

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07376

研究課題名(和文)血管の炎症と動脈硬化：インフラマソーム活性化の動脈硬化への寄与の病理学的解明

研究課題名(英文) Vascular Inflammation and Atherosclerosis: Pathological Elucidation of the Contribution of Inflammasome Activation to Atherosclerosis

研究代表者

倉田 美恵 (Kurata, Mie)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：80423440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフラマソームが恒常的に活性化している疾患の一つであるマックルウェルズ症候群の実在の遺伝子変異を挿入した当教室で作成したモデルマウスを用いて動脈硬化症におけるNLRP3インフラマソームの寄与を明らかにすることを目標とした。脾細胞に対しLPS刺激を行うことで野生型と比べて高いIL-1の放出をきたすこと、また、同様に本教室で作成したNLRP3未発現マウスは同刺激に対し反応が著しく低下していることを確認した。これらのマウスを用いて胎児期から12カ月齢に及ぶまで長期間、多段階的に表現型の推移、血液、組織学的サンプルを得た。長期経過において血行動態と心臓形態がドラマティカルに変化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管疾患、特に動脈硬化症やうつ血性心不全は高齢化社会において克服すべき大きな課題である。これらの疾患の病態には慢性炎症が関与している。炎症抑制、特にIL-1を抑制することで心血管イベントの二次予防になることが大規模臨床研究で統計学的に明らかになり、IL-1が治療標的と考えられるようになった。しかしながらIL-1は多様な免疫応答の要であり阻害による免疫抑制はリンパ増殖性疾患などの原因となりうる。NLRP3インフラマソームの動脈硬化症への寄与が明らかとなれば、NLRP3インフラマソームのみを標的とした分子標的治療が可能となり、副作用のないプレジジョンメディスンが実現する。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the contribution of the NLRP3 inflammasome to arteriosclerosis using a model mouse created by our laboratory that has an existing genetic mutation inserted into Muckle-Wells syndrome, one of the diseases in which the inflammasome is constantly activated. The goal was to Stimulation of splenocytes with LPS resulted in higher IL-1 release compared to wild-type mice. I confirmed that there is These mice were used to obtain phenotypic transitions, blood, and histological samples over a long period of time from the fetal period to 12 months of age. We found that hemodynamics and cardiac morphology changed dramatically in the long-term course.

研究分野：人体病理

キーワード：人体病理 自己炎症 循環器病理

## 1. 研究開始当初の背景

研究課題の核心をなす学術的「問い」は「動脈硬化症の病理組織像の形成に NLRP3 インフラマソームがどのように関与しているのか」である。

慢性炎症が動脈硬化症の原因とされる一方で、インフラマソームの寄与は明らかではない。動脈硬化やそれに起因する心不全に対する現在の治療はスタチンを主体とする脂質低下に焦点が当てられている。近年、脂質代謝に影響を及ぼさず炎症を抑制することで心血管イベントの発症を低下させる可能性が示唆されている。特に、2017年にリウマチ治療薬として用いられている抗インターロイキン-1 (IL-1) 抗体であるカナキヌマブが、心筋梗塞後患者の心不全死を含む、心血管死と心血管イベント再発を抑制した Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study : CANTOS が報告され (Ridker, N Engl J Med. 2017) 慢性的な高 IL-1 を抑制することの重要性が認識された。また、慢性炎症性疾患である関節リウマチ患者には動脈硬化性疾患や心不全の発症率が高く、十分な抗炎症治療を行うことで動脈硬化が改善する (Del Porto, Rheumatology. 2007)。CANTOS の臨床的意義は IL-1 の心血管病リスクが IL-1 を抑制することによって軽減することを、統計学的に示したことである。しかし、NLRP3 インフラマソーム活性化状態がどの程度動脈硬化症に影響を及ぼすかという「問い」について病理組織学的に明らかにした研究はない。

NLRP3 インフラマソームの心血管病理における役割は明らかではない。インフラマソームは IL-1 の活性化に重要な役割を果たしている。インフラマソームは、多様な病原体や自己の代謝産物によって活性化する自然免疫系の病原体認識複合体である (図 1)。代表的なインフラマソームである NLRP3 インフラマソームを慢性的に活性化させる因子と動脈硬化症との関連が報告されている (Paramel, J. Am Heart Assoc. 2016)。しかしながら、「動脈硬化症の病理組織像の形成に NLRP3 インフラマソームがどのように寄与しているのか」という「問い」の答えは明らかにされていない。

