

機関番号：32202

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200077

研究課題名（和文） 心血管ストレスの感知機能としてのインフラマソームの役割の解明

研究課題名（英文） Eb_X`bY`<aY_T`Tfb`Xf`Tf`Ta`a\g\T`fXafbe`Ybe`VTeWbi TfVh_Te`fgeXffXf`

研究代表者

高橋 将文（TAKAHASHI MASAFUMI）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40296108

研究成果の概要（和文）：

心血管疾患の病態において、炎症は重要な役割を果たしており、なかでも感染の関与しない無菌性炎症がインフラマソームと呼ばれる分子複合体を介していることが示されている。本研究では、心血管疾患におけるインフラマソームの役割を解明し、インフラマソームを治療標的として新たな治療法を開発することを目的として、マウス心虚血再灌流傷害モデルを用いて研究を行った。本研究により、心虚血再灌流傷害の初期炎症においてインフラマソームが重要な役割を果たしており、その制御が本疾患に対する新たな治療標的となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Inflammation plays a key role in the pathophysiology of cardiovascular diseases. In particular, recent studies suggest that a sterile inflammatory response is mediated through a multiple-protein complex called the inflammasomes. The purpose of this study is to investigate the role of inflammasomes in the pathogenesis of cardiovascular diseases and explore a therapeutic potential of regulating inflammasomes for cardiovascular diseases using a murine model of myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury. Our results demonstrate the importance of inflammasomes for the initial inflammatory response after myocardial I/R and suggest that the inflammasome is a potential novel therapeutic target for preventing myocardial I/R injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
総計	23,500,000	7,050,000	30,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・分子病態血管学

キーワード：インフラマソーム・心血管・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化や心血管インターベンション治療後の再狭窄、虚血性心疾患の病態に炎症反応が深く関与しているという事実は、現在、広く受け入れられており、スタチンやアンジオテンシン受容体拮抗薬の多面的効果が一部抗炎症作用を介しているとの証拠も蓄積されてきている。一方、強力な抗炎症薬であるステロイド治療は逆に虚血性疾患を増悪するとの報告もある。これらの事実は、炎症を標的とした治療戦略のためには、より局所で効率よく炎症反応を制御する必要があり、初期の炎症惹起の機序の解明が不可欠であることを示唆している。しかしながら、心血管疾患において、どのようにして最初の炎症反応が惹起されるのかという疑問については全く分かっていない。

(2) 最近、免疫学の分野においてインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体が細胞の炎症反応の最も初期の段階で重要な役割を果たしていることが発見された (Martinon et al., Cell 2004, Nature 2006; Ogura et al., Cell 2006; Drenth et al., N Engl J Med 2006)。インフラマソームは、刺激因子の種類によって異なるシグナル分子で構成され、細菌やウイルス等の病原体には IPAF や Nod といった NLR (Nod-like 受容体) を含むインフラマソームが形成されるが、痛風の結晶などが刺激となって形成される場合には NLRP3 (NALP3/cryopyrin) を含んで形成されることがごく最近明らかとされた。

(3) アダプター分子である ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) は、信州大学の谷口らにより発見された分子であり、上記のどちらのタイプのインフラマソーム形成にも関与し、インフラマソームの中心構成分

子として機能している。また、ASC は caspase-1 を結合してその活性化を制御し、さらに caspase-1 による interleukin (IL)-1 β および IL-18 の前駆体からの産生・分泌、NF- κ B の活性化を担っている。このインフラマソームと疾患との関連においても、ASC や関連分子である Nod がクローン病や家族性地中海熱といった自己炎症症候群の原因遺伝子であること報告されており、非常に注目を集めている。しかし、心血管疾患におけるインフラマソームおよびその構成分子 ASC の役割については、ほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、心血管ストレスの感知機構としてのインフラマソームの役割を解明し、インフラマソームを治療標的として新たな心血管疾患の治療法を開発することを目的に、心虚血再灌流傷害モデルを用いて、インフラマソームの役割および、その活性制御による治療効果について検討した。また、心虚血再灌流傷害においてインフラマソーム活性化の場となっている細胞の同定および、その活性化機序についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 心虚血再灌流モデル

