
研究助成業績報告集

2020 年度 公募自由課題研究助成
山内進循環器病研究助成

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	動脈硬化の慢性炎症における血管周囲脂肪の役割の解明	上田 和孝	1
2	心筋症に対する、QSI 法を用いた新たな心臓 MRI 解析技術の開発	勝俣 良紀	4
3	物理的刺激で活性化される心臓自然免疫シグナルの解明	高橋 佑典	9
4	大動脈周囲褐色脂肪組織および MLX 遺伝子が高安動脈炎に及ぼす影響についての検討	田村 夏子	11

動脈硬化の慢性炎症における血管周囲脂肪の役割の解明

東京大学医学部附属病院・助教
上田和孝

I. 緒言

虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患は生活の質や生命を脅かし、本疾患に起因する死亡者数は現在の日本ではがんに比肩する高い割合を占めていることから、その克服は喫緊の課題であり、効果的な予防・治療法の開発には動脈硬化形成の分子メカニズムの解明が必要不可欠である。

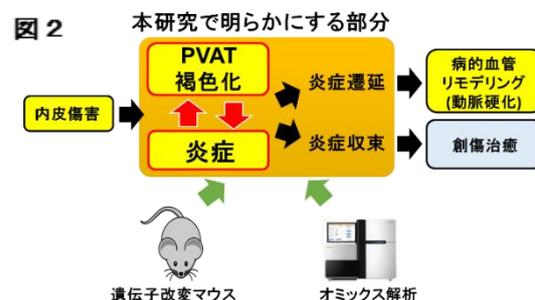
動脈硬化は血管炎症の経時的変化をもたらす慢性炎症疾患の典型といえる。申請者らは、動脈硬化形成時の炎症の主要な舞台として、動脈周囲に存在する脂肪組織である血管周囲脂肪（perivascular adipose tissue; PVAT）に注目した(図1)。まず、予備検討として行った RNA シーケンス解析で、動脈ストレスにより PVAT でマクロファージ等の免疫細胞やインフラマソーム等の炎症に関連した遺伝子群が増加するとともに、『PVAT の褐色脂肪化』という特徴的な応答を示すことを見出した。脂肪の褐色化とは、皮下脂肪等の白色脂肪組織が様々な刺激により褐色脂肪様の性質を示す現象を指す。特筆すべきことに、薬剤によりこの褐色脂肪化を抑制すると血管の炎症と病的リモデリング(動脈硬化)が増悪することを突き止めた。以上の結果から、PVAT は血管炎症を感知して褐色化し、炎症を収束に導く火消し役を果たしていると考えた。

この仮説の検証のため本研究では、①最新の遺伝子工学技術を用いた動物モデル実験と、②PVAT 培養細胞を用いたオミックス解析を柱として、動脈硬化の慢性炎症における褐色化 PVAT の分子生理学的意義を解明する。まず、脂肪特異的 PRDM16 ノックアウトマウスを用いて PVAT の褐色化を遺伝子レベルで抑制し、血管傷害に対する血管炎症やリモデリング応答を検討する。また、本マウスの PVAT 由来培養細胞を用いて脂肪酸メタボローム解析と 1 細胞トランスクリプトーム解析を行い、褐色化 PVAT が発現する特徴的な抗炎症因子を見出す。さらに、見出した新規抗炎症因子の動脈硬化進展抑制効果を

マウスを用いて検証する(図2)。

本研究の特色は、これまで単なる支持組織でしかないと考えられてきた PVAT が、血管炎症に秩序をもたらしていると捉え、「炎症」、「PVAT」、「褐色化」を有機的に結び付けることで動脈硬化形成機序の新しい概念を生み出そうとする点にある。本研究によって、動脈硬化の血管炎症の制御における褐色化 PVAT の意義が示されるとともに、オミックス解析により動脈硬化形成過程における炎症の惹起、遷延化、不可逆化に関わる鍵となる分子が同定されることが期待できる。動脈硬化形成メカニズムを炎症の遷延と収束の観点から理解し、動脈硬化の新たな予防・治療のターゲットの創出を目指し、本研究を開始した。

図1 血管周囲脂肪組織
perivascular adipose tissue
(PVAT)



II. 対象・方法

1. 褐色化ブロックマウスを用いた褐色化 PVAT による炎症制御メカニズムの解明

本研究では、①adipoq-Cre PRDM16 flox: 脂肪褐色化制御分子 PRDM16 の脂肪特異的 KO マウス(褐色化ブロックマウス)、および②UCP1 KO: 褐色色

肪の特徴的機能分子 UCP1 の KO マウス(褐色脂肪機能ブロックマウス)を用いて検討を行った。これらのマウスを用いてワイヤー擦過による大腿動脈の内皮傷害を作成した後、免疫組織染色による免疫細胞浸潤(マクロファージ(M1/M2)、好中球、リンパ球、マスト細胞など)、qRT-PCRによる炎症性サイトカイン発現、EVG染色(内膜/中膜壁厚比)による血管リモデリングの変化を検討した。

2.1 細胞解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

我々は褐色化 PVAT 由来 stromal vascular fraction (SVF)細胞株を樹立した。興味深いことに、褐色化 PVAT-SVF の培養上清はマクロファージの炎症性サイトカイン発現を抑制した。このことから褐色化 PVATは何らかの抗炎症因子を分泌していると考えている。本研究では、脂肪組織の1細胞トランスクリプトーム解析を行い、バルク解析では把握の難しい精密な遺伝子発現変化の解析を行った。得られたデータから褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の候補を絞り込む作業を行った。

3. 褐色化 PVAT をターゲットとした新規動脈硬化治療薬開発の基盤構築

血管傷害後の炎症細胞浸潤や血管リモデリングに対する、脂肪褐色化を刺激する薬剤の効果を検討する。β3 受容体刺激薬は脂肪褐色化を強力に促進することが知られることから、本研究ではβ3 受容体刺激薬(CL316243)の動脈硬化への作用を検討する。また、1細胞解析によって同定された褐色化 PVAT 由来の炎症抑制因子について、そのマクロファージに対する炎症制御作用を検討した。

