

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23969

研究課題名(和文)カルモジュリンキナーゼを標的とした炎症シグナル抑制による新規心不全治療法の開発

研究課題名(英文)Anti-inflammatory approach targeting calcium/calmodulin-dependent protein kinase as a novel therapeutic strategy to the heart failure

研究代表者

末富 建 (Suetomi, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：40749842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的心負荷によって心筋細胞で発生した慢性炎症シグナルが周囲の細胞に伝播し、心筋組織の線維化や心収縮能低下などを引き起こすメカニズムについて検証した。培養心筋細胞の浸透圧負荷によって種々の炎症遺伝子および炎症抑制遺伝子亢進、Caspase-1活性の増加、細胞外小胞の増加を認め、非接触共培養したマクロファージにおいて炎症遺伝子やインフラマソームシグナルの亢進を認めた。またこれらの反応がカルモジュリン依存性キナーゼによって制御されていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一連の結果から、心筋負荷から生じる炎症シグナルがCaMKII依存性にマクロファージに影響しリモデリングに寄与することが示唆された。ただし今回の研究期間では細胞外小胞取り込みの直接的な確認には至っておらず、マクロファージの反応の違いが、細胞外小胞の取り込みの違いによって生じているかは現時点では明らかではない。また、マクロファージ以外の非心筋細胞の反応についても十分な評価ができておらず、今後の課題である。CaMKIIを標的とすることで、より選択的で、免疫抑制の副作用を回避した炎症治療法につながる可能性があり、引き続き上記の機序を明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：The potential efficacy of anti-inflammatory therapy was shown by the results of the recently published clinical trials in which a significant decrease in adverse cardiac events was observed in patients treated by inhibitions of sterile inflammation. We investigated how the inflammatory signals from cardiomyocytes propagate to other cells. Elevated inflammatory gene expressions and inflammasome activations are observed in macrophages when cocultured with osmotic-stretched neonatal mouse cardiomyocytes. These responses are regulated by the Calcium/calmodulin-dependent protein kinase(CaMKII) in macrophage.

研究分野：心不全

キーワード：カルモジュリン依存性キナーゼ マクロファージ 心筋細胞 慢性炎症 心不全 圧負荷 心筋リモデリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

心筋障害が慢性期に心リモデリングをきたす機序は長く不明であったが、近年、無菌性炎症が関与していることが広く知られるようになった。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 の複合体が形成され、活性化を経て Caspase-1 として機能し、炎症シグナル伝達物質インターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) や IL-18 が産生される。

研究代表者は昨年、圧負荷刺激によって CaMKII が心筋細胞内の炎症遺伝子および NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こし、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: 図1)。ほぼ同時期に他の研究グループから、非虚血性心筋障害を引き起こすカテコラミン負荷モデルにおいても、やはり心筋細胞内からインフラマソームが発生し、その後に他の細胞に炎症シグナルが拡散することが報告された (Xiao et al. Eur Heart J 2018)。これらから、心リモデリングをもたらす無菌性炎症は、まず心筋細胞内のシグナルが発端となることが示唆された。さらに近年、圧負荷刺激によって心筋細胞からエクソソーム等の細胞外小胞が放出されていることや、細胞外小胞の取り込みに関与する Dynamin related protein 1 (Drp1) の活性が CaMKII に依存していることが報告されている (Pironti et al. Circulation 2015、Bo et al. Biochem Biophys Res Commun 2018)。

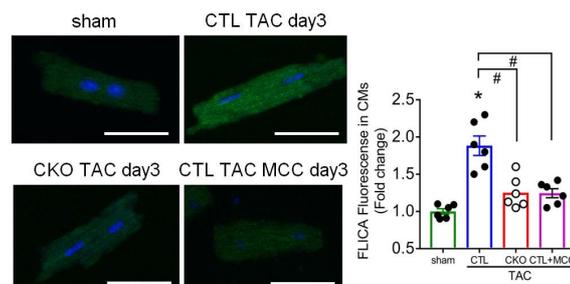


図1: TAC (Transverse aortic constriction) による圧負荷刺激後のマウス単離心筋細胞内インフラマソーム活性。FAM-FLICA Caspase-1 assay kit 使用。Scale Bar = 50  $\mu$ m。CKO: Cardiomyocyte-specific CaMKII knockout。MCC: NLRP3 阻害剤 MCC950 (Millipore 社製, 10 mg/kg/12hr)。\*P<0.05 vs sham; #P<0.05 vs control (CTL) TAC。

## 2. 研究の目的

心筋細胞から発生したインフラマソームシグナルが非心筋細胞(線維芽細胞、マクロファージ等)へ伝播しているか否かを明らかにすること、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。

## 3. 研究の方法

### (1) CaMKII 遺伝子改変マウスの横行大動脈縮窄術 (TAC) への反応性

野生型マウス、CaMKII ノックアウトマウス、心筋特異的 CaMKII ノックアウトマウスに対して施行された TAC の経過を、遺伝子発現、免疫染色、線維化、心機能変化について比較した。

