

平成30年 5月10日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07151

研究課題名(和文)急性肺傷害における無菌性炎症の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying sterile inflammation in acute lung injury

研究代表者

水品 佳子(Mizushina, Yoshiko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70458321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：誤嚥性肺臓炎の病態におけるIL-1 およびNLRP3インフラマソームの役割を解明するため、マウス誤嚥性肺臓炎モデルを用いて解析し、IL-1^{−/−}がNLRP3インフラマソーム非依存的に肺傷害の進行に関与することを明らかにした。
続いて酸刺激で誘導されるカスパーゼ-1非依存的な新規IL-1 プロセシング機構を解明する目的で、THP-1細胞をpH 1.75酸性溶液で刺激したところ20-kDa成熟型IL-1 (以下p20-IL-1) がプロセシングされた。p20-IL-1は、カスパーゼ-1非依存的に未知のアミノ酸切断部位でプロセシングされることを明らかにし、そのアミノ酸切断部位を質量分析で解析中である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of NLRP3 inflammasome-driven IL-1^{−/−} production in a mouse model of acid aspiration-induced inflammation and ALI. Acid aspiration induced inflammatory responses and ALI in wild-type mice, and these were significantly attenuated in IL-1^{−/−} mice; however, acid aspiration-induced ALI and IL-1^{−/−} production were not inhibited in NLRP3-KO mice. In vitro experiments revealed that acidic stress (pH 1.75) induced pro-IL-1^{−/−} processing into its 20-kDa mature form (p20-IL-1^{−/−}), which was different from caspase-1-processed 17-kDa form (p17-IL-1^{−/−}), in human THP-1 macrophages. Acidic stress-produced p20-IL-1^{−/−} was prevented by inhibitors for serine proteases (AEBSF), but not for cysteine proteases (E-64) and cathepsin G. We generated THP-1 macrophages constitutively expressing human IL-1^{−/−} which have known cleavage site mutations, and found that acidic stress failed to process these mutants.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：炎症 酵素 細胞・組織 肺疾患 免疫学

1. 研究開始当初の背景

急性肺傷害 (acute lung injury : ALI) や急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome : ARDS) は全身性炎症や肺組織の直接的な傷害によって誘導される。その病態には、各種炎症性サイトカインや好中球エラスターゼの関与等が報告されているが、その詳細は不明で、現在においても ARDS の死亡率は 20~30% と高いことから、有効な治療法の開発が急務となっている。

近年、病原体が直接的には関与しない無菌性炎症に、炎症性サイトカインである IL-1 β (interleukin-1 β) の関与が示されている。IL-1 β は前駆体 (pro-IL-1 β) として分泌された後、プロテアーゼにより活性型 IL-1 β にプロセッシングされる。これを行う代表的なプロテアーゼがカスパーゼ-1 である。カスパーゼ-1 の活性化は、Nod-like receptor である NLRP3 とアダプター分子 ASC、カスパーゼ-1 で構成される NLRP3 インフラマソームと呼ばれる細胞質内蛋白質複合体によって主に制御されることが知られている (図 1)。危険シグナルを認識することで NLRP3 インフラマソームが形成され、ALI を含む様々な疾患の無菌性炎症を惹起することが報告されている。一方で、IL-1 β のプロセッシングには、カスパーゼ-1 以外のプロテアーゼも関与する (インフラマソーム非依存性 IL-1 β プロセッシング) が、その詳細は不明である。

誤嚥性肺臓炎は、pH 2.5 未満の胃内容物 (胃酸および食物残渣) の誤嚥により発症し、ALI を合併する。強酸の胃内容物を誤嚥することで、肺上皮細胞が直接傷害されて炎症細胞が浸潤し、炎症性サイトカインや活性酸素種が産生されることで ALI の病態が誘導される。一方、申請者は、肺腔内に常在する肺泡マクロファージが NLRP3 インフラマソームを強く発現していることを確認している (図 2 : Western blot 法。初代培養細胞を使用)。そこで、誤嚥性肺臓炎では、酸刺激によって肺泡マクロファージの NLRP3 インフラマソームが活性化し、炎症が惹起されるとの仮説の検証を行った。ところが、IL-1 β 欠損マウスでは傷害の程度が有意に軽減されたにも関わらず、NLRP3 欠損マウスでは改善を認めなかった。また、気管支肺泡洗浄液 (BALF) 中の IL-1 β 濃度は、塩酸気管内投与により上昇するが、野生型 (WT) マウスと NLRP3 欠損マウスで有意差を認めなかった (図 3)。以上の予備的な検討から、この病態では、NLRP3 に非依存的な IL-1 β プロセッシング機構が存在する可能性が示された。