III. 結果

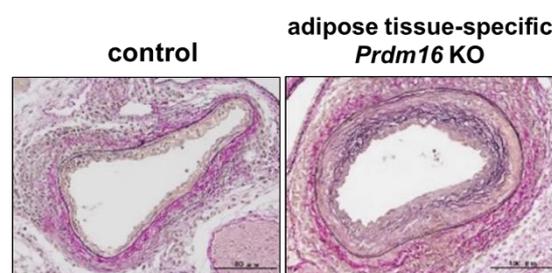
1. PVAT 褐色化は傷害後の血管炎症を終息に導く

褐色化ブロックマウス(adipoq-Cre PRDM16 flox)において血管傷害を作成すると、傷害 14 日後の血管内膜肥厚が野生型マウスに比べて増悪した。F4/80 による免疫染色では、PVAT および血管におけるマクロファージの集積の程度には両群で差がなかった一方で、褐色化ブロックマウスにおいては、炎症型マクロファージマーカーである iNOS 陽性細胞数は顕著に増加しており、一方で抗炎症型マクロファージである CD206 陽性細胞数は減少していたことから、褐色化をブロックすることでマクロファ

ージの性質が変化することが示唆された。

次に、褐色化 PVAT がマクロファージの性質を制御するメカニズムを検討するために、褐色化脂肪において特徴的に発現する機能分子である UCP1 をノックアウトしたマウス(UCP1 KO マウス)を用いて同様の実験を行ったところ、意外にも、血管傷害後のリモデリングに違いは見られなかった。このことから、褐色化 PVAT は UCP1 発現とは異なる機序でマクロファージに働きかけ、性質を変化させている可能性を考えた。

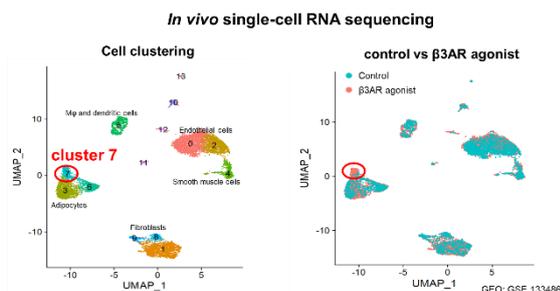
Adipose tissue-specific Prdm16 KO mice (Adiponectin^{Cre+};Prdm16^{flox/flox})



2.1 細胞解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

そこで我々は、PVAT 脂肪組織を用いた1細胞解析を試みた。マウス大腿動脈にワイヤーによる血管傷害を加えた後に PVAT を採取したが、得られる組織量が極めて少ないこと、また、脂肪細胞のみならず膠原線維などの比較的弾性の強い組織も含まれることから、細胞をきれいに単離していく作業に難渋しており、現在も分離法の最適化を試みている。

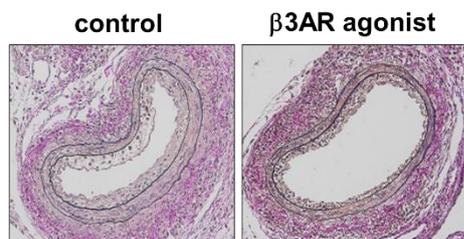
一方で、マウス内臓脂肪組織を用いた1細胞解析結果については過去に報告があったことから、その結果を活用した解析を並行して行った。細胞ごとの発現遺伝子の特徴によるクラスター分類で、マウス内臓脂肪は個別の特徴を有する 15 のクラスターに分類された。その中で、褐色化を刺激するβ3 受容体刺激薬投与後の脂肪において、ある一つのクラスター(C7)が特徴的に現れることが分かった。このクラスターの特徴を詳しく見てみると、褐色脂肪に特徴的に発現する遺伝子群(*Ucp1*, *Cidea*, *Ppargc1a* 等)が増加しており、本クラスターは褐色化した脂肪細胞の群であることが分かった。Gene Ontology によって遺伝子の機能的特徴を解析すると、ある分泌性タンパクをコードする遺伝子 *X*が見出された。



3. 褐色化 PVAT 制御による血管炎症抑制効果

$\beta 3$ 受容体刺激薬(CL316243)は PVAT の褐色化を強く促進することを確認した。この CL316243 をマウス大腿動脈周囲に塗布したのち、血管傷害を加えたところ、傷害 14 日後の血管では、iNOS 陽性細胞数が減少し、CD206 陽性細胞数は増加しており、血管リモデリングは有意に抑制された。また、上記研究 2 で同定した遺伝子 X から生成されるタンパク X を用いて培養マクロファージ細胞(RAW264.7)を刺激すると、マクロファージの抗炎症型へのシフトが起こり、炎症性サイトカインの発現も減少した。

Browning activation inhibits vascular remodeling



IV. 考 察

本研究から、血管傷害後に生じる PVAT の褐色化によって、PVAT から分泌される因子がマクロファージに作用し抗炎症型へシフトさせることで、血管の炎症を終息に導き、病的な血管リモデリングを抑制することが示唆される。この結果は、褐色化刺激薬が動脈硬化予防・治療に有用である可能性を示唆するものであり、今後は、将来の臨床への応用の可能性を見据え、血管傷害以外の血管疾患モデルでの検討や、ヒトの動脈サンプルを用いた検討などをさらに行っていく予定である。

V. 結 論

血管傷害後には PVAT が褐色化することで血管の炎症を終息に導き、病的な血管リモデリングの抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

VI. 研究協力者

小室一成 東京大学大学院 教授
 脇 裕典 東京大学大学院 准教授
 伊藤 薫 理化学研究所 グループリーダー
 野村征太郎 東京大学大学院 特任助教
 安達祐助 東京大学大学院 特任研究員

VII. 参考文献

- 1) Ueda K, Takimoto E, Lu Q, et al. Membrane-Initiated Estrogen Receptor Signaling Mediates Metabolic Homeostasis via Central Activation of Protein Phosphatase 2A. *Diabetes*. 67(8):1524-1537, 2018.
- 2) Kaneko M*, Ueda K*, Nishimae I, et al. Subendocardial ischemia due to coronary artery spasm causes transient severe mitral regurgitation. *Circulation-Heart Failure*. 11:e0054962018, 2018. *corresponding author
- 3) Ueda K, Toko H, Komuro I. Endothelial cell-derived angiocrines elicit physiological cardiomyocyte hypertrophy -bidirectional communication- *Circulation*. 139:2585-2587, 2019.
- 4) Ueda K, Adachi Y, Liu P, et al. Regulatory actions of estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. *Frontiers in Endocrinology*. 10:909, 2020.
- 5) Fukuma N, Takimoto E, Ueda K, et al. Estrogen receptor- α non-nuclear signaling confers cardioprotection and is essential to cGMP-PDE5 inhibition efficacy. *JACC: Basic to Translational Science*, 5(3):282-295, 2020.

