

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08916

研究課題名(和文) CAWS川崎病様血管炎モデルにおけるNLRP3インフラマソームの機能解析

研究課題名(英文) Mechanism of NLRP3 inflammasome in CAWS-induced vasculitis

研究代表者

中村 潤 (Nakamura, Jun)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70646314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CAWS血管炎におけるNLRP3インフラマソームの役割を解明を目的とした。その結果、CAWS血管炎の発症にNLRP3インフラマソームが重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、NLRP3インフラマソーム活性化の責任細胞として骨髄由来樹状細胞が同定された。さらに、CAWSがIL-1 β 産生を誘導する細胞内シグナルを解析したところ、Dectin-2/Syk/JNK/NF- κ B経路を介してIL-1 β 前駆体およびNLRP3合成(プライミング経路)が誘導され、Dectin-2/Syk/JNK/ミトコンドリア活性酸素経路を介してNLRP3インフラマソームが活性化させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病は、主に冠状動脈に炎症が生じる原因不明の汎血管炎で、小児臨床において重要な課題の一つとなっている。川崎病ではIL-1 β やTNF- α などの炎症性サイトカインが重要な役割を担っている可能性が示唆されていることから、IL-1 β の産生・分泌に関わるNLRP3インフラマソームが川崎病の病態に関与しているとの仮説を立てた。これを実証するために、CAWS血管炎マウスモデルを用いて研究を行った。その結果、CAWSモデルでの血管炎発症には、NLRP3インフラマソーム活性化が関与していることが示された。この結果は、川崎病の治療標的としてのNLRP3インフラマソームの可能性を示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project was to elucidate the role of the NLRP3 inflammasome in CAWS vasculitis.

It has revealed that the NLRP3 inflammasome plays an important role in the development of CAWS vasculitis. In addition, bone marrow-derived dendritic cells were identified as responsible cells for NLRP3 inflammasome activation. Furthermore, we revealed that IL-1 β precursor and NLRP3 synthesis (priming pathway) were induced via the Dectin-2/Syk/JNK/NF- κ B pathway and the NLRP3 inflammasome is activated via the Dectin-2/Syk/JNK/mitochondrial reactive oxygen species pathway.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：川崎病様血管炎 CAWS血管炎 NLRP3インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

川崎病は、1967年に川崎富作により報告された発熱や発疹等の症状を呈する疾患で、主に乳幼児が罹患する血管炎症候群である。川崎病は中型血管炎に分類されており、冠動脈が高頻度で侵襲され、病態が進行して生じる冠動脈瘤が予後に大きな影響を及ぼす。近年、川崎病の発症数は増加傾向にあるが、その病因や発症機序は未だ明らかではない。現在、行われている免疫グロブリン大量静注療法 (IVIG) は、川崎病の急性期炎症を早期に沈静化させ、冠動脈瘤の形成を予防することが示されているが、約10~20%の患者はIVIG抵抗性であり、冠動脈瘤を形成する多くの患児がIVIG抵抗性であることから、川崎病の発症や病態の分子機構の解明とともに、より有効な治療法の開発が切望されている。

川崎病患者では、その糞便中に *Candida albicans* が含まれること、その培養上清由来の CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction) を動物に投与すると大動脈起始部に血管炎が誘発され、CAWS血管炎マウスは川崎病様血管炎モデルとして知られている¹⁾²⁾。さらに最近、中国東北部からの対流圏の気流パターンと日本での川崎病発症との関連性ととも、対流圏気流中で最も多く含まれていた菌類として *Candida* 種が同定されたことから、*Candida* 種が川崎病の有力な発症因子として注目されている³⁾。

我々は、炎症抑制性サイトカインの IL-10 が、その血管炎病態を抑制することを見だし、その作用機序を解析することにより、CAWS による血管炎発症機構の一部を明らかにした⁴⁾。また、近年の研究で、川崎病では IL-1 や TNF- α などの炎症性サイトカインが重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

IL-1 の産生・分泌に関わる NLRP3 インフラマソームが川崎病の病態に関与しているとの仮説を立てた。そこで、CAWS によって誘導される川崎病様血管炎の病態発現に、NLRP3 インフラマソームがどのように関与するかを解明することによって、新規予防・治療法開発の標的となり得るかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスおよび IL-1 β ・NLRP3・ASC 欠損マウスに CAWS を投与し、血管炎の評価を行った。

