

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06875

研究課題名(和文) 動脈硬化病変におけるカスパーゼ11依存性のパイロトーシスの役割の解明

研究課題名(英文) The role of caspase-11-dependent pyroptosis in atherosclerotic lesion

研究代表者

唐澤 直義 (Karasawa, Tadayoshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60631893

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)：パイロトーシスを引き起こす炎症性カスパーゼのひとつカスパーゼ11の動脈硬化における役割は明らかではない。そこで、本研究ではカスパーゼ11が動脈硬化の進展に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。ApoE欠損下にてカスパーゼ11変異を保有するマウスを作成し、ウエスタンダイエット負荷時の動脈硬化形成について評価した。カスパーゼ11の変異は壊死性病変の面積を減少させるとともに、コレステロール結晶の蓄積を抑制した。さらに、カスパーゼ11の変異は動脈硬化病変への好中球の浸潤を抑制した。カスパーゼ11は進展した動脈硬化病変において誘導され、好中球の浸潤と壊死性病変の形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管イベントの抑制には血中LDLコレステロールの低下だけでは不十分であることが明らかになってきており、この残余リスクを制御する標的として動脈硬化病変における炎症が注目されている。本研究は進展した動脈硬化病変においてカスパーゼ11が好中球の浸潤を制御することを明らかにした。炎症性カスパーゼが引き起こすパイロトーシスとそれに伴う好中球の浸潤は、今後、動脈硬化における炎症を制御し、心血管イベントを抑制する上での有効な標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：Caspase-11 is an inflammatory caspase that triggers pyroptosis. However, the effect of caspase-11 deficiency on the development of atherosclerosis has not been fully evaluated. In the present study, we investigated the role of caspase-11 in the development of atherosclerosis. ApoE-deficient mice carrying caspase-11 mutation were fed a Western diet for 8 weeks. The formation of the necrotic core and deposition of cholesterol crystals are prevented by caspase-11 deficiency. The neutrophil infiltration into atherosclerotic lesions was also attenuated by caspase-11 deficiency. RNA-seq analysis revealed that upregulations of caspase-11 and neutrophil migration are common features of advanced atherosclerotic lesions. Furthermore, similar expression profiles were observed in unstable human plaque. These data suggest that caspase-11 regulates neutrophil recruitment and plaque destabilization in advanced atherosclerotic lesions.

