

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14951

研究課題名（和文）NSAIDsによる自然免疫応答の抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Unraveling inhibitory effects of NSAIDs on innate immune response

研究代表者

齊藤 達哉（SAITOH, Tatsuya）

徳島大学・先端酵素学研究所（次世代）・教授

研究者番号：60456936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：尿酸塩結晶に応じて活性化する自然免疫機構であるNLRP3インフラマソームは、痛風発作に深く関与している。NLRP3インフラマソームは、コレステロール結晶や遊離脂肪酸などの栄養代謝物によっても活性化し、動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病の発症要因となる。したがって、NLRP3インフラマソームは生活習慣病の治療・創薬標的として注目されている。我々は、痛風発作の際に使用される非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）がNLRP3インフラマソームに及ぼす影響を検討し、NSAIDsが異なる機序でその薬理効果を発揮していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：NLRP3-inflammasome, an innate immune system, is activated by monosodium urate crystals, and is involved in gout attack. NLRP3-inflammasome is also activated by metabolites such as cholesterol crystals and free fatty acids, and causes the development of lifestyle diseases. Therefore, NLRP3-inflammasome is considered as a target of therapy and drug development of lifestyle diseases. We have examined the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are used during a gout attack, on NLRP3-inflammasome, and found that they exert their pharmacological effects through different modes of action.

研究分野：生物系薬学

キーワード：抗炎症薬 NSAIDs 痛風 自然免疫 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化に伴い、痛風や高尿酸血症などの生活習慣病が社会的問題となって久しい。今や、痛風患者数は日本に約 100 万人、また痛風の予備軍である高尿酸血症患者数は約 1000 万人と、成人日本人男性の 2~3 割に存在するといわれている。

痛風は、特に第一中足趾節関節に好発する、非感染性急性炎症発作を特徴とする疾患である。近年の研究から、痛風の発症には、高尿酸血症が持続することにより析出した尿酸塩（プリン体最終代謝産物）の結晶に対する自然免疫を介した炎症が関わっていることが明らかになってきた。すなわち、本来は病原体を認識するはずの自然免疫機構が、過剰な栄養摂取等により関節腔内に蓄積した尿酸塩結晶を異物として認識し、炎症を惹起することで痛風を発症することが明らかになってきた。とりわけ、自然免疫関連受容体である NLRP3 を含む複合体（NLRP3 インフラマソーム）は、尿酸塩結晶をはじめ、コレステロール結晶や遊離脂肪酸などの生活習慣病関連代謝物により活性化することが示されており、生活習慣病の治療・創薬標的として注目されている（図 1・齊藤達哉, 痛風性関節炎の病態機序. 最新医学 別冊 診断と治療の ABC 105「高尿酸血症・痛風」(2015), Page 67-73. から抜粋）。

研究代表者らは、NLRP3 インフラマソームの活性化を微小管が促進すること、痛風発作緩解・予防薬であるコルヒチンが微小管重合阻害を介して痛風に対する抗炎症作用を発揮していることを明らかにするなど、痛風研究に取り組んできた。しかしながら、痛風発作の際に使用される非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)が NLRP3 インフラマソームに及ぼす影響については不明な点が多い。

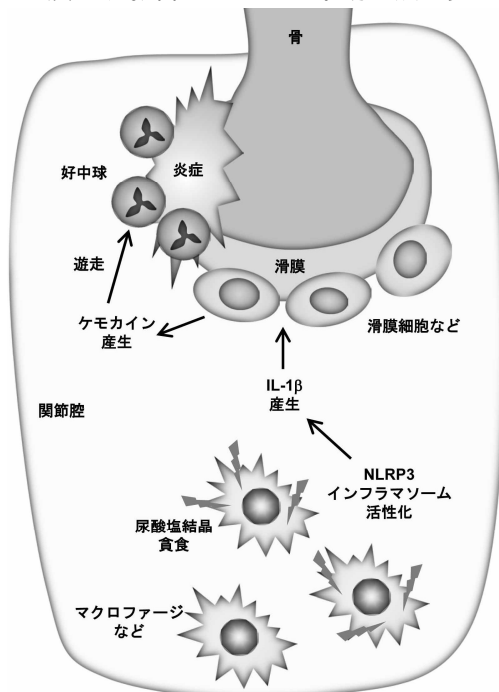


図 1 . NLRP3 インフラマソームと痛風発症

2. 研究の目的

本研究の目的は、NSAIDs が NLRP3 インフラマソームに及ぼす影響について、*in vitro* および *in vivo* の条件下で検討するものである。本研究により、痛風発作の治療薬の作用機序を理解し、より効果的な薬物療法の開発に資することを目指す。

