

難治性心臓病における自然免疫経路を介した  
初期炎症反応の役割の解明と新たな治療法の開発

## 《研究の概要》

狭心症や心筋梗塞といった虚血性心疾患や大動脈瘤、動脈硬化などの心血管疾患の病態における炎症反応の関与が示されている。これらの病態では、病原体の関与がないことから“無菌性炎症”と呼ばれているが、どのようにしてこの炎症反応が惹起されるのかはわかっていない。近年、いくつかの無菌性炎症が自然炎症経路であるインフラマソームと呼ばれる細胞内に形成される分子複合体を介して惹起されることが明らかとなってきた。無菌性炎症に関わる NLRP3 インフラマソームは、アダプター分子 ASC を中心として Nod-like 受容体 (NLR) に属する NLRP3 とカスパーゼ-1 の複合体から構成される。この活性化はカスパーゼ-1 の活性化を誘導し、炎症サイトカインである IL-1 $\beta$  を前駆体から成熟型へとプロセッシングすることで IL-1 $\beta$  の分泌を促し、炎症反応を惹起する。我々は以前より、このインフラマソームに着目して研究を行っており、血管傷害後の新生内膜形成においてインフラマソームが重要な役割を果たしていることを報告している。本研究では、心血管疾患の無菌性炎症反応におけるインフラマソームの役割を解明し、これを治療標的とした新たな治療法を開発することを目的として研究を行った。

マウス心虚血再灌流モデルの傷害心筋において ASC およびカスパーゼ-1 の発現増加を認め、再灌流後の心筋梗塞領域や心機能障害、心リモデリングがインフラマソーム構成分子の欠損マウスで有意に改善されることを見出した。特に、白血球が傷害心筋へと浸潤してくるより早期の再灌流後心臓において、すでにインフラマソームの活性化を認め、このインフラマソーム活性化を介した初期炎症反応の場が心線維芽細胞であることも明らかとした。また、高コレステロール食誘導性のマウス動脈硬化モデルや腹部大動脈瘤モデルにおいても、インフラマソーム構成分子の欠損によって病変部の炎症反応が減弱して病態が改善することを明らかとした。特に、腹部大動脈瘤では、血管外膜に浸潤したマクロファージのインフラマソームが重要であることを見出している。

これらの結果から、インフラマソームが様々な心血管疾患における無菌性炎症の感知センサーとして働いており、これら疾患に対する新たな治療標的となりえることが示された。

<u>氏名</u>	<u>所属機関名</u>	<u>研究分担</u>
高橋将文	自治医科大学 バイオイメージング研究部・教授	研究の総括・データ解析・動物 実験
村上 孝	自治医科大学 バイオイメージング研究部・准教授 (2011年～高崎健康福祉大学薬学部・教授)	インフラマソームの分子機構 の解析
木村博昭	自治医科大学 バイオイメージング研究部・講師	インフラマソームの分子機構 の解析
臼井文武	自治医科大学 バイオイメージング研究部・博士研究員	心血管疾患動物モデルの作 成・解析

## 研究報告

### I. 研究目的

狭心症や心筋梗塞といった虚血性心疾患や大動脈瘤、動脈硬化などの心血管疾患の病態における炎症反応の関与が示されている。これらの病態での炎症反応は、細菌やウイルスといった病原体の関与がないことから“無菌性炎症”と呼ばれているが、この無菌性炎症反応がどのようにして惹起されるのかは不明であった。近年、痛風結晶やアスベスト等による無菌性炎症が、自然炎症経路であるインフラマソームと呼ばれる細胞内に形成される分子複合体を介して惹起されることが明らかとなってきた。無菌性炎症に関わるインフラマソームとして NLRP3 (NALP3、cryopyrin) インフラマソームが最もよく研究されているが、これはアダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を中心として Nod-like 受容体 (NLR) に属する NLRP3 とカスパーゼ-1 の複合体から構成される。この活性化はカスパーゼ-1 の活性化を誘導し、炎症サイトカインであるインターロイキン (IL)  $-1\beta$  を前駆体から成熟型へとプロセッシングすることで IL- $1\beta$  の分泌を促し、炎症反応を惹起する。我々は以前より、このインフラマソームに着目して研究を行い、血管傷害後の新生内膜形成においてインフラマソームが重要な役割を果たしていることを報告したことから、インフラマソームが心血管疾患における炎症反応の感知センサーとして働いているのではないかとの仮説に至った。この仮説を検証するため、本研究では、心血管疾患の初期炎症反応におけるインフラマソームの役割を解明し、これを治療標的とした新たな治療法を開発することを目的に研究を行った。

