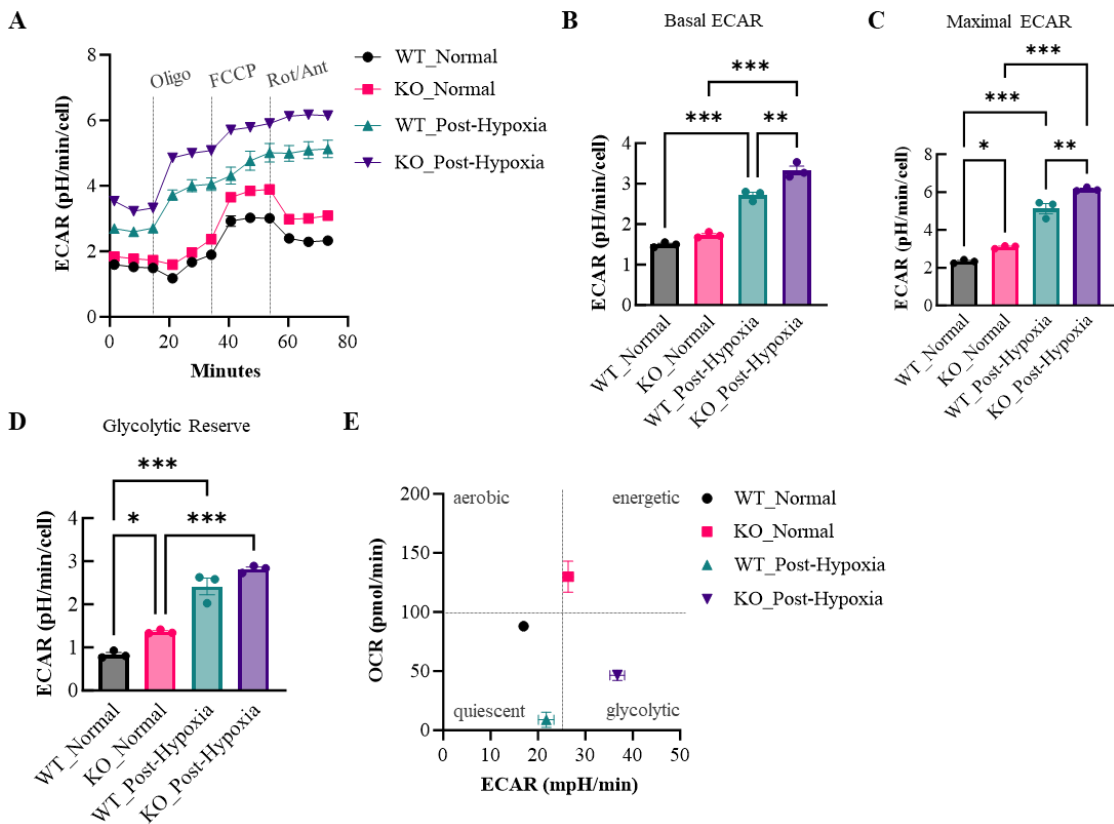
Figure 26 $Grn^{-/-}$ macrophages exhibit abnormal OCR post-hypoxia.

(A–F) Tracing analyses of the oxygen consumption rate (OCR) and quantitative data of basal respiration, maximal respiration, ATP-production coupled respiration, proton leak, and non-mitochondrial oxygen consumption in $Grn^{+/+}$ and $Grn^{-/-}$ BMDMs under normoxia and hypoxia for 24 h. Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Tukey's test).

3-6 プログラニューリン欠損が低酸素後のマクロファージにおける嫌氣的代謝に及ぼす影響

マクロファージは、細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate: ECAR) で定量化される解糖系活性の亢進により低酸素環境への適応を維持する (98)。そこで、OCR 測定時と同様の条件で ECAR を解析した。いずれのマクロファージ群においても、24 時間の低酸素障害は、基礎 ECAR、最大 ECAR および解

糖予備能を増加させた (Figure 27A-D)。また、プログラニュリン欠損マクロファージにおいて、野生型と比較して低酸素障害 24 時間後の基礎 ECAR および最大 ECAR が増加した (Figure 27 A-C)。加えて、プログラニュリン欠損マクロファージは、正常酸素条件下において最大 ECAR および解糖予備能の亢進を示した (Figure 27C, D)。いずれの骨髄由来マクロファージにおいても、低酸素後に OCR の低下および ECAR の増加が観察され、解糖系への代謝シフトが惹起された。好氣的代謝と嫌氣的代謝の活性と偏性を反映するエネルギーマップを作成した。プログラニュリン欠損マクロファージは、正常酸素条件下および低酸素条件下において、野生型と比較して高いエネルギー活性を示した (Figure 27E)。以上より、プログラニュリン欠損はマクロファージにおいて代謝活性を亢進することが示唆された。



(Continued on next page)

Figure 27 Grn^{-/-} macrophages exhibit abnormal ECAR post-hypoxia.

(A–D) Tracing analyses of the extracellular acidification rate (ECAR) and quantitative data of basal ECAR, maximal ECAR, and glycolytic reserve in Grn^{+/+} and Grn^{-/-} BMDMs under normoxia and hypoxia for 24 h. (E) Energy map of BMDMs 24 h after normoxia and hypoxia. Data are represented as the mean ± SEM (n = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 (Tukey's test).

3-7 プログラニューリン欠損が低酸素応答後の早期にマクロファージ代謝に及ぼす影響

次に、マクロファージにおけるプログラニューリン欠損が、低酸素の初期応答において解糖系への代謝シフトを誘導するか否かを検討した。心筋梗塞後に浸潤した単球が低酸素状態に曝露される初期的な環境を再現するために、5日間分化させた未成熟骨髄由来マクロファージを用いた。未成熟骨髄由来マクロファージを低酸素に3時間曝露した後、ECARを測定した。プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージでは、低酸素3時間後に野生型と比較して基礎ECAR、最大ECAR、および解糖予備能の亢進を示した (Figure 28A-D)。野生型骨髄由来マクロファージでは、低酸素3時間後に基礎ECARおよび最大ECARが低下した (Figure B, C)。一方、正常酸素条件下では、両群間に有意差はなかった (Figure 28B-D)。また、プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージは、正常酸素条件下および低酸素条件下で、野生型と比較して高いエネルギー代謝活性を示した (Figure 28E)。したがって、プログラニューリン欠損は、マクロファージにおいて低酸素応答後の早期に解糖系を亢進する可能性がある。

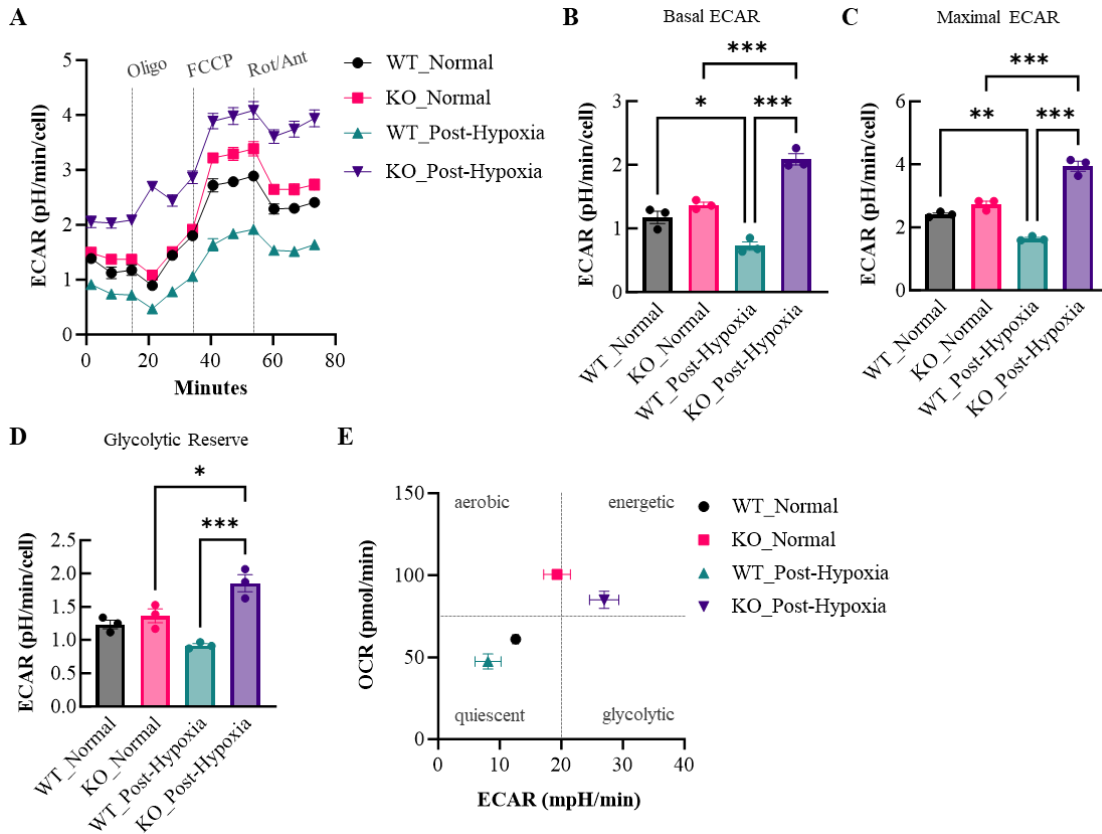


Figure 28 $Grn^{-/-}$ macrophages enhance the glycolytic activity in response to hypoxia.

(A–D) Tracing analyses of ECAR and quantitative data of basal ECAR, maximal ECAR, and glycolytic reserve in $Grn^{+/+}$ and $Grn^{-/-}$ BMDMs under normoxia and hypoxia for 3 h. (E) Energy map of BMDMs 3 h after normoxia and hypoxia. Data are represented as the mean \pm SEM ($n = 3$).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Tukey's test).

