

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591468

研究課題名(和文)細胞死に対する自然炎症の機序の解明およびその関節リウマチへの関与

研究課題名(英文)The mechanism of innate inflammation in response to cell death and its contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

河野 肇 (Kono, Hajime)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：60585074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：生体内における通常以上の細胞死は急性炎症反応を引き起こす。この内因性Danger Signalによる急性炎症は様々な炎症性疾患の原因となると考えられているが、この炎症反応における分子機構は未だ明らかではない。

本研究においては、細胞死に対する炎症反応におけるその分子メカニズムの解析を行った。細胞死に対する急性炎症反応はIL-1依存性である。IL-1は非活性蛋白として転写翻訳され、カスパーゼ1により切断され活性体となるとされていた。しかし、われわれはIL-1依存性の細胞死に対する炎症反応において、カスパーゼ1非依存性の経路を同定し、その経路にCathepsin Cが重要であることを同定した。

研究成果の概要(英文)：Cell death, especially necrotic cell death, induces acute inflammation. It is supposed that this acute responses underlie many pathological conditions including autoimmune diseases, but the molecular mechanisms of the danger signals to evoke inflammation or the key pathways responsible for neutrophil recruitment are not well studied.

We investigated the molecular mechanisms responsible for inducing inflammatory responses to necrotic cells in vivo. In our system the inflammation to cell death depends on IL-1. IL-1 is transcribed as an immature protein and requires cleavage by Caspase-1. Here we identified a novel molecular pathway to cell death-induced inflammation that is dependent on IL-1, but not on Caspase-1. In addition, we identified Cathepsin C as one of the key molecules involved in this Caspase-1 independent pathway in vivo. Cathepsin C is known to mature neutrophil serine proteases including proteinase 3 that was shown to have ability to mature IL-1 in vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：自然炎症 IL-1 Cathepsin C Caspase 1

1. 研究開始当初の背景

近年の研究の進歩により、家族性地中海熱などの遺伝性疾患が NLRP3 の遺伝子に起因した IL-1 過剰産生が病態の本体であることが判明し、抗 IL-1 抗体などの生物学的製剤が高い効果を示している。これらの疾患においては機能亢進型 NLRP3 遺伝子異常による IL-1 過剰によるマクロファージと好中球の活性化が特徴であるため、自己炎症性疾患と命名された。この定義は多発硬化症や全身性エリテマトーデスなどの獲得免疫が主体となる自己免疫疾患と対をなす概念である。近年の研究の進歩により、自らの体内で形成される尿酸結晶などの無菌的微粒子に対する急性炎症反応も NLRP3 インフラマソームおよび IL-1 依存性であることが判明した(業績文献 4)。さらには高血糖ストレスに対する炎症反応、血管内皮におけるコレステロール結晶に対する炎症反応と動脈硬化も NLRP3 インフラマソームおよび IL-1 依存性であることが判明し、これらにおける自然免疫炎症の寄与が明らかとなってきた。このようにさまざまな疾患群において自己炎症疾患としての側面の重要性が明らかになりつつある。関節リウマチにおいてはその病態が IL-1 依存性であることが判明しているが、その自己炎症性疾患としての側面は判明していない。

感染に対する生体防御の第一線において、自然免疫による炎症反応は重要な役割を果たしている。一方自然免疫による急性炎症反応の対象は病原体に限局されるものではないため、感染局所に遊走した白血球の活性酸素やプロテアーゼなどの分解酵素などが漏れだして自らの組織傷害をも引き起こす。生体内における通常以上の細胞死、特にネクロシスは急性炎症反応を引き起こす。細胞死が感染によりもたらされる場合には、急性炎症反応の惹起は合目的であり、生体には有利な事象である。しかし、感染を伴わない細胞死においては、急性炎症反応、特に好中球の