### (2) 心筋細胞や細胞外小胞に炎症シグナルが含まれるか

NMVM (neonatal mouse ventricular myocyte) の単離培養心筋細胞に対して、30 分間、143 mOsm/kg の低浸透圧環境下で培養 (浸透圧負荷: Osmotic stretch) を行ったのち、心筋細胞を回収、炎症・線維化関連遺伝子を主とした mRNA 測定、各種蛋白量の測定およびインフラマソームシグナルの酵素反応を測定した。また培養液も回収し、超遠心法によって細胞外小胞を分離したのち、細胞外小胞の濃度測定、炎症・線維化関連遺伝子の mRNA、蛋白量の測定を行い、浸透圧負荷に伴う有意な変化がみられるか否かを調べた。

### (3) 共培養や細胞外小胞添加によってマクロファージの反応が起こるか

マウス腹腔洗浄によってマクロファージを回収、浸透圧負荷後の培養心筋細胞をトランスウェルタイプ培養容器にてマクロファージと非接触共培養した。一定時間経過後、マクロファージを回収、炎症・線維化関連遺伝子を主とした mRNA 測定、各種蛋白量の測定、インフラマソームシグナルの酵素反応を測定した。培養心筋細胞を浸透圧負荷後に超遠心法で分離した細胞外小胞をマクロファージ培養液内に添加し、共培養と同様の反応がみられるか否かを、浸透圧負荷無しの培養液から分離した細胞外小胞を添加した場合をコントロールとして評価した。

#### (4) CaMKIIをターゲットとした治療的介入

培養マクロファージに対して KN-93 pretreat による薬理的 CaMKII 阻害を行っておき、浸透圧負荷後の培養心筋細胞と上記と同様の非接触共培養を行い、炎症・線維化関連遺伝子の発現の違いやインフラマソームの反応性に違いがみられるか検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) CaMKII 遺伝子改変マウスの横行大動脈縮窄術 (TAC) への反応性

野生型マウス、CaMKII ノックアウトマウス、心筋特異的 CaMKII ノックアウトマウスに対して施行された横行大動脈縮窄術 (TAC) の経過を、遺伝子発現、免疫染色、線維化、心機能変化について比較した。野生型マウスで認められた炎症反応、インフラマソーム活性 (Caspase-1 活性) CD68 陽性細胞の心筋集積、線維化および心機能低下は心筋特異的 CaMKII ノックアウトマウスで抑制されていたが、CaMKII ノックアウトマウスでは更に抑制されており両群で有意な差が認められた。このことから CaMKII は心筋のみでなく他の組織・細胞においても心筋リモデリングに寄与している可能性が示唆された。

#### (2) 心筋細胞や細胞外小胞に炎症シグナルが含まれるか

NMVM(neonatal mouse ventricular myocyte) を単離し浸透圧負荷を行ったところ、心筋細胞内において IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1, MIP1 $\alpha$  等種々の炎症シグナルの mRNA 量および IL-10 等炎症抑制シグナルの mRNA 量が増加していたほか、インフラマソームの構成成分である ASC および NLRP3 の増加、また Caspase-1 活性の上昇を認めた (図 2)。

また、培養液から超遠心法によって回収した細胞外小胞の濃度が浸透圧負荷により有意に増加していた。Western blotting にてインフラマソーム構成成分である ASC および NLRP3 が検出され、コントロールと比較し増加傾向であったが有意差は認めず、むしろ炎症抑制シグナルの発現亢進傾向を認めた。

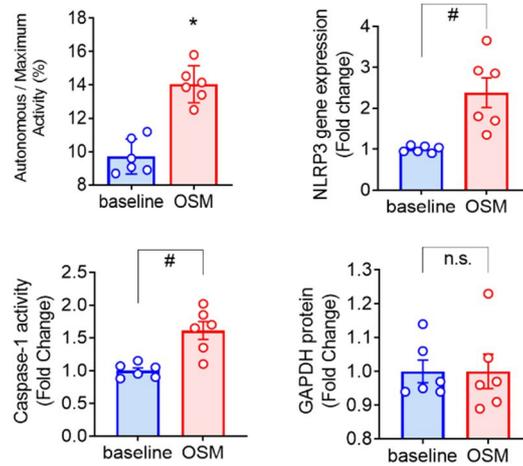


図2: 培養心筋細胞NMVM のOsmotic StretchによるCaMKII activity, NLRP3遺伝子発現、Caspase-1 activityの変化 #P<0.05 vs baseline

#### (3) 共培養や細胞外小胞添加によってマクロファージの反応が起こるか

浸透圧負荷後の培養心筋細胞をマクロファージと非接触共培養したところ、野生型マウスの腹腔から洗浄回収したマクロファージにおいては炎症シグナルの発現亢進および Caspase-1 活性の著明な上昇を認めた (図 3)。培養心筋細胞を浸透圧負荷して得られた細胞外小胞をマクロファージ培養液に添加したところ、反応は共培養と比べ軽微であったものの、共培養と同様の炎症シグナルの発現亢進傾向および Caspase-1 活性の増加傾向を認めた。