### II. 研究計画及び材料と方法

#### (1) 心筋梗塞におけるインフラマソームの役割の解明

野生型 C57BL/6 マウス (wild-type: WT; ♂、8-12 週齢) および ASC 欠損 (-KO) マウス、カスパーゼ-1 (Casp1) -KO マウス (C57BL/6 background) を使用した。心筋梗塞では臨床的に梗塞後に心血管インターベンション治療を受けることが多く、その再灌流傷害が臨床的な問題となっていることを踏まえ、本研究では心虚血再灌流傷害モデルにより検討する

こととした。心虚血再灌流モデルは人工呼吸下で開胸して冠動脈左前下行枝を 30 分間結紮し、その後解除することにより作成した。マウス骨髄置換モデルは、レシピエントマウスに 9Gy の放射線を照射後、ドナーマウスから採取した骨髄細胞を経静脈的に移植して作成し、8 週間後に実験に用いた。In vitro の実験には、マウス新生仔心臓から心筋細胞と心線維芽細胞をそれぞれ単離、培養して用いた。

## (2) 動脈硬化・腹部大動脈瘤におけるインフラマソームの役割の解明

動脈硬化モデルとして汎用されている ApoE-KO マウスに Casp1-KO マウスを掛け合わせて、ApoE/Casp1-ダブル KO (DKO) マウスを作成した。動脈硬化モデルは、高コレステロール食 (Western Diet:0.15% w/w cholesterol、40% kcal% butter fat を含有) を 12 週間投与することで作成した。大動脈における動脈硬化病変は、Sudan IV 染色により、大動脈起始部における動脈硬化病変は、Oil red O 染色により解析し、それぞれ定量化した。また、腹部大動脈瘤モデルの作成は、ApoE-KO マウスおよび ApoE/Casp1-DKO にアンジオテンシン II (1000ng/kg/min) を浸透圧ミニポンプ (Alzet) により 4 週間持続注入することで作成した。In vitro の実験には、L929 細胞の培養液により分化させたマウス骨髄細胞由来マクロファージおよび J774 細胞株を用いた。

## III. 研究成果

### (1) 心筋梗塞におけるインフラマソームの役割の解明

心虚血再灌流後の傷害心筋では ASC の強い発現を認めた。特に、虚血部位および境界部位に集簇しているマクロファージや好中球といった炎症細胞において強い発現を認めたが、血管や間質細胞においても ASC の発現を認めた。また、in situ hybridization 法により、傷害心筋 (特に炎症細胞) での ASC mRNA の発現も確認された。このことから、心虚血再灌流傷害において ASC およびインフラマソームが役割を果たしていることが示されたことから、次に ASC-KO マウスを用いて心虚血再灌流傷害における ASC 欠損の影響を検討した。WT マウスと ASC-KO マウスでは、左心室に対する虚血領域 (AAR/LV) に有意な差は認められなかったが、ASC-KO マウスの梗塞領域 (IA/AAR) は、WT マウスと比較して有意に減少していることが示された。この心虚血再灌流後の梗塞領域の有意な減少は、カスパーゼ-1-KO マウスにおいても確認され、インフラマソームの阻害が心虚血再灌流傷害に対する改善効果を示すことが明らかとなった。さらに、虚血再灌流後 14 日目での心線維化領域をマッソン・トリクローム染色で評価したところ、ASC-KO マウスにおいて線維化が有意に減少しており、ASC の欠損が傷害後の心リモデリングの改善にも寄与していることが示された。傷害心筋における炎症細胞浸潤および炎症性サイトカインの発現を検討したところ、ASC-KO マウスでは、マクロファージや好中球の浸潤および IL-1 $\beta$  をはじめとした炎症性サイトカインの発現が有意に減少しており、ASC-KO マウスでは虚血再灌流後の炎症反応のそのものが減弱していることがわかった。