浸潤により組織はさらにダメージを受ける。特にこれら細胞死を起こす原因が感染によらない場合、急性炎症は組織傷害のみ引き起こし、様々な炎症性疾患の原因となると考えられている(*Annu Rev Immunol.* 28: 321)。関節リウマチにおいては、関節への外傷が発症に関与すること、もしくは全身的な関節所見の悪化につながるものが経験されており、細胞死に対する炎症反応が関節リウマチにつながるものが想定される。炎症原性のない正常生細胞が細胞死に伴い炎症を惹起する性質を帯びる機序については明らかではないが、これまでの実験結果から細胞形質膜の統合性破綻にともない通常細胞内に隠されている分子が放出されることによると考えられる。このような通常細胞内に隠されており、細胞傷害時に放出される分子は damage associated molecular patterns (DAMPs)、または Danger Signal と呼ばれている(*Annu. Rev. Immunol.* 12: 991)。申請者らは尿酸が DAMPs であることを発見、報告した(*J Clin Invest.* 120: 1939, *Nature* 425:516)。細胞内には大量の尿酸が含まれているが、細胞死後には核酸を材料としてさらに大量の尿酸が産生される。そのほかの DAMPs としては DNA、特に非メチル化 CpG に富む領域が関与している。他には HMGB1、S100 タンパク、熱ショックタンパクなども報告されている。近年感染に伴う Pathogen Associated Molecular Patterns の受容体として Toll like 受容体(TLR)や NOD 受容体が同定され、感染に対する自然免疫および細胞性免疫双方に寄与することが明らかとなった。

このように TLRs は病原体由来の分子を認識することが判明しているが、哺乳類由来の分子を認識するとの報告もある。申請者らは TLRs が細胞死を検出するかについて検討を開始したところ、TLRs ではなく、TLRs と細胞内信号伝達分子 MyD88 を共有する IL-1 受容体が重要であることが判明した(*Nature*

Medicine. 13: 851)。同様にシリカ結晶、アルミニウムゲル、コレステロール結晶に対する急性好中球性反応は IL-1 受容体欠失マウスでは消失していた (*Nature Immunol.* 9: 847)。

どのような細胞種がこの免疫反応に関与しているかについては、最近申請者らにより CD11b 陽性マクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかにされた (業績文献 3)。細胞死に対する炎症反応においては IL-1 が重要な役割を果たしているが、骨髓キメラマウスを使った実験により、In Vivo では IL-1 受容体 (IL-1R) は非骨髓由来細胞に局在するものが重要であると判明している (*Nature Medicine*. 13: 851)。

死細胞、もしくは尿酸結晶やシリカ結晶などの無菌的微粒子によるインフラマソームおよび IL-1 活性化のメカニズムは以下のステップを経ると考えられている。(i)マクロファージの貪食、(ii)ライソソームの破裂、(iii)NLRP3-ASC インフラマソーム活性化、(iv)Caspase1 による IL-1 の活性化。申請者は死細胞に対する急性炎症反応は IL-1 依存性であることを報告しているが、さらに (a) Caspase1 依存性、NLRP3 非依存性経路、(b)Caspase1 非依存性経路を発見した。(a)においては他の Nod like receptor が、(b)においては Cathepsin G などの好中球由来の分子が関与していると想定している。このような細胞死、もしくは無菌的微粒子による炎症反応の分子機構を解明する。

2. 研究の目的

家族性地中海熱などの遺伝性疾患は NLRP3 遺伝子異常に起因した IL-1 過剰産生が病態の本体であり、自然免疫自己炎症性疾患である。最近の研究の進歩により、自らの体内で形成される尿酸結晶などの無菌的微粒子に対する急性炎症反応も NLRP3 および IL-1 依存性であ

ることが明らかとなった。生体内における通常以上の細胞死、特にネクローシスは急性炎症反応を引き起こす。この内因性 Danger Signal による急性炎症は様々な炎症性疾患の原因となると考えられているが、この炎症反応における分子機構は未だ明らかではない。関節リウマチでは外傷などによる無菌的な細胞死が症状増悪に関連すると経験上知られている。

本研究では関節リウマチにおける自然炎症の寄与を、細胞死に対する炎症から解明することを目標とする。そのため本研究では、まず、死細胞に対する炎症反応における IL-1 活性化機構の解析を行った。特に、IL-1 のインフラマソーム、Caspase1 以外の IL-1 活性化機構を同定した。In Vitro において、Caspase1 以外に IL-1 活性化能を持つ酵素として、好中球セリンプロテアーゼである Proteinase-3 や Cathepsin G、肥満細胞キマーゼなどが知られている。これらも転写翻訳された時点では非活性体であるが、N 末端の 2 アミノ酸を Cathepsin C により切断されることにより活性体となる。特に Caspase-1 非依存性経路におけるこれら Cathepsin C 依存性 IL-1 活性化の経路の in vivo における役割について検討した。