研究分野：代謝学

キーワード：炎症 パイロトーシス 動脈硬化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心血管イベントの抑制には血中 LDL コレステロールの低下だけでは不十分であることが明らかになってきており、この残余リスクを制御する標的として動脈硬化病変における炎症が注目されている。私たちは以前、動脈硬化における炎症の惹起機構として自然免疫に関わる分子複合体である NLRP3 インフラマソームが重要な役割を果たすことを明らかにしてきた(文献1, 2, 3)。NLRP3 インフラマソームは主にマクローファージなどの自然免疫細胞に発現し、コレステロール結晶や飽和脂肪酸などの危険シグナルに応答してカスパーゼ-1 を活性化し、炎症性サイトカインのインターロイキン(IL)-1 $\beta$  の成熟を制御する(文献4, 5)。また、Gasdermin D (GSDMD)を切断することで、細胞質成分の流出を伴う制御された細胞死であるパイロトーシスを誘導することで炎症応答を誘導する。一方、カスパーゼ 11 はカスパーゼ 1 と類似した酵素活性を示す炎症性カスパーゼであるが、その役割は明らかになっていなかった。しかしながら近年、カスパーゼ 11 がセンサー分子として機能し、GSDMD を介したパイロトーシスを誘導し、さらに NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こす非標準インフラマソームの存在が明らかになった(文献6, 7)。私たちは以前、動脈硬化の進展におけるインフラマソームの役割を明らかにするために、Apoe 欠損下にてカスパーゼ 1 を欠損したマウスを作製し、解析を行った。その結果、カスパーゼ 1 の欠損下ではリン酸カルシウム結晶などにより誘導される IL-1 $\beta$  産生が抑制されるとともに、動脈硬化形成が抑制されることを報告した(文献2)。しかしながら、以前より樹立され、申請者らも用いていたカスパーゼ 1 欠損マウスはカスパーゼ 11 も欠損することが報告された(文献6)。遺伝子欠損マウスの作成に用いられてきた 129 系統はカスパーゼ 11 にミスセンス変異が生じており、変異遺伝子がゲノム上で隣接するカスパーゼ 1 と連鎖して遺伝するためである。従って、この際には動脈硬化の抑制作用において、カスパーゼ 1 とカスパーゼ 11 どちらの欠損が重要か、明らかにすることができなかった。これまでは、動脈硬化における NLRP3 インフラマソーム活性化は危険シグナルが直接的に NLRP3 インフラマソームを活性化する標準経路が主要な経路だと考えられてきていた。実際に、私たちもコレステロール結晶やリン酸カルシウム結晶、飽和脂肪酸などの危険シグナルが直接 NLRP3 インフラマソームを活性化することを検証してきた。しかしながら、動脈硬化の進展におけるインフラマソーム活性化経路としてはカスパーゼ 11 を介した非標準インフラマソーム経路も重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究ではカスパーゼ 11 が動脈硬化病変における細胞死と炎症を制御するセンサー分子であるとの仮説の下、カスパーゼ 11 欠損が動脈硬化の進展に及ぼす影響を明らかにする。さらに、動脈硬化の進展過程におけるカスパーゼ 11 経路の役割について検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1)カスパーゼ 11 の欠損が動脈硬化形成に及ぼす影響の解析

カスパーゼ 11 遺伝子座に変異を保有する 129 系統から樹立したカスパーゼ 11<sup>lox</sup> マウスはゲノム上でカスパーゼ 1 とカスパーゼ 11 が隣接しているため、129 由来のカスパーゼ 11 変異が連鎖して遺伝していることを確認している。そこで、カスパーゼ 11<sup>lox</sup> マウスをカスパーゼ 11 欠損マウスとして利用し、高脂血症、動脈硬化モデルマウスである Apoe 欠損マウスとの二重欠損マウスを作成した。さらに、Apoe 欠損マウス及び、Apoe・カスパーゼ 11 二重欠損マウスに対して、高脂肪・高ショ糖・高コレステロール食であるウェスタンダイエットを負荷することで、高脂血症・動脈硬化形成を誘導し、8 週間後に血中脂質、動脈硬化病変について評価を行なった。

#### (2)マウス動脈硬化の進展過程及びヒト不安定プラークにおける遺伝子変化の検討

高脂肪食を与えた Apoe 欠損マウス(PRJNA609051)およびヒト動脈硬化プラークの安定および不

安定プラーク (PRJNA493259) の RNA-seq データの解析を行なった。FASTQ ファイルは HISAT2-2.2.1 を使用して GRCm38 または GRCh38 参照ゲノムにマッピングし, featureCounts (subread 2.0.1) によってカウントした。遺伝子発現の差異解析は DESeq2 R パッケージ (バージョン 1.28.1) [22] を使用して実施した。GSEA は, キュレートされた遺伝子セットを用いて Broad institute GSEA4.1.0 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) を使用して実施した。

#### 4. 研究成果

(1) カスパーゼ 11 の欠損は壊死性病変の形成を抑制する。

Apoe 欠損マウス及び, Apoe・カスパーゼ 11 二重欠損マウスについて, 8 週間のウエスタンダイエツト負荷の後, 動脈硬化形成について, Oil-Red O 染色により評価を行つたが, 病変面積については両群間で差を認めなかつた。一方, HE 染色を行い, 壊死性病変の面積について評価を行つたところ, カスパーゼ 11 の欠損により, 抑制されることが明らかになった。また, 偏光顕微鏡による評価を行つたところ, カスパーゼ 11 の欠損下では, コレステロール結晶の沈着が抑制されることが明らかになった。さらに, 抗 Ly6G 抗体を用いて免疫染色による評価を行うと, カスパーゼ 11 の欠損によって動脈硬化病変への好中球浸潤が抑制されることが明らかになった (図 1, 文献 8)。一方, マクロファージの浸潤には差は認めず, Th17 のマーカーである IL-17 の染色については検出されなかつた。