心筋症に対する、QSI法を用いた 新たな心臓MRI解析技術の開発

慶應義塾大学医学部・専任講師
勝 俣 良 紀

I. 緒言

高齢化による心不全患者の増加(心不全パンデミック)が問題となる中、心不全入院患者の1年死亡率は15-20%、1年心不全再入院率は30%と依然として予後不良な疾病のままである。このような患者イベントの発生の予測には、各種モダリティを用いた心臓の評価から死亡や合併症に関する予測リスク(危険率)を正確に予測し、医療者および患者が認識することが重要である。MRI(磁気共鳴画像診断法)は磁気の利用した画像検査で、「心筋の動きの程度(心収縮率)」の評価は客観的かつ再現性が高い。また、ガドリニウム造影剤を用いることで、虚血性心筋症を含む多くの心筋症の心筋の変性(線維化)の評価することが可能となり、MRIは「心筋の質」の評価を行うことができる唯一のモダリティである。現在、ガドリニウム造影剤を用いた診断は、心筋梗塞の範囲の同定、心筋のviability(生存心筋)の評価、また原因不明の心筋症の診断に用いられている。しかし、ガドリニウム造影剤には腎性全身性繊維症(Nephrogenic Systemic Fibrosis: NSF)という、皮膚及び結合組織の線維化を伴い関節の可動性障害や他の器官に影響を及ぼして死亡に至る治療法のない合併症が存在する。特に腎機能障害患者で発症していることが判明し、腎機能低下症例(eGFR (estimated glomerular filtration rate) が30mL/min/173m²未満)では、使用が禁忌となっている。一方、eGFRが30-60mL/min/173m²の患者でも腎性全身性繊維症の報告があり、ガドリニウム造影剤の使用は慎重な対応が求められている。特に、心不全患者では、腎不全を合併している患者が多いため、約50%程度が造影MRI検査を断念している

現状がある。そのため、重篤な副作用の報告のあるガドリニウム造影剤を使用せずに、心筋の状態を把握する技術の開発は喫緊の課題である。

MRIの撮影および解析方法は多岐にわたり、既存の方法では検出できなかった現象を新たな撮像・解析法を用いて評価できる可能性がある。申請者はこれまでにMRI: q-space imaging法(QSI)を用い、骨格筋における筋質解析を、動物およびヒトにて行ってきた。QSI法は、組織学的な微細な差を感知出来る新規MRI撮像法であり、マウスにおける異なる性質をもつ筋組織を区別することが可能であった¹。また、同様の結果をヒトの骨格筋でも示すことに成功した²。本研究では、MRI:QSI法を用いて、ガドリニウム造影剤を使用せずに心筋障害部位の評価を行うプログラムを開発することを目的とする。

II. 対象・方法

14~16週齢(体重280g~320g)の雄性Wistar Ratを用いて、虚血再灌流(IR:虚血30分)モデルを作成した。心臓の左前下行枝を結紮する際は左心耳の先端から2mm下方で糸針を通して左前下行枝を結紮することで、各ラットいずれも虚血範囲を概ね同面積とする。再灌流後48時間後、7日後、30日後に、心臓のホルマリン固定処理を行い、QSI法で評価した。同検体で、ガドリニウム造影剤による梗塞部位の評価も同時に行った。MRI撮影後、過去の報告から心筋梗塞部位として報告されている抗C4d抗体³、心筋骨格マーカーであるトロポニン抗体、アポトーシスを反映するTUNEL、HE染色や線維化を反映するMasson等で染色し、QSI法でみられる高信号域と対比した。

特に、ヒトへの応用を考慮し、心筋信号を高感度取得する Stimulated Echo システムの開発に注力する。即ち、短時間計測のために QSI アルゴリズムを最適化し、撮像時間、解像度、コントラストなどのパラメーターから心筋組織状態を比較し、心電図同期下での拍動心臓の心筋評価が可能なプログラム開発を行う(図 1)。

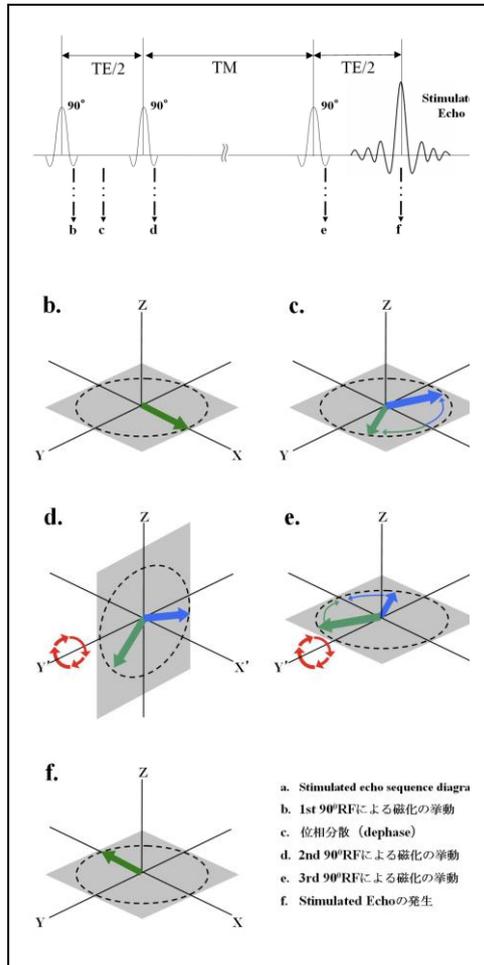


図 1: Stimulated Echo の発生原理
 d-e 間は縦磁化として信号保存されるため、心筋における拡散計測をより定量的に達成できる解析法。

III. 結果

14~16 週齢 (体重 280 g ~ 320 g) の雄性 Wistar Rat を用いて、虚血再灌流 (IR: 虚血 30 分) モデルを作成した。心臓の左前下行枝を結紮する際は左心耳の先端から 2mm 下方で糸針を通して左前下行枝を結紮することで、各ラットいずれも虚血範囲を概ね同面積とする。再灌流後 48 時間後、7 日後、30 日後に、心臓のホルマリン固定処理を行い、QSI 法で評価した。同検体で、ガドリニウム造影剤による