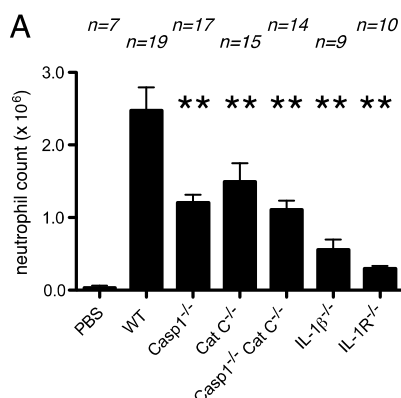
3. 研究の方法

IL-1 活性化における Caspase1 非依存性経路について検討するために、Caspase1 および Cathepsin C のダブルノックアウトマウスを作製した。IL-1 受容体欠失マウスと野生型 C57BL/6 マウスをそれぞれ陰性対照、陽性対照として、Caspase1 欠失マウス、Cathepsin C 欠失マウス、上述ダブルノックアウトマウスに死細胞もしくはシリカ結晶を腹腔内投与した。4 時間後もしくは 16 時間後に腹腔内の好中球および単球の数をフローサイトメータを用いて定量した。

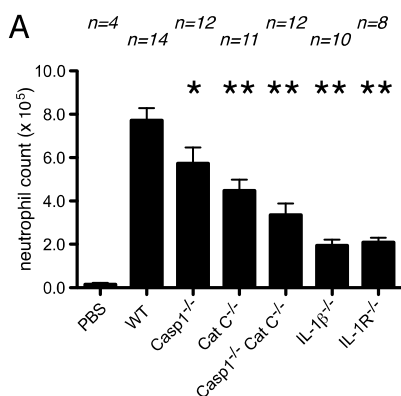
4. 研究成果

Caspase1非依存性、CathepsinC依存性のIL-1活性化機構を見いだした。それにはCathepsin Cが重要な役割を果たすことが明らかとなった。

我々は以前より、死細胞もしくは清潔な微粒子に対する *in vivo* での好中球性炎症反応はIL-1依存性であるが、Caspase1非依存性成分があることを認めていた。



今回の検討においても上の図の様に、炎症のその初期反応である死細胞投与後4時間において、Caspase1欠失マウスは野生型マウスと好中球遊走に差がなく、ダブルノックアウトマウスにおいては有意に好中球遊走の減弱が認められた。



また、シリカに対する急性炎症反応においても、シリカ投与4時間後において上記の様にダブルノックアウトマウスにおいてはCaspase1欠失マウスに比べて好中球遊走における明らかな減弱が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1: Kono H, Onda A, Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2014 Feb;26:147-56. doi: 10.1016/j.coi.2013.12.004. Epub 2014 Jan 7. 査読あり.

2: Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Katayama M, Migita K, Suda A, Ohno S, Hashimoto H, Takasaki Y, Sumida T, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Human leukocyte antigens and systemic lupus erythematosus: a protective role for the HLA-DR6 alleles DRB1*13:02 and *14:03. *PLoS One.* 2014 Feb 3;9(2):e87792. doi: 10.1371/journal.pone.0087792.

eCollection 2014. 査読あり.

3: De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, Beyer M, Xu D, Zimmer S, Lahrman C, Schildberg FA, Vogelhuber J, Kraut M, Ulas T, Kerksiek A, Krebs W, Bode N, Grebe A, Fitzgerald ML, Hernandez NJ, Williams BR, Knolle P, Kneilling M, Röcken M, Lütjohann D, Wright SD, Schultze JL, Latz E. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol.* 2014 Feb;15(2):152-60. doi: 10.1038/ni.2784.

Epub

2013 Dec 8. 査読あり.

4: Yanagida T, Orihashi K, Kono H. In vivo evaluation of neutrophil recruitment in response to sterile particulates. Methods Mol Biol. 2013;1040:211-21. doi: 10.1007/978-1-62703-523-1_16. 査読あり.

5: Kono H, Orłowski GM, Patel Z, Rock KL. The IL-1-dependent sterile inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C. J Immunol. 2012 Oct 1;189(7):3734-40. Epub 2012 Aug 22. 査読あり.

6: Rock KL, Lai JJ, Kono H. Innate and adaptive immune responses to cell death. Immunol Rev. 2011 Sep;243(1):191-205. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01040.x. Review. 査読あり.

〔学会発表〕(計 1 件)

H. Kono, G. Orłowski, Z. Patel, K. L. Rock
The IL-1-dependent sterile inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C. IEIIS 2012, Tokyo

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 肇 (KONO, Hajime)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：60585074

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：