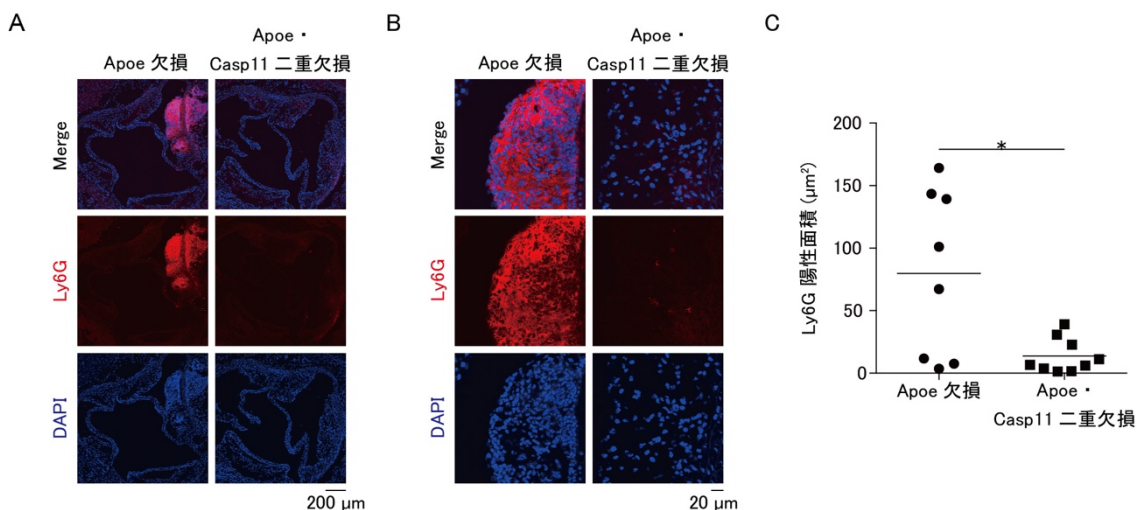


図 1.カスパーゼ11の欠損はマウス動脈硬化病変における好中球浸潤を抑制する。

(A-C) Apoe 欠損マウス及び, Apoe・カスパーゼ 11 二重欠損マウス大動脈起初部切片の抗 Ly6G 染色 (A 及び B) 共焦点顕微鏡による解析, (C) Ly6G 陽性面積の定量

(2) マウスの進展した動脈硬化病変及びヒト不安定プラークでは好中球浸潤経路が活性化する

Apoe 欠損マウスにおける動脈硬化の進展に伴う遺伝子発現の変化を解析するために, 公共データベース上のデータセットの解析を行なった。4055 の GO biological process の遺伝子セットのうち, 1317 の遺伝子セットが初期の動脈硬化病変と比較して進行した動脈硬化病変において有意に濃縮されていた。このうち, 細胞外マトリックスの分解, 好中球浸潤, パイロトーシスに関する経路が進展した動脈硬化病変において濃縮されており, 好中球の浸潤に関しては *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5* など, 浸潤を制御するケモカインの増加を認めた (図 2, 文献 8)。さらに, *Mmp8* や *Adam8* のような細胞外マトリックスの分解に関与する好中球酵素についても, 進展した動脈硬化病変において増加しており, プラークの不安定性の増加が示唆された。