マウス骨髄置換モデルでの検討では、ASC-KO 骨髄を WT マウスへと置換したマウス (ASC-KO $\rightarrow$ WT) において、WT 骨髄を WT マウスへと置換したマウス (WT $\rightarrow$ WT) に比較して心筋梗塞領域の有意な減少を認め、WT 骨髄を ASC-KO マウスへと置換したマウス (WT $\rightarrow$ ASC-KO) においても同程度の梗塞領域減少効果が認められた。一方、心虚血再灌流後の炎症細胞浸

潤の時間経過を検討してみたところ、再灌流後 1~3 時間では明瞭な心筋傷害を認めたとにかかわらず炎症細胞の浸潤はまだ認められなかったことから、心虚血再灌流後の初期のインフラマソーム活性化には骨髄由来以外の細胞、つまり心レジデント細胞である心筋細胞や心線維芽細胞が重要な役割を果たしていることが推測された。

心レジデント細胞でのインフラマソーム活性化をより詳細に解析するため、心筋細胞と心線維芽細胞をそれぞれ培養して *in vitro* の実験を行った。炎症惹起刺激であるリポ多糖 (LPS) 処理による IL-1 $\beta$  のプロセッシングや産生は心筋細胞では全く検出されず、心線維芽細胞でのみ認められた。また、心線維芽細胞に低濃度の LPS で priming して虚血再灌流を模した低酸素再酸素化刺激を加えると、IL-1 $\beta$  の産生は有意に増加し、この産生は ASC-KO マウス由来の心線維芽細胞では著明に減少していた。さらに、低酸素再酸素化によるインフラマソームの活性化が、細胞内カリウムの細胞外への流出 (K efflux) と酸化ストレス (ROS) を介していることも確認された。これらの結果より、心虚血再灌流後の初期炎症反応が、心線維芽細胞におけるインフラマソームの活性化によって誘導されているとの新しい知見を得た。

## (2) 動脈硬化・腹部大動脈瘤におけるインフラマソームの役割の解明

高コレステロール食負荷によって動脈硬化を誘導したところ、ApoE-KO マウスと比較して、ApoE/Casp1-DKO マウスでは大動脈全体の動脈硬化病変面積ならびに大動脈起始部の病変面積の有意な減少を認め、大動脈起始部病変におけるマクロファージの浸潤も減少していた。一方、これらマウス間で血清コレステロールおよび中性脂肪値には有意な差を認めなかった。カスパーゼ-1 は IL-1 $\beta$  産生の重要な酵素であることから、IL-1 $\beta$  の発現を検討したところ、ApoE/Casp1-DKO マウスの病変部では IL-1 $\beta$  の発現が減少しており、血中の IL-1 $\beta$  をはじめとした炎症性サイトカインも減少していることがわかった。本研究の遂行中に、コレステロール結晶がインフラマソームを活性化することが報告されてしまったことと、近年、血管の石灰化が直接マクロファージを活性化させて動脈硬化病変の進展や不安定性に寄与していることが示唆されていることから、血管石灰化に重要なカルシウム結晶 (TCP: Tricalcium phosphate crystal) を用いて、*In vitro* の検討を行った。TCP 刺激により、J774 マクロファージからカスパーゼ-1 の活性化および IL-1 $\beta$  産生が用量依存的に誘導され、この機序としてリソソームとそこから放出されるカテプシン B が関与していることが示された。また、TCP 刺激による IL-1 $\beta$  の産生は ApoE-KO マウスから作成した骨髄細胞由来マクロファージにおいても認められ、この IL-1 $\beta$  産生は ApoE/Casp1-DKO マウスから作成した骨髄細胞由来マクロファージではほぼ完全に抑制されていた。

