

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17119

研究課題名(和文)カルモジュリンキナーゼを標的としたインフラマソーム制御による新しい心不全治療

研究課題名(英文) Novel treatment for heart failure by inflammasome regulation targeting calcium-calmodulin dependent protein kinase II

研究代表者

末富 建 (Suetomi, Takeshi)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40749842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CaMKII臓器特異的遺伝子組み換えマウスでは慢性圧負荷モデルおよび2-hit theoryによるHFpEFモデルでの炎症反応および線維化シグナルが野生型と比較して有意に軽減し、慢性期の左室心筋リモデリングが抑制された。また、培養心筋細胞へのCaMKII遺伝子の過剰発現あるいはRNA干渉による発現抑制に伴うCaspase-1活性の変化や、培養液中の細胞外小胞の変化を解析したほか、非接触性共培養によるマクロファージへの影響を観察した。その結果、心筋細胞内のCaMKII由来のシグナルが細胞外小胞、IL-1、IL-18等を介してマクロファージの反応を惹起していることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージ内CaMKIIは慢性心負荷に伴う炎症反応、線維化および心機能低下に関与しており、心筋リモデリングにおける治療標的としての有用性が示唆された。マクロファージにおけるCaMKII-インフラマソームシグナル伝達解析を継続し、同部位を標的とすることで、従来の免疫抑制薬と異なる選択的な炎症抑制治療としての心不全治療への臨床応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：We analyzed changes of caspase-1 activity in cultured cardiomyocytes associated with overexpression or suppression of CaMKII. Extracellular vesicles in the culture medium were also analyzed. Signals originated from myocardial cells induced macrophage responses through mediators such as extracellular vesicles, IL-1 and IL-18. In chronic pressure overload model and HFpEF model, inflammatory responses and fibrosis signals were significantly reduced in macrophage-specific CaMKII knockout mice compared to wild type. Chronic left ventricular myocardial remodeling was also suppressed by CaMKII knockout.

研究分野：循環器内科学

キーワード：カルモジュリンキナーゼ 心不全 自然炎症 インフラマソーム リモデリング

### 1. 研究開始当初の背景

わが国の心不全患者数は今後さらに増加する一方で、その治療法については大半が対症療法にとどまっている。そのため、心不全の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、最近の大規模臨床試験の結果から、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。圧負荷等の非虚血性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、自然炎症 (sterile inflammation) が関与していることが広く知られるようになった。

NLRP3 インフラサ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 (IL-1 ) や IL-18 が産生される。最近この IL-1 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 ( CANTOS study, REDHERT trial 等 ) が行われ、良好な結果が得られていることから、臨床的にも心不全の新しい治療アプローチとしてインフラサームシグナル

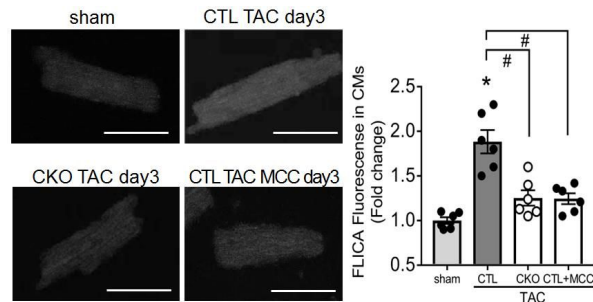


図1: 横行大動脈縮窄術 (Transverse aortic constriction: TAC) による圧負荷刺激後のマウス単離心筋細胞内インフラサーム活性。FAM-FLICA Caspase-1 assay kit使用, Scale Bar = 50 μm。CKO: Cardiomyocyte-specific CaMKII knockout。MCC: NLRP3阻害剤 MCC950 (Millipore社製 10mg/kg/12hr)。\*P<0.05 vs sham; #P<0.05 vs control (CTL) TAC

の制御が注目されている (Ridker et al. N Engl J Med. 2017, Everett BM et al. Circulation 2019, Van Tassell et al. Circ Heart Fail. 2017)。研究代表者は圧負荷刺激によって CaMK が心筋細胞内の炎症遺伝子および NLRP3 インフラサ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)。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サームが発生し、その後に他の非心筋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)。すなわち心リモデリングをもたらす Sterile inflammation は、まず心筋細胞内のシグナルが発端となる。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直接的・間接的に関与する分子が CaMK に依存していることが報告されている (Pironti et al. Circulation 2015)。

### 2. 研究の目的

心筋細胞から発生したインフラサームシグナルの非心筋細胞への伝播を明らかにし、心不全をもたらす炎症反応に対する選択的な治療標的を見出す。本研究では、心筋細胞から放出される細胞外小胞がインフラサームを惹起する炎症シグナルを有するか、細胞外小胞の取り込みが CaMK 依存性に起こるか、CaMK をターゲットとした治療的介入の 3 点について検証した。