一方、本病態における NLRP3 以外のインフラマソームの構成分子である ASC やカスパーゼ-1 の役割は不明である。これに関して、最近、申請者らを含むいくつかのグループから、これらの構成分子がインフラマソームとは独立した各々の分子固有の機能を持っていることが報告されており (J Biol Chem.

290:5065-77, 2015, J Immunol 192:4342-4351, 2014 等)、インフラマソームに関連する各々の欠損マウスを用いて検証する必要がある。

また、申請者による培養マクロファージを用いた予備的な解析では、pH 1.75 の酸性溶液刺激によって IL-1 β 前駆体は成熟型 IL-1 β にプロセッシングされたが、それはカスパーゼ-1 によってプロセッシングされた IL-1 β (17-kDa) とともに、異なる分子量の IL-1 β (20-kDa) がより明瞭に検出された (図 4 : Western blot 法)。つまり、in vitro の系においても酸刺激によってカスパーゼ-1 以外のプロテアーゼによる IL-1 β プロセッシング機構があることが明らかとなった。しかし、この酸刺激によって活性化されるプロテアーゼが IL-1 β のアミノ酸配列のどこを切断するのか、どのような機序で誘導されるのかについては、現在のところ、全くわかっておらず、これまで報告もない。

【国内外における研究動向】

これまで、誤嚥性肺臓炎におけるインフラマソームや IL-1 β の役割を検証した報告はない。また、IL-1 β のカスパーゼ-1 非依存的なプロセッシング機構については、好中球エラスターゼやカテプシン G 等での報告が散見されるが、その詳細は明らかではない。

図 1

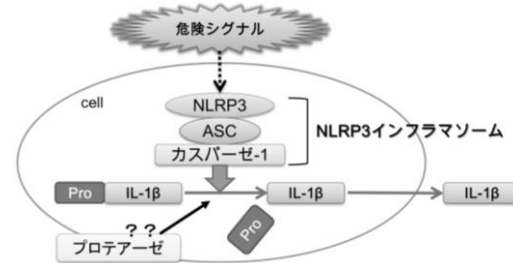


図 2

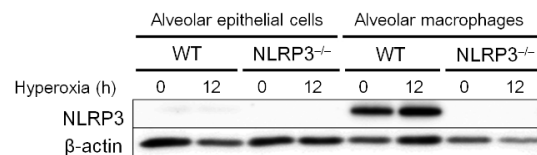
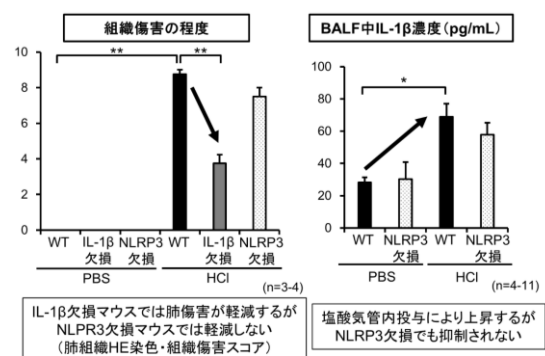
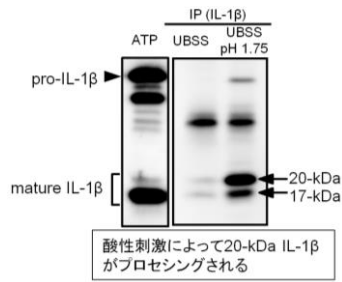


図 3



Data are expressed as mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01.