梗塞部位の評価も同時に行った。

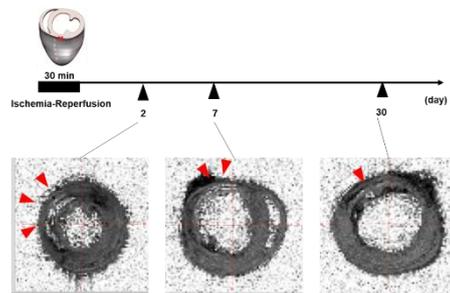


図 2 QSI 更新豪の梗塞領域を中心として左室壁が菲薄化
 QSI の高信号域は、心臓虚血再灌流と 48 時間より現れ、1 カ月程度かけて消退していく

MRI 撮影後、過去の報告から心筋梗塞部位として報告されている抗 C4d 抗体 (Arch Pathol Lab Med. 2010;134:256-263)、心筋骨格マーカーであるトロポニン抗体、アポトーシスを反映する TUNEL、HE 染色や線維化を反映する Masson 等で染色し、QSI 法でみられる高信号域と対比した。結果としては、下図のように、ガドリニウム造影剤はトロポニンの欠損部位や繊維化部分と一致している一方で、QSI は、壊死部分を示唆する C4d 陽性部分と一致した。

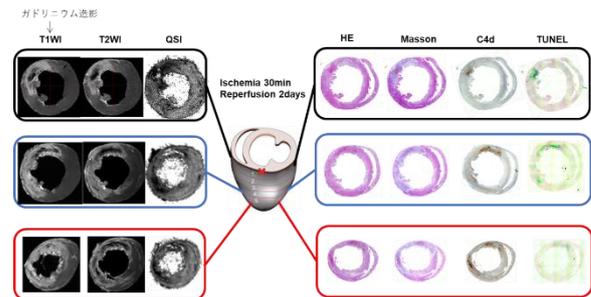


図 3 QSI 法では、不可欠な心筋障害部位と一致した部位で高信号域を認めた

IV. 考察

MRI を用いた拡散計測手法は、検査部位を問わず、臨床応用されている技術で、組織内の水分子の動きである拡散現象を利用した MRI 手法である。1965 年に Stejskal と Tanner により核磁気共鳴法を使用した拡散計測が報告され、1986 年に Le Bihan らにより MRI を用いた頭蓋内の拡散現象の画像化が行われた。1990 年に Mosely らにより、超急性期の脳梗塞の診断における有用性が示されて以来、頭蓋内病変の診断に臨床利用が進んでいる。しかし、生体組織は非常に複雑な構造から成り立っており、上記技術では正確に再現することはできない。そこで q-space imaging (QSI) が Callaghan PT によって 1990 年に提唱された。当初、QSI は NMR の分野

で多孔物質に対する研究目的で報告された。この QSI は生体組織における水分子の制限拡散を解析する手法とされ、マイクロサイズの構造情報を取得することが可能となる。

生体にも目が向けられ脳疾患による細胞の変形や、赤血球の形状評価(Kuchel PW, Magn. Reson. Med., 1997) などの報告がなされ、臨床応用へ大きな期待が寄せられている。しかし、当技術は MRI 装置の性能不足、長時間計測といった観点から臨床応用へは遠い現状である。この問題点をクリアし、安全かつ簡便な心疾患鑑別を目指すことを本研究開発では実行してきた。

A. 水分子拡散モデル

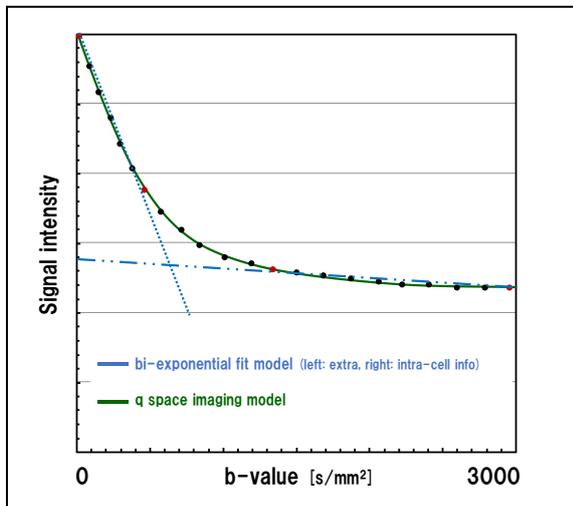


図4: QSI 法及び bi exponential model 解析アルゴリズム

QSI 法(緑)は多くの b-value での撮像を行い組織定量する解析法。bi exponential model(青)は3点以上の b-value を用いて組織にモデルを当てはめ定量する解析法。

QSI では拡散現象をモデル過程を経ずに、確率密度分布から生体内の制限された組織構造を信号化する。モデル化せずに組織構造を表現するために、MRI から収集する信号は膨大なデータ数となる。実際に臨床研究として展開していくには数十分から2時間程度を要する。臨床応用に向けるために時間短縮は必須であり、この短縮化を我々は拡散データ信号の収集 window を調節する b-value という値を最適化させ、且つ、bi-exponential 数理モデルを心筋組織に仮定し当てはめることで、心筋組織の細胞外空間構造、細胞内空間構造の情報抽出技術開発を試みる。当技術開発で最短で QSI の4分の1から5分の1程度の時間短縮が望め、臨床展開可能な計測時間を

達成できる(図4)。

B. 心筋信号発生パルスシーケンスプログラム

QSI パルスシーケンスには通常 spin echo: SE パルスシーケンスをベースとし、motion probing gradient: MPG と呼ばれ QSI パルスシーケンスには通常 spin echo: SE パルスシーケンスをベースとし、motion probing gradient: MPG と呼ばれる傾斜磁場を組み込んだ QSI パルスシーケンスにて多くの研究が進められてきた。しかし、この SE ベースを用いた心筋計測には幾つか問題点が存在し、これらを解決することにより QSI の心筋への臨床展開が大きく開かれる。問題点の一つとして、心筋組織の T2 値は非常に短く、QSI 計測では echo time: TE 延長の影響を大きく受けることである。そのため、T2 信号は減衰が著しく非常にノイズの多い情報となる。この問題を解決するため Stimulated Echo: STE による信号発生機序を利用したパルスシーケンスをベースとした計測法を臨床機にて設計・開発させることで信号を高感度に計測可能にする(図5)。シミュレーションによると2倍近くの SNR を達成可能となり、QSI 法の心臓 MRI への応用が可能となりうる(Hata J, RPT, 2013)。MRI による拡散計測は位相分散を伴うため非常に低信号であり、心筋組織はさらに低 T2 値のため低信号であるが、この開発手法を臨床機へ実装することで、心筋組織からも十分な信号を受信することができ拡散計測を達成することが可能となる。

