

炎症の選択的抑制による新規心不全治療法の開発

山口大学医学部 器官病態内科学
末富 建

研究の概要

わが国の心不全患者数は今後さらに増加する一方、心不全治療は現在においてもその大半は対症療法であり、病態に根本的にアプローチする治療が求められている。そのような中、最近の大規模試験の結果から、心機能低下に炎症が関与していることが再び注目されている。心負荷に伴う炎症がどのように発生し伝播するのか長らく不明であったが、申請者らの最近の研究により、心筋細胞内のカルシウム・カルモジュリンキナーゼII (CaMKII) 活性化に伴うインフラマソーム発生が起源となっていることが明らかになった。本研究ではこの知見をさらに発展させ、「心筋細胞でのインフラマソーム発生」および「心筋細胞から他の細胞へのシグナル拡散」を標的とした、あたらしい心不全治療法の確立を目指している。

背景

心筋障害が慢性期に心リモデリングをきたす機序として炎症 (sterile inflammation) が関与していることが解明されてきている。インフラマソームはその主たるシグナル伝達経路であり、NLRP3、ASC、procaspase-1複合体が形成され、IL-1 β やIL-18が産生される。最近このIL-1 β 等をターゲットとした、心血管イベントや心不全に対する臨床試験が行われ、良好な結果が得られていることから、臨床的に注目されている (Ridker et al. N Engl J Med. 2017, Van Tassell et al. Circ Heart Fail. 2017)。

申請者は昨年、圧負荷刺激によってCaMKIIが心筋細胞内のNLRP3インフラマソームの活性化 (図1) を引き起こし、その後のマクロファージの浸潤や心筋線維化、心機能低下につながることを突き止め報告した (Suetomi et al. Circulation 2018)。

目的

本研究の目的は、①心筋細胞から発生したインフラマソームシグナルの非心筋細胞 (線維芽細胞、マクロファージ等) への伝播様式を明らかにすること、②最終的に心不全をもたらすインフラマソームシグナルに対する選択的な治療標的を見出すことである。申請者は、「マクロファージは心筋細胞から放出された細胞外小胞を取り込むことで活性化し、心筋リモデリングにつながるシグナルをもたらす」、「マクロファージにおける細胞外小胞の取り込みはCaMKII δ に依存している」という仮説を検証するため、以下の3項目について実施する。

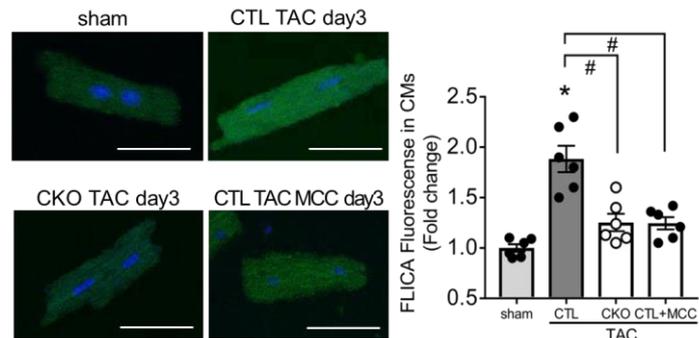


図1: 横行大動脈縮窄術 (Transverse aortic constriction: TAC) による圧負荷刺激後のマウス単離心筋細胞内インフラマソーム活性

FAM-FLICA Caspase-1 assay kit使用, Scale Bar = 50 μ m

CKO: Cardiomyocyte-specific CaMKII knockout

MCC: NLRP3阻害剤 MCC950 (Millipore社製 10mg/kg/12hr)

*P<0.05 vs sham; #P<0.05 vs control(CTL)TAC

1) 心筋細胞から放出される細胞外小胞は炎症シグナルを含むか
 培養心筋細胞に対して浸透圧負荷 (Osmotic stretch) を行ったのち、回収された心筋細胞および超遠心にて精製した細胞外小胞にそれぞれ炎症シグナル伝達物質が増加しているか否かを調べる。

2) 細胞外小胞の取り込みがCaMK II 依存性に起こるか
 予備実験において、CaMK II δ ノックアウトマウスのマクロファージでは細胞外小胞の取り込みに関与する蛋白質Xのリン酸化が抑制されていたことから、申請者らは細胞外小胞の取り込みがCaMK II 依存性に起こる可能性が高いと考えている。GFP-ASCを発現させた培養心筋細胞を浸透圧負荷し、得られた細胞外小胞をマクロファージ培養液に添加し、マクロファージ内のASC speck formationや

Caspase-1活性が増加するか否かを確認する。また、アデノウイルスベクターによってCaMK II δ を強発現させたマクロファージにおいて、細胞外小胞の取り込みが増加するか否か (GFP標識されたASCがマクロファージ内で増加するか) を評価する。

3) CaMK II をターゲットとした治療的介入
 治療的介入として、siRNAを用いたマクロファージ内のCaMK II ノックダウン、KN-93による薬理的CaMK II 阻害を行い、マクロファージの細胞外小胞取り込みやインフラマソームの活性低下が起こるか検証する。