3-8 プログラニュリン欠損が炎症応答後の早期にマクロファージ代謝に及ぼす影響

培養 7 日目の骨髄由来マクロファージを用いて、LPS+IFN- γ で 3 時間刺激後の ECAR を評価した。いずれの骨髄由来マクロファージにおいても、LPS+IFN- γ による炎症刺激は、基礎 ECAR および最大 ECAR を増加させた。プログラニュリン欠損マクロファージでは、野生型と比較して、LPS+IFN- γ 刺激後に基礎 ECAR および最大 ECAR が増加した (Figure 29A-C)。一方、解糖予備能はプログラニュリン欠損により有意に変化しなかった (Figure 29A, D)。また、プログ

ラニュリン欠損マクロファージは、正常酸素条件下において最大 ECAR および解糖予備能の亢進を示した (Figure 29C, D)。エネルギーマップの結果により、プログラニュリン欠損マクロファージは、炎症応答後に野生型と比較してエネルギー代謝および解糖代謝が亢進した (Figure 29E)。以上より、プログラニュリン欠損は、マクロファージにおいて低酸素および炎症後の早期に解糖系への代謝シフトを促進する可能性がある。

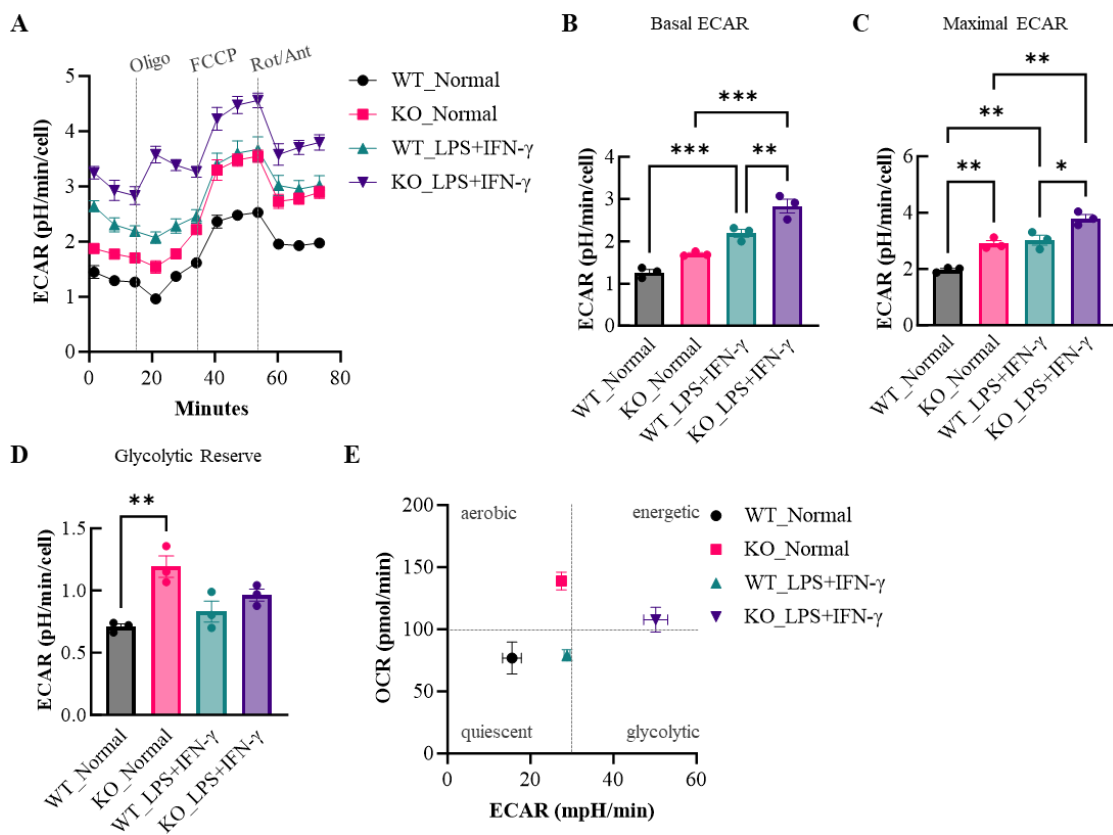


Figure 29 $Grn^{-/-}$ macrophages enhance the glycolytic activity in response to inflammation.

(A–D) Tracing analyses of ECAR and quantitative data of basal ECAR, maximal ECAR, and glycolytic reserve in $Grn^{+/+}$ and $Grn^{-/-}$ BMDMs treated with LPS plus IFN- γ for 3 h. (E) Energy map of BMDMs 3 h after LPS plus IFN- γ stimulation. Data are represented as the mean \pm SEM (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 (Tukey's test).

第4節 考察

本研究より、プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージの投与は、マウス心筋梗塞モデルに対して著しいQT延長を誘導することが明らかになった。RNA-seq解析の結果より、プログラニューリン欠損マウスの心臓では、炎症性シグナルの亢進が観察された。プログラニューリン欠損マクロファージは、低酸素応答後において心細胞死を誘導する分泌物、過剰なROS産生、エネルギー代謝の亢進を示した。以上の結果は、プログラニューリン欠損が、心筋梗塞後に心臓傷害を促進するマクロファージ表現型の誘導を示唆している。

病態生理に対するマクロファージ表現型の影響を検証するために、マウスモデルにマクロファージを直接投与する実験を行った。静脈内投与された骨髄由来マクロファージは、マウスの坐骨神経破砕モデルや腎虚血再灌流モデルにおいて、病変部位に浸潤することが報告されている(99, 100)。また、骨髄由来マクロファージは、圧負荷誘発後の心臓において低酸素領域に集積している(101)。これらの知見から、骨髄由来マクロファージは、虚血組織に選択的に集積することが示唆される。先行研究では、カベオリン-1欠損骨髄由来マクロファージの静脈内投与は、マウス心筋梗塞モデルにおいて心臓の間質性線維化を増加させている(102)。今回の検討により、プログラニューリン欠損マクロファージの静脈内投与は、心筋梗塞後における心臓電気生理の障害を増悪させることを明らかにした。他方、先行研究では、ミクログリア特異的または全身性のプログラニューリン欠損は、脳損傷後に神経細胞死を亢進させることが報告されている(93)。以上を踏まえると、プログラニューリン欠損マクロファージは、低酸素または炎症条件下で、組織損傷および機能障害を増悪させる可能性がある。

ミトコンドリアはOXPHOSを介してATPを供給するが、その際に副次的に

ROS が発生する (98)。ミトコンドリア機能障害は、低酸素および炎症条件下において、マクロファージに mtROS 産生および炎症反応を誘導する (97)。本章の検討から、プログラニューリン欠損は低酸素 24 時間後の骨髄由来マクロファージにおいて ROS 産生および最大ミトコンドリア呼吸を亢進することを示した。*Grn* ノックダウンは SH-SY5Y 神経芽腫細胞株の mtROS およびミトコンドリア量を増加させることが報告されている (103)。したがって、プログラニューリン欠損は、ミトコンドリア機能障害を引き起こし、ROS 発生を促進することが示唆される。

低酸素は、低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor: HIF)-1 α の活性化を介して、解糖系を亢進して炎症性サイトカインを誘導する。解糖系への代謝シフトは、マクロファージにおける ROS 産生を促進し、HIF-1 α 安定化と NF- κ B 活性化に寄与することで、TNF- α を含む炎症性サイトカインの放出を促進する (97)。本検討から、プログラニューリン欠損は低酸素および LPS+IFN- γ 刺激 3 時間後の骨髄由来マクロファージにおいて解糖系活性を増加させることを示した。さらに、プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージの低酸素後培養上清は、OGD 誘発心筋細胞死を促進した。また、プログラニューリン欠損マウスの心臓では TNF シグナルおよび NF- κ B シグナルが活性化された。先行研究では、プログラニューリンは、低酸素条件下で HIF-1 α の発現と NF- κ B の活性化を抑制する (50, 104)。また、TNF- α は心筋細胞の細胞死と収縮機能障害を誘導する (105)。以上より、プログラニューリンは、HIF-1 α および NF- κ B の阻害を介して、マクロファージにおける解糖活性および炎症応答を調節し、虚血後の心筋細胞死に対して保護的に機能する可能性が考えられる。

結論として、本研究は、プログラニューリン欠損が低酸素条件下におけるマクロファージの代謝異常を介して障害性因子の放出を誘導し、心筋梗塞後の心臓電

気生理を増悪させることを見出した。第1章および第2章では、プログラニュリン欠損が心筋梗塞後の有害な心臓リモデリングに寄与することおよびその病態メカニズムの一端はマクロファージの機能障害に起因することを明らかにした。しかしながら、プログラニュリンの投与が心筋虚血傷害および心臓リモデリングに対して治療効果を示すかについては不明である。そこで、第3章ではプログラニュリンの投与が心筋虚血病態に及ぼす影響について検討した。

第3章 プログラニューリンの心筋虚血再灌流障害に対する作用

第1節 緒言

心筋虚血再灌流障害は、経皮的冠動脈形成術の際に副次的かつ不可避に発生し、梗塞拡大および心筋障害を誘導する (16)。梗塞領域の程度は心機能障害の重症度と関連しており、左心室の20%以上の梗塞で心不全徴候が出現し、40%を超えると心原性ショックに陥ると報告されている (17)。本邦を含む臨床試験の結果から、心房性ナトリウム利尿ペプチドおよびニコランジルは再灌流療法の補助薬として限定的な有効性が認められている (6)。しかしながら、これら治療法に関するエビデンスは乏しく推奨度が低い。心筋虚血再灌流障害に対する有用な治療法は未だ確立されておらず、急性心筋梗塞後の早期適応により梗塞拡大および心機能障害を抑制できる新規治療薬の創出が望まれている。

好中球は急性心筋梗塞後の初期に梗塞部位に動員される炎症細胞である (55)。組織に浸潤した好中球は、心筋死細胞の貪食除去やプロテアーゼ放出を介した細胞外マトリックスの分解により癒痕形成の進行に寄与する (106)。また、好中球による細胞外マトリックスの分解は、マクロファージを含む白血球の浸潤を促進する。一方、脱顆粒に伴う ROS の放出や炎症性サイトカインの過剰分泌による炎症の遷延化は、組織傷害の増悪や創傷治癒の遅延につながる (107)。実際、好中球の過剰な浸潤は急性冠症候群患者における有害な臨床転帰や死亡率と関連している (108, 109)。また、マウス心筋梗塞モデルにおいても、好中球の過剰な集積は梗塞拡大につながる事が報告されている (110)。以上の観点から、好中球の浸潤を制御することは心筋虚血傷害の減少に寄与すると考えられる。

急性心筋梗塞は、心筋細胞の不可逆的な脱落を引き起こす。心筋壊死に伴う組織の脆弱化は、しばしば心室壁の破裂の原因となり致命的である (6)。組織

の統合性を維持し、心室壁の破裂を防ぐため、梗塞領域とその周辺領域に線維癒痕が形成される。線維癒痕は、コラーゲンの豊富な細胞外マトリックスで構成され、心室壁の硬質化により機械的ストレスに対して保護機能を亢進させる(72)。しかしながら、癒痕形成に伴う線維化の亢進は、心臓の張力を減少させ心機能を障害する一面もある(111)。また、臨床において心臓線維化の大きさは、心機能障害や死亡率の程度と相関することが報告されている(112)。以上を踏まえると、急性心筋梗塞後の癒痕形成を制御し、過剰な線維化を抑制することが予後改善に重要である。