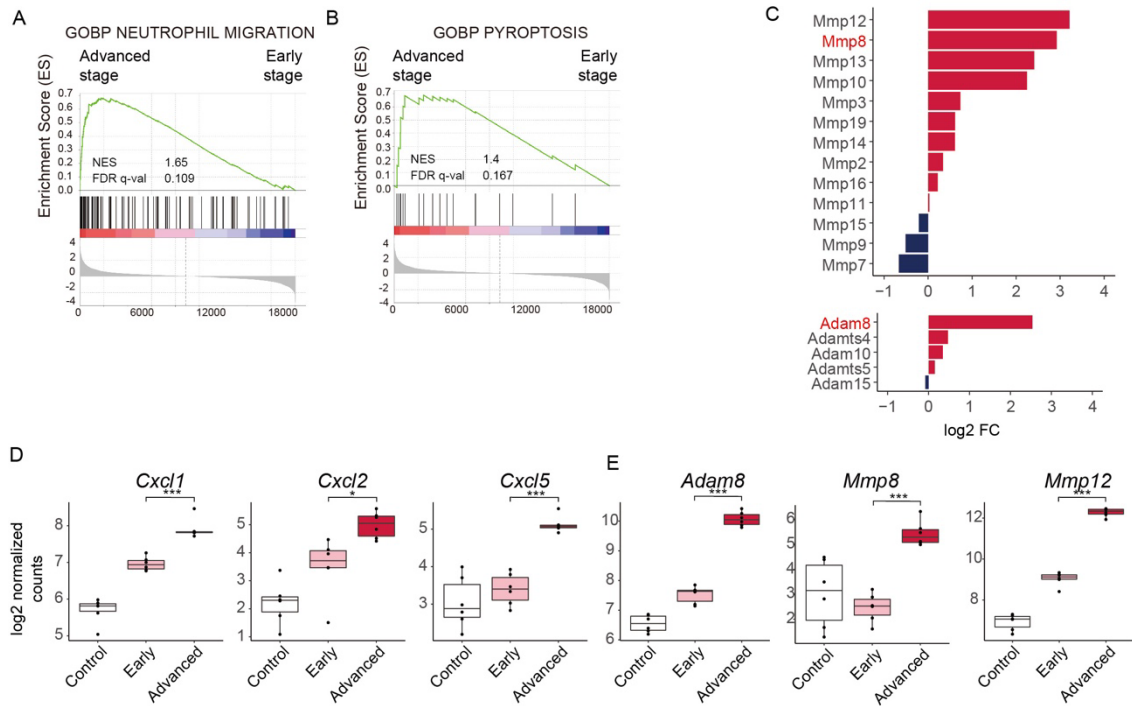


図 2. マウスの進展した動脈硬化病変においては好中球浸潤経路と細胞外マトリックス分解酵素が活性化している。

(A-E) Apoe 欠損マウスにおける動脈硬化の進展過程における遺伝子発現変動の RNA-seq 解析

(A 及び B) GO biological process 遺伝子セットを用いた GSEA 解析, (C) Mmp 及び Adam の遺伝子発現変化, (D) 好中球浸潤に関わるケモカイン発現, (E) 細胞外マトリックス分解酵素発現

ヒト不安定プラークの遺伝子発現の解析の結果, GO biological process の遺伝子セットのうち, 1011 の遺伝子セットが不安定プラークにおいて有意に濃縮されていた. 細胞外マトリックスの分解, 好中球浸潤, パイロトーシスに関する経路が不安定プラークにおいて有意に濃縮されており, 好中球浸潤に関連するケモカイン (*CXCL1* と *CXCL8*) や *MMP8* や *ADAM8* のような細胞外マトリックスの分解に関与する好中球酵素も不安定プラークで発現が増加していた (図 3, 文献 8). また, マウスにおける *Casp11* に相当する *CASP4* 遺伝子も不安定プラークで発現が増加するとともに, 不安定プラークにおけるドミナントな炎症性カスパーゼであることが明らかになった.