応募者は循環器内科医として循環器系疾患の病態には慢性炎症があり、長期的な経過で動脈硬化症や心不全に悪影響を及ぼすことを臨床の場で体感してきた。その病態解明のため病理学教室に移籍後は、インフラマソームの主要アダプタータンパク質：ASC の発見者である増本純也教授に師事し、試験管内反応系の再構成作製プロジェクトに参加した。具体的には NLR とそのアダプター分子を無細胞コムギ胚芽系で作製しリガンドを負荷することでそれらの結合性を Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA) で定量する方法である。代表的 NLR で多彩なリガンドを認識し IL-1 の活性化に重要な役割を果たす NLRP3 インフラマソームにおいて 既知のリガンドと結合すること、結合ドメインを欠如させると結合性を喪失すること、自己炎症性疾患において知られている変異を加えることで過剰な結合性を証明した(応募者は、NLRP3 インフラマソームが恒常的に活性化しているモデルマウスを用いることで循環器疾患における NLRP3 インフラマソームの関与を評価できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化症の予防と治療におけるプレジジョンメディシンを確立するために、ヒト動脈硬化薬での NLRP3 インフラマソームの寄与を明らかにしたい。そのために、剖検症例での NLRP3 インフラマソーム構成分子の発現を解析したのち、NLRP3 インフラマソームが恒常的に活性化しているモデルマウスを用いて、種々の太さの動脈にどのように組織像の変化が起こるのかを病理組織学的に明らかにし、その組織像の改善を目的とした分子標的薬の開発を目指す。この目的を達成するため、下記の研究計画を実行する。

ヒト動脈硬化薬および心筋等の心血管系における NLRP3 インフラマソーム構成タンパク質の発現と IL-1 の発現を免疫組織学的に明らかにする。

NLRP3 恒常的活性化モデルマウス (CAPS モデルマウス(図 1,2 参照)) と NLRP3 とそのアダプター ASC の欠失マウスにおける動脈硬化の経時的進展を病理組織学的に明らかにする。

創薬機構から提供される化合物コアラライブラリーを用いて、NLRP3 インフラマソームを標的とする低分子化合物を探索する。

で同定した化合物の動脈硬化症への予防効果を病理組織学的に明らかにする。

## 3. 研究の方法

剖検症例における動脈硬化薬での NLRP3 インフラマソーム構成分子の発現解析  
当教室に保存されている 2010 年から 2020 年度までの剖検例から動脈壁を含む切片を選定し、NLRP3 インフラマソームの構成分子である、NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1b の発現を免疫組織

学的に明らかにする。

NLRP3 活性型モデルマウスが循環器系に及ぼす経時的変化を明らかにする。

当教室で作成した CAPS モデルマウスを保有している。先行実験によって、このマウスは生後約 3 日目には真皮網状層に好中球浸潤が認められる。これはヒト CAPS に合致した病理組織像で、NLRP3 インフラマソームの恒常的活性化を再現している。24 週齢マウスには心筋に無菌性の好中球浸潤が認められる。

i) 血行動態的解析

4 週齢、6 週齢、8 週齢、12 週齢、24 週齢において心エコーを行い心機能の推移を定量する。心機能は M mode で左室収縮期径、拡張期径、左室駆出率を計測し同タイミングで血漿 IL-1 を測定する。

ii) 病理組織学的解析

循環器系への炎症細胞浸潤の開始時期、進行度を病理組織学的に明らかにする。i) の週齢に加え胎生期、生後 0 日、3 日、7 日、14 日に心臓と大動脈を採取し、炎症細胞浸潤、線維化の程度を比較する。

NLRP3 インフラマソームシグナルの抑制による動脈硬化に与える影響の解析。

i) CAPS モデルマウスと ASC 欠失マウスとを交配し、動脈硬化の進展を解析すると同様の血行動態、病理組織学的解析を行う。

ii) NLRP3 インフラマソーム阻害薬の開発と投与

NLRP3 阻害薬を若年時から投与し心機能、動脈硬化病変の程度を比較する。

#### 4. 研究成果

本研究は、「動脈硬化症の病理組織像の形成に NLRP3 インフラマソームがどのように関与しているのか」を学術的な問いとして挙げている。インフラマソームが恒常的に活性化している疾患の一つであるマックルウェルズ症候群の实在の遺伝子変異を挿入したモデルマウス：CAPS モデルマウスを用いて、動脈硬化症における NLRP3 インフラマソームの寄与を明らかにすることを目標とした。

当教室で作成した CAPS モデルマウスはマックルウェルズ症候群と類似した皮膚症状をきたすことはすでに確認していたが、実際脾細胞に対し LPS 刺激を行うことで野生型と比して高い IL-1 の放出をきたすこと、また、同様に本教室で作成した NLRP3 未発現マウスは同刺激に対し反応が著しく低下していることを確認した。これらのマウスを用いて胎児期から 12 カ月齢に及ぶまで長期間、多段階的に体重の推移、血液、組織学的サンプルを得た。さらに、経時的に心臓超音波検査を行うことで長期経過において血行動態と心臓形態がドラマティカルに変化することを見出した。これらの知見を現在投稿準備中である。