### 3. 研究の方法

浸透圧負荷による心筋細胞負荷およびマクロファージとの共培養によって、心筋細胞から発せられるインフラサーム等の炎症シグナルのマクロファージへの伝達を確認した。

マクロファージ特異的 CaMK ノックアウト (KO) マウスを作製し、慢性心負荷に伴うリモデリングにおけるマクロファージ内 CaMK の影響を評価した。

### 4. 研究成果

浸透圧負荷した培養心筋細胞の培地をマクロファージ培地に添加したところ、マクロファージ内のインフラマソーム活性が著明に増加し、この反応は心筋細胞培地へのエクソソーム遊離阻害薬GW4869の添加によって有意に抑制されていることから、細胞外小胞の媒介が強く示唆された。一方、IL-18の中和抗体やケモカインMCP-1 ( Monocyte chemoattractant protein 1 ) 阻害薬 (RS102895) では明らかな抑制効果は認めなかった (図2)。培養液から回収された細胞外小胞においてはインフラマソームの構成成分である ASC および NLRP3 の増加が確認された。インフラマソームシグナルが細胞外小胞に包含されて他の細胞に移行している可能性が示唆された。

また既存の CaMK  $\delta$ -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  $\delta$  ノックアウト (KO) マウスを作製した。KO マウスの易感染性は認めず、通常飼育における寿命は野生型と同等であった。KO マウスに対して NOS 阻害薬 (L-NAME) および高脂肪食 15 週間投与で HFpEF が形成される ” 2-hit theory (Nature. 2019 568:351-356) ” に基づく慢性心負荷を与えたところ、心筋細胞の肥大は野生型と同程度にもかかわらず、その後の CD68 陽性細胞の心筋内集積が野生型と比べて著明に少なく、線維化マーカー (col1a1, periostin) 発現量および心筋線維化が抑制され、心エコー上の左心室拡張能の悪化 (E/E' の上昇) が有意に軽減していた。心負荷に伴う炎症シグナル発生、炎症細胞浸潤、組織線維化という一連の心リモデリング過程に対してマクロファージ内 CaMK  $\delta$  が治療標的となりうることが示唆された (図3)。