C. 呼吸・心電図同期システム

MRI において心筋計測には呼吸、そして心電図同期システムの併用が必須となる。T1 強調画像や T2 強調画像といった通常の MRI 解剖画像ではすでに呼吸や心電図同期システムが実装されて使用されている。しかしながら拡散計測では長い信号収集時間(エコータイム)のため心電図タイミングと合わず、基本的に脳や脊髄といった生体の動きによる同期計測を行う必要のない中枢神経領域でしか使用されていない。上記B項目にて開発するパルスシステムには、Mixing Time: TM(図5)と呼ばれる時間は信号が保存され、通常起こる信号減衰が起こらない。このため心拍に合わせて計測タイミングを調整し、同期を行うことが可能となる。この手法を臨床機に開発実装することで、非常に複雑な動きを呈する心筋組織からの信号を取得することが可能となる。

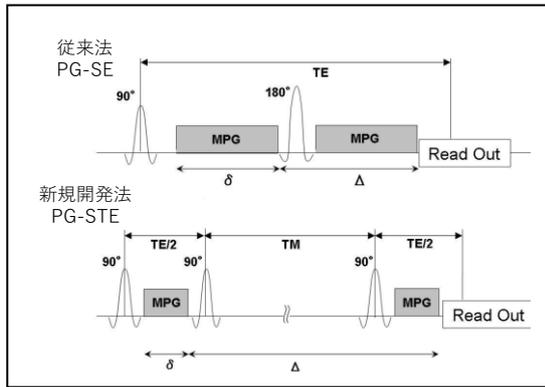


図5：拡散計測における従来法と本開発手法との比較
新規開発法では、長いTMによる高精度計測、短いTEによる高感度計測を達成することが理論上可能である。

2. 競合/代替技術

心臓MRIは歴史的に、spin echo (SE) や gradient echo (GRE)などのパルスシーケンスを基本として、心電図同期法、高速SEおよび高速GREなどの撮像技術の進歩とともに発展してきた。しかし、心筋症の原因となる心筋自体の微細な性状変化を検出するには、ガドリニウム (Gd) 遅延造影MRIが必要であった。Kimらは、遅延造影MRIで得られた梗塞心筋の壁内進展度から、冠動脈血行再建術後の壁運動改善度を予測できることを報告した⁵。特に、心内膜下梗塞には従来の心筋シンチグラフィよりも遅延造影MRIの方が感度・特異度よく正確に評価できた⁶。これは、陈旧性心筋梗塞のみならず急性心筋梗塞後早期においても同様であった^{7,8}。

一方で、心筋症の成因を鑑別するために、近年考案された撮像法がT1 mappingや拡散強調像^{9,10}である。2013年にsociety for Cardiovascular Magnetic Resonanceの発表した「心筋のT1 mappingと細胞外容積計測に関するコンセンサス・ステートメント¹¹」によると、Gd造影剤を使用しないNative T1においても、心筋線維化や心筋浮腫、アミドイド沈着によりT1が延長し、心筋への脂肪や鉄成分の沈着や出血によりT1は短縮する。一方、T1 mappingは心筋組織に線維化と脂肪沈着や鉄沈着が同時に生じれば、T1値を延長させる効果と短縮させる効果が打ち消しあい、見かけ上正常値となることもありうるという欠点をもつ。これに対し、拡散強調像はプロトンの拡散を見るものであり、T1 mappingとは異なる観点からの心筋の評価が可能である。

本研究では、この拡散強調像を基本として水分子

の変位検出能をさらに高めたQSIという拡散モデルを用い、また撮像シーケンスにSTEを採用することで、撮像時間を極度に延長することなく心筋の微細な変化を検出することを目指す。この技術を使うことで、造影剤を使用せず心筋の微細な構造変化を検出でき、しかもT1 mappingでは偽正常化パターンとなってしまうような病変も本開発手法では明瞭に描出が可能となると考えられる。

3. 市場規模、実用化イメージ

急性心筋梗塞をはじめとした虚血性心疾患においては、不可逆的な壊死をきたした梗塞部位と、可逆性の回復を示す虚血部位に分けられる。虚血性心筋症の生存心筋 (viability)の評価は、診断の質の向上、予後予測、治療方針の決定、患者への疾患の理解度の向上に有益であることが報告されており、心臓造影MRIによる評価が最も感度および特異度が高いと報告されている。また、肥大型心筋症や拡張型心筋症などの非虚血性心疾患においても、心筋症の原因の鑑別や予後の予測、治療方針の決定に、心臓造影MRIによる評価が有用であり、他の検査法では評価できない重要な検査手法となっている。2018年に日本循環器学会から提示された心筋症診療ガイドラインでも、各種心筋症に対する心臓造影MRI検査は、疾患の鑑別、予後の予測、治療方針の決定に対して、最もよい適応と記載されている。(クラスI (エビデンスレベルA))

ガドリニウム造影剤を使用した解析は心筋症の診察において必須の検査手法であるが、ガドリニウム造影剤には重篤な合併症が報告されており、多くの心疾患患者に適用できない問題がある。QSI法は造影剤を使用せずに、心臓の筋質の解析をより安全に行う点で非常に高い新規性/優位性/革新性を有している。特に、本技術は虚血性心筋症以外の多くの種類の心筋症にも応用が可能と考えられ、疾患の診断、予後予測、治療法の選択のための重要なツールとなりうる。さらに、基礎研究における心筋障害部位の評価は、心エコー評価が主体であり、その結果の解釈は恣意的な要素が強かった。小動物を用いた基礎研究の分野でもQSI法を用いた心筋障害の解析は、その客観性の高さからより正確な評価を可能とし、基礎研究の質の向上につながる可能性が高い。その結果、臨床応用可能な基礎のシーズを正確に把握することが可能となり、より効率的な臨床研究の実施を通して、患者に新たな治療法を提供することが可能となると考えられる。

V. 結論

心臓虚血再灌流モデルにおいて、MRI:QSI法は、心筋障害部位と一致した部位での高信号の描出に成功した。本方法は、造影剤を用いずに心筋障害部位を同定できる方法として、臨床応用が期待される。