プログラニュリンは、いくつかの虚血性疾患動物モデルに対する保護作用が報告されている(50, 113)。当研究室では、マウス中大脳動脈閉塞再灌流モデルに対して、プログラニュリンの投与が好中球浸潤の抑制を介して神経保護作用を示すことを報告している(50)。他の研究機関では、マウス腎虚血再灌流モデルにおいて、好中球およびマクロファージ浸潤の抑制および炎症性サイトカイン産生の減少を伴い、尿細管障害を軽減している(113)。第1章および第2章では、プログラニュリンが急性心筋梗塞後の有害な心臓リモデリングを抑制し、生命予後の改善に寄与する可能性を示した。しかしながら、プログラニュリンの心筋虚血再灌流障害および急性心筋梗塞後の線維化に対する治療効果については不明である。

本研究では、マウス左冠動脈結紮モデルおよびウサギ心筋虚血再灌流モデルを用いて、プログラニュリン投与の心筋虚血および再灌流障害に対する保護作用について検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 動物

8-10 週齢雄性 ICR マウスおよび 10 週齢日本白色種ウサギは日本エスエルシー株式会社より購入した (Shizuoka, Japan)。実験動物のプロトコールは、米国立衛生研究所 (National Institutes of Health) の「実験動物の使用に関するガイドライン (Guidelines on the Use of Laboratory Animals)」に従って実施され、岐阜薬科大学および岐阜大学の施設動物管理使用委員会および施設バイオセーフティ委員会の承認および監視を受けた (岐阜薬科大学動物実験申請承認番号: 2017-112、2017-234、2017-315、2017-316、2018-002、2018-048、2019-085、岐阜大学動物実験申請承認番号: 27-89、29-47、29-69、29-83)。岐阜薬科大学および岐阜大学の動物実験施設では、全てのマウスを $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクルで飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。

2-2 実験材料

本実験に用いた薬物および試薬は、以下の通りである。

Recombinant mouse progranulin protein は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、塩化カリウム [potassium chloride (KCl)]、塩酸 [hydrochloric acid (HCl)]、スクロース (sucrose)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA)、硫酸アンモニウム (ammonium sulfate) は Wako (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム [potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)]、リン酸水素二ナトリウム・十二水 [disodium hydrogenphosphate 12-water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)]、リン酸二水素ナトリウム二水和物 [sodium dihydrogenphosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)]、ホルマリン (formalin)、ペントバルビタールナトリウム (pentobarbital sodium)、protein assay CBB solution、リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS) は Nacalai

Tesque (Kyoto, Japan)、塩化ナトリウム [sodium chloride (NaCl)]、リドカイン (lidocaine) は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)、生理食塩水 (saline) は Otsuka Pharmaceutical (Tokushima, Japan)、TTC、Masson's trichrome stain kit、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) は Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan)、イソフルラン (isoflurane) は Pfizer (Tokyo, Japan)、トリス塩基 (tris base) は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS)、ペニシリン (penicillin)、ストレプトマイシン (streptomycin)、非必須アミノ酸溶液 (non-essential amino acid solution)、Hoechst 33342、pcDNA3.1 は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent は Roche Diagnostics、normal horse serum、vectashield fluorescent mounting medium は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、フルオロマウント (fluoromount) は Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、optimal cutting temperature (O.C.T.) compound、パラフィン (paraffin) は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

2-3 マウス左冠動脈永久閉塞モデルの作製

既報の方法に準じ、以下のようにマウス左冠動脈永久閉塞モデルを作製した (60)。麻酔の導入は 2.0–3.0%イソフルラン吸入により行い、70%亜酸化窒素および 30%酸素存在下、1.0–1.5%イソフルラン吸入にて維持した。気管内にチューブを挿入し、マウス用人工呼吸器 (HARVARD APPARATUS, mouse ventilator, Massachusetts, USA) にて、7 mL/kg、140 strokes/min で陽圧換気を開始した。右側臥位左肋間開胸にて心臓を露出した後、7-0 絹糸 (Silk blade 7-0, Alfresa, Tokyo, Japan) を用いて左冠動脈の結紮を行い、心臓左冠動脈を閉塞させた。左冠動脈閉塞の可否は、結紮部以遠の色調変化により確認した。その後、3-0 絹糸

(Surgical Silk 3-0, Johnson & Johnson, New Jersey, USA) を用いて肋間閉胸および皮膚縫合を行った。自発呼吸の回復後、気管内チューブを抜管し、マウスを覚醒させた。一連の処置の間は、ヒートパット (NS-TC10 temperature controller, Neu-roscience Inc., Tokyo, Japan) を用いて体温を 37°C に維持した。Sham 群のマウスに対しては、左冠動脈の結紮以外は同様の処置を行った。

2-4 梗塞領域の測定

梗塞サイズは、左冠動脈永久閉塞 24 時間後に 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich) 染色を用いて測定した。マウスは左冠動脈永久閉塞 24 時間後に 50 mg/kg ペントバルビタールナトリウムの腹腔投与により安楽死させた。その後、心臓を摘出し、生理食塩水で洗浄後に結紮部以遠を 4 切片にスライスし、2% TTC 溶液に 20 分間浸漬した。次いで 4% paraformaldehyde (PFA) に 24 時間、4°C で浸漬固定した。染色した全切片は、デジタルカメラ (J4 MODEL1 NIKKOR Zoom Lens Kif, Nikon Imaging Japan, Tokyo, Japan) で撮影し、各スライスの重量を測定した。その後、解析ソフト (image-J ver. 1.51j8; National Institutes of Health, Bethesda MD, USA) を用いて、スライス毎の梗塞領域 (IA) と左心室領域 (LV) を定量した。梗塞領域重量は IA/LV 比を用いて算出した。次に各スライスの IA 重量および LV 重量の総和をそれぞれ算出し、総 LV 重量に占める総 IA 重量を梗塞サイズとした。

2-5 ウサギ心筋虚血再灌流モデルの作製

既報に準じ、以下のようにウサギ心筋虚血再灌流モデルを作製した (60, 114)。麻酔の導入・維持はペントバルビタールナトリウム (30–40 mg/kg) にて実施した。気管内にチューブを挿管し、人工呼吸器 (Model SN-480-5, Shimano, Tokyo,

Japan) を用いて室内循環空気による陽圧換気を開始した。切開実施部位周辺に 1%リドカインを筋肉内投与し、局所麻酔を誘導した。左肋間開胸にて心臓を露出後、4-0 絹糸 (Surgical Silk 4-0, Johnson & Johnson, New Jersey, USA) およびチューブを用いて左冠動脈を一過性に閉塞した。左冠動脈閉塞は、閉塞部位以遠の血色変化にて確認した。左冠動脈閉塞 30 分後、チューブによる圧迫を解除し再灌流を行った。その後、肋間および皮膚を縫合し閉胸した。自発呼吸の回復後、気管内チューブを抜管し、ウサギを覚醒させた。

2-6 線維化領域の測定

線維化領域は、再灌流 2 週間後にマッソントリクローム染色を用いて測定した。ウサギは再灌流 2 週間後にペントバルビタールナトリウム (60–70 mg/kg) の耳静脈内投与により安楽死させた。次いで心臓を摘出し生理食塩水で洗浄後、大動脈より 4%PFA を灌流させた。心耳、右心室、大動脈を切除し、閉塞部位以遠を 4 切片にスライスした。乳頭筋部に位置する切片を 10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、24 時間後にパラフィン包埋を実施した。パラフィン切片は 6 μm に調製し、マッソントリクローム染色を行った。染色した全ての切片は蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影し、解析ソフト (image-J ver. 1.51j8) を用いて線維化領域を定量した。線維化サイズは左心室領域に対する線維化領域の割合として算出した。

2-7 心機能評価

心機能評価は、心エコーおよび心カテーテルを用いて行った (114)。再灌流 2 週間後に、ペントバルビタールナトリウム (25 mg/kg) を耳静脈内投与し、心エコー (SSD2000, Aloka, Mitaka, Japan) および 3.8–7.5 MHz imaging transducer

を用いて、左室駆出率、左室内径短縮率、左室収縮期末期圧、左室拡張期末期圧を測定した。心エコー実施後、1%リドカインの投与により局所麻酔を誘導した。切開により血管を露出後、血管内に心カテーテルを挿入して、心室内血圧および心拍数を測定した。左室±dP/dt は micromanometer-tipped catheter (SPR 407, Millar Instruments, Burnaby, BC, Canada) により測定した。

2-8 ヒトプログラニューリンの調製

ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞は、DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [10% Fetal Bovine Serum (FBS)、penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)、Non-Essential Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific) を含む] 培地を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞に X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて pcDNA3.1 および pcDNA3.1 (+)-progranulin をトランスフェクションした (115)。トランスフェクション 2 日後、FBS 不含 DMEM/F12 に培地を交換して一日培養した。その後、培養液を回収し遠心分離により細胞を除去した。分泌されたプログラニューリンを含む培養上清を 50%飽和硫酸アンモニウムにより沈殿させた。沈殿物を 30 mM Tris-HCl、pH 7.5 に懸濁した。タンパク質濃度は、Protein Assay CBB Solution (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) によって決定した。

2-9 プログラニューリンの投与

マウスプログラニューリン (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) は、300 µg/kg に調製し、マウス心臓左冠動脈永久閉塞の直前に尾静脈より投与した。溶媒群に対しては、同容量の phosphate buffered saline (PBS) を投与した。

上記の方法で調製されたヒトプログランニューリンは、ウサギに対して 300 µg/kg の濃度で再灌流直後に耳静脈より投与した。

2-10 組織免疫染色

マウスはペントバルビタールナトリウムにより安楽死させ、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を下大静脈より灌流し、ついで 4% PFA 含有 0.1 M phosphate buffer (PB: pH 7.4) を灌流した。その後、心臓を摘出し、4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) 溶液中に一晩浸漬した。固定した心臓は 25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 溶液に 24 時間浸漬し、optimal cutting temperature compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に凍結包埋した。クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、 -20°C 、厚さ 10 µm で凍結切片を作製し、MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441, Matsunami, Osaka, Japan) に静置して、 -80°C で保存した。凍結切片は、染色前に -20°C で 1 時間放置した後、室温で 10 分間乾燥させ、0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline: PBS: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 18 mM KH_2PO_3) で洗浄した。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Tokyo, Japan) を用いて切片周辺を囲んだ。PBS で洗浄後、5% normal horse serum 含有 PBS で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、Hoechst 33342 (1:1,000) と 10 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Vectashield fluorescent mounting medium (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA) を用いてカバーガラスで封入した。その後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV-10; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。一次抗体には、anti-NIMP-R14 antibody (1:100; Abcam, Eugene, OR, USA)、FITC anti-CD45

antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.), PE anti-CD11b antibody (1:100; BioLegend Co, Inc.) を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いた。