また、NLRP3 インフラマソーム活性阻害因子の効果の検証を ID0L マウスを用いた in vivo 実験で定量化し、論文化した (Kaneko, Kurata, Masumoto, et al. SciRep. 2020)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kanno K, Sakaue T, Hamaguchi M, Namiguchi K, Nanba D, Aono J, Kurata M, Matsumoto J, Higashiyama S, Izutani H	4. 巻 22
2. 論文標題 Hypoxic Culture Maintains Cell Growth of the Primary Human Valve Interstitial Cells with Stemness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 10534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masumoto Junya, Zhou Wei, Morikawa Shinnosuke, Hosokawa Sho, Taguchi Haruka, Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Kaneko Naoe	4. 巻 41
2. 論文標題 Molecular biology of autoinflammatory diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-021-00181-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akazawa Yusuke, Inaba Shinji, Sakaue Tomohisa, Kurata Mie, Aono Jun, Yasugi Takumi, Moritani Tomozo, Nishiyama Hikaru, Higaki Takashi, Eguchi Mariko, Yamaguchi Osamu	4. 巻 23
2. 論文標題 Active aneurysm thrombosis after Kawasaki disease in an adult: Insight into anticoagulation therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 206 ~ 209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2020.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higashi Haruhiko, Nishimura Takashi, Aono Jun, Sakaue Tomohisa, Kurata Mie, Izutani Hironori, Yamaguchi Osamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathological Evidence of Native Aortic Valve Injury After Impella Support	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation: Heart Failure	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Naoe, Kurata Mie, Yamamoto Toshihiro, Shigemura Tomonari, Agematsu Kazunaga, Yamazaki Takashi, Takeda Hiroyuki, Sawasaki Tatsuya, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Yachie Akihiro, Migita Kiyoshi, Yoshiura Koh-ichiro, Urano Takeshi, Masumoto Junya	4. 巻 10
2. 論文標題 KN3014, a piperidine-containing small compound, inhibits auto-secretion of IL-1 from PBMCs in a patient with MuckleWells syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13562-13562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70513-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Aono Jun, Nakashiro Koh-ichi, Shikata Fumiaki, Kawakami Natsuki, Oshima Yusuke, Kurata Mie, Nanba Daisuke, Masumoto Junya, Yamaguchi Osamu, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 110
2. 論文標題 Valve Interstitial Cell-Specific Cyclooxygenase-1 Associated With Calcification of Aortic Valves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 40 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.09.085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ochi Toshiki, Maruta Masaki, Tanimoto Kazushi, Kondo Fumitake, Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Fujiwara Hiroshi, Masumoto Junya, Takenaka Katsuto, Yasukawa Masaki	4. 巻 4
2. 論文標題 A single-chain antibody generation system yielding CAR-T cells with superior antitumor function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 273-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01791-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishizu Akihiro, Kawakami Tamihiro, Kanno Hiroyuki, Takahashi Kei, Miyazaki Tatsuhiko, Ikeda Eiji, Oharaseki Toshiaki, Ogawa Yayoi, Onimaru Mitsuho, Kurata Mie, Nakazawa Daigo, Muso Eri, Harigai Masayoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Expert perspectives on pathological findings in vasculitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mr/roac043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Naoe, Mori Wakako, Kurata Mie, Yamamoto Toshihiro, Zako Tamotsu, Masumoto Junya	4. 巻 36
2. 論文標題 Inflammasome assembly is required for intracellular formation of 2-microglobulin amyloid fibrils, leading to IL-1 secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Immunopathology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03946320221104554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Kaneko Naoe, Masumoto Junya	4. 巻 18
2. 論文標題 Intestinal edema induced by LPS-induced endotoxemia is associated with an inflammasome adaptor ASC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0281746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kayo, Aono Jun, Nakao Yasuhisa, Hamaguchi Mika, Suehiro Chika, Kurata Mie, Sakaue Tomohisa, Kakino Akemi, Sawamura Tatsuya, Inoue Katsuji, Ikeda Shuntaro, Suzuki Jun, Yamaguchi Osamu	4. 巻 46
2. 論文標題 LOX-1 deficiency increases ruptured abdominal aortic aneurysm via thinning of adventitial collagen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 63 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01093-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 倉田美恵
2. 発表標題 病理組織像から考える粥状動脈硬化巣内新生血管の意義
3. 学会等名 第6回 血管生物医学会 若手研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井士瑛、倉田美恵、増本純也
2. 発表標題 放射線治療施行後に生じた小脳出血の一部検例
3. 学会等名 日本病理学会総会 2023年
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二川昇馬、倉田美恵、増本純也
2. 発表標題 遺伝子パネル検査によりがん治療に結びつく細く短い糸 全てのがん を治すことができる日はくるのか
3. 学会等名 日本病理学会総会 2023年
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉田美恵、増本純也
2. 発表標題 循環補助内留置型ポンプカテーテルImpella 挿入後の動脈弁尖の組織像の比較
3. 学会等名 日本病理学会総会 2023年
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増本 純也、金子 直恵、山本 敏弘、倉田 美恵
2. 発表標題 細胞傷害によるインフラマソームの活性化とその意義
3. 学会等名 日本病理学会総会 2023年
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福島万奈、星野瞳、米元菜採、村元暁文、山中真依子、加藤久隆、倉田美恵、増本純也、小林基弘
2. 発表標題 未分化多形肉腫におけるNLRP3 インフラマソームの関与
3. 学会等名 日本病理学会総会 2023年
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------