VI. 研究協力者

中島大輔・慶應義塾大学・特任助教
畑純一・慶應義塾大学・特別研究員
市原元気・慶應義塾大学・助教

VII. 参考文献

1. Nakashima D, Fujita N, Hata J, Komaki Y, Suzuki S, Nagura T, et al. Quantitative analysis of intervertebral disc degeneration using q-space imaging in a rat model. *J Orthop Res*. 2020;38:2220-2229
2. Nakashima D, Hata J, Sone Y, Maruyama K, Feiweier T, Okano JH, et al. Detecting mild lower-limb skeletal muscle fatigue with stimulated-echo q-space imaging. *Magn Reson Med Sci*. 2020
3. Jenkins CP, Cardona DM, Bowers JN, Oliari BR, Allan RW, Normann SJ. The utility of c4d, c9, and troponin t immunohistochemistry in acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:256-263
4. King MD, Houseman J, Roussel SA, van Bruggen N, Williams SR, Gadian DG. Q-space imaging of the brain. *Magn Reson Med*. 1994;32:707-713
5. Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parker MA, Simonetti O, et al. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med*. 2000;343:1445-1453
6. Wagner A, Mahrholdt H, Holly TA, Elliott MD, Regenfus M, Parker M, et al. Contrast-enhanced mri and routine single photon emission computed tomography (spect) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: An imaging study. *Lancet*. 2003;361:374-379
7. Choi KM, Kim RJ, Gubernikoff G, Vargas JD, Parker M, Judd RM. Transmural extent of acute myocardial infarction predicts long-term improvement in contractile function. *Circulation*. 2001;104:1101-1107
8. Kitagawa K, Sakuma H, Hirano T, Okamoto S, Makino K, Takeda K. Acute myocardial infarction: Myocardial viability assessment in patients early thereafter comparison of contrast-enhanced mr imaging with resting (201)tl spect. Single photon emission computed tomography. *Radiology*. 2003;226:138-144
9. Nguyen C, Fan Z, Xie Y, Dawkins J, Tseliou E, Bi X, et al. In vivo contrast free chronic myocardial infarction characterization using diffusion-weighted cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2014;16:68
10. Shi RY, An DA, Chen BH, Wu R, Du L, Jiang M, et al. Diffusion-weighted imaging in hypertrophic cardiomyopathy: Association with high t2-weighted signal intensity in addition to late gadolinium enhancement. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2020;36:2229-2238
11. Moon JC, Messroghli DR, Kellman P, Piechnik SK, Robson MD, Ugander M, et al. Myocardial t1 mapping and extracellular volume quantification: A society for cardiovascular magnetic resonance (scmr) and cmr working group of the european society of cardiology consensus statement. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013;15:92

物理的刺激で活性化される心臓自然免疫シグナルの解明

国立循環器病研究センター
分子薬理部上級研究員
高橋 佑典

I. 緒言

弁膜症による容量負荷、高血圧による圧負荷のいずれにおいても、心不全の発症・増悪にメカノストレスの重要性が指摘されている。近年メカノセンサーが細胞接着部位である介在板にあることが指摘されており¹⁾、また実際に多くの介在板タンパク質をコードする遺伝子変異が心不全の原因となることは、メカノセンサーとしての介在板の重要性が注目されている。

AMPKはATPの加水分解産物であるAMPによって活性化され、細胞のエネルギー代謝を制御するセンサーとして働くリン酸化酵素である。我々は、心筋組織においてAMPKが細胞接着部位である介在板に局在していること、さらに心拍動によるメカノシグナル依存的にAMPKの介在板への局在がコントロールされていることを見出し、心臓においてAMPKがメカノシグナルに関与していることを明らかにしてきた²⁾。これらの事実に基づき、生化学的に心臓介在板におけるAMPKの新規基質探索をおこなったところ、機能未知の膜タンパク質AMPK interacting protein at the intercalated disc (AipID)を同定した。我々は心筋細胞においてAipIDの発現を上昇させると、IL-1, 6, CCL2, 7などの自然免疫サイトカイン・ケモカインの発現が上昇することを見出しており、これらの結果はAipIDが心筋組織において、物理的刺激を自然免疫反応につなげる重要な因子であることを示唆する。本研究ではAipIDの*in vivo*での心臓での役割を解明することで、心臓におけるメカノストレスと炎症反応をつなぐメカニズムの解明を目指す。

II. 対象・方法

CRSPR/Cas9システムを用いてAipIDのノックアウト(KO)マウスを作製した。野生型(WT)マウスとAipID KOマウスの大動脈を結紮し、左室内に高圧負荷をかけた横行大動脈縮窄(TAC)モデルを作製した。

術後1週間と4週間に心エコー図検査を行い、心機能を評価した。また術後1週間、4週間の心臓を摘出し、Hematoxylin Eosin (HE)染色ならびにMasson's Trichrome (MT)染色を行い、繊維化率を計測した。また、凍結切片も作成し、CD45ならびにCD68抗体を用いて免疫染色を行った。さらに、術後3日の心臓も摘出し、組織を凍結破砕によって作製した組織粉末からtotalRNAを抽出し、RNA-seqを行った。

III. 結果

AipIDの機能解析のため、CRSPR/Cas9システムを用いてAipIDのノックアウト(KO)マウスを作製した。作製したマウスは生殖可能で、メンデルの法則に従った比率でKOマウスが生まれることから胎生致死の表現系がないことが明らかになった。AipID KOマウスはベースラインでは心機能低下を認めなかったため、TACモデルをWTマウスとAipID KOマウスで作製した。WTマウスはTAC術後4週間で左室駆出率(Ejection fraction)の低下が見られたが、KOマウスでは左室駆出率の低下が抑制された(図1)。