野生型 C57BL/6 マウス (wild-type: WT; ♂、8-12 週齢) および ASC ノックアウト (ASC-KO) マウス (C57BL/6 background) を使用した。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。

(2) 組織染色および免疫染色法

組織染色は、HE (Hematoxylin Eosin) 染色および MT (Masson's Trichrome) 染色を施行した。また、ASC 分子の発現、単球/マク

ロファージ (Mac-3) および好中球 (Gr-1) の浸潤、毛細血管数 (CD31) の評価は、それぞれに対する特異的な抗体を用いた免疫染色により検討した。

(3) 炎症性サイトカイン濃度の測定

炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、MCP-1、IL-10 のタンパク濃度は、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法および Cytometric Beads Assay (CBA) 法を用いて測定した。

(4) 骨髄置換モデル

骨髄由来細胞の役割を明らかにするため、レシピエントマウスに放射線 (9Gy) を照射後、ドナーマウスの骨髄細胞を経静脈的に移植して、3種類 (WT \rightarrow WT、WT \rightarrow ASC-KO、ASC-KO \rightarrow WT) の骨髄置換マウスを作成して検討した。

(5) in vitro 細胞単離・培養実験

マウス新生仔心臓から酵素法を用いて心筋細胞と心線維芽細胞をそれぞれ単離・培養した。

(6) Western blot 法

pro-IL-1 β および mature IL-1 β 蛋白は、Western blot 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 心虚血再灌流傷害におけるインフラマソームの役割

心虚血再灌流傷害におけるインフラマソームの関与を確認するため、まず、心虚血再灌流後 48 時間での傷害心筋における ASC の発現について、抗 ASC 抗体を用いた免疫組織染色法で検討した。虚血部位および境界部位に集簇している炎症細胞において ASC の強い発現が認められ、血管や間質細胞において ASC の発現が認められた (図 1)。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。これらの所見から、心虚血再灌流後の心筋傷

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唆された。

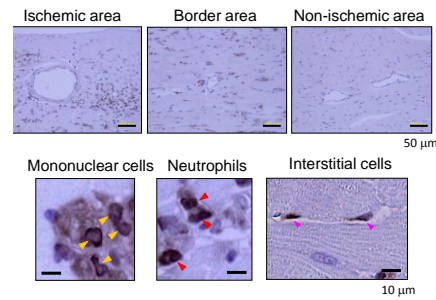


図1 虚血再灌流後の傷害心筋におけるASCの発現

次に、インフラマソーム制御が心虚血再灌流傷害に対する治療効果があるかどうかを検討するため、ASC-KO マウスを用いてモデルを作成し、WT マウスとの比較を行った。WT マウスと ASC-KO マウスでは、左心室に対する虚血危険領域 (AAR/LV: モデルのばらつきを反映) 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: 傷害の程度を反映) 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 (図 2)。また、心臓超音波検査では、左室心機能の有意な改善が示された。さらに、虚血再灌流後 14 日目の心線維化領域を MT 染色で評価したところ、WT マウスと比較して 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。また、ASC-KO マウスの心筋傷害部位では、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、MCP-1、IL-10 の産生も有意に減少していた。

