

# 細胞内カルシウムイオン調節因子とインフラマソームを標的とした 心筋線維化に対する新規治療法の開発

山口大学大学院医学系研究科 器官病態内科学講座

助教 末富 建

## はじめに

高齢化の進行に伴い、心不全患者数は年々増加している。その中でも「収縮機能が保持された心不全 (Heart Failure with Preserved Ejection Fraction : HFpEF)」は、全心不全症例の約半数を占めるが、現時点において予後を改善し得る確立された治療法は限定的である<sup>(1)</sup>。HFpEFの主要な病態生理は、間質線維化などによる心筋の拡張障害であり、その分子機構の解明が急務となっている。近年の大規模臨床試験および基礎研究により、心筋組織における自然炎症の関与が改めて注目されており<sup>(2)</sup>、特にNLRP3インフラマソームの異常活性化が病態進展に寄与する可能性が示唆されている。本研究は、細胞内カルシウムイオンの恒常性維持とその調節因子の安定化が、NLRP3インフラマソームの異常活性化を抑制することにより自然炎症・心筋線維化を制御し、HFpEFの進行を抑制しうるかを検証することを目的とする。

## 結 果

本研究では、既報に基づき高脂肪食 (high-fat diet : HFD) と一酸化窒素合成酵素阻害薬 L-NAME の併用による「2-hit」負荷を行い、HFpEF病態を模倣したマウスモデルを作製した<sup>(3)</sup>。このモデルは、肥満や内皮機能障害といった臨床的背景を反映し、HFpEFの病態生理を再現することが知られている。

野生型マウスにHFD+L-NAMEを8週間曝露した結果、顕著な体重増加が認められ、心重量/脛骨長比 (HW/TL) の有意な上昇を伴う心肥大が生じた。また、肺重量の増加を伴う肺うっ血が観察され、心エコー解析ではE/E'比の上昇を呈し、左室拡張障害が明らかとなった。一方、左室駆出率は正常範囲内に維持されており、収縮機能は保持されていた。さらに、トレッドミル試験により運動耐容能を評価したところ、コントロール群と比較して走行距離が著明に減少し、HFpEFの特徴である運動耐容能低下を再現していた。

これに対し、リアノジン受容体安定化作用を有するダントロレンを同時投与した群では、心肥大、肺うっ血、ならびにE/E'比上昇がいずれも有意に抑制され、運動耐容能も改善傾向を示した。これらの結果は、細胞内カルシウム動態の安定化がHFpEF病態の進行を防止する可能性を示唆しており、Ca<sup>2+</sup>過負荷に伴う自然炎症の制御が病態改善に寄与する可能性を支持する。

さらに、マクロファージ特異的にCaMKII $\delta$ を欠損させたマウス (CaMKII $\delta$  fl/fl x LysM-Cre:MKO) において同様の2-hit負荷を行ったところ、心肥大 (HW/TL比) は野生型コントロール群と同程度であったものの、肺うっ血および左室拡張障害は顕著ではなく、E/E'比の上昇も有意差を認めなかった。また、運動耐容能も良好に維持されていた。これらの知見は、マクロファージにおけるCaMKII $\delta$ の活性化が心筋線維化や拡張障害の進展に寄与していることを示し、CaMKII $\delta$ を介した自然炎症シグナルがHFpEF病態の形成における重要な病態経路である可能性を示唆している。

MKOマウスに2-hit負荷を行ったところ、心筋細胞の肥大は野生型コントロール群と同程度に認められた。すなわち、心筋細胞径および心重量/脛骨長比 (HW/TL) は有意な差を示さず、心筋肥大そのものの形成にはマクロファージCaMKII $\delta$ 欠損の影響は限定的であった。一方で、炎症および線維化に関連する組織学的変化には顕著な差異が認められた。10週時点での免疫染色解析では、コントロール群において心筋間質へのCD68陽性マクロファージの集積が明瞭に観察されたのに対し、MKO群ではその浸潤数が有意に減少していた。さらに、15週時点での定量PCR解析において、線維化関連遺伝子であるColla1およびPeriostinの発現量はMKO群で有意に低下していた。また、Masson-Trichrome染色による組織学的評価でも、MKO群では心筋間質の線維化領域が著明に抑制されていた。

これまでのHFpEFモデルを用いた研究では、不全心筋においてリアノジン受容体2 (RyR2) の不安定化に伴い、カルモジュリン (CaM) がRyR2から解離し、遊離型CaM (free CaM) が核内へ移行することで、肥大関連転写経路の活性化および収縮不全を惹起することが報告されている。本研究では、同様の分子機構がHFpEF病態においても関与するかを検証するため、HFpEFモデルマウス心筋細胞におけるCaMとRyR2の局在変化を免疫蛍光染色により解析した。

その結果、負荷前の正常心筋細胞では、CaMシグナルはZライン上でRyR2と明瞭に共局在していた。一方、HFD + L-NAME負荷後のHFpEF心筋細胞では、RyR2に結合した

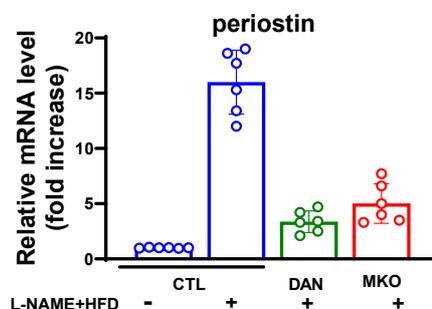


図1 負荷15週時点における線維化関連遺伝子Periostinの発現量

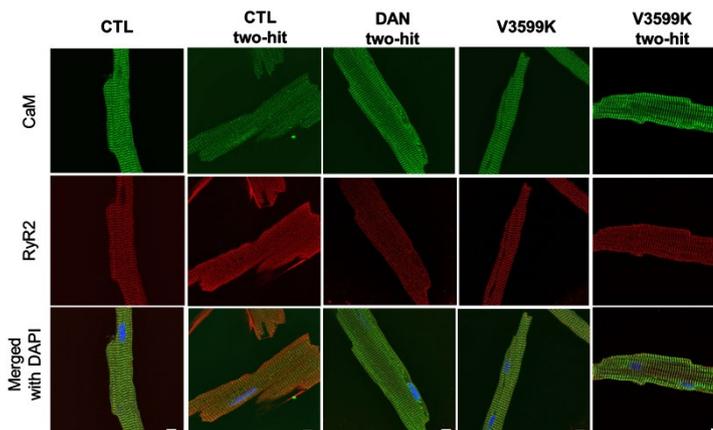


図2 免疫蛍光染色によるCaMとRyR2の局在評価

CaM蛍光シグナルが著明に減少し、CaM-RyR2複合体の解離が生じていることが示唆された。これに対し、リアノジン受容体安定化薬であるダントロレンを同時投与した群では、RyR2上のCaM蛍光シグナルが保持されており、その強度はL-NAME非投与・HFD非負荷群と有意な差を認めなかった。

さらに、RyR2の構造安定性を遺伝学的に高めたRyR2 V3599K変異マウスにおいても、HFD + L-NAME負荷下でCaM-RyR2結合の維持が確認された。これらの結果から、HFpEF心筋細胞においてもRyR2不安定化に伴うCaM解離が生じること、そしてRyR2の薬理的または遺伝学的安定化によってCaM結合を保持できることが示された。これにより、CaM-RyR2結合の破綻がHFpEF病態形成の上流イベントとして機能している可能性が示唆される。

## 考 察

HFpEFは、収縮能が保持されている一方で拡張能が著しく障害される。本研究のHFpEFマウスモデルにおいては、カルモジュリン (CaM) のリアノジン受容体2 (RyR2) への結合親和性の低下およびRyR2の不安定化が認められた。これに伴い、拡張期の異常なCa<sup>2+</sup>漏出 (Ca<sup>2+</sup> leak) が生じ、RyR2から解離したCaMが核内に移行する現象が確認された。一方で、心筋収縮能は保持されており、この点はHFpEFの臨床的特徴と一致していた。筋小胞体内カルシウム含量 (SR Ca<sup>2+</sup> content) と心筋収縮との相関は古くから知られている。HFpEFでは、RyR2からのCa<sup>2+</sup> leakおよび障害された筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) によるCa<sup>2+</sup>再取り込みの低下によりSR Ca<sup>2+</sup> contentが減少し、これが収縮不全の一因となることが報告されている。しかし、本研究のL-NAME + HFDによるHFpEFモデルでは駆出率が保持されており、SR Ca<sup>2+</sup> contentの有意な低下は認められないことが予想される。今後は、このRyR2不安定化とCa<sup>2+</sup> leakとSR Ca<sup>2+</sup> contentの保持が両立するメカニズムを詳細に解析する。

HFpEFのもう一つの特徴である拡張能低下は、心筋細胞肥大、間質線維化に伴う組織剛性 (stiffness) の上昇、あるいはCa<sup>2+</sup> leakによる受動的弛緩障害など、複合的要因により惹起される。本モデルでもこれらの病態変化が顕著に認められたが、薬理的 (ダントロレン投与) および遺伝学的 (RyR2 V3599K変異) にRyR2を安定化させることで、心筋肥大・線維化のいずれも有意に抑制された。CaMがRyR2から解離すると、遊離CaM (free CaM) が細胞質でCaMKIIを活性化させ、過剰なCaMKII活性化はNF- $\kappa$ BおよびNLRP3インフラマソーム経路を介してpro-fibroticシグナルを誘導し、線維芽細胞活性化およびコラーゲン合成亢進を促進することが報告されている<sup>(4)</sup>。さらに、CaMの核内移行は転写因子MEF2を活性化し、心筋肥大関連遺伝子群の発現を促進する<sup>(5)</sup>。これらの知見を総合すると、RyR2の構造的安定化によるHFpEF改善効果は、CaM解離の抑制およびCaMKII-NF $\kappa$ B-インフラマソーム経路の抑制を介して発揮されていると考えられる。

また今後の課題として、すでに進行したHFpEF病態に対して、RyR2安定化が心筋リモデリング抑制効果を有するかを検証することが挙げられる。特に、線維化進展後における自然炎症経路の可逆性の有無を明らかにすることは、臨床応用に向けた重要なステップとなる。

## 要 約

本研究は、細胞内カルシウム恒常性と自然炎症制御の関連からHFpEFの分子機構を検討した。高脂肪食+L-NAMEによる2-hit HFpEFモデルでは心肥大・拡張障害・線維化が生じたが、ダントロレン投与により改善した。マクロファージ特異的CaMKII $\delta$ 欠損マウスでは、線維化や炎症細胞浸潤が抑制された。さらに、HFpEF心筋でRyR2不安定化に伴うCaM-RyR2解離が認められたが、RyR2安定化によりCaM結合は保持され、病態が軽減した。これらの結果は、RyR2安定化とCaMKII-インフラマソーム経路の制御がHFpEFの新規治療標的となる可能性を示す。

## 文 献

1. Pfeffer MA et al. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res.* 2019;124:1598-1617.
2. Ridker PM et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-1131.
3. Schiattarella GG et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature.* 2019;568:351-356.
4. Suetomi T et al. Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca<sup>(2+)</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II delta Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling. *Circulation.* 2018;138:2530-2544.
5. Oda T et al. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;125:87-97.