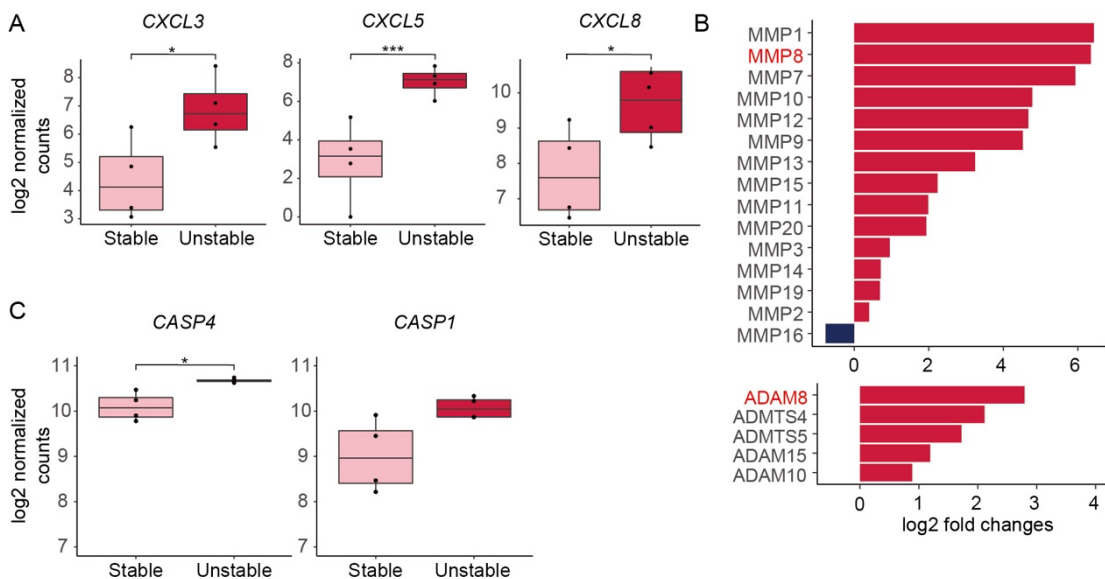


図 3. ヒト不安定プラークにおいては好中球浸潤経路と細胞外マトリックス分解酵素が活性化している。

(A-E)ヒト安定プラーク及び不安定プラーク遺伝子発現の RNA-seq 解析 (A)好中球浸潤に関わるケモカイン発現, (B)MMP 及び ADAM の遺伝子発現変化, (C)炎症性カスパーゼ発現

本研究結果により, カスパーゼ 11 の変異がマウス動脈硬化モデルマウスにおいて動脈硬病変における好中球浸潤と壊死性病変の形成を抑制することが明らかになった. また, 好中球浸潤とカスパーゼ 4/11 の活性化, 好中球由来の細胞外マトリックス分解酵素の増加が進展した動脈硬化病変及びヒト不安定プラークにおける共通した特徴であることが明らかになった. カスパーゼ 11 は進展した動脈硬化病変において好中球浸潤の制御とプラークの不安定化に寄与している可能性が推測される.