図 4



2. 研究の目的

急性肺傷害における無菌性炎症の重要性が示されているが、その炎症が惹起される分子機序は未だ解明されていない。我々は、これまで様々な肺傷害における炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を制御する新規炎症経路であるインフラマソームの役割について研究してきた。その過程において、胃酸誤嚥により発症する誤嚥性肺臓炎が、IL-1 β による無菌性炎症によって惹起されることを見出した。ところが、この IL-1 β 産生はインフラマソーム非依存性であり、誤嚥性肺臓炎の病態では、インフラマソームによって活性化される IL-1 β のプロセッシング酵素、カスパーゼ-1 とは異なる酵素（プロテアーゼ）による新たなプロセッシング機構が存在することが示唆された。そこで今回、誤嚥性肺臓炎における IL-1 β の役割、およびカスパーゼ-1 非依存性の IL-1 β プロセッシング機構を解明し、さらには誤嚥性肺臓炎を含む急性肺傷害における無菌性炎症の分子基盤を解明し、急性肺傷害における新たな治療標的の同定することを目的に研究を行った。

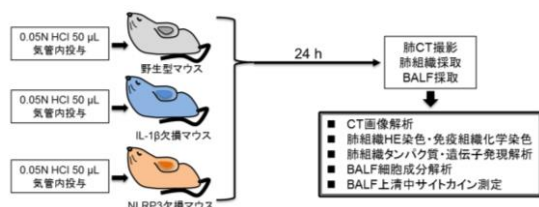
3. 研究の方法

【研究計画 1】誤嚥性肺臓炎の病態における IL-1 β および NLRP3 インフラマソームの役割

マウスの気管内に 0.05 N 塩酸を投与することで、マウス誤嚥性肺臓炎モデルを作製し、組織染色 (HE) を行い、肺傷害の程度を評価した。BALF 中の IL-1 β を ELISA 法で測定するとともに、肺組織における IL-1 β を含む炎症性サイトカイン/ケモカインの発現や炎症細胞浸潤を Real-time RT-PCR 法や免疫染色法、フローサイトメトリー法で解析した。

誤嚥性肺臓炎における IL-1 β および NLRP3 インフラマソームの役割を検証するため、NLRP3 および IL-1 β の各欠損マウスに同モデルを作製して検討した (図 5)。

図 5



【研究計画 2】酸刺激で誘導されるカスパーゼ-1 非依存的な新規 IL-1 β プロセッシング機構の解明

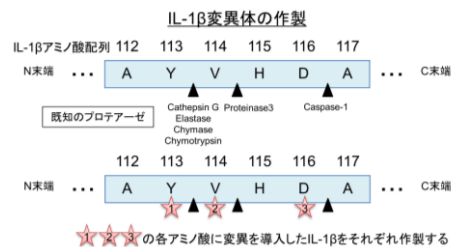
培養マクロファージ (マウス腹腔マクロファージ・ヒト単球性白血病細胞株 [THP-1]) に、酸刺激 (pH 1.75 溶液) を加えた際の IL-1 β の産生を ELISA 法で、IL-1 β のプロセッシングを Western blot 法で解析した。酸刺激による IL-1 β の産生およびプロセッシングはすでに確認しており、インフラマソーム活性化経路との関連を探るため、カスパーゼ-1 阻害剤 (Z-YVAD)、ミトコンドリア活性酸素種阻害剤 (Mito-TEMPO)、リソソーム阻害剤 (CA074-Me)、K 流出阻害 (KCl 130 mEq/L) 等による影響を検討した。

責任プロテアーゼを同定するため、以下の①～③の手法を用いて解析を行った。

① システイン・セリンプロテアーゼに対する各種プロテアーゼ阻害剤 (AEBSF、E64、Cathepsin G Inhibitor I、Pepstatin A 等) を用いて候補となるプロテアーゼの同定を試みた。

② 既知の IL-1 β のプロセッシング部位のアミノ酸配列に変異を導入した IL-1 β (Y113D・V114E・D116I) を作製し、レンチウイルスベクターを用いて THP-1 細胞に導入した。これら変異 IL-1 β を導入した THP-1 細胞を用いてプロセッシング部位の解析を行った (図 6)。

図 6



③ 酸刺激による新規プロセッシング部位の同定を行なうため、プロセッシングされた IL-1 β を SDS-PAGE ゲルから抽出し、質量分析 (MS) で解析した (図 7)。この解析のためには、約 50~100 ng の切断 IL-1 β が必要であることから、大量の THP-1 培養上清を限外ろ過カラムで精製・濃縮し、さらに Ni アガロースビーズ、抗 Flag 抗体アフィニティゲルを用いて精製した。