(2) 我々は血管炎部位に CD11b 陽性マクロファージおよび CD11c 陽性細胞樹状細胞が多数浸潤していることを確認したため、これらの細胞が重要な役割を果たしている可能性を考えた。そこで、骨髄由来マクロファージおよび樹状細胞を作成し、IL-1 β 産生に関与しているかを Western blot で解析した。

(3) (2) の *in vitro* 実験で骨髄由来樹状細胞が CAWS によって引き起こされる NLRP3 インフラマソーム活性化の責任細胞であることが示されたため、CAWS 血管炎における細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。

4. 研究成果

(1) IL-1 β の各欠損マウスでは野生型マウスと比較して、CAWS 血管炎が有意に抑制されることが確認された (図1)。

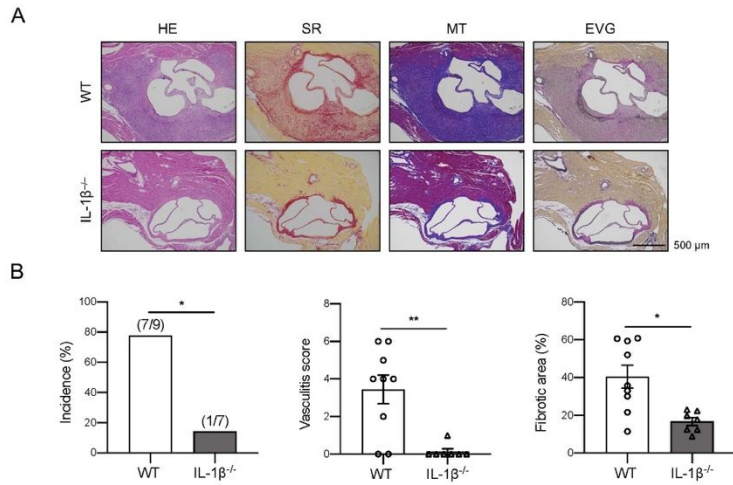


図1. 野生型およびIL-1 β 欠損マウスへのCAWS投与による大動脈弁・冠動脈周囲の血管炎(A)、血管炎発症率、血管炎スコア、線維化エリアの評価(B)

さらに、NLRP3 インフラサーム構成分子の NLRP3 および ASC の各欠損マウスにおいて、同様の実験を行ったところ、血管炎や線維化が有意に抑制された(図2)。この結果から、CAWS 血管炎の発症に NLRP3 インフラサームが重要な役割を果たしていることがわかった。