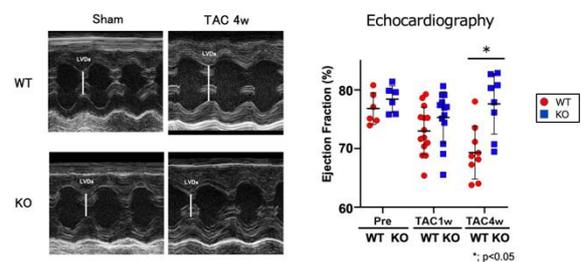


図1 横行大動脈縮窄術後の心エコー図検査。KOマウスでは左室収縮能の低下が抑制された。

MT染色ではWTマウスで繊維化の増大を認めたが、KOマウスでは繊維化も抑制された(図2)。

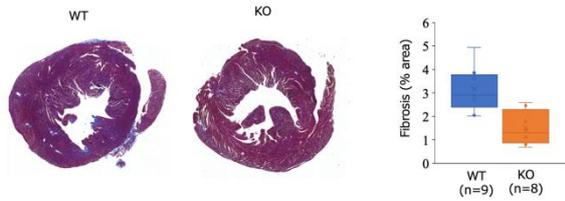


図2 横行大動脈縮窄術後4週のMT染色。KOマウスでは左室の繊維化が抑制された。

以上の結果より、AipIDのKOマウスはTAC術後の心機能低下に対して心保護作用を示すことが明らかとなった。

AipID KOの心保護作用の機序を詳細に検討するために、より早いタイミングであるTAC術後3日での心臓における遺伝子変化をRNA-seq解析を用いて評価した。Gene Ontology エンリッチメント解析を行った結果、KOマウスと比べてWTマウスで発現が上昇した遺伝子群は「Inflammatory response」「Positive regulation of immune response」「Leukocyte migration」「Leukocyte chemotaxis」「Neutrophil migration」など自然免疫シグナルに関連した遺伝子群であることが明らかとなった(図3)。また、TAC術後1週間でWTマウスの心臓ではCD45、CD68陽性細胞が増加するが、KOマウスでは炎症細胞浸潤が抑制された(図4)。

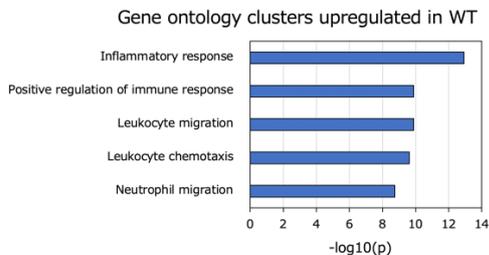


図3 横行大動脈縮窄術後3日のRNA-seq解析。KOマウスで自然免疫シグナルに関連した遺伝子群の遺伝子発現が抑制されていた。

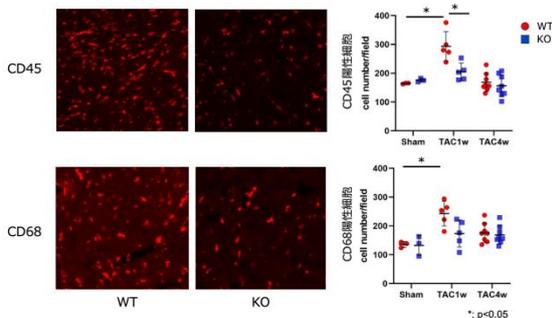


図4 横行大動脈縮窄術後の免疫染色。KOマウスで術後1週の炎症細胞浸潤が抑制されていた。

以上の結果より、AipID KOマウスは心臓への炎症細胞浸潤を抑制することによって心保護作用を示すと考えられた。

IV. 考察

本研究では心臓介在板に局在するAMPKの基質として新たに同定したAipIDの*in vivo*での機能解析を行った。我々は心筋細胞においてAIPIDの発現を上昇させると、自然免疫サイトカイン・ケモカインの発現が上昇することを見出し、KOマウスを用いた検討でも同様にAipIDが炎症細胞浸潤に重要な因子であることを明らかにした。しかしながら、心筋細胞に発現するAipIDが炎症細胞浸潤を引き起こす下流の分子メカニズムはいまだに明らかになっていない。こちらについては、現在樹立中のAipID TG mouseを用いた*in vivo*結合タンパク質探索により、AipIDと自然免疫シグナルをつなぐアダプター因子を明らかにしていく計画です。

V. 結論

成熟マウス心臓において、心筋細胞の介在板に局在するAMPKの新規基質として心筋と骨格筋に発現する機能未知蛋白質であるAipIDを同定した。AipIDは成熟マウス心臓においても心筋内炎症細胞浸潤に関与することが示唆された。

VI. 研究協力者

国立循環器病研究センター分子薬理部・部長
新谷泰範

VII. 参考文献

- 1) Yuki Katanosaka, Keiichiro Iwasaki, Yoshihiro Ujihara, et al. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat Commun.* 2014;5:3932.
- 2) Shohei Yashirogi, Takemasa Nagao, Yuya Nishida, et al. AMPK regulates cell shape of cardiomyocytes by modulating turnover of microtubules through CLIP-170. *EMBO Rep.* 2021;22(1):e50949.

大動脈周囲褐色脂肪組織および MLX 遺伝子が高安動脈炎に及ぼす影響についての検討

東京医科歯科大学 循環制御内科学 非常勤講師
田村 夏子

I. 緒言

高安動脈炎は原因不明の全身性の大型血管炎である。近年、本邦において行われたゲノムワイド関連解析で、疾患関連遺伝子 MLX 遺伝子が見出された¹。私たちの以前の研究で変異型 MLX 遺伝子を持つ患者は重症の大動脈弁閉鎖不全症を併発する割合が高いこと、沼野分類で最も病変の広がりが多い type V の割合も多いことを報告した。また、*in vitro* では変異型 MLX 遺伝子により NLRP3-inflammasome を介した炎症反応が促進されることを解明した²。その研究の一環で MLX 遺伝子は大動脈弁組織・褐色脂肪組織・小腸に多く発現していることがわかった。褐色脂肪組織は、血管周囲に多く存在しており、男性より女性に、高齢者より若年者で活動性が高いことが報告されており³、本疾患の疫学的特徴とも合致する。このことから、大動脈周囲褐色脂肪組織と変異型 MLX 遺伝子とが高安動脈炎に及ぼす影響について解明することを本研究の目的とした。

II. 対象・方法

以下の方法で、高安動脈炎の疾患モデルマウスを作成し、大動脈周囲褐色脂肪組織と変異型 MLX 遺伝子と本疾患との関連を検討する。

① UCP-1 ペプチドアジュバントインジェクションマウスモデル (WT UCP1(+))

血管周囲の褐色脂肪組織に炎症を誘導し、自己免疫性褐色脂肪組織炎マウスモデルを作成する。BALB/c マウスに Freund アジュバントと UCP-1 ペプチドを混合したものを皮下注射し、4 週間後に血管の組織を病理学的に評価した。

② 変異型 MLX ノックインマウス (MLXKI)

褐色脂肪組織中に多く存在する MLX 遺伝子の変異が血管炎に関与しているかどうかの検討として、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて MLX-Q139R ノックインマウスを作成した。