図 7



4. 研究成果

誤嚥性肺臓炎の病態における IL-1 β および NLRP3 インフラマソームの役割

IL-1 β は NLRP3 非依存的に誤嚥性肺臓炎の病態に関与する

WT、IL-1 β 欠損 (以下 IL-1 $\beta^{-/-}$) および NLRP3 欠損 (以下 NLRP3 $^{-/-}$) マウスの気管内に PBS もしくは 0.05N 塩酸 50 μ L を投与し、投与 24 時間後に解析を行った。WT マウスの肺組織 HE 染色では塩酸投与により肺うっ血・出血、炎症細胞浸潤や肺胞壁の浮腫を認めた。肺傷害を定量化したところ IL-1 $\beta^{-/-}$ マウスでは WT マウスと比較して有意に肺傷害が軽減したが、NLRP3 $^{-/-}$ マウスでは WT マウスと有意差を認めなかった (図 8A, B)。

BALF 中の IL-1 β は、塩酸投与により有意に増加したが、WT マウスと NLRP3 $^{-/-}$ マウスに有意差を認めなかった (図 8C)。WT マウスの肺組織における IL-1 β mRNA の発現量は塩酸投与により有意に増加した (図 8D)。以上の結果から IL-1 β は NLRP3 インフラマソーム非依存的にマウス誤嚥性肺臓炎モデルの病態に関与していることが示唆された。

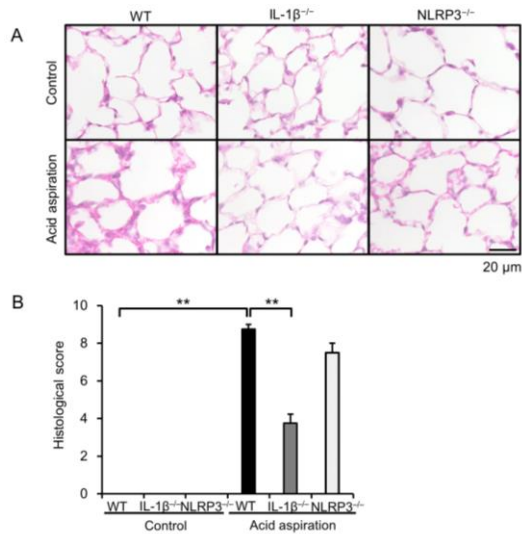
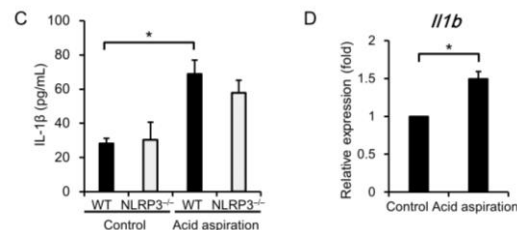


図 8



IL-1 β の欠損は炎症細胞浸潤および ROS 産生を軽減する

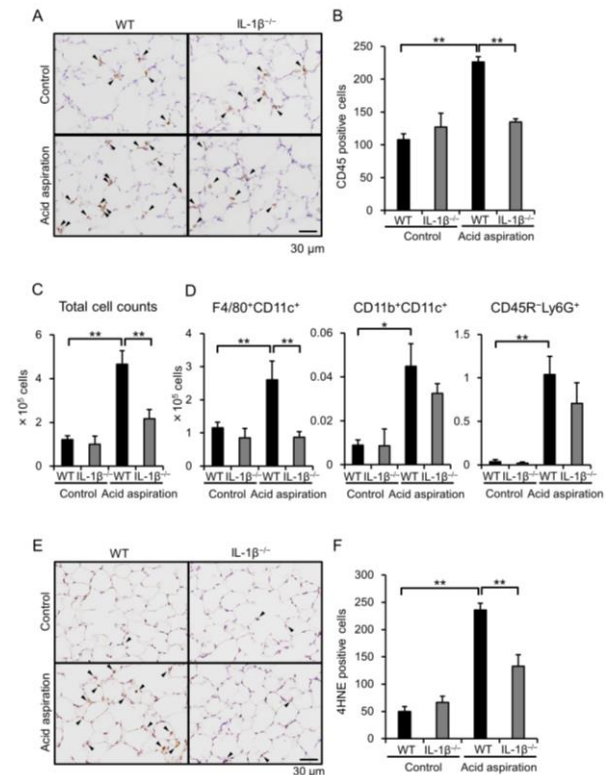
肺組織における炎症細胞浸潤を評価する目的で、CD45 による肺組織の免疫染色を行った。