3. 研究の方法

材料

本研究には、C57BL/6 マウスを用いた。自然免疫の担当細胞としては、当該マウスに 4% チオグリコレートを腹腔内投与して得られた腹腔渗出性マクロファージを用いた。

実験内容

・ NLRP3 インフラマソームに対する NSAIDs の阻害効果の測定
 腹腔渗出性マクロファージを、Pam3CSK4 による前処置を 6 時間行った後に、抗炎症薬存在下・非存在下で PBS に懸濁した尿酸結晶に暴露した。2 時間後に培養上清を回収し、IL-1β濃度を測定した。同様に、プリン体であるアデノシン三リン酸(ATP)、NLRP3 インフラマソーム以外のインフラマソームを活性化するリガンドであるフラジェリンや dsDNA による刺激を実施し、2 時間後に上清中の IL-1β濃度を ELISA により測定した。

・マウス痛風モデルを用いた NSAIDs の抗炎症効果についての評価
 痛風のモデルマウスにおいて NSAIDs が NLRP3 インフラマソームに与える影響を測定した。すなわち、C57BL/6 マウスに NSAIDs もしくは PBS を投与し、さらに 30 分後に尿酸塩結晶を腹腔内に投与して腹膜炎を惹起させ、6 時間後に腹腔内における IL-1β濃度を ELISA により測定した。

4. 研究成果

痛風は、尿酸塩結晶に対する NLRP3 インフラマソームの活性化により発症する。しかし、この機構が知られるようになる前から、痛風発作に対してジクロフェナクやロキソプロフェンなどの NSAIDs が投与されており、その有効性が良く知られてきた。

C57BL/6 マウスの腹腔渗出性マクロファージに対して尿酸塩結晶による刺激を行ったところ、ジクロフェナク投与により IL-1β濃度が有意に低下した。一方で、ロキソプロフェン投与では IL-1β濃度は低下しなかった。尿酸塩と同じプリン体である ATP で刺激した場合にも、ジクロフェナク投与により IL-1β濃度は低下するが、ロキソプロフェン投与では低下しなかった。フラジェリンや dsDNA で刺激した場合には、ジクロフェナクでは IL-1β濃度は低下しなかった。尿酸塩結晶の刺激に応じて放出されるプロスタグランジン E2 (PGE2)濃度は、ジクロフェナクとロキソプロフェンのそれぞれの投与によ

り低下した。さらに、尿酸塩結晶を腹腔内に投与することで惹起する腹膜炎（痛風のマウスモデル）においては、ジクロフェナクを投与することにより、NLRP3 インフラマソームを介して放出が誘導される IL-1 β の濃度が有意に低下した。

尿酸塩結晶およびATPによるIL-1 β 放出を抑制したことから、ジクロフェナクはファゴサイトーシスを阻害しているわけではなく、尿酸塩結晶及びATPの両方が活性化する共通のシグナル伝達経路を阻害している可能性が高い。また、フラジェリンにより活性化されるNLRC4 インフラマソームを介したIL-1 β 放出やdsDNAにより活性化されるAIM2 インフラマソームを介したIL-1 β 放出を抑制しなかったことから、ジクロフェナクはNLRP3 インフラマソームを選択的に阻害することが示唆される。シクロオキシゲナーゼ(COX)に対する既知の薬理作用から予想できるように、ジクロフェナクおよびロキソプロフェンはともに尿酸塩結晶に応じて放出されるPGE2の濃度を低下させた。