アンジオテンシン II を ApoE-KO マウスに持続投与して作成した腹部大動脈瘤モデルにおいても、ApoE-KO マウスと比較して、ApoE/Casp1-DKO マウスでは大動脈瘤の形成率および大動脈の最大径が有意に減少することを見出した。ApoE/Casp1-DKO マウスでは、病変部における炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)、コラーゲンなどの発現の減少を認めた。一方、血中 IL-1 $\beta$  濃度を経時的に検討すると、大動脈径の変化がまだ認められない早期により高値を示し、大動脈外膜側に浸潤しているマクロファージにおいてインフラマソームの活性化が認められた。さらに、骨髄細胞由来マクロファージおよび J774 マクロファージを用いてインフラマソーム活性化の分子機序を解析し、アンジ

オテンシンⅡが AT1 受容体を介してミトコンドリアにおける酸化ストレスを増加させ、インフラマソームの活性化が誘導されることを明らかとした。

#### IV. 考察

炎症反応は様々な疾患の病態に関与している。本研究では、特に心血管疾患に焦点を絞って、その無菌性炎症の惹起機構をインフラマソームを中心に解析し、心虚血再灌流傷害や動脈硬化、腹部大動脈瘤におけるインフラマソームの重要性を明らかとした。

心筋梗塞は、動脈硬化性の冠動脈狭窄病変におけるプラークに破綻が生じることで血栓が形成され、冠動脈が閉塞して灌流心筋が虚血から壊死に陥る病態である。心筋の虚血状態を解除するため、臨床的に心血管インターベンション治療によって冠動脈を再開通する治療が行われ、非常に有効で確立した治療法となっているが、一方で不整脈や心筋壊死の増大といった虚血再灌流傷害が臨床的に問題となる。この虚血再灌流傷害では炎症が強く誘導されることがわかっていたが、その機序はわかっていた。本研究により、この心虚血再灌流後の炎症反応がインフラマソームを介していることが明らかとなった。特に、炎症細胞が集簇する前のごく早期に心線維芽細胞でのインフラマソームが活性化し、これが炎症細胞の集簇とより大きな炎症反応のトリガーとなることを明らかにしたことは、重要な知見である。心線維芽細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌することで心線維化に寄与することや増殖因子やサイトカインといった液性因子を分泌することが知られているが、本研究により、虚血再灌流という生体にとっての“危険シグナル”を感知して、炎症反応を惹起するという心線維芽細胞の新たな役割が示されたと考えている。動脈硬化や腹部動脈瘤においてもインフラマソームを抑制することで血管の炎症反応を減弱し、その病態を改善できることが示された。これらの病態においても血管外膜に存在する線維芽細胞が役割を果たしている可能性は残っているが、インフラマソーム活性化の場となっているのはマクロファージであると現時点では考えられており、さらなる検討が必要である。

インフラマソーム活性化の分子機構は不明な点も多いが、主に3つの経路が様々な活性化刺激による共通した機序として報告されている。ROS と K 流出、リソソームからのカテプシン B の放出である。本研究の結果から、カルシウム結晶によるインフラマソーム活性化はマクロファージによってカルシウム結晶が取り込まれ、リソソームからのカテプシン B 放出を介してインフラマソームが活性化すると考えられる。一方、アンジオテンシンⅡ刺激では、マクロファージのミトコンドリアにおける ROS の産生が引き起こされて、これがインフラマソームの活性化を導くと考えられる。さらに、虚血再灌流刺激による心線維芽細胞でのインフラマソームの活性化は、ROS および K 流出を介していることが示されたことから、これらの活性化刺激においても、インフラマソーム活性化経路の使い分けがなされていると考えられる。一方、これらの刺激がインフラマソームを活性化する詳細な分子機序や、それがどのような機序で NLR (NLRP3) に認識されるのか、さらには TLR (Toll-like 受容体) /NF- $\kappa$ B 経路とのクロストークなど、いまだ説明されていない課題も多く、今後の検討が必要である。これまで不明であった心血管疾患における無菌性炎症の惹起機序が少しずつではあるが明らかとなっており、その一部にインフラマソームが関与していることもわかってきた。今後の心血管疾患におけるインフラマソーム研究の発展に