塩酸投与により WT マウスでは CD45 陽性細胞が増加し、IL-1 $\beta^{-/-}$ マウスではその増加が

有意に抑制された (図 9A, B)。BALF 中の炎症細胞の解析では、総細胞数、肺胞マクロファージ (F4/80 $^{+}$ /CD11c $^{+}$)、活性化マクロファージ (CD11b $^{+}$ /CD11c $^{+}$)、好中球 (CD45R $^{+}$ /Ly6G $^{+}$) は塩酸投与後の WT マウスで有意に増加した (図 9C, D)。WT マウスと比較して、IL-1 $\beta^{-/-}$ マウスでは、総細胞数、肺胞マクロファージの増加は有意に抑制され、活性化マクロファージと好中球数も抑制される傾向を認めた。

4-HNE 免疫染色による ROS 産生の評価では、塩酸投与後の WT マウスで陽性細胞数が増加し、IL-1 $\beta^{-/-}$ マウスではその増加が有意に抑制された (図 9E, F)。

図 9



酸刺激で誘導されるカスパーゼ-1 非依存的な新規 IL-1 β プロセシング機構の解明

酸性刺激によりマクロファージの IL-1 β プロセシングが誘導される

マクロファージ分化させた THP-1 細胞を pH 1.75 酸性溶液で刺激したところ、上清中の IL-1 β は有意に増加した (図 10A)。

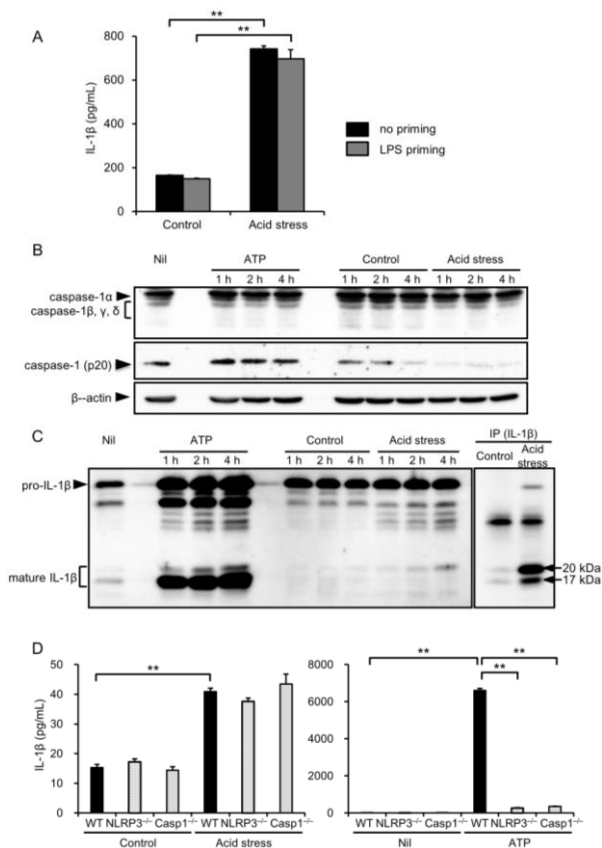
一方で、酸性溶液刺激後の THP-1 細胞を Western blot 法で解析したがカスパーゼ-1 の活性化を示す p20 は検出されず (図 10B)、酸性刺激による THP-1 細胞の IL-1 β プロセシングは NLRP3 インフラマソーム非依存的であることが示唆された。加えて、酸性刺激後の THP-1 細胞上清中の IL- β を Western blot 法で解析したところ、代表的なカスパーゼ-1 活性化物質である ATP 刺激では 17-kDa の成熟型

IL-1 β (以下 p17-IL-1 β) が検出されたが、酸性刺激ではそれとは異なる 20-kDa の成熟型 IL-1 β (以下 p20-IL-1 β) が検出された (図 10C)。

マウス腹腔由来マクロファージを用いた解析では、WT マウス由来マクロファージを ATP で刺激すると、上清中の IL-1 β は増加し、NLRP3^{-/-}マウス由来およびカスパーゼ-1 欠損 (以下 Casp1^{-/-}) マウス由来マクロファージではその増加が抑制された (図 10D)。酸性刺激では、WT マウス由