2-11 統計学的解析

データは平均値±平均値の標準誤差で表した。量的変数は、2 群間比較には Student の両側または片側 *t* 検定を、多群間比較には一元配置分散分析後に Dunnett 検定を用いて統計的に解析した。統計的有意性は $P<0.05$ とした。全ての統計解析は、SPSS (version 24.0.0.0; IBM, Armonk, NY, USA) を用いて実施した。

第3節 実験成績

3-1 プログラニュリン投与の心筋梗塞サイズに対する効果

マウス左冠動脈永久閉塞モデルを用いて、左冠動脈閉塞 24 時間後における心筋梗塞サイズに対するプログラニュリンの効果について検討した。左冠動脈閉塞直前のプログラニュリンの尾静脈内投与は、心筋梗塞サイズを有意に 21% 減少させた (Figure 30A, B)。

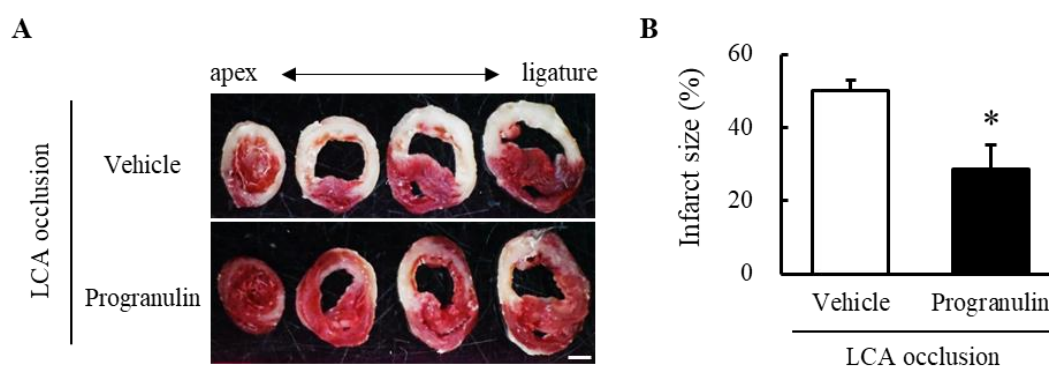


Figure 30 Decreased myocardial infarct size by administration of recombinant progranulin in a murine model.

(A) Representative photographs show 2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining of heart sections 24 h after MI after the administration of recombinant progranulin in the MI murine model. (B) Infarction size 24 h after the induction of MI. Administration of recombinant progranulin reduced infarction size compared with vehicle-treated group. Data are the means \pm SEM. (n=7-9) * p < 0.05 vs. vehicle-treated group (two-tailed Student's t -test)

3-2 プログラニュリンの好中球浸潤に対する作用

マウス左冠動脈永久閉塞モデルを用いて、プログラニュリン投与の好中球浸潤に対する作用について検討した。プログラニュリン投与群では、梗塞領域において好中球マーカーNIMP-R14⁺細胞数の37%の有意な減少および境界領域において減少傾向が認められた (Figure 31A-C)。

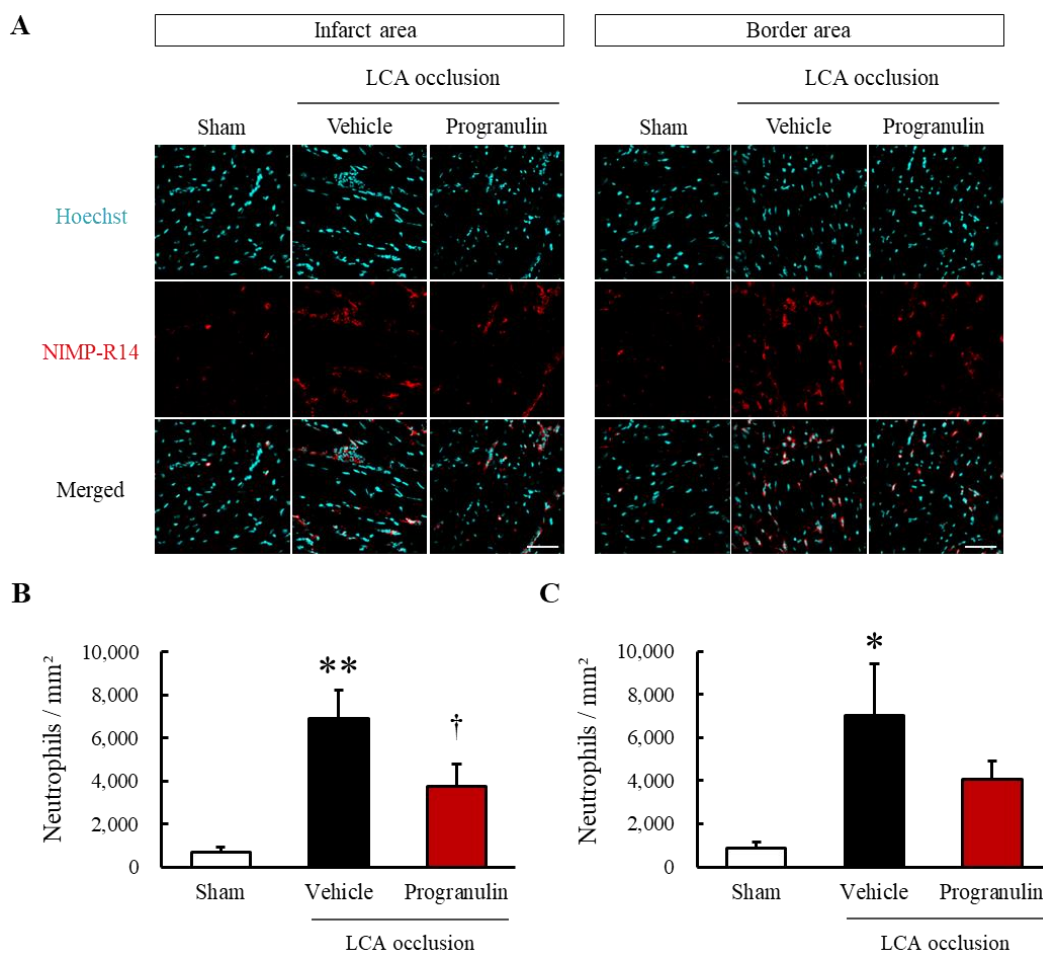


Figure 31 Attenuated the infiltrating neutrophils after myocardial infarction by administration of recombinant progranulin in a murine model.

(A) Reparative images show immunostaining for NIMP-R14 at the infarct and border area 1 day after MI. Nuclei were stained with Hoechst 33342. (B) Number of neutrophils per mm² at infarct area after MI. (C) Number of neutrophils per mm² at border area after MI. Administration of recombinant progranulin reduced infiltrating neutrophils at infarct area compared with vehicle-treated group. Scale bar: 50 μ m. Data are the means \pm SEM. (n=5-6) ** p < 0.01 vs. sham-operated group (two-tailed Student's t -test), † p < 0.05 vs. vehicle-treated group (one-tailed Student's t -test)

3-3 プログラニュリンのマクロファージ浸潤に対する作用

マウス左冠動脈永久閉塞モデルを用いて、プログラニュリン投与がマクロファージ浸潤に及ぼす影響について検討した。プログラニュリン投与群では、梗塞周辺領域において CD45⁺ CD11b⁺細胞数の減少が観察されたことから、マク

ロファージ浸潤の抑制が示唆された (Figure 32)。

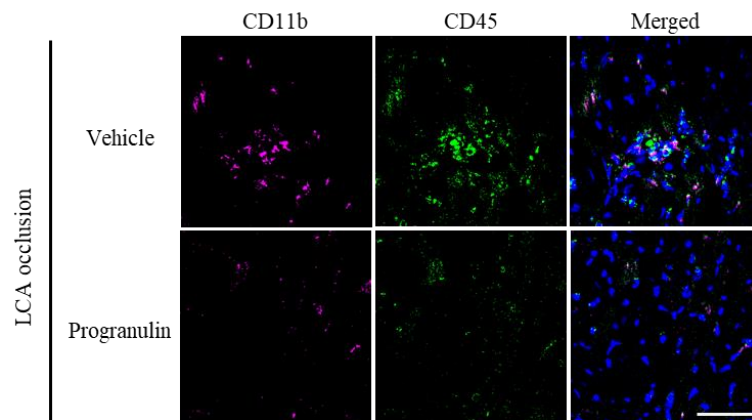


Figure 32 Administration of recombinant progranulin suppresses infiltration of macrophages after myocardial infarction in a murine model.

Typical confocal microscopic images of the cells expressing CD45 and CD11b at border areas 1 day after myocardial infarction in vehicle-treated group and progranulin-treated group. Blue: nuclei stained with Hoechst 33342, Magenta: CD11b, Green: CD45. Scale bar: 50 μ m.

3-4 プログラニュリンの心機能障害に対する作用

ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用いて、プログラニュリン投与の心機能に対する作用について検討した。本検討で評価した \pm dP/dtの値は、心収縮機能を反映する (116)。心カテーテル評価において、プログラニュリン投与は、心筋虚血再灌流2週間後の+dP/dtを25%改善した (Figure 33A)。一方、-dP/dtは、プログラニュリン投与群と溶媒投与群の両群において、有意な変化は認められなかった (Figure 33B)。さらに心エコーを用いて、心血管リモデリングの指標である左室内径に関連する項目を検討した。プログラニュリン投与群において、心筋虚血再灌流障害後の左室収縮期末期径および左室拡張期末期径のそれぞれ12%および16%の減少が認められた (Figure 33C, D)。また、プログラニュリン投与は、心筋虚血再灌流障害後の左室駆出率および左室内径短縮率をそれぞれ12%および14%改善させた (Figure 33E, F)。