無刺激で飼育し、他のモデルマウスと合わせて 13 週間の血管について病理学的評価を行った。

③ 変異型 MLX ノックインマウス UCP-1 ペプチドアジュバントインジェクションマウス (MLXKI UCP1(+))

変異型 MLX ノックインマウスについて、①と同様の方法で UCP-1 アジュバントインジェクションも行ったモデルを作成した。

④ LCWE インジェクションマウス (WT LCWE(+))

既に確立している大型血管炎マウスモデルとして、乳酸菌細胞壁抽出物 (*Lactobacillus casei* wall cell extract/LCWE) 腹腔注射による大動脈炎マウスについて野生型 BALB/c マウスで作成した。これらのモデルマウスについて主に血管を HE 染色で染色し形態を評価し、画像ソフト imageJ で断面積の測定を行った。

III. 結果

自己免疫性褐色脂肪組織炎モデルマウスの面積は野生型と比較して、血管断面積が有意に増大した。(WT vs WT UCP1(+): mean 82225 μm^2 vs 158336 μm^2 : $p < 0.05$) 血管面積の拡大だけでなく血管周囲の褐色脂肪組織の増大、血管壁肥厚、リンパ球の浸潤がみられた (図 1・2)。

変異型 MLX ノックインマウスの血管断面積は野生型と比較して有意に増大していた。(WT vs MLXKI: mean 82225 μm^2 vs 127342 μm^2 : $p < 0.05$) 血管は野生型と比較して肥厚しており、リンパ球の浸潤や弾性繊維の断裂を認め、血管周囲のリンパ節腫大も認めた (図 1・2)。

変異型 MLX ノックインマウスは野生型マウスと比較して体重が減少しているだけでなく (WT vs MLX-KI: mean 23 g vs 19 g: $p < 0.01$)、血管周囲の褐色脂肪組織の増大、大動脈弁組織の肥大、小腸パイエル板の肥厚や大腸平滑筋の腫大がみられ

たが、寿命や出産に明らかな影響はなかった。

次に変異型MLXノックインマウスに自己免疫性褐色脂肪織炎を発症させたモデルを作成したところ、野生型マウスと比較して有意に増大していただけでなく (WT vs MLXKI UCP1(+): mean 82225 μm^2 vs 138771 μm^2 : $p < 0.05$)、刺激していない変異型MLXノックインマウスと比較して、さらに増大傾向をみせ

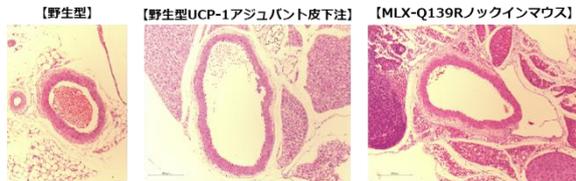


図1: 野生型と比較して野生型UCP-1アジュバント皮下注 (自己免疫性褐色脂肪織炎モデル) と変異型MLXノックインマウスでは血管断面積が有意に増大し ($p < 0.05$)、血管周囲褐色脂肪組織も増大した。

た (MLXKI vs MLXKI UCP1(+): mean 127342 μm^2 vs 138771 μm^2)。血管壁の肥厚やリンパ球浸潤、血管周囲リンパ節腫大も増悪した (図2)。

一方、既に確立している大型血管炎マウスモデル (乳酸菌細胞壁抽出物腹腔注射による大動脈炎マウス) を野生型マウスで作成し評価したところ、刺激していない野生型と比較して有意に血管断面積が増大した (WT vs WT LCWE(+): mean 82225 μm^2 vs 151658 μm^2 : $p < 0.05$)。しかし、上述した自己免疫性褐色脂肪織炎モデルマウスや変異型MLXノックインマウスと比較して、血管周囲は白色脂肪が多くみられ、血管壁へのリンパ球浸潤や血管周囲のリンパ節腫大は少なかった (図2)。

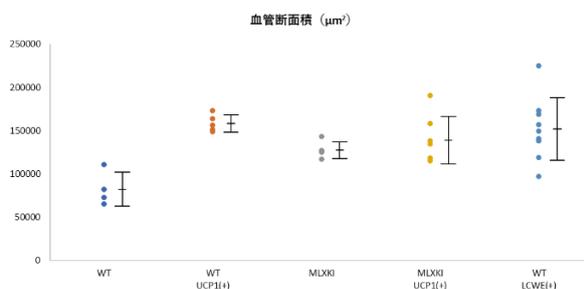


図2: 各血管炎モデルマウスの血管断面積の比較。自己免疫性褐色脂肪織炎モデルや変異型MLXノックインマウス、変異型MLXノックインマウスの自己免疫性褐色脂肪織炎モデルで、従来の血管炎モデルマウスである野生型の乳酸菌細胞壁抽出物腹腔注射モデルと同程度に野生型マウスと比較して有意に血管断面積が増大した。(いずれもvs WT $p < 0.05$)

IV. 考察

野生型マウスに自己免疫性褐色脂肪組織炎を発症させたモデルで血管断面積の増大がみられたことから、褐色脂肪組織の炎症が血管炎発症に関与することが推測される。

また、刺激を行っていない変異型MLXノックインマウスでも野生型マウスと比較して血管断面積の増大を認め、変異型MLX遺伝子が血管炎の発症に影響

を与えていることが分かった。

さらに、変異型MLXノックインマウスでみられた血管炎の組織像と血管周囲の褐色脂肪組織の増大所見について、自己免疫性褐色脂肪織炎モデルと類似していたことから、変異型MLX遺伝子と褐色脂肪組織が血管炎の発症や増悪に深く関与していることが推測される。

V. 結論

自己免疫性褐色脂肪織炎モデルマウスと変異型MLX遺伝子ノックインマウスで大型血管炎モデルマウスを作成した。血管周囲褐色脂肪組織と変異型MLX遺伝子は血管炎の発症機序に重要な役割を果たしている。

VI. 研究協力者

東京医科歯科大学 循環器内科 准教授 前嶋康弘
東京医科歯科大学 循環器内科 教授 笹野哲郎

VII. 参考文献

1. Terao, C. *et al.* Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 289–297 (2013).
2. Tamura, N. *et al.* Single-Nucleotide Polymorphism of the MLX Gene Is Associated With Takayasu Arteritis. *Circ. Genomic Precis. Med.* (2018) doi:10.1161/CIRCGEN.118.002296.
3. Cypess, A. M. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* (2009) doi:10.1056/nejmoa0810780.