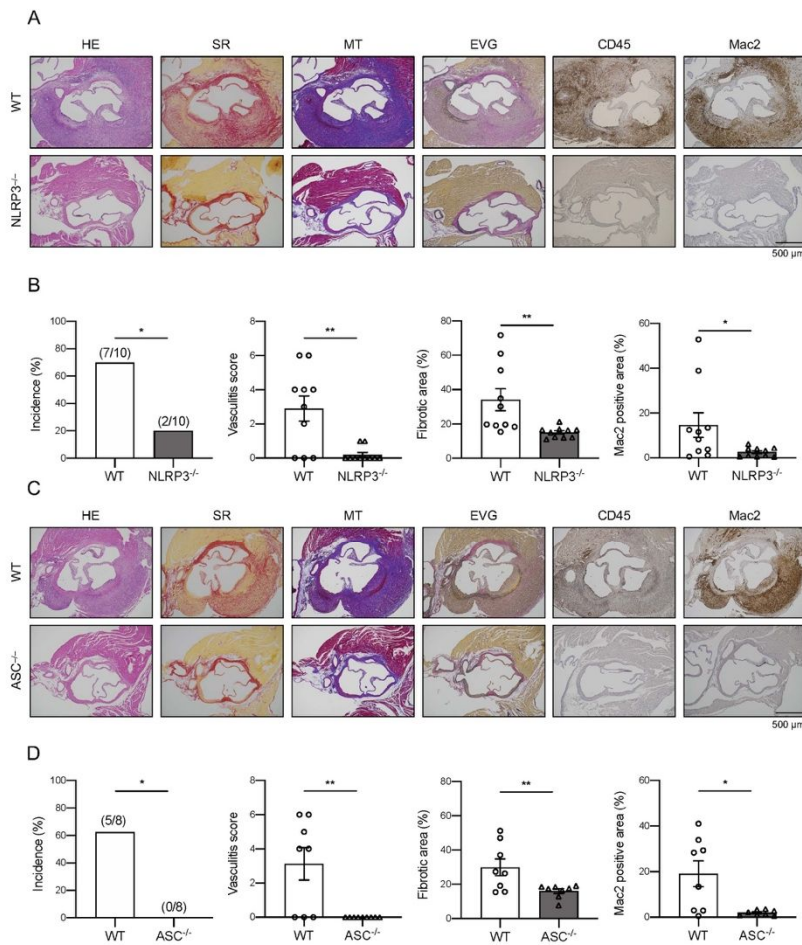


図2. 野生型およびNLRP3・ASC欠損マウスへのCAWS投与による大動脈弁・冠動脈周囲の血管炎(A, C)、血管炎発症率、血管炎スコア、線維化エリアの評価(B, D)

(2) 骨髄由来マクロファージおよび骨髄由来樹状細胞にCAWSを投与する実験を行った。骨髄

由来マクロファージではpro-IL-1 β は産生されていたが、活性型IL-1 β は産生されていなかった(図3.A)。一方、骨髄由来樹状細胞ではpro-IL-1 β および活性型IL-1 β の産生が見られた(図3.B)。このことからCAWS血管炎におけるNLRP3インフラマソーム活性化の責任細胞は骨髄由来樹状細胞であることが示された。

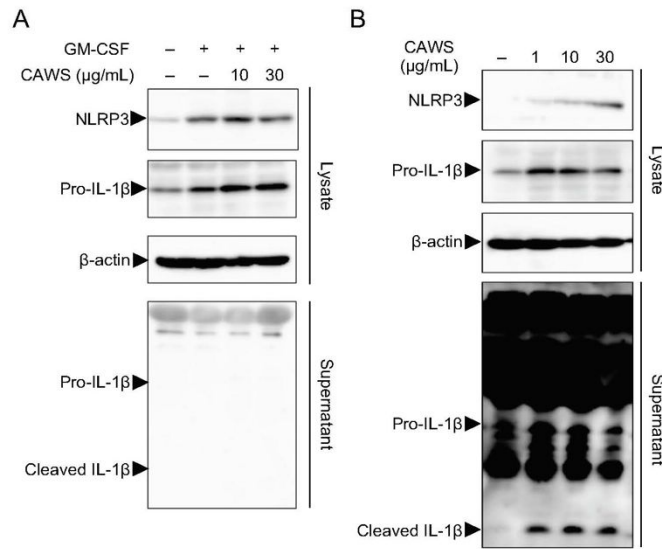


図3. 骨髄由来マクロファージへのCAWS投与(A)および骨髄由来樹状細胞へのCAWS投与(B)によるIL-1 β 産生の評価

(3) 次に骨髄由来樹状細胞に対し、Syk inhibitorのR406およびJNK inhibitorのSP600125 を投与する群および非添加群に分けてのCAWS投与を行い、細胞シグナル伝達の解析を行った。その結果、CAWS血管炎モデルで関与する細胞内シグナル伝達経路としては、Dectin-2/Syk/JNK/NF- κ B経路を介してIL-1 β 前駆体およびNLRP3合成(プライミング経路)が誘導されることが明らかとなった(図4)。

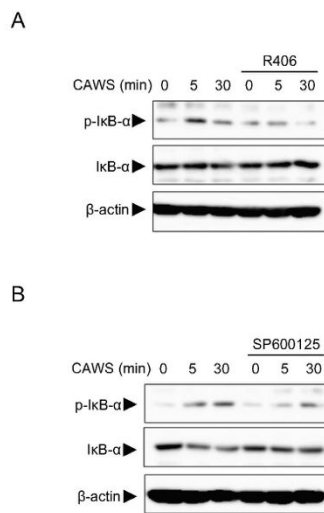


図4. 骨髄由来樹状細胞をR406 (Syk inhibitor: A)およびSP600125 (JNK inhibitor: B)添加群・非添加群に分けてのCAWS投与による細胞シグナル伝達の解析