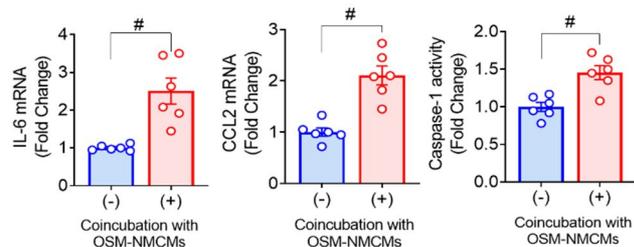


図3: 浸透圧負荷 NMVMとの非接触型共培養後の Macrophageにおける炎症遺伝子およびCaspase-1 activityの変化 #P<0.05 vs baseline

#### (4) CaMKIIをターゲットとした治療的介入

浸透圧負荷後の培養心筋細胞を KN-93 の前投与による薬理的 CaMKII阻害を行ったマクロファージと非接触共培養したところ、コントロール群と比較しマクロファージ内の炎症シグナルの発現および Caspase-1 活性の抑制が認められた (図 4)。

上記の一連の結果から、心筋負荷から生じる炎症シグナルが CaMKII 依存性にマクロファージに影響しリモデリングに寄与することが示唆された。ただし今回の研究期間では細胞外小胞取り込みの直接的な確認には至っておらず、マクロファージの反応の違いが、細胞外小胞の取り込みの違いによって生じているかは現時点では明らかではない。また、マクロファージ以外の非心筋細胞の反応についても十分な評価ができておらず、今後の課題である。CaMKII を標的とすることで、より選択的で、免疫抑制の副作用を回避した炎症治療法につながる可能性があり、引き続き上記の機序を明らかにしたい。今後、部位特異的 CaMKII ノックアウトマウスを用いた解析をさらに進める予定である。

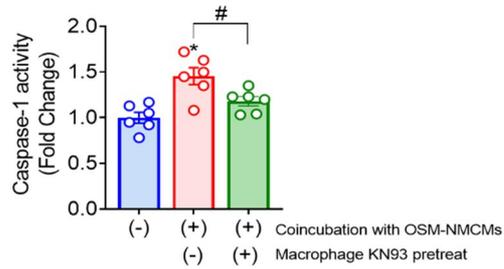


図4: 浸透圧負荷NMVMとの非接触型共培養後の Macrophageにおける Caspase-1 activityの変化 \*P<0.05 vs baseline #P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suetomi Takeshi, Miyamoto Shigeki, Joan Heller Brown	4. 巻 317
2. 論文標題 Inflammation in nonischemic heart disease: initiation by cardiomyocyte CaMKII and NLRP3 inflammasome signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H877 ~ H890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00223.2019	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Andrew Willeford, Cameron Brand, Shigeki Miyamoto, Joan Heller Brown
2. 発表標題 Calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Signaling in Cardiomyocytes Initiates Inflammasome Required for Adverse Cardiac Remodeling in Response to Pressure Overload
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Satomi Tateda, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
2. 発表標題 Sterile inflammation through Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin-dependent protein kinase II signaling is essential for adverse cardiac remodeling
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Satomi Tateda, Michiaki Kono, Toshiro Kajii, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
2. 発表標題 Sterile Inflammation through CaMKII is Essential for Adverse Cardiac Remodeling
3. 学会等名 The 85th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Shinichi Okuda, Yoko Okamoto, Satomi Tateda, Toshiro Kajii, Michiaki Kohno, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
2. 発表標題 Sterile Inflammation through CaMKII Signaling in non-ischemic heart failure
3. 学会等名 The 4th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Michiaki Kono, Toshiro Kajii, Masaki Tamitani, Yoshihide Nakamura, Takayoshi Kato, Hitoshi Uchinoumi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano
2. 発表標題 Anti-inflammatory approach for heart failure targeting Calcium-Calmodulin dependent protein kinase
3. 学会等名 The 84th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末富 建、奥田真一、河野通暁、梶井俊郎、内海仁志、小田哲郎、小林茂樹、山本 健、矢野雅文
2. 発表標題 カルモジュリン依存性キナーゼを介したインフラマソーム活性化が心筋リモデリングを規定する
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Van Kim Ninh, Takeshi Suetomi, Shigeki Miyamoto, Joan Heller Brown
2. 発表標題 Cardiomyocyte-generated Monocyte Chemoattractant Protein 1 Contributes to Cardiac Inflammation During Adverse Remodeling in Pressure Overload
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 末畠 建、矢野雅文	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)日本臨牀社	5. 総ページ数 630
3. 書名 心不全(第2版)中 最新の基礎・臨床研究の進歩 薬物治療概論 Ca <sup>2+</sup> 感受性増強薬	

〔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
---------	---------