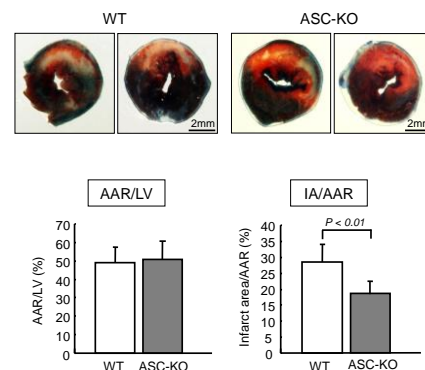


図2 心虚血再灌流後の心筋梗塞領域

我々は、以前に、骨髄由来の炎症細胞がインフラマソーム活性化の場として重要であることを報告している。そこで骨髄由来細胞の役割を明らかとするため、マウス骨髄置換 (BMT) モデルを作成して検討を行った。予想していたように、ASC-KO 骨髄を WT マウスへと置換したマウス (ASC-KO→WT) では、WT 骨髄を WT マウスへと置換したマウス (WT→WT) に比較して心筋梗塞領域の有意な減少を認めた (図3)。驚いたことに、WT 骨髄を ASC-KO マウスへと置換したマウス (WT→ASC-KO) においても同程度の梗塞領域減少効果を認めた。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、炎症細胞浸潤は再灌流 6 時間以降で明瞭に認められるが、再灌流後 1~3 時間では心筋傷害はあるもののはっきりとした炎症細胞浸潤を認めなかった。これらの所見から、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、つまり心筋細胞そのものや心線維芽細胞が重要な役割を果たしていると推測された。

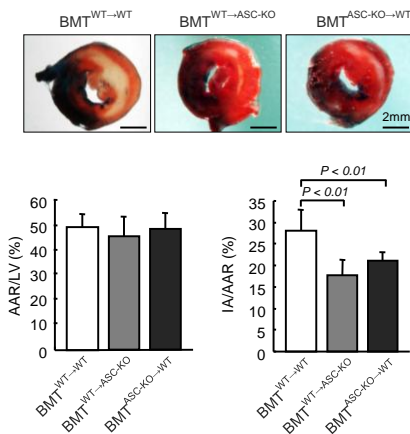


図3 骨髄置換マウスにおける心虚血再灌流後の梗塞領域

(2) 心虚血再灌流傷害におけるインフラマソーム活性化の分子機序

インフラマソーム活性化の分子機序をより詳細に解析するため、マウスより初代心筋細胞 (CM) と心線維芽細胞 (CF) を単離、培

養して検討した。興味深いことに、炎症の一般的な刺激であるリポ多糖 (lipopolysaccharide:LPS) 刺激による IL-1 β 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。さらに、心線維芽細胞に少量の LPS で前処理 (priming) して低酸素再酸素化 (hypoxia/reoxygenation : H/R) 刺激を加えると、IL-1 β の産生は有意に増加した。一方、IL-1 β のこの産生は 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 (図 4)。さらに、K ionophore である Nigericin による刺激によっても IL-1 β の産生は有意に増加し、ASC-KO マウス由来の心線維芽細胞で著明に減少することから、この産生に K 流出が関与している可能性が考えられた。このことから、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 K 流出を介したインフラマソームの活性化によって誘導されている可能性が示された。

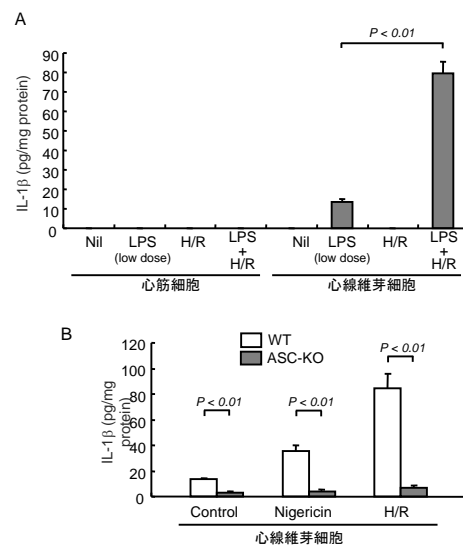


図4 低酸素再酸素化刺激によるインフラマソーム活性化

以上の結果をまとめると、心虚血再灌流傷害の病態においてはインフラマソームが重要な役割を果たしており、その活性化の制御が心虚血再灌流傷害に対する新たな治療標的となり得ることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto, 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
2. 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
3. Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J* 74: 418-423, 2010
4. Takahashi M. Immature erythroid cells: a new source for therapeutic angiogenesis? *J Mol Cell Cardiol* 49: 341-342, 2010
5. Takahashi M, Izawa A, Ishigatsubo Y, Fujimoto K, Miyamoto M, Horie T, Aizawa Y, Amano J, Minota S, Murohara T, Matsubara H, Ikeda U. Therapeutic neovascularization by the implantation of autologous mononuclear cells in patients with connective tissue diseases. *Curr Pharm Design* 15: 2778-2783, 2009
6. Shiba Y, Takahashi M, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res* 81: 169-177, 2009