<引用文献>

- (1) T. Karasawa, M. Takahashi, Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis, *J Atheroscler Thromb* 24 (2017) 443-451.
- (2) F. Usui, K. Shirasuna, H. Kimura, K. Tatsumi, A. Kawashima, T. Karasawa, S. Hida, J. Sagara, S. Taniguchi, M. Takahashi, Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice, *Biochem Biophys Res Commun* 425 (2012) 162-168.
- (3) T. Wakabayashi, M. Takahashi, D. Yamamuro, T. Karasawa, A. Takei, S. Takei, H. Yamazaki, S. Nagashima, K. Ebihara, S. Ishibashi, Inflammasome Activation Aggravates Cutaneous Xanthomatosis and Atherosclerosis in ACAT1 (Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase 1) Deficiency in Bone Marrow, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38 (2018) 2576-2589. 10.1161/atvbaha.118.311648.
- (4) P. Duewell, H. Kono, K.J. Rayner, C.M. Sirois, G. Vladimer, F.G. Bauernfeind, G.S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K.A. Fitzgerald, K.L. Rock, K.J. Moore, S.D. Wright, V. Hornung, E. Latz, NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals, *Nature* 464 (2010) 1357-1361.
- (5) T. Karasawa, A. Kawashima, F. Usui-Kawanishi, S. Watanabe, H. Kimura, R. Kamata, K. Shirasuna, Y. Koyama, A. Sato-Tomita, T. Matsuzaka, H. Tomoda, S.Y. Park, N. Shibayama, H. Shimano, T. Kasahara, M. Takahashi, Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38 (2018) 744-756. 10.1161/atvbaha.117.310581.
- (6) N. Kayagaki, S. Warming, M. Lamkanfi, L. Vande Walle, S. Louie, J. Dong, K. Newton, Y. Qu, J. Liu, S. Heldens, J. Zhang, W.P. Lee, M. Roose-Girma, V.M. Dixit, Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11, *Nature* 479 (2011) 117-121.
- (7) N. Kayagaki, I.B. Stowe, B.L. Lee, K. O'Rourke, K. Anderson, S. Warming, T. Cuellar, B. Haley, M. Roose-Girma, Q.T. Phung, P.S. Liu, J.R. Lill, H. Li, J. Wu, S. Kummerfeld, J. Zhang, W.P. Lee, S.J. Snipas, G.S. Salvesen, L.X. Morris, L. Fitzgerald, Y. Zhang, E.M. Bertram, C.C. Goodnow, V.M. Dixit, Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling, *Nature* 526 (2015) 666-671.
- (8) T. Karasawa, T. Komada, C. Baatarjav, E. Aizawa, Y. Mizushina, K. Fujimura, Y. Gunji, S. Komori, H. Aizawa, C.B. Jing Tao, T. Matsumura, M. Takahashi, Caspase-11 deficiency attenuates neutrophil recruitment into the atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice, *Biochem Biophys Res Commun* 686 (2023) 149158. 10.1016/j.bbrc.2023.149158.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Baatarjav Chintogtokh, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Fujimura Kenta, Gunji Yoshitaka, Komori Satoko, Aizawa Hidetoshi, Jing Tao Cantona Billton, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi | 4. 巻<br>686                   |
| 2. 論文標題<br>Caspase-11 deficiency attenuates neutrophil recruitment into the atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice  | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>149158 - 149158 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2023.149158  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujimura Kenta, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Mizushina Yoshiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Otsu Kinya, Takeda Norihiko, Mizukami Hiroaki, Kario Kazuomi, Takahashi Masafumi | 4. 巻<br>180           |
| 2. 論文標題<br>NLRP3 inflammasome-driven IL-1 and IL-18 contribute to lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy   | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Molecular and Cellular Cardiology   | 6. 最初と最後の頁<br>58 - 68 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.yjmcc.2023.05.003   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>唐澤 直義                              |
| 2. 発表標題<br>脂肪酸によるNLRP3インフラマソームを介した炎症惹起機構と動脈硬化 |
| 3. 学会等名<br>第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）          |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>唐澤 直義                             |
| 2. 発表標題<br>カスパーゼ11を介した好中球浸潤の制御と不安定プラーク形成との関連 |
| 3. 学会等名<br>第55回日本動脈硬化学会総会・学術集会               |
| 4. 発表年<br>2023年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|---|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 高橋 将文<br><br>(Takahashi Masafumi)<br><br>(40296108) | 自治医科大学・医学部・教授<br><br><br>(32202) |    |
| 研究分担者 | 相澤 恵美<br><br>(Aizawa Emi)<br><br>(80877621)         | 自治医科大学・医学部・助教<br><br><br>(32202) |    |
| 研究分担者 | 駒田 敬則<br><br>(Komada Takanori)<br><br>(90824730)    | 自治医科大学・医学部・講師<br><br><br>(32202) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|