ジクロフェナクおよびロキソプロフェンは、どちらも痛風発作における炎症に対して投与される。一方で、本研究で示されたように、NLRP3 インフラマソームを介したIL-1 β の放出に対する効果は両治療薬では異なっていた。ロキソプロフェンと比べて、痛風発作の治療薬としてジクロフェナクはより強力な抗炎症効果を発揮すると考えられている。上記の結果から、特に強い効果を発揮するジクロフェナクは、COXを介したPGE2の放出だけでなく、NLRP3 インフラマソームを介したIL-1 β の放出を抑制することにより、炎症を緩和している可能性が考えられた(図2)。これらの解析結果は、尿酸塩結晶によって引き起こされる痛風発作の病態とその効果的な抑制法を解明し、より効果的な薬物療法の開発を目指す上での重要な知見である。

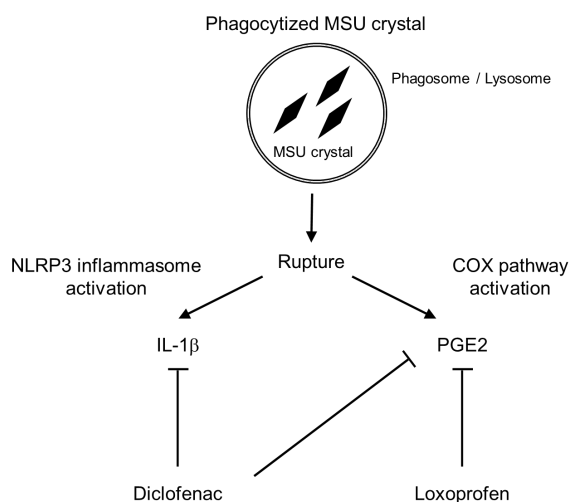


図2 . 痛風発作治療薬として予想されるジクロフェナクの作用機序

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19件)

齊藤達哉、オートファジーによる炎症制御、最新医学、査読無、71巻、2016、16-22

高瀨 充寛、齊藤 達哉、痛風関節炎の発症機序、日本臨床 増刊号 高尿酸血症・低尿酸血症、査読無、74巻、2016、31-36

Imagawa Y, Saitoh T, Tsujimoto Y. Vital staining for cell death identifies Atg9a-dependent necrosis in developmental bone formation in mouse. Nat Commun. 査読有. 7, 2016, 13391. doi: 10.1038/ncomms13391

Santeford A, Wiley LA, Park S, Bamba S, Nakamura R, Gdoura A, Ferguson TA, Rao PK, Guan JL, Saitoh T, Akira S, Xavier R, Virgin HW, Apte RS. Impaired Autophagy in Macrophages Promotes Inflammatory Eye Disease. Autophagy. 査読有. 12, 2016, 1876-1885. doi: 10.1080/15548627.2016.1207857

Saitoh T, Akira S. Regulation of inflammasomes by autophagy. J Allergy Clin Immunol, 査読有. 138, 2016, 28-36. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.009

Isaka Y, Takabatake Y, Takahashi A, Saitoh T, Yoshimori T. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. Nephrol Dial Transplant. 査読有. 31, 2016, 890-896. doi: 10.1093/ndt/gfv024

Park S, Buck MD, Desai C, Zhang X, Loginicheva E, Martinez J, Freeman ML, Saitoh T, Akira S, Guan JL, He YW, Blackman MA, Handley SA, Levine B, Green DR, Reese TA, Artyomov MN, Virgin HW. Autophagy Genes Enhance Murine Gammaherpesvirus 68 Reactivation from Latency by Preventing Virus-Induced Systemic Inflammation. Cell Host Microbe. 査読有. 19, 2016, 91-101. doi: 10.1016/j.chom.2015.12.010

Klionsky DJ, et al. (Saitoh Tを含めて2000人以上の著者). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 査読無. 12, 2016, 1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356

Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol*. 査読有. 16, 2015, 1014-1024. doi:10.1038/ni.3273

Misawa T, Saitoh T, Kozaki T, Park S, Takahama M, Akira S. Resveratrol inhibits the acetylated α -tubulin-mediated assembly of the NLRP3-inflammasome. *Int Immunol*. 査読有. 27, 2015, 425-434. doi:10.1093/intimm/dxv018.