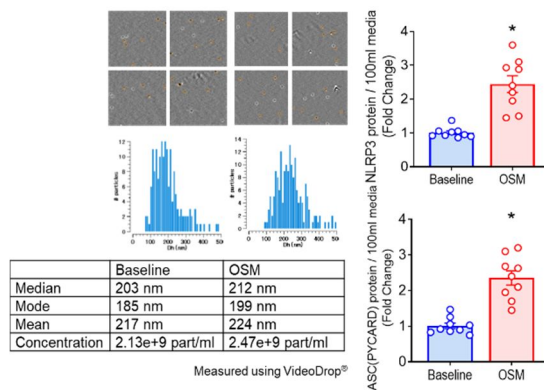


図2: 浸透圧負荷前後の心筋細胞培養液から回収した細胞外小胞量、NLRP3およびASCの比較

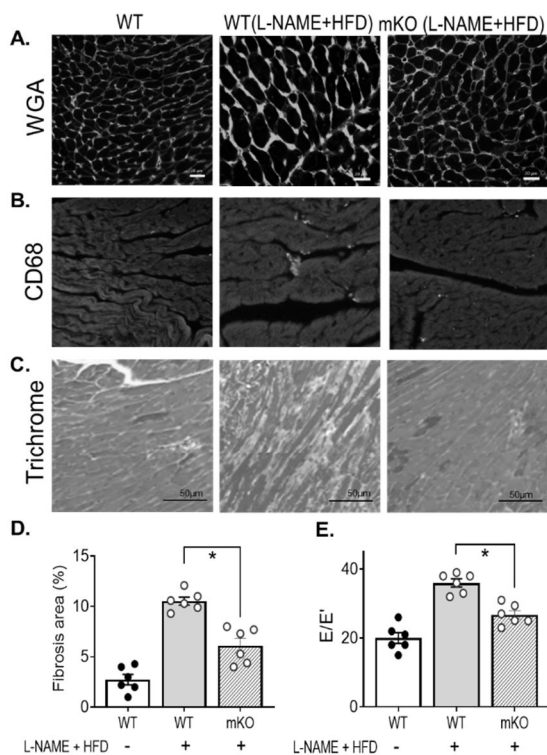


図3: CaMK $\delta$ KO (mKO) におけるHFpEF (L-NAME+HFD 心負荷) の進行抑制 A. WGAによる心筋径測定 B. CD68陽性細胞の心筋組織集積 C. Masson-Trichromeによる心筋組織線維化評価 D. 心負荷15週時点での線維化比較 E. 心エコーによる拡張能 (E/E') HFD: High Fat Diet \*P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinji Tanaka, Takeshi Yamamoto, Mei Mikawa, Junya Nawata, Shohei Fujii, Yoshihide Nakamura, Takayoshi Kato, Masakazu Fukuda, Takeshi Suetomi, Hitoshi Uchinomi, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Takayuki Okamura, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano	4. 巻 22
2. 論文標題 Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, reduces the development of ventricular arrhythmias, and improves prognosis in pulmonary hypertension.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	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) 10.1016/j.hrthm.2022.02.003.	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 Fujii Shohei, Kobayashi Shigeki, Chang Yaowei, Nawata Junya, Yoshitomi Ryosuke, Tanaka Shinji, Kohno Michiaki, Nakamura Yoshihide, Ishiguchi Hironori, Suetomi Takeshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Okamura Takayuki, Yamamoto Takeshi, Yano Masafumi	4. 巻 178
2. 論文標題 RyR2-targeting therapy prevents left ventricular remodeling and ventricular tachycardia in post-infarction heart failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 36 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2023.03.007	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 Nawata Junya, Yamamoto Takeshi, Tanaka Shinji, Yano Yasutake, Uchida Tomoyuki, Fujii Shohei, Nakamura Yoshihide, Suetomi Takeshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Dantrolene improves left ventricular diastolic property in mineralcorticoid-salt-induced hypertensive rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101449 ~ 101449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2023.101449	査読の有無 無
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 Yano Yasutake, Kobayashi Shigeki, Uchida Tomoyuki, Chang Yaowei, Nawata Junya, Fujii Shohei, Nakamura Yoshihide, Suetomi Takeshi, Uchinoumi Hitoshi, Oda Tetsuro, Yamamoto Takeshi, Yano Masafumi	4. 巻 642
2. 論文標題 Stabilizing cardiac ryanodine receptor with dantrolene treatment prevents left ventricular remodeling in pressure-overloaded heart failure mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 175 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.063	査読の有無 無
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 Uchida Tomoyuki, Oda Tetsuro, Yamamoto Takeshi, Inamitsu Masako, Sakai Chihiro, Uchinoumi Hitoshi, Suetomi Takeshi, Nakamura Yoshihide, Okamoto Yoko, Tateda Satomi, Fujii Shohei, Tanaka Shinji, Nawata Junya, Okamura Takayuki, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 628
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress promotes nuclear translocation of calmodulin, which activates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 155 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.069	査読の有無 無
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 Sakai Chihiro, Mikawa Mei, Yamamoto Takeshi, Uchida Tomoyuki, Nakamura Yoshihide, Akase Hideaki, Suetomi Takeshi, Tominaga Naomi, Inamitsu Masako, Oda Tetsuro, Okamura Takayuki, Kobayashi Shigeki, Yano Masafumi	4. 巻 623
2. 論文標題 Dantrolene reduces platelet-derived growth factor (PDGF)-induced vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation following vascular injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 51 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.07.038	査読の有無 無
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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

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 Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II is Essential for Adverse Cardiac Remodeling
3. 学会等名 The 85th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (JCS2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Masafumi Yano
2. 発表標題 Anti-inflammatory approach targeting CaMKII as a novel therapeutic strategy to the heart failure
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2021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, 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 (CaMKII) signaling is essential for adverse cardiac remodeling
3. 学会等名 the 38th Annual Scientific Meeting of the Japanese Section of the International Society for Heart Research (ISHR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi
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
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 (JCS2020)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Takeshi Suetomi, Hiroto Shimokawahara, Nozomi Yamamoto, Yoshitake Fukuda, Misaki Kanezawa, Kazuki Suruga, Kazuna Hayashi, Ayane Miyagi, Soichiro Kobashi, Yoichi Sugiyama, Masataka Shigetoshi, Isao Tabuchi, Aiko Ogawa, Atsuyuki Watanabe, Hiromi Matsubara
2 . 発表標題 High incidence of pulmonary artery thrombosis after balloon pulmonary angioplasty in CTEPH patients receiving direct oral anticoagulants
3 . 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022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 Mediation of inflammation through Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in macrophage is essential for pressure overload-induced adverse cardiac remodeling
3 . 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022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 Mediation of inflammation through Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in macrophage is essential for pressure overload-induced adverse cardiac remodeling
3 . 学会等名 日本心不全学会学術集会 2022
4 . 発表年 2022年

1. 発表者名 末富 建、下川原裕人、宮城文音、枚山陽一、小川愛子、西崎真理、松原広己
2. 発表標題 PGI2急速増量による肺動脈性肺高血圧症の血行動態的寛解導入
3. 学会等名 第7回日本肺高血圧肺循環学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Suetomi, Hiroto Shimokawahara, Yoichi Sugiyama, Ayane Miyagi, Aiko Ogawa, Mari Nishizaki, Hiromi Matsubara
2. 発表標題 Hemodynamic remission induction by intravenous PGI2 in severe pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 15th PVRI Annual World Congress on PVD (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------