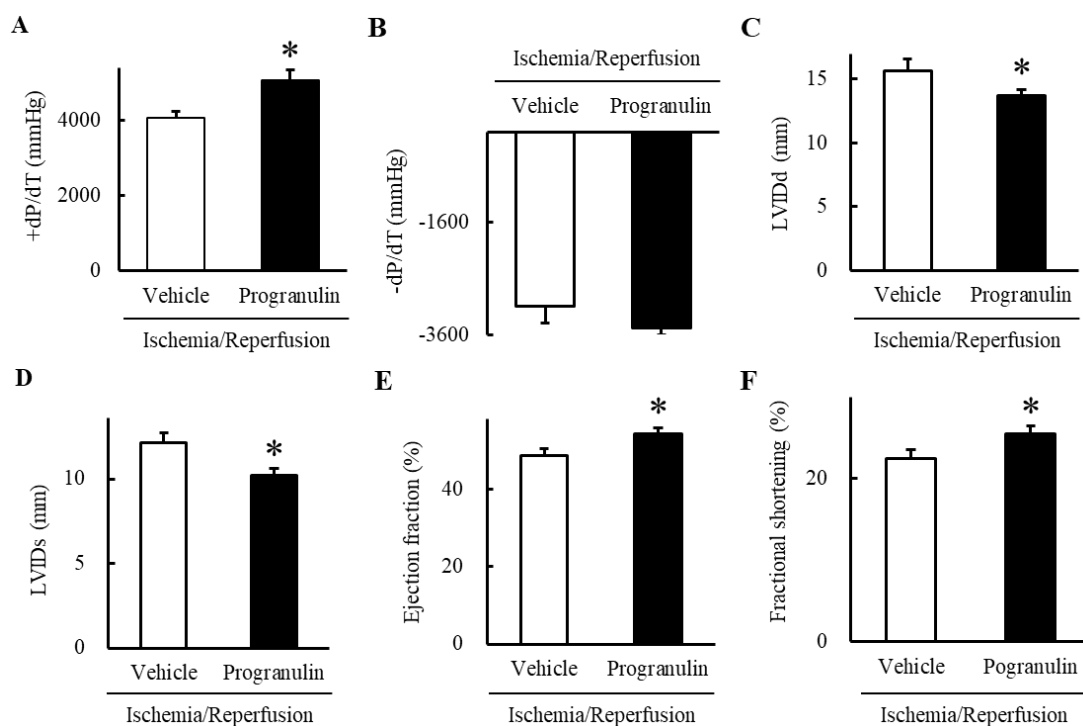


Figure 33 Improvement of myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits by injection of recombinant progranulin.

(A, B) The maximal positive and negative values of the first derivative in left ventricular pressure (dP/dT) were determined by cardiac catheterization 2 weeks after reperfusion. (C-F) Left ventricular internal diameter at systole (LVIDs) and diastole (LVIDd), fractional shortening (FS), and ejection fraction (EF) were measured by echocardiography. The administration of recombinant progranulin significantly ameliorated the deterioration of +dP/dT, LVIDs, LVIDd, FS, and EF compared with vehicle-treated group. Data are the means \pm SEM. (n=3-7) * p < 0.05 vs. vehicle-treated group (A-B; two-tailed Student's t -test, C-F; one-tailed Student's t -test).

3-5 プログラニュリンの線維化に対する作用

ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用いて、心筋虚血再灌流後の線維化に対するプログラニュリンの作用について、マッソントリクローム染色により検討を行った。マッソントリクローム試薬は、線維化領域を青色に染色する。プログラニュリン投与は、心筋虚血再灌流後の線維化サイズを 10%有意に減少させた (Figure 34A, B)。

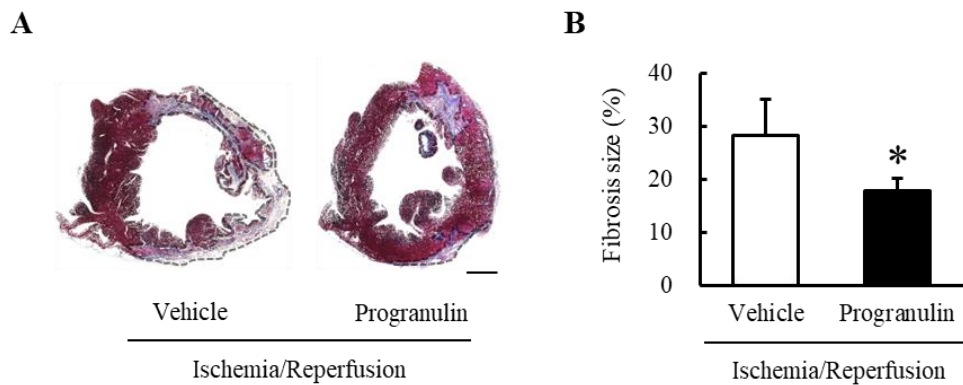


Figure 34 Decrease in myocardial fibrosis size by administration of recombinant progranulin after myocardial ischemia-reperfusion in rabbits

(A) Representative photographs show LV cross-sections by Masson's trichrome staining 2 weeks after reperfusion by administration of recombinant progranulin. (B) Fibrosis size 2 weeks after reperfusion. Administration of recombinant progranulin significantly reduced fibrosis size compared with vehicle-treated group. Scale bar: 2.5 mm. Data are the means \pm SEM. (n=3-7) * p <0.05 vs. vehicle-treated group (one-tailed Student's t -test)

第4節 考察

本章では、プログラニュリンの心筋虚血および再灌流障害に対する作用について検討した。プログラニュリンの投与は、左冠動脈閉塞後の急性期における心筋虚血傷害を軽減し、虚血再灌流後の慢性期における心機能障害を改善した。プログラニュリンは、心筋虚血再灌流障害に対して心臓保護的に作用する可能性がある。

好中球は急性心筋梗塞後の最も早期に梗塞部位に集積する白血球であり、死細胞を貪食除去し炎症の収束に寄与する (55)。一方、好中球によるプロテアーゼや ROS、炎症性サイトカイン等の過剰な産生は、炎症を遷延化させ組織損傷を増悪する (117)。本研究の検討結果より、プログラニュリンは心筋虚血 24 時間後において好中球の浸潤を抑制し、梗塞サイズを減少させることが明らかになった。先行研究において、プログラニュリンは脳および腎臓の虚血再灌流障害に対して好中球の浸潤を抑制し、組織損傷を軽減することが報告されている (50, 113)。これらの所見は、プログラニュリンが好中球の動員を抑制し、組織損傷を減弱することを示唆している。他方、プログラニュリンは、ハウスダストマイト誘発マウス喘息モデルにおいて、非ヒストン性クロマチン結合タンパク質 (high-mobility group box 1: HMGB1) の過剰発現を抑制する (118)。HMGB1 は CXCL12 と複合体を形成し、C-X-C chemokine receptor (CXCR)-4 を介したシグナル伝達によって、損傷組織への炎症細胞の動員を促進することが報告されている (119)。また、HMGB1 発現量は心筋虚血により増加し、心筋虚血再灌流障害の増悪に寄与する (120)。以上より、プログラニュリン投与による好中球の浸潤抑制は、心筋虚血によって誘導される HMGB1 発現を抑制することが推察される。プログラニュリンの好中球遊走に対する詳細な作用機構を理解するためには、今後更なる検討が必要である。

単球・マクロファージは、急性心筋梗塞後に好中球に次いで心臓へ動員され、早期には炎症応答を、後期には組織修復を促進する (121)。マクロファージの集積は、心筋梗塞 1 日後から 14 日後において観察されている (55)。炎症の遷延化は過剰な線維化を含む心臓リモデリングを誘導し、生命予後を増悪させるため、マクロファージの機能を制御することは重要である (117)。今回、プログラニュリンの投与は、ウサギ心筋虚血再灌流モデルにおける左室線維化を抑制した。また、プログラニュリン投与群では、マウス左冠動脈永久閉塞モデルにおいてマクロファージ浸潤の抑制が観察された。先行研究では、プログラニュリンはマクロファージにおける炎症応答後の炎症性サイトカイン産生を抑制することが報告されている (57)。また、マウス慢性炎症性肝疾患肝障害モデルでは、プログラニュリンの投与により肝線維化に関与する F4/80 陽性マクロファージの集積が減少した (73)。以上の観点より、プログラニュリンはマクロファージの炎症応答性を制御し、心筋梗塞後の線維化を抑制したと考えられる。

心筋梗塞後の組織修復過程において、心臓線維瘢痕の形成は組織の統合性を維持するために必要である (122)。しかしながら、過剰な線維化による組織の硬質化は、心収縮機能障害を引き起こす (123–125)。本研究において、プログラニュリン投与は、心筋虚血再灌流障害後の左室リモデリングおよび心機能障害を有意に改善させた。また、プログラニュリン投与は、心筋虚血再灌流障害後の線維化サイズを有意に減少させた。心筋梗塞後の線維瘢痕形成には、Wnt シグナル経路の関与が考えられる。Wnt シグナルは心筋梗塞後に活性化され、組織傷害および心筋リモデリングを増悪させる (126, 127)。Wnt シグナルの阻害は、心筋梗塞後の心筋リモデリングおよび線維化形成を抑制することが報告されている (128, 129)。プログラニュリンは、炎症病態下における Wnt タンパク質発現を抑制し、Wnt シグナルを制御する事が報告されている (130)。以上

を踏まえると、プログラニューリンは、心筋梗塞後の Wnt シグナル抑制によって心機能障害および線維化の増悪を抑制する可能性がある。プログラニューリンの心臓保護作用に Wnt シグナルが関与するか否かは、今後更なる検討によって明らかにする必要がある。

以上より、プログラニューリンは、好中球およびマクロファージの浸潤抑制を介して心筋虚血傷害を減弱すると共に、再灌流障害後の左室線維化を減少させ、心機能を改善させる可能性が示された。プログラニューリンは、心筋虚血再灌流障害に対する新規治療標的として期待される。

総括および結論

急性心筋梗塞に代表される虚血性心疾患は世界における死因の第1位である。急性心筋梗塞後の救命率は、経皮的冠動脈形成術および血栓溶解療法による再灌流療法の発展により向上している。しかしながら、急性心筋梗塞患者の4人に1人は収縮機能障害を伴う梗塞後心不全に進展し、重症心不全患者の5年生存率は50%以下と未だ予後不良である。既存薬を用いた治療は急性心筋梗塞後の心不全発症および予後増悪を遅延させるが、心不全への進展を完全には抑制できない。したがって、急性心筋梗塞の既往歴を有する患者における更なる予後改善には、急性心筋梗塞後病態の理解および新規治療標薬の開発が不可欠である。

本研究は、心筋梗塞後リモデリングにおいて重要な役割を担うマクロファージおよびマクロファージに高発現するプログラニュリンに着目し、プログラニュリンの急性心筋梗塞後病態における役割並びに新規治療標的としての有用性を検討した。

第1章では、心筋梗塞後リモデリングにおけるプログラニュリンの関与について検討した。

- 1) プログラニュリンは、マウス梗塞後心臓のマクロファージにおいて顕著な発現を示した。
- 2) プログラニュリン欠損マウスは、野生型マウスと比較して、心筋梗塞誘導後に生存率の低下、左室線維化の亢進、QT 間隔の延長、骨髄由来マクロファージ浸潤数の増加を示した。
- 3) 骨髄由来マクロファージにおける *Grn* 発現量は、LPS および IFN- γ の処置により増加した。

4) プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージでは、炎症応答後に TGF- β 、IL-4R 発現量の増加、IL-1 β 、IL-10 発現量の低下および貪食活性の早期亢進を示した。

第 2 章では、マクロファージにおけるプログラニューリンの関与について検討した。

- 1) プログラニューリン欠損マウスの梗塞後心臓では、炎症性シグナルの亢進が認められた。
- 2) プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージ投与は、マウス心筋梗塞モデルにおける QT 間隔を延長させた。
- 3) プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージにおける低酸素処置後の培養上清は、酸素グルコース欠乏条件下における心筋細胞死率を増加させた。
- 4) プログラニューリン欠損骨髄由来マクロファージは、低酸素および炎症条件下において、ROS 産生量、OCR および ECAR を増加させた。

第 3 章では、プログラニューリンの心筋虚血再灌流障害に対する保護作用について検討した。

- 1) マウス心筋梗塞モデルに対するプログラニューリンの心筋虚血前投与は、梗塞サイズを減少させた。
- 2) ウサギ心筋虚血再灌流障害モデルに対するプログラニューリンの再灌流直後投与は、左室収縮能を改善し、左室線維化サイズを減少させた。

本研究において、プログラニューリンはマクロファージの炎症応答性を調節し、心筋虚血傷害後における器質的および電気生理学的リモデリングに対して保

護的に作用することが示された。また、プログラニュリンはエネルギー代謝制御を介して、炎症応答性に影響することが示唆された。以上より、プログラニュリンは、急性心筋梗塞後の心機能障害を減弱し、生命予後の改善に寄与し得る可能性が考えられる。

本知見は、プログラニュリンによるマクロファージの機能制御を介した急性心筋梗塞後における有害な心臓リモデリング抑制作用、心筋虚血再灌流障害に対する保護作用の実証のみに留まらず、同メカニズムの他の虚血性疾患への応用できる可能性を示唆している。したがって、プログラニュリン製剤の開発は、虚血臓器に対する保護、リモデリング制御を介した新規治療法の確立に繋がると期待される。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学 学長で、生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室 前教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇切なる御指導並びに御助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室 教授 嶋澤雅光博士、准教授 中村信介博士、助教 久世祥己博士、岐阜薬科大学 バイオメディカル寄付講座 特任講師 大津航博士に感謝いたします。また、諸種の御協力と御助言を頂きました薬効解析学研究室諸氏に心より感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益なるご助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 免疫生物学研究室 教授 田中宏幸博士、岐阜薬科大学 生命薬学大講座 感染制御学研究室 教授 腰塚哲朗博士、並びに岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室 教授 位田雅俊博士に深謝いたします。

本研究に際し、動物実験の御指導、御助言および御協力を賜りました岐阜大学医学部附属病院 第二内科 研究部門 (循環呼吸先端医学講座) 特任教授 湊口信也博士、岐阜大学医学部附属病院 第二内科 循環器内科・救急災害部門 准教授 金森寛充博士、講師 山田好久博士に深く感謝いたします。実験試料の御提供、御助言および御協力を賜りました福岡大学 薬学部 免疫・分子治療学研究室 准教授 細川雅人博士、公益財団法人 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト 鈴木元治郎博士に深く感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費 JP21J23271 の助成を受けたものです。

引用文献

1. Global Health Estimates (2020). The top 10 causes of death. World Health Organization.
2. Tsao, C. W., Aday, A. W., Almarzooq, Z. I., et al. (2022) 2022 Heart Disease & Stroke Statistical Update Fact Sheet Global Burden of Disease. *Circulation* 145, E153–E639
3. Birger, M., Kaldjian, A. S., Roth, G. A., Moran, A. E., Dieleman, J. L., and Bellows, B. K. (2021) Spending on Cardiovascular Disease and Cardiovascular Risk Factors in the United States: 1996 to 2016. *Circulation* 144, 271–282
4. 平成28年度 (2016) 国民医療費の概況 (厚生労働省).
5. Jensen, R. V., Hjortbak, M. V., and Bøtker, H. E. (2020) Ischemic Heart Disease: An Update. *Semin. Nucl. Med.* 50, 195–207
6. 急性冠症候群ガイドライン (2018年改訂版).
7. 2022年JCSガイドライン フォーカスアップデート版 安定冠動脈疾患の診断と治療.
8. Byrne, R. A., Rossello, X., Coughlan, J. J., et al. (2023) 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* 44, 3720–3826
9. Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., et al. (2018) Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). In *Circulation* vol. 138,
10. Sumner, G. L., Kuriachan, V. P., and Mitchell., L. B. (2018) Sudden cardiac death. *Encycl. Cardiovasc. Res. Med.* 511–520
11. Dégano, I. R., Salomaa, V., Veronesi, G., Ferrières, J., Kirchberger, I., Laks, T., Havulinna, A. S., Ruidavets, J. B., Ferrario, M. M., Meisinger, C., Elosua, R., and Marrugat, J. (2015) Twenty-five-year trends in myocardial infarction attack

- and mortality rates, and case-fatality, in six European populations. *Heart* 101, 1413–1421
12. Schmidt, M., Jacobsen, J. B., Lash, T. L., Bøtker, H. E., and Sørensen, H. T. (2012) 25 Year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: A Danish nationwide cohort study. *BMJ* 344, 1–2
 13. Sabia, P., Abbott, R. D., Afrookteh, A., Keller, M. W., Touchstone, D. A., and Kaul, S. (1991) Importance of two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular systolic function in patients presenting to the emergency room with cardiac-related symptoms. *Circulation* 84, 1615–1624
 14. Kan, G., Visser, C. A., Koolen, J. J., and Dunning, A. J. (1986) Short and long term predictive value of admission wall motion score in acute myocardial infarction A cross sectional echocardiographic study of 345 patients. *Heart* 56, 422–427
 15. Nishimura, R. A., Tajik, A. J., Shub, C., Miller, F. A., Ilstrup, D. M., and Harrison, C. E. (1984) Role of two-dimensional echocardiography in the prediction of in-hospital complications after acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 4, 1080–1087
 16. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 123, 92–100
 17. Page, D. L., Caulfield, J. B., Kastor, J. A., DeSanctis, R. W., and Sanders, C. A. (1971) Myocardial Changes Associated with Cardiogenic Shock. *N. Engl. J. Med.* 285, 133–137
 18. 急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017年改訂版).

19. Vos, T., Abajobir, A. A., Abbafati, C., et al. (2017) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, 1211–1259
20. Shiba, N., Nochioka, K., Miura, M., Kohno, H., and Shimokawa, H. (2011) Trend of westernization of etiology and clinical characteristics of heart failure patients in Japan: First report from the CHART-2 Study. *Circ. J.* 75, 823–833
21. Velagaleti, R. S., Pencina, M. J., Murabito, J. M., Wang, T. J., Parikh, N. I., D’Agostino, R. B., Levy, D., Kannel, W. B., and Vasan, R. S. (2008) Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 118, 2057–2062
22. Salari, N., Morddarvanjoghi, F., Abdolmaleki, A., Rasoulpoor, S., Khaleghi, A. A., Hezarkhani, L. A., Shohaimi, S., and Mohammadi, M. (2023) The global prevalence of myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc. Disord.* 23, 1–12
23. Maggioni, A. P., Orso, F., Calabria, S., Rossi, E., Cinconze, E., Baldasseroni, S., and Martini, N. (2016) The real-world evidence of heart failure: Findings from 41 413 patients of the ARNO database. *Eur. J. Heart Fail.* 18, 402–410
24. Chun, S., Tu, J. V., Wijeyesundera, H. C., Austin, P. C., Wang, X., Levy, D., and Lee, D. S. (2012) Lifetime analysis of hospitalizations and survival of patients newly admitted with heart failure. *Circ. Hear. Fail.* 5, 414–421
25. Taylor, C. J., Ordóñez-Mena, J. M., Roalfe, A. K., Lay-Flurrie, S., Jones, N. R., Marshall, T., and Hobbs, F. D. R. (2019) Trends in survival after a diagnosis of heart failure in the United Kingdom 2000-2017: population based cohort study.

BMJ 364, 1–22

26. Shiba, N. and Shimokawa, H. (2008) Chronic heart failure in Japan: Implications of the CHART studies. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 103–113
27. Epstein, A. E., DiMarco, J. P., Ellenbogen, K. A., et al. (2008) ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, e1–e62
28. Juillire, Y., Cambou, J. P., Bataille, V., Mulak, G., Galinier, M., Gibelin, P., Benamer, H., Bouvaist, H., Méneveau, N., Tabone, X., Simon, T., and Danchin, N. (2012) Heart Failure in Acute Myocardial Infarction: a Comparison Between Patients With or Without Heart Failure Criteria From the FAST-MI Registry. *Rev. Esp. Cardiol.* 65, 326–333
29. Lewis, E. F., Moye, L. A., Rouleau, J. L., Sacks, F. M., Arnold, J. M. O., Warnica, J. W., Flaker, G. C., Braunwald, E., and Pfeffer, M. A. (2003) Predictors of Late Development of Heart Failure in Stable Survivors of Myocardial Infarction: The CARE Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 1446–1453
30. Tauber, A. I. (2003) Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 897–901
31. Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., and Schlitzer, A. (2023) Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat. Rev. Immunol.* 23, 563–579
32. Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., et al. (2014) Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–

33. Nathan, C. F., Murray, H. W., Wlebe, I. E., and Rubin, B. Y. (1983) Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158, 670–689
34. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292
35. Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M. J. (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047
36. Van Dyken, S. J. and Locksley, R. M. (2013) Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: Roles in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 317–343
37. Frodermann, V. and Nahrendorf, M. (2018) Macrophages and cardiovascular health. *Physiol. Rev.* 98, 2523–2569
38. Hu, Y., Zhang, H., Lu, Y., Bai, H., Xu, Y., Zhu, X., Zhou, R., Ben, J., Xu, Y., and Chen, Q. (2011) Class A scavenger receptor attenuates myocardial infarction-induced cardiomyocyte necrosis through suppressing M1 macrophage subset polarization. *Basic Res. Cardiol.* 106, 1311–1328
39. Shivshankar, P., Halade, G. V., Calhoun, C., Escobar, G. P., Mehr, A. J., Jimenez, F., Martinez, C., Bhatnagar, H., Mjaatvedt, C. H., Lindsey, M. L., and Le Saux, C. J. (2014) Caveolin-1 deletion exacerbates cardiac interstitial

