

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20885

研究課題名（和文）心臓線維芽細胞のNLRP3インフラマソームが心臓の炎症を惹起する機序の解明

研究課題名（英文）NLRP3 inflammasomes in cardiac fibroblasts induce cardiac inflammation in heart failure model

研究代表者

棚田 洋平（Tanada, Yohei）

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：80958918

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）：心臓の炎症は心不全の発症・増悪に関わる。心臓線維芽細胞のNLRP3遺伝子発現量が心不全発症の超急性期に上昇するため、心臓線維芽細胞のNLRP3が心臓の炎症と心不全にいかに関わるかを調べた。心臓線維芽細胞特異的なNLRP3ノックアウトマウスでは野生型に比べて、心不全が改善した。続いて、心臓線維芽細胞を培養し、NLRP3活性化の機序を解析した。共焦点顕微鏡では、活性化シグナルでミトコンドリアが分裂し、ミトコンドリアDNAの放出が認められた。BAKとBAXのノックダウンでNLRP3活性が抑制された。そこで、BAK/BAXの阻害薬を心不全モデルに用いて病態が改善するかを確認する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の臨床試験で、心血管の炎症を標的にした抗IL-1b抗体の投与が良好な成績であったが、血中のサイトカインが標的のため、有害事象も発生する。そこで、炎症細胞を標的とした治療も模索されているが、長期投与の副作用が問題となる。一方、心臓線維芽細胞が標的の研究は線維化機構の解明が中心で、抗線維化薬の開発を重視している。本研究では「心不全発症の非常に早い時期に心臓線維芽細胞のNLRP3により惹起される炎症」を新たな治療標的とする。心不全発症早期のみが標的の場合、長期投与による副作用の発生リスクが減る可能性があり、患者負担が減少する。また、医療費削減にもつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cardiac inflammation is involved in the genesis of heart failure. We reported the increase of Nlrp3 RNA expression in cardiac fibroblasts in the acute phase of heart failure. We aim to show whether NLRP3 inflammasome in cardiac fibroblasts induces cardiac inflammation. Cardiac fibroblast-specific deletion of NLRP3 in mice attenuated cardiac dysfunction in response to pressure overload. In vitro, NLRP3 inflammasome activation induced mitochondrial fragmentation and the export of mitochondrial DNA in cardiac fibroblasts. Using siRNAs and a chemical inhibitor, we found that the export of mitochondrial DNA depends on BAK/BAX protein in mitochondria. We will use the chemical inhibitor in heart failure model mice in further study.

研究分野：心不全

キーワード：NLRP3インフラマソーム 心臓線維芽細胞 ミトコンドリア ミトコンドリアDNA

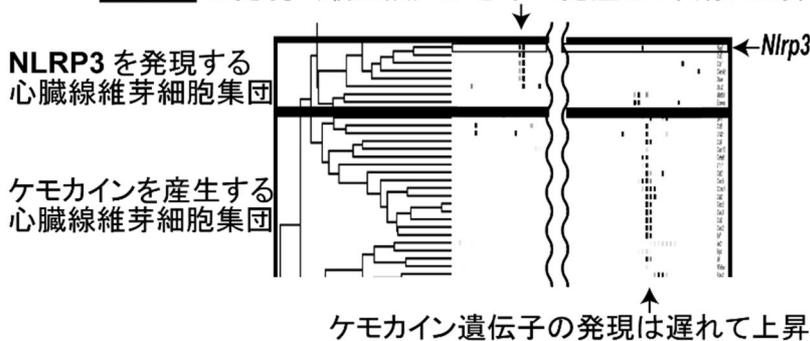
1. 研究開始当初の背景

心不全は先進国の主な死亡原因の一つで、新規治療薬の開発が急務である。心臓の炎症が心不全の発症・増悪に関わるため、炎症を誘導する細胞が治療標的として探索されている。申請者の所属したグループは、心筋細胞でミトコンドリア DNA が炎症を惹起し、心不全を発症させることを報告し (Nature, 2012)、ミトコンドリアと炎症に着目していた。

さらに、申請者らは心不全マウスモデルで、心臓線維芽細胞の 1 細胞遺伝子発現解析を行った。結果、心臓線維芽細胞の一部の集団がケモカインを産生し、炎症細胞を障害部位に誘導していた (Sci Signal, 2021)。一方、同研究の擬似時系列解析で、上記の集団とは異なる「心不全発症の非常に早い時期に

NLRP3 遺伝子の発現量が上昇する」心臓線維芽細胞の集団が認められた(図)。NLRP3 インフラマソームは活性化されると IL-1 β サイトカインを産生し、炎症を誘発する。ごく早期の NLRP3 の発現量上昇は、心臓線維芽細胞が心不全発症の急性期に炎症を惹起する可能性を示唆している。

NLRP3 の発現 (最上段) が心不全発症ごく早期に上昇



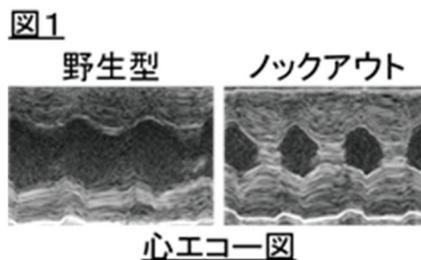
2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓線維芽細胞の NLRP3 インフラマソーム活性化機序を *in vitro* で解明し、その機序を阻害する薬剤の投与がマウス心不全モデルの表現型に与える影響を調べること、心臓線維芽細胞の NLRP3 が新たな治療標的となり得るかを見出すことである。