三澤拓馬、審良静男、齊藤達哉、尿酸塩結晶による炎症惹起の分子機序、高尿酸血症と痛風、査読無、23巻、2015、20-26

高濱充寛、齊藤達哉、最新文献紹介 - ケトン代謝物である β -ヒドロキシ酪酸はNLRP3インフラマソームに起因する炎症性疾患の発症を抑制する -、高尿酸血症と痛風、査読無、23巻、2015、106

齊藤達哉、オルガネラ接触領域を介した自然免疫応答の誘導、実験医学、査読無、33巻、2015、2574-2578

齊藤達哉、ミトコンドリア損傷による自然免疫の活性化と炎症関連疾患、医学のあゆみ、査読無、254巻、2015、459-464

三澤拓馬、齊藤達哉、審良静男、NLRP3インフラマソームと痛風関節炎、痛風と核酸代謝、査読無、39巻、2015、1-6

齊藤達哉、オートファジー関連因子による自然免疫応答の制御、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、40巻、2015、483-488

齊藤達哉、痛風性関節炎の病態機序、最新医学 別冊 診断と治療のABC 105 「高尿酸血症・痛風」、査読無、2015、67-73

三澤拓馬、審良静男、齊藤達哉、インフラマソームの活性化機構、臨床免疫・アレルギー科、査読無、63巻、2015、489-494

三澤拓馬、審良静男、齊藤達哉、微小管によるミトコンドリアの局在制御がNLRP3インフラマソームの活性化を促進する、細胞工学、査読無、34巻、2015、567-570

〔学会発表〕(計12件)

齊藤達哉、中山昌喜、高濱充寛、NLRP3インフラマソーム活性化を阻害する化合物の同定、日本薬学会第137年会、一般口頭発表、2017年3月26日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

齊藤達哉、高濱充寛、リソソーム損傷により引き起こされる自然免疫応答の制御メカニズム、第90回日本薬理学会年会、一般口頭発表、2017年3月16日、長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市)

Tatsuya Saitoh、The roles of organelle communication in innate immune responses、第45回日本免疫学会学術集会、シンポジウム招待講演、2016年12月7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Tatsuya Saitoh、Organelle Crosstalk Mediates Innate Immune Response、第89回日本生化学会大会、シンポジウム招待講演、2016年9月26日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

Tatsuya Saitoh、Role of mitochondria in regulation of innate immune response、The KSBMB International Conference 2016、招待講演、2016年5月19日、ソウル市(韓国)

齊藤達哉、高濱充寛、三澤拓馬、審良静男、大気汚染物質により惹起される炎症反応の理解と制御法開発、第86回日本衛生学会学術総会、一般口頭発表、2016年5月14日、旭川市民文化会館(北海道旭川市)

齊藤達哉、高濱充寛、オートファジーによるNLRP3インフラマソーム活性化の制御、日本薬学会第136年会、一般口頭発表、2016年3月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

齊藤達哉、フィトケミカルによる自然炎症の抑制、第89回日本薬理学会年会、一般口頭発表、2016年3月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

齊藤達哉、NLRP3インフラマソーム活性化を阻害する化合物の同定、第68回日本薬理学会西南部会、一般口頭発表、2015年11月21日、海峡メッセ下関(山

口県下関市)

齊藤達哉、オートファジー関連因子による自然免疫応答の制御、第9回オートファジー研究会、招待講演、2015年11月17日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

齊藤達哉、感染防御における自然免疫の役割、第47回日本小児感染症学会総会・学術集会、ランチョンセミナー招待講演、2015年11月1日、ザ・セレクトン福島(福島県福島市)

齊藤達哉、ミトコンドリア損傷に応じて誘導される新たな自然免疫応答、第24回日本 Cell Death 学会学術集会、シンポジウム招待講演、2015年7月11日、大阪大学会館(大阪府豊中市)

〔図書〕(計1件)

藏城雅文、南勲、小川佳宏、福原淳範、齊藤達哉、三澤拓馬、審良静男、小島淳、小川久雄、筒井裕之、外24名、メディカルレビュー社、ここまで明らかになった!尿酸代謝ワールドと高尿酸血症の病態解明~診療と医学の最前線~、2015、160ページ(40-45)

〔その他〕

・表彰

雑誌論文 (Misawa T, et al) が International Immunology 誌の Outstanding Merit Award 2015 に選出された。

・ホームページ等

<http://saitoh Tatsuya.wixsite.com/saitohlab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 達哉 (SAITOH, Tatsuya)
徳島大学先端酵素学研究所・教授
研究者番号：60456936