- fibrosis by promoting M2 macrophage activation in mice after myocardial infarction. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* 76, 84–93
40. Kleinberger, G., Capell, A., Haass, C., and Van Broeckhoven, C. (2013) Mechanisms of granulin deficiency: Lessons from cellular and animal models. *Mol. Neurobiol.* 47, 337–360
 41. Gass, J., Cannon, A., Mackenzie, I. R., et al. (2006) Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2988–3001
 42. Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., et al. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (80-.).* 319, 1668–1672
 43. Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Sargent, L., Vitale, D., Leonard, H., Iwaki, H., Song, Y., Bandres-Ciga, S., Menden, K., Faghri, F., Heutink, P., Cookson, M. R., and Singleton, A. B. (2021) Evidence for GRN connecting multiple neurodegenerative diseases. *Brain Commun.* 3, 1–2
 44. Ahmed, Z., Sheng, H., Xu, Y. F., et al. (2010) Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging. *Am. J. Pathol.* 177, 311–324
 45. Jian, J., Konopka, J., and Liu, C. (2013) Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 93, 199–208
 46. Fu, W., Hu, W., Yi, Y. S., et al. (2021) TNFR2/14-3-3 ϵ signaling complex instructs macrophage plasticity in inflammation and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 131, 10–11
 47. Neill, T., Goyal, A., Buraschi, S., Sharpe, C., Natkanski, E., Schaefer, L.,

- Morrione, A., and Iozzo, R. V. (2016) EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin. *J. Cell Biol.* 215, 687–703
48. Hu, F., Padukkavidana, T., Vægter, C. B., Brady, O. A., Zheng, Y., Mackenzie, I. R., Feldman, H. H., Nykjaer, A., and Strittmatter, S. M. (2010) Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 68, 654–667
49. Rhinn, H., Tatton, N., McCaughey, S., Kurnellas, M., and Rosenthal, A. (2022) Progranulin as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 43, 641–652
50. Egashira, Y., Suzuki, Y., Azuma, Y., Takagi, T., Mishiro, K., Sugitani, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Kashimata, M., Iwama, T., and Hara, H. (2013) The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. *J. Neuroinflammation* 10, 1–2
51. Tang, W., Lu, Y., Tian, Q. Y., et al. (2011) The growth factor progranulin binds to tnfr receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*. 332, 478–484
52. Spencer, F. A., Meyer, T. E., Gore, J. M., and Goldberg, R. J. (2002) Heterogeneity in the management and outcomes of patients with acute myocardial infarction complicated by heart failure: The national registry of myocardial infarction. *Circulation* 105, 2605–2610
53. Prabhu, S. D. and Frangogiannis, N. G. (2016) The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. *Circ. Res.* 119, 91–112
54. Weil, B. R. and Neelamegham, S. (2019) Selectins and immune cells in acute

- myocardial infarction and post-infarction ventricular remodelings: Pathophysiology and novel treatments. *Front. Immunol.* 10, 1–15
55. Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., Fukuda, K., and Sano, M. (2013) Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 62, 24–35
56. Wan, E., Yeap, X. Y., Dehn, S., et al. (2013) Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ. Res.* 113, 1004–1012
57. Yu, Y., Xu, X., Liu, L., Mao, S., Feng, T., Lu, Y., Cheng, Y., Wang, H., Zhao, W., and Tang, W. (2016) Progranulin deficiency leads to severe inflammation, lung injury and cell death in a mouse model of endotoxic shock. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 506–517
58. Sugihara, H., Miyaji, K., Yamanouchi, K., Matsuwaki, T., and Nishihara, M. (2018) Progranulin deficiency leads to prolonged persistence of macrophages, accompanied with myofiber hypertrophy in regenerating muscle. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 346–353
59. Kayasuga, Y., Chiba, S., Suzuki, M., Kikusui, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Kotaki, H., Horai, R., Iwakura, Y., and Nishihara, M. (2007) Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. *Behav. Brain Res.* 185, 110–118
60. Lindsey, M. L., Bolli, R., Cauty, J. M., et al. (2018) Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ.*

Physiol. 314, H812–H838

61. Merentie, M., Lottonen-Raikaslehto, L., and Ylä-Herttuala, S. (2018) Development and validation of ECG analysis algorithm in mice. In *Conn's Handbook of Models for Human Aging* pp. 271–285, Elsevier Inc.
62. Speerschneider, T. and Thomsen, M. B. (2013) Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice. *Acta Physiol.* 209, 262–271
63. Aronoff, L., Epelman, S., and Clemente-Casares, X. (2018) Isolation and identification of extravascular immune cells of the heart. *J. Vis. Exp.* 2018, 1–7
64. Li, S., Li, L., Chen, J., Fan, Y., Wang, C., Du, Y., Guo, C., Chen, F., and Li, W. (2021) Liposomal honokiol inhibits glioblastoma growth through regulating macrophage polarization. *Ann. Transl. Med.* 9, 1644–1644
65. Farbehi, N., Patrick, R., Dorison, A., Xaymardan, M., Janbandhu, V., Wystub-Lis, K., Ho, J. W. K., Nordon, R. E., and Harvey, R. P. (2019) Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *Elife* 8, 1–39
66. Ross, J. and Kongo, M. (1996) The role of hypertrophy and growth factors in heart failure. *J. Card. Fail.* 2
67. Seropian, I. M., Toldo, S., Van Tassell, B. W., and Abbate, A. (2014) Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following St-segment elevation acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 1593–1603
68. Frangogiannis, N. G. (2017) The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J. Clin. Invest.* 127, 1600–1612
69. Al-Khatib, S. M., Allen LaPointe, N. M., Kramer, J. M., and Califf, R. M. (2003) What Clinicians Should Know about the QT Interval. *Jama* 289, 2120–

70. Frodermann, V. and Nahrendorf, M. (2018) Macrophages and cardiovascular health. *Physiol. Rev.* 98, 2523–2569
71. Oishi, Y., Spann, N. J., Link, V. M., et al. (2017) SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* 25, 412–427
72. Talman, V. and Ruskoaho, H. (2016) Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* 365, 563–581
73. Yoo, W., Lee, J., Noh, K. H., Lee, S., Jung, D., Kabir, M. H., Park, D., Lee, C., Kwon, K. S., Kim, J. S., and Kim, S. (2019) Progranulin attenuates liver fibrosis by downregulating the inflammatory response. *Cell Death Dis.* 10
74. Fu, X., Khalil, H., Kanisicak, O., Boyer, J. G., Vagnozzi, R. J., Maliken, B. D., Sargent, M. A., Prasad, V., Valiente-Alandi, I., Blaxall, B. C., and Molkentin, J. D. (2018) Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J. Clin. Invest.* 128, 2127–2143
75. Zhu, Y., Ohama, T., Kawase, R., Chang, J., Inui, H., Kanno, K., Okada, T., Masuda, D., Koseki, M., Nishida, M., Sakata, Y., and Yamashita, S. (2020) Progranulin deficiency leads to enhanced age-related cardiac hypertrophy through complement C1q-induced β -catenin activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 138, 197–211
76. Nahrendorf, M. and Swirski, F. K. (2013) Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ. Res.* 112, 1624–1633
77. Hulsmans, M., Sam, F., and Nahrendorf, M. (2016) Monocyte and macrophage

- contributions to cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 93, 149–155
78. Duncan, S. E., Gao, S., Sarhene, M., Coffie, J. W., Linhua, D., Bao, X., Jing, Z., Li, S., Guo, R., Su, J., and Fan, G. (2020) Macrophage Activities in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Cardiol. Res. Pract.* 2020
79. Tarzami, S. T., Cheng, R., Miao, W., Kitsis, R. N., and Berman, J. W. (2002) Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 209–221
80. Schmitz, K., Wilken-Schmitz, A., Vasic, V., Brunkhorst, R., Schmidt, M., and Tegeder, I. (2020) Progranulin deficiency confers resistance to autoimmune encephalomyelitis in mice. *Cell. Mol. Immunol.* 17, 1077–1091
81. Kao, A. W., Eisenhut, R. J., Martens, L. H., Nakamura, A., Huang, A., Bagley, J. A., Zhou, P., De Luis, A., Neukomm, L. J., Cabello, J., Farese, R. V., and Kenyon, C. (2011) A neurodegenerative disease mutation that accelerates the clearance of apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4441–4446
82. Matsumura, S. I., Iwanaga, S., Mochizuki, S., Okamoto, H., Ogawa, S., and Okada, Y. (2005) Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* 115, 599–609
83. Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., Van Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S., and Gilroy, D. W. (2008) Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112, 4117–4127
84. Shiraishi, M., Shintani, Y., Shintani, Y., Ishida, H., Saba, R., Yamaguchi, A.,

- Adachi, H., Yashiro, K., and Suzuki, K. (2016) Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J. Clin. Invest.* 126, 2151–2166
85. Kim, Y., Nurakhayev, S., Nurkesh, A., Zharkinbekov, Z., and Saparov, A. (2021) Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–15
86. Yang, Q., Wang, Y., Pei, G., Deng, X., Jiang, H., Wu, J., Zhou, C., Guo, Y., Yao, Y., Zeng, R., and Xu, G. (2019) Bone marrow-derived Ly6C⁺ macrophages promote ischemia-induced chronic kidney disease. *Cell Death Dis.* 10
87. Frangogiannis, N. G., Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B. J., and Entman, M. L. (2007) Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 115, 584–592
88. Madrigano, J. (2008) Electrical Remodeling in the Failing Heart. *Occup. Environ. Med.* 23, 1–7
89. Schwartz, P. J. and Wolf, S. (1978) QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* 57, 1074–1077
90. Xia, R., Tomsits, P., Loy, S., Zhang, Z., Pauly, V., Schüttler, D., and Clauss, S. (2022) Cardiac Macrophages and Their Effects on Arrhythmogenesis. *Front. Physiol.* 13, 1–17
91. Fei, Y. D., Wang, Q., Hou, J. W., Li, W., Cai, X. X., Yang, Y. L., Zhang, L. H., Wei, Z. X., Chen, T. Z., Wang, Y. P., and Li, Y. G. (2019) Macrophages facilitate post myocardial infarction arrhythmias: Roles of gap junction and