更なる解析で、Dectin-2/Syk/JNK/ミトコンドリア活性酸素経路を介してNLRP3インフラマソームが活性化されていることが明らかになった。これらの結果により、骨髄由来樹状細胞におけるNLRP3

インフラマソーム活性化機構が解明された(図5)

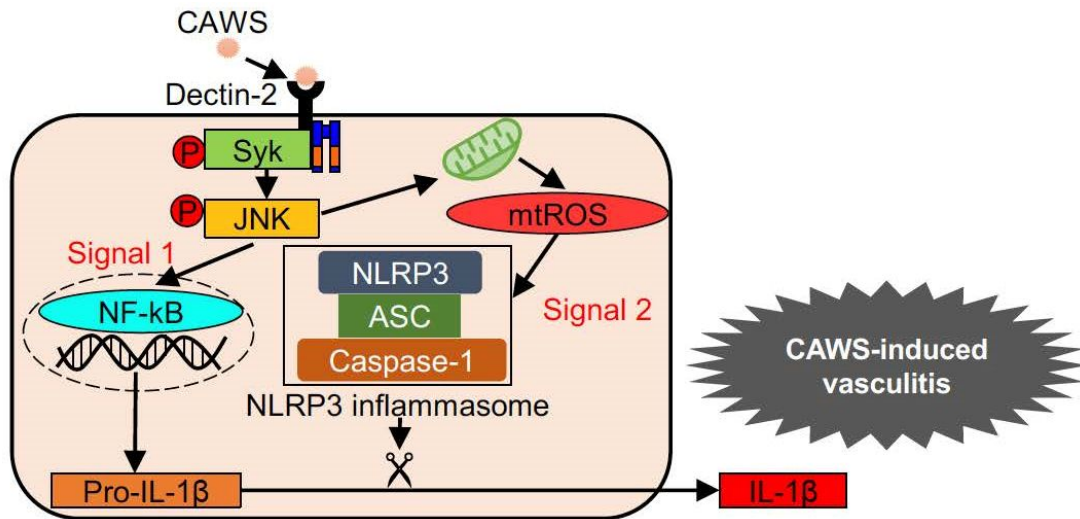


図5. 骨髄由来樹状細胞におけるCAWS誘導性IL-1β産生メカニズムの概念

上記結果より、CAWS血管炎の病態におけるNLRP3インフラマソームの役割が解明された。本研究は川崎病の病態解明の一助となると考えられ、NLRP3インフラマソームという分子からみた新たな治療・予防法の開発に寄与することが期待される。

<引用文献>

- 1) Ohno N. Chemistry and biology of angiitis inducer, *Candida albicans* water-soluble mannoprotein-beta-glucan complex (CAWS). *Microbiology and immunology* 2003; 47(7): 479-90.
- 2) Nagi-Miura N, Harada T, Shinohara H, Kurihara K, Adachi Y, Ishida-Okawara A et al. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis* 2006; 186(2): 310-20.
- 3) Murata H. [Experimental arteritis on murine with *Candida*—in relation to arteritis in MCLS-- (author's transl)]. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 1978; 52(8): 331-7.
- 4) Nakamura J, Watanabe S, Kimura H, Kobayashi M, Karasawa T, Kamata R, et al. Adeno-associated Virus Vector-mediated Interleukin-10 Induction Prevents Vascular Inflammation in a Murine Model of Kawasaki Disease. *Sci Rep.* 2018;8(1):7601.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anzai Fumiya, Watanabe Sachiko, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Nakamura Jun, Nagi-miura Noriko, Ohno Naohito, Takeishi Yasuchika, Takahashi Masafumi	4. 巻 138
2. 論文標題 Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2019.11.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 http://www.jichi.ac.jp/inflammation/

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
研究分担者	高橋 将文 (Takahashi Masafumi) (40296108)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	唐澤 直義 (Karasawa Tadayoshi) (60631893)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	渡邊 幸子 (Watanabe Sachiko) (80770619)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	削除：2020年3月9日
研究分担者	駒田 敬則 (Komada Takanori) (90824730)	自治医科大学・医学部・助教 (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