3. 研究の方法

本研究では、マウス圧負荷心不全モデルを *in vivo* で用い、培養心臓線維芽細胞を *in vitro* で用いる。

(1) 心臓線維芽細胞特異的な NLRP3 ノックアウトマウスを作成し、心不全時の表現型を調べる。準備実験として、圧負荷による心不全を惹起する大動脈縮窄術を少数の野生型マウスと NLRP3 ノックアウトマウスに施行したところ、野生型と比べてノックアウトマウスでは慢性期の心機能の悪化が抑制された (図 1)。心臓線維芽細胞の NLRP3 は心不全を増悪する役割があると考えられるため、施行数を増やして表現型を確定のため Sham 群も追加し、各群 10 匹まで施行数を増やす。

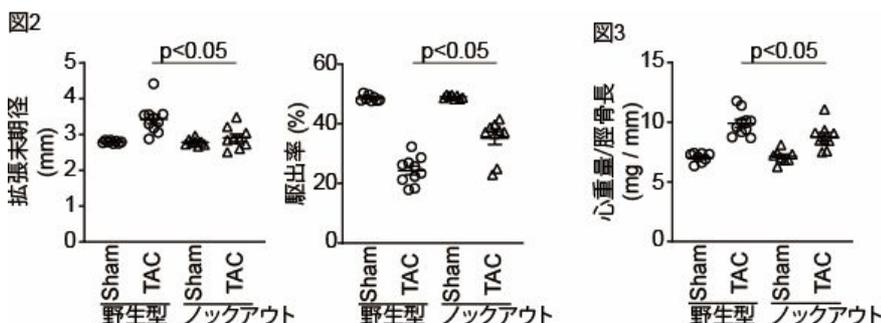


(2) 培養心臓線維芽細胞を用いて NLRP3 活性化の詳細な機構を *in vitro* で明らかにする。申請者の準備実験では、NLRP3 インフラマソームが活性化されるとミトコンドリアが分裂し、ミトコンドリア DNA がミトコンドリア外に放出されることが共焦点顕微鏡により観察された (図 2)。ミトコンドリア DNA が放出される機序を解析し、その阻害薬候補を探索する。

(3) 上記で効果のあった阻害薬を心不全発症早期のみに野生型マウスに投与し、心機能が改善するかを確認する。心不全抑制効果を示せば、心臓線維芽細胞の NLRP3 インフラマソーム活性化時のミトコンドリア DNA 放出機構を阻害することが、心不全の新たな治療標的となり得る可能性がある。

4. 研究成果

(1) 圧負荷で心不全を惹起する大動脈縮窄術を野生型マウスと NLRP3 ノックアウトマウスに施行し、心不全慢性期での表現型を確定した。ノックアウト



トマウスでは、心臓超音波検査での心拡大および心収縮能が改善し(図 2)、心重量の増加も有意に抑制された(図 3)。また、心筋組織の解析では、心筋細胞の肥大化は抑制され(図 4a)、線維化も改善された(図 4b)。以上より慢性期の心不全増悪に心臓線維芽細胞の NLRP3 が関わることがわかった。

(2) 培養心臓線維芽細胞を用いて NLRP3 活性化の詳細な機構を *in vitro* で明らかにする。cGAS-STING 経路ではミトコンドリア DNA を放出する細孔がミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)、BAK/BAX オリゴマー、VDAC と報告されており、NLRP3 でも同じ細孔の可能性はある。それぞれの主な構成タンパク質は、シクロフィリン D、BAK と BAX であり、siRNA を用いて各々をノックダウンした際の IL-1 β 産生量の増減を確認した。結果、IL-1 β の産生量はシクロフィリン D のノックダウンでは低下しなかった。VDAC1 または VDAC3 のノックダウンでも IL-1 β の産生量は変化しなかった。さらに、BAX および BAK 各々のノックダウンでも IL-1 β 産生量は低下しなかった。BAX と BAK はお互いに補完しあっている可能性がある。そこで、BAX と BAK をダブルノックダウンしたところ、IL-1 β の産生量は低下した(図 5)。つまり、心臓線維芽細胞では BAK/BAX オリゴマーを介してミトコンドリア DNA が放出されることで、NLRP3 インフラマソームが活性化すると考えられる。

図 4

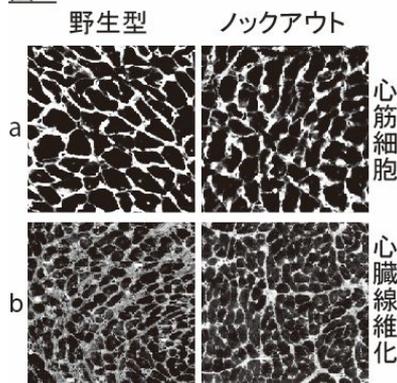
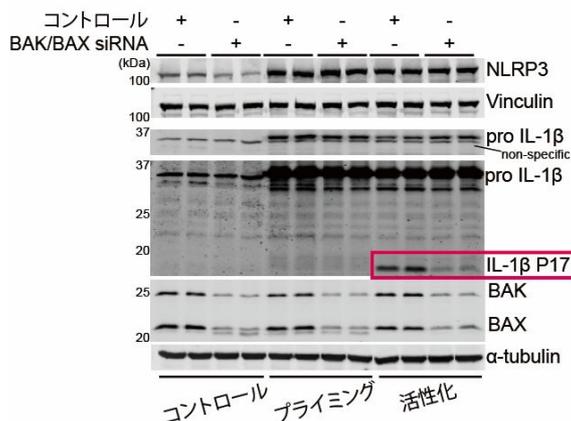


図 5



(3) BAK/BAX オリゴマーの阻害薬を野生型マウスに投与し、心機能が改善するかを確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------