KCa3.1. *Theranostics* 9, 6396–6411

92. Cai, S., Zhao, M., Zhou, B., Yoshii, A., Bugg, D., Villet, O., Sahu, A., Olson, G. S., Davis, J., and Tian, R. (2023) Mitochondrial dysfunction in macrophages promotes inflammation and suppresses repair after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 133
93. Martens, L. H., Zhang, J., Barmada, S. J., Zhou, P., Kamiya, S., Sun, B., Min, S. W., Gan, L., Finkbeiner, S., Huang, E. J., and Farese, R. V. (2012) Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *J. Clin. Invest.* 122, 3955–3959
94. Takahashi, K., Nakamura, S., Otsu, W., Shimazawa, M., and Hara, H. (2021) Progranulin deficiency in Iba-1+ myeloid cells exacerbates choroidal neovascularization by perturbation of lysosomal function and abnormal inflammation. *J. Neuroinflammation* 18, 1–16
95. Sasaki, T., Kuse, Y., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2023) Progranulin deficiency exacerbates cardiac remodeling after myocardial infarction. *FASEB BioAdvances* 395–411
96. Tse, G., Gong, M., Wong, W. T., et al. (2017) The Tpeak – Tend interval as an electrocardiographic risk marker of arrhythmic and mortality outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Hear. Rhythm* 14, 1131–1137
97. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., and Malik, A. B. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants Redox Signal.* 20, 1126–1167
98. Canton, M., Sánchez-Rodríguez, R., Spera, I., Venegas, F. C., Favia, M., Viola, A., and Castegna, A. (2021) Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources

- and Targets. *Front. Immunol.* 12, 1–13
99. Jha, M. K., Passero, J. V., Rawat, A., et al. (2021) Macrophage monocarboxylate transporter 1 promotes peripheral nerve regeneration after injury in mice. *J. Clin. Invest.* 131
 100. Ranganathan, P. V., Jayakumar, C., and Ramesh, G. (2013) Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 304, 948–957
 101. Abe, H., Takeda, N., Isagawa, T., et al. (2019) Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. *Nat. Commun.* 10, 1–8
 102. Shivshankar, P., Halade, G. V., Calhoun, C., Escobar, G. P., Mehr, A. J., Jimenez, F., Martinez, C., Bhatnagar, H., Mjaatvedt, C. H., Lindsey, M. L., and Le Saux, C. J. (2014) Caveolin-1 deletion exacerbates cardiac interstitial fibrosis by promoting M2 macrophage activation in mice after myocardial infarction. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* 76, 84–93
 103. Rodríguez-Periñán, G., de la Encarnación, A., Moreno, F., López de Munain, A., Martínez, A., Martín-Requero, Á., Alquézar, C., and Bartolomé, F. (2023) Progranulin Deficiency Induces Mitochondrial Dysfunction in Frontotemporal Lobar Degeneration with TDP-43 Inclusions. *Antioxidants* 12
 104. You, Z. P., Yu, M. J., Zhang, Y. L., and Shi, K. (2019) Progranulin protects the mouse retina under hypoxic conditions via inhibition of the Toll-like receptor-4-NADPH oxidase 4 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 19, 382–390
 105. Saraf, A., Rampoldi, A., Chao, M., Li, D., Armand, L., Hwang, H., Liu, R., Jha, R., Fu, H., Maxwell, J. T., and Xu, C. (2021) Functional and molecular effects

- of TNF- α on human iPSC-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.* 52, 102218
106. Zhang, N., Aiyasiding, X., Li, W. jing, Liao, H. han, and Tang, Q. zhu. (2022) Neutrophil degranulation and myocardial infarction. *Cell Commun. Signal.* 20, 1–23
 107. Bratton, D. L. and Henson, P. M. (2011) Neutrophil clearance: When the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 32, 350–357
 108. Chia, S., Nagurney, J. T., Brown, D. F. M., Raffel, O. C., Bamberg, F., Senatore, F., Wackers, F. J. T., and Jang, I. K. (2009) Association of Leukocyte and Neutrophil Counts With Infarct Size, Left Ventricular Function and Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction. *Am. J. Cardiol.* 103, 333–337
 109. Guasti, L., Dentali, F., Castiglioni, L., Maroni, L., Marino, F., Squizzato, A., Ageno, W., Gianni, M., Gaudio, G., Grandi, A. M., Cosentino, M., and Venco, A. (2011) Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularization: A systematic review on more than 34,000 subjects. *Thromb. Haemost.* 106, 591–599
 110. Schloss, M. J., Horckmans, M., Nitz, K., Duchene, J., Drechsler, M., Bidzhekov, K., Scheiermann, C., Weber, C., Soehnlein, O., and Steffens, S. (2016) The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO Mol. Med.* 8, 937–948
 111. Raman, S. V., Moreo, A., Ambrosio, G., Chiara, B. De, Pu, M., Tran, T., and Mauri, F. (2009) Influence of myocardial fibrosis on left ventricular diastolic function noninvasive assessment by cardiac magnetic resonance and echo. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 2, 437–443

112. Mewton, N., Liu, C. Y., Croisille, P., Bluemke, D., and Lima, J. A. C. (2011) Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 891–903
113. Zhou, M., Tang, W., Fu, Y., et al. (2015) Progranulin protects against renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int.* 87, 918–929
114. Yamada, Y., Wakao, S., Kushida, Y., et al. (2018) S1P–S1PR2 axis mediates homing of muse cells into damaged heart for long-lasting tissue repair and functional recovery after acute myocardial infarction. *Circ. Res.* 122, 1069–1083
115. Tanaka, Y., Suzuki, G., Matsuwaki, T., Hosokawa, M., Serrano, G., Beach, T. G., Yamanouchi, K., Hasegawa, M., and Nishihara, M. (2017) Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. *Hum. Mol. Genet.* 26, 969–988
116. Sarazan, R. D., Kroehle, J. P., and Main, B. W. (2012) Left ventricular pressure, contractility and dP/dtmax in nonclinical drug safety assessment studies. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 66, 71–78
117. Daseke, M. J., Chalise, U., Becirovic-Agic, M., Salomon, J. D., Cook, L. M., Case, A. J., and Lindsey, M. L. (2021) Neutrophil signaling during myocardial infarction wound repair. *Cell. Signal.* 77, 109816
118. Liu, M., Shan, M., Zhang, Y., and Guo, Z. (2021) Progranulin protects against airway remodeling through the modulation of autophagy via HMGB1 suppression in house dust mite-induced chronic asthma. *J. Inflamm. Res.* 14, 3891–3904
119. Schiraldi, M., Raucci, A., Muñoz, L. M., et al. (2012) HMGB1 promotes

- recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* 209, 551–563
120. Andrassy, M., Volz, H. C., Igwe, J. C., et al. (2008) High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation* 117, 3216–3226
 121. Jung, K., Kim, P., Leuschner, F., Gorbатов, R., Kim, J. K., Ueno, T., Nahrendorf, M., and Yun, S. H. (2013) Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ. Res.* 112, 891–899
 122. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, F. N. (2010) The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48, 504–511
 123. Luo, S., Hieu, T. B., Ma, F., Yu, Y., Cao, Z., Wang, M., Wu, W., Mao, Y., Rose, P., Law, B. Y. K., and Zhu, Y. Z. (2017) ZYZ-168 alleviates cardiac fibrosis after myocardial infarction through inhibition of ERK1/2-dependent ROCK1 activation. *Sci. Rep.* 7, 1–14
 124. Díez, J., Querejeta, R., López, B., González, A., Larman, M., and Martínez Ubago, J. L. (2002) Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 105, 2512–2517
 125. Hein, S., Arnon, E., Kostin, S., Schönburg, M., Elsässer, A., Polyakova, V., Bauer, E. P., Klövekorn, W. P., and Schaper, J. (2003) Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human: Heart structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107, 984–991
 126. Fu, W., Wang, W. E., and Zeng, C. (2019) Wnt signaling pathways in

- myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors. *Acta Pharmacol. Sin.* 40, 9–12
127. Gourdie, R. G., Dimmeler, S., and Kohl, P. (2016) Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 620–638
 128. Palevski, D., Levin-Kotler, L. P., Kain, D., Naftali-Shani, N., Landa, N., Ben-Mordechai, T., Konfino, T., Holbova, R., Molotski, N., Rosin-Arbesfeld, R., Lang, R. A., and Leor, J. (2017) Loss of macrophage Wnt secretion improves remodeling and function after myocardial infarction in mice. *J. Am. Heart Assoc.* 6, 1–18
 129. Uitterdijk, A., Hermans, K. C. M., De Wijs-Meijler, D. P. M., Daskalopoulos, E. P., Reiss, I. K., Duncker, D. J., Matthijs Blankesteijn, W., and Merkus, D. (2016) UM206, a selective Frizzled antagonist, attenuates adverse remodeling after myocardial infarction in swine. *Lab. Investig.* 96, 168–176
 130. Alquézar, C., de la Encarnación, A., Moreno, F., López de Munain, A., and Martín-Requero, Á. (2016) Progranulin deficiency induces overactivation of WNT5A expression via TNF- α /NF- κ B pathway in peripheral cells from frontotemporal dementia-linked granulin mutation carriers. *J. Psychiatry Neurosci.* 41, 225–239

略語一覽表

α SMA	Alpha-smooth muscle actin
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
Ang II	Angiotensin II
BC	B-cells
BMDM	Bone marrow derived macrophage
BSA	Bovine serum albumin
BW	Body weight
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C motif chemokine receptor
CD	Cluster of Differentiation
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR	C-X-C chemokine receptor
Cyc	Cycling EC
DC	Dendritic-like cells
DCFH-DA	Highly sensitive 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
EC	Endothelial cells
ECAR	Extracellular acidification rate
ECG	Electrocardiogram
EF	Ejection fraction
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
F-Act	Activated fibroblasts

FBS	Fetal bovine serum
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FS	Fractional shortening
F-SH	Fibroblast-Sca1 ^{high}
F-SL	Fibroblast-Sca1 ^{low}
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration
F-WntX	Fibroblasts expressing Wnt
GO	Gene ontology
GHE	Global health estimates
Glia	Glial cells
Grn	Granulin
HIF	Hypoxia inducible factor
HMGB1	High-mobility group box 1
HW	Heart weight
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IL-4R	Interleukin-4 receptor
KO	Knockout
LCA	Left coronary artery
LPS	Lipopolysaccharide
LV	Left ventricular
LVIDd	LV internal diameter at diastole
LVIDs	LV internal diameter at systole

Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex
M1Mo	M1 monocytes
M1M ϕ	M1 macrophages
M2M ϕ	M2 macrophages
MAC	Macrophage
MAC-IFNIC	Macrophages showed strong upregulation of IFN-induced genes
MAC-TR	Cardiac tissue-resident M ϕ
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MerTK	Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
mtROS	Mitochondrial ROS
Mural	Mural cells
MYO	Myofibroblasts
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NKC	Natural killer cells
OCR	Oxygen consumption rate
OGD	Oxygen-glucose deprivation
Oligo	Oligomycin A
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
PFA	Paraformaldehyde
PGRN	Progranulin
ROS	Reactive oxygen species
Rot/Ant	Rotenone/Antimycin A

TC	T-cells
TDP-43	TAR DNA-binding protein 43
TGF- β	Transforming growth factor- β
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TTC	2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride
WT	Wild type
WHO	World health organization