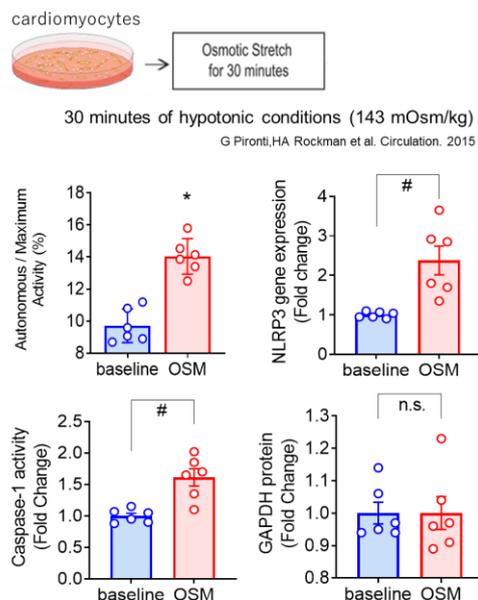


図2 浸透圧負荷による心筋細胞のCaMKII活性、インフラマソーム構成成分、およびインフラマソーム活性の評価
 OSM: Osmotic stretch * p<0.05 vs baseline, # p<0.05

研究成果

① 心筋細胞から放出される細胞外小胞は炎症シグナルを含むか

培養心筋細胞への浸透圧負荷を行った。回収された心筋細胞では図2の通りCaMKII活性、NLRP3遺伝子発現およびCaspase-1の活性増加を確認した。また培養液から超遠心法にて細胞外小胞を精製。図3の通りインフラマソームの構成成分であるASCおよび NLRP3の増加が確認され、インフラマソームシグナルが細胞外小胞に含有され他の細胞に移行している可能性が示唆された。

② 細胞外小胞の取り込みがCaMK II 依存性に起こるか

計画当初の「細胞外小胞のマクロファージ培養液添加」では効果にばらつきがあるため、両者の非接触型共培養に変更したところ安定した変化 (マクロファージ内Caspase-1活性増加等) が観察された。シグナル伝達を可視化すべくTdTomato-ASCベクターを作成し、培養心筋細胞への安定した発現を得るためのプロトコルを模索中である。

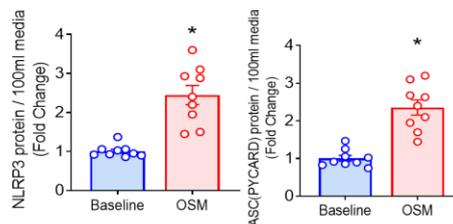
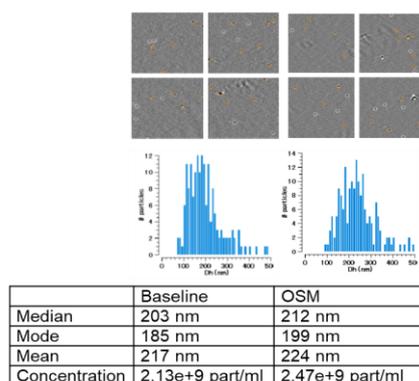


図3 浸透圧負荷培養液から精製した細胞外小胞の評価および小胞中ASC, NLRP3の比較
 OSM: Osmotic stretch * p<0.05 vs baseline

③ CaMK II をターゲットとした治療的介入

図4に示す通り、KN-93による薬理的CaMK II 阻害、siRNAを用いたWTマクロファージのCaMK II ノックダウン、およびglobal CaMKII KOマウスから単離したマクロファージにおいて、負荷心筋細胞との共培養での炎症反応抑制、Caspase-1活性の軽減がみられた。

②のASC可視化のプロトコル確立を含め、マクロファージの細胞

外小胞取り込みを定量化する方法について検討中である。さらにin vivoでの評価として、既存のCaMK II δ -floxedマウスとLysM-Creマウスの交配によるマクロファージ特異的CaMK II δ ノックアウトマウスの作製が進んでおり、横行大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷刺激に伴う心筋組織の線維化や慢性期の心機能低下が野生型と比べ有意に軽減しているかを検証している。

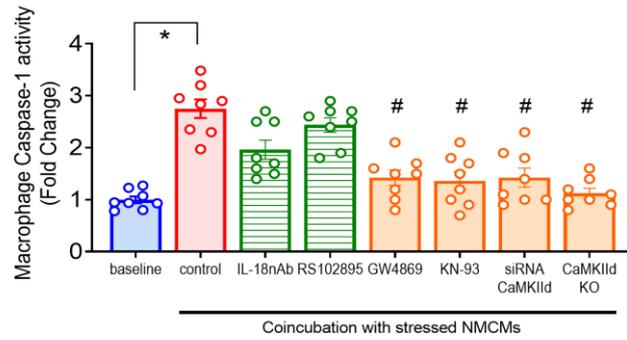


図4 浸透圧負荷心筋細胞との共培養マクロファージにおけるCaspase-1活性
NMCMs: マウス胎児心筋細胞 * p<0.05 vs baseline # p<0.05 vs control

謝辞

本研究では心筋細胞から放出される細胞外小胞を通した炎症シグナルの伝播について、in vivoでの評価につなげる有用な知見が得られました。本研究に多大なご支援を頂いた公益財団法人アステラス病態代謝研究会に感謝申し上げます。また、研究の構想および技術面で多大なご助力を賜りました山口大学大学院器官病態内科学講座教授の矢野雅文先生および小田哲郎先生、内海仁志先生に御礼申し上げます。