

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06918

研究課題名(和文)マクロファージにおけるNLRP3インフラマソームに関するLRGの機能解析

研究課題名(英文)The involvement of leucine rich alpha-2 glycoprotein in the inflammasome of macrophage

研究代表者

宇留島 隼人(Urushima, Hayato)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト・協力研究員

研究者番号：90755745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：LRGは炎症性腸疾患の病勢を鋭敏に表すバイオマーカーであるが、詳しい機能はまだ不明な点が多い。野生型マウスとLRG KOマウスにDSSで腸炎を誘導したところLRG KOマウスにおいて好中球やマクロファージの炎症部位への浸潤が抑制され、腸炎症状が軽減した。LRGは当初予想されたインフラマソームを介した炎症増強作用ではなく、TGF $\beta$ -Smad1シグナルを増強し血管内皮における接着分子であるエンドグリンの発現を亢進することが明らかとなった。これらのことからLRGは血管内皮細胞への炎症性細胞の接着を促し、炎症部位への細胞浸潤を亢進し腸炎の病態形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein (LRG) has been identified as a disease activity marker of inflammatory diseases including inflammatory bowel disease (IBD). However, the roles of LRG in these diseases has not yet been clarified. We analyzed the function of LRG by using of DSS-induced colitis mice model of IBD. LRG deficiency led to decrease of infiltration of inflammatory cells such as neutrophil and macrophage. LRG upregulated the expression of endoglin which is an adhesion molecule via promotion of TGF $\beta$ -Smad1 pathway in vascular endothelium. Taken together, our data suggest that LRG accelerates the trafficking of leukocyte by upregulation of adhesion molecule in vascular endothelial cells, leading to progression of colonic inflammation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

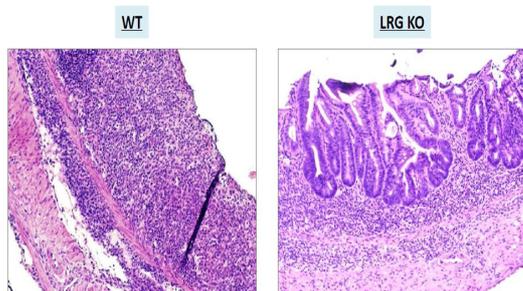
ロイシンリッチ 2-グリコプロテイン (LRG) は、1977 年にヒトの血清から単離された糖タンパクである。我々は、IBD(クローン病と潰瘍性大腸炎)などの免疫難病患者血清のプロテオミクス解析により、**病態の疾患活動性に応じて血清 LRG が上昇**することを見出した (*Ann Rheum Dis*, 2010、*Inflamm Bowel Dis*, 2010)。LRG の作用機序として TGF- $\beta$  を介した血管新生促進 (*Nature*, 2013)、アポトーシス抑制 (*Apoptosis*, 2010) などが報告されているが、依然としてその免疫難病との関わりは不明な点が多く、詳細な機能解析が待たれている。

IBD は厚生労働省より特定疾患に指定されている再発・寛解を繰り返す原因不明の難治性疾患であり**年々患者数が増加している**。遺伝要因、食事などの環境要因などが病因として推測されているが、免疫細胞の異常活性による**炎症性サイトカインの産生亢進**が重要な病態のひとつである。様々な抗サイトカイン製剤などが開発され有効性を発揮しているが、寛解導入が困難症例や治療不応症例が見られ、新規治療ターゲットの探索が必要な疾患である。

これまでの我々の研究によって

・ **IBD 活動期患者の腸管粘膜において LRG が検出**される

・ 腸炎モデル実験において、**LRG ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて腸炎が軽度**である (下図)



・ **LRG ノックアウトマウスは健康に発育**することが明らかとなっていた。

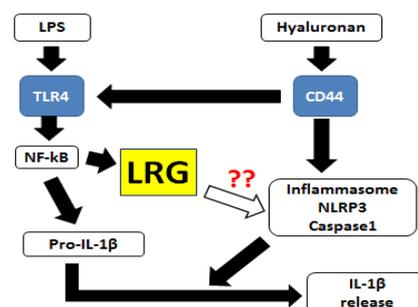
以上のことから LRG は生存には不要であるが

IBD の病態に直接関わっている可能性があり、有用な治療ターゲットとなることが推測される。

しかし、腸管粘膜局所における LRG と免疫細胞との関係は未解明であった。

我々はマクロファージマーカーである F4/80+CD11b+細胞の CD44 発現が野生型マウスと LRG ノックアウトマウスで差があることを確認している。また LRG ノックアウトマウスと野生型マウスの大腸の mRNA 発現を RNA array により解析したところ、野生型マウスと LRG ノックアウトマウスの間に CD44 発現で有意な差が確認された。CD44 の刺激によりマクロファージからの IL1- $\beta$ 、TNF、iNOS などの炎症性サイトカイン産生が亢進することがわかっており、そのメカニズムの一つにインフラマソームの関与が報告されている (*J Biol Chem* 2009)。