7. Kobayashi S, Ise H, Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials* 30: 574-582, 2009
8. Takahashi M. Genetic susceptibility to restenosis: Role of bone marrow cells and inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 10: 1407-1408, 2009
9. Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, J Sagara, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation* 117: 3079-3087, 2008
10. Murayama H, Takahashi M, Takamoto M, Shiba Y, Ise H, Koyama J, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Deficiency of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. *Cardiovasc Res* 80: 175-180, 2008
11. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U. MCP-1 induces cardioprotection against ischemia/reperfusion injury: Role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 78: 554-562, 2008

[学会発表] (計 11 件)

1. Takahashi M. Role of inflammasome in cardiovascular diseases. *International Academy of Cardiology, 15th World Congress on Heart Disease* 2010年7月23日~27日 Vancouver, Canada
2. Takahashi M, Taniguchi S. Role of

- inflammasome in cardiovascular diseases. *14th International Congress of Immunology* 2010年8月22日～8月27日 神戸
4. Takahashi M, Hata T, Kawaguchi M, Kashima Y, Hida S, Izawa A, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Th17 cells, a new subset of CD4⁺ T-cells, plays an important role in angiogenic response to hindlimb ischemia. 第15回日本遺伝子治療学会 2009年7月9日～11日 大阪
 5. Takahashi M. Role of inflammasome in cardiovascular diseases. *The Annual Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis (KSLA)* 2009年9月4日～5日 Seoul, South Korea
 6. Kawaguchi M., Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Takahashi Y, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Deficiency of ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) in bone marrow cells improved myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *American Heart Association Scientific Sessions* 2009年11月14日～18日 Orlando, USA
 7. Hata T, Takahashi M, Kawaguchi M, Kashima Y, Izawa A, Hida S, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Contribution of Th17 cells, a new subset of CD4⁺ T cells, to angiogenic response to hindlimb ischemia. *American Heart Association Scientific Sessions* 2009年11月14日～18日 Orlando, USA
 8. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Takahashi Y, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation in cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Heart Association Scientific Sessions* 2009年11月14日～18日 Orlando, USA
 9. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Takahashi Y, Morimoto H, Ise H, Sagara J, Hongo M, Taniguchi S, Ikeda U. Role of an Inflammasome adaptor molecule ASC in myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Heart Association Scientific Sessions* 2008年11月8日～12日 New Orleans, USA
 10. Hata T, Takahashi M, Kawaguchi T, Kashima Y, Shiba Y, Ise H, Hida S, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17-CD4⁺ T cells in angiogenic response to hindlimb ischemia in mice. *American Heart Association Scientific Sessions* 2008年11月8日～12日 New Orleans, USA
 11. Murayama H, Takahashi M, Shiba Y, Ise H, Takamoto M, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Double deficiency of tumor necrosis factor- α and Interferon- γ in bone marrow-derived cells prevents neointimal formation in a murine model of vascular injury. *American Heart Association Scientific Sessions* 2008年11月8日～12日 New Orleans, USA
- [図書] (計 0 件)
- [その他] 研究代表者ホームページ：
<http://www.jichi.ac.jp/bioimaging/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
高橋 将文 (TAKAHASHI MASAFUMI)
研究者番号：40296108
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
谷口 俊一郎 (TANIGUCHI SHUN'ICHIRO)
研究者番号：60117166
池田 宇一 (IKEDA UICHI)
研究者番号：30221063