よって、無菌性炎症の惹起機序の解明や、これを利用した新たな治療法の開発に貢献することが期待される。

最後に、本研究事業に貴重なご支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に厚く御礼申し上げます。

## V. 研究成果の発表

1. Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J* 74: 418-423, 2010
2. Takahashi M. Immature erythroid cells: a new source for therapeutic angiogenesis? *J Mol Cell Cardiol* 49: 341-342, 2010
3. Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology* 20: 843-864, 2010
4. Abe H, Takahashi M, Yaegashi H, Eda S, Tsunemoto H, Kamikozawa M, Koyama J, Yamazaki K, Ikeda U. The efficacy of continuous positive airway pressure on arrhythmias in obstructive sleep apnea patients. *Heart and Vessels* 25: 63-69, 2010
5. Yamaguchi A, Murakami T, Takahashi M, Kobayashi E, Sugawara Y. Luminescence imaging of regenerating free bone graft in rats. *Plast Reconstr Surg* 127: 78-87, 2011
6. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 123: 594-604, 2011
7. Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction. *Trends Cardiovasc Med* 21:37-41, 2011
8. Hata T, Takahashi M, Hida S, Kawaguchi M, Kashima Y, Usui F, Morimoto, Nishiyama A, Izawa A, Koyama J, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17 cells in inflammation and neovascularization after ischemia. *Cardiovasc Res* 90: 364-372 2011
9. Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Takahashi M, Takahashi M, Ishida T, Ishida T, Hirata K, Yamamoto T, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M. Species differences of macrophage very low-density lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. *Biochem Biophys Res Commun* 407: 656-662, 2011
10. Kinugawa S, Tojo A, Sakai T, Tsumura H, Takahashi M, Hirata Y, Fujita T. Selective albuminuria via podocyte albumin transport in puromycin nephritic rats is attenuated by an inhibitor of NADPH oxidase. *Kidney Int* 80:1328-1338,

2011

11. Sekine H, Shimizu T, Dobashi I, Matsuura K, Hagiwara N, Takahashi M, Kobayashi E, Yamato M, Okano T. Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Eng* 17: 2973-2980, 2011
12. Ise M, Ise H, Shiba Y, Kobayashi S, Goto M, Takahashi M, Akaike T, Ikeda U. Targeting N-acetylglucosamine-bearing polymer-coated liposomes to vascular smooth muscle cells. *J Artif Organ* 14: 301-309, 2011
13. Takeda S, Chinda J, Murakami T, Numata A, Iwazu Y, Akimoto T, Hamano Y, Muto S, Takahashi M, Kusano E. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: a potential model for paraneoplastic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 27: 1786-1792, 2012
14. Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H. Thy-1 positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 137: 733-742, 2012
15. Akita S, Kubota K, Kobayashi A, Misawa R, Shimizu A, Nakata T, Yokoyama T, Takahashi M, Miyagawa S. Role of bone marrow cells in the development of pancreatic fibrosis in a rat model of pancreatitis induced by choline-deficient/ethionone-supplemented diet. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 743-749, 2012
16. Kobayashi M, Morita T, Chunn NAL, Matsui A, Takahashi M, Murakami T. Effect of host immunity on metastatic potential in renal cell carcinoma: the assessment of optimal in vivo models to study metastatic behavior of renal cells. *Tumor Biol* 33: 551-559, 2012
17. Okano T, Wakitani S, Okabe T, Takahashi M, Koike T, Nakamura H. Nucleated cells circulating in the peripheral blood contribute to the repair of osteochondral defects in the early phase of healing. *J Tissue Eng Reg Med* (in press)
18. Usui F, Kimura H, Ohshiro T, Tatsumi K, Kawashima A, Nishiyama A, Iwakura Y, Ishibashi S, Takahashi M. Interleukin-17 deficiency reduced vascular inflammation and development of atherosclerosis in western diet-induced ApoE-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 420:72-77, 2012
19. Takahashi M. Adipose tissue: an alternative source for therapeutic angiogenesis. *Circ J* (in press)
20. Takahashi M. Role of the inflammasome in vascular injury and atherosclerosis. *Inflammation and Regeneration* 32: 112-118, 2012