前述の RNA array 解析では CD44 発現に加え、LRG ノックアウトマウスと野生型マウスの間にインフラマソームの一種である **NLRP3** の発現に差が見られた。また、NLRP3 と共に IL-1 産生に関わる **caspase1** の発現が LRG ノックアウトマウスに比べ野生型マウスで有意に高くなっていた。プロモーター解析によって LRG は、炎症反応に重要に関わる重要な転写因子である NF- $\kappa$ B シグナルの下流に存在することも確認している。これらのことから腸炎時において **LRG は NLRP3 インフラマソームを介してマクロファージからの IL-1 および IL-18 の産生に関与しているのではない**かということが考えられた。(下図)



## 2. 研究の目的

上記のことから LRG の腸炎病態への関与をマクロファージにおける NLRP3 インフラマソームに着目して解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### In vivo 実験

3 %DSS で腸炎を誘導し、野生型、LRG ノックアウトマウス間における差異を観察した。具体的には炎症細胞浸潤などの組織学的評価、腸管粘膜における炎症性サイトカイン発現、血清サイトカインの測定などを行った。

### In vitro 実験

リコンビナント LRG タンパクを用いて、LRG の炎症反応への関わりを分子生物学的に解析した。

## 4. 研究成果

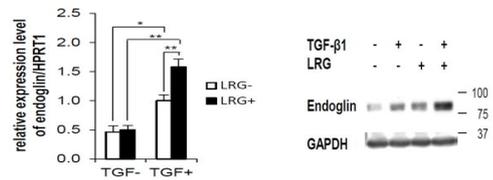
野生型および LRG ノックアウトマウスに DSS を強制投与し、腸管粘膜における 24 時間以内の経時的なサイトカインの発現を解析した。インフラマソームの下流である IL1

の発現は DSS 投与後速やかに上昇するが、野生型マウスと LRG ノックアウトの間に差は見られなかった。また、野生型マウスに比べ、LRG ノックアウトマウスで好中球やマクロファージの浸潤が減少し、LRG が炎症性細胞の浸潤に関与していることが示唆された。続いて炎症細胞浸潤に関わる KC, MCP-1, MIP-1

などのケモカインの産生量を測定したところ、野生型マウスと LRG ノックアウト間に差は見られなかった。すなわち、LRG はケモカイン産生量を増加させて炎症性細胞浸潤を増加させているのではなく、他の因子に関与して浸潤細胞数増加に関与していることが示唆された。

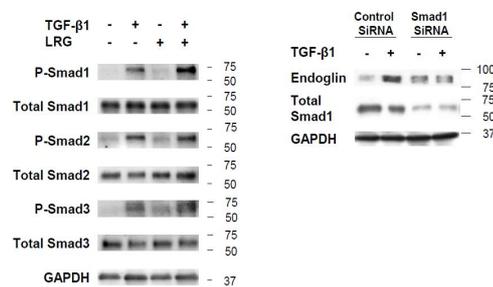
近年、LRG はエンドグリンと結合することで TGF シグナルの一つである Smad1 経路を増強することが報告されている (Nature 2013)。エンドグリンは血管内皮に発現し、細胞接着分子として機能するタンパクである。血管内皮細胞株 HUVEC にリコンビナント LRG を添加し、TGF 刺激を加えた。リコンビナント LRG 添加による VCAM, ICAM などの主要な接着分子に変化は見られなかったが、エンドグリン発現は LRG 添加によって増加し

た。(下図)



また、ヒト単球細胞株である THP-1 の HUVEC への接着を調べたところ、LRG の添加によって接着する細胞数が増加した。

これらの作用が Smad1 を介したものを証明する為に RNA 干渉法によって Smad1 を阻害したところ、LRG によるエンドグリン発現増加作用がキャンセルされた。(下図)



これらのことから LRG は TGF - Smad1 経路を介してエンドグリンの発現を増加し、血管内皮への炎症性細胞の接着を亢進することで炎症部位への細胞浸潤を促進していることが示唆された。当初 LRG が関与すると予想していた炎症性サイトカイン産生増強作用は、マクロファージの浸潤を増強することによる結果として生じていることが考えられる。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名

Takashi Mishima, Hayato Urushima, Minoru Fujimoto, Hiromi Honda, Lee Hyun, Tomoharu Ohkawara, Satoshi Serada, Tetsuji Naka

発表標題

Leucine-rich 2-glycoprotein (LRG) enhances colonic inflammation by

increasing leukocyte adhesion to  
TGF- $\beta$ -stimulated endothelium

学会名

The 13th International Workshop on  
Autoantibodies and Autoimmunity  
(IWAA2016)

発表年月日

2016年10月11日

発表場所

ウエスティン都ホテル京都(京都市東山区)  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇留島隼人( Urushima Hayato )

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養  
研究所・免疫シグナルプロジェクト・協力研  
究員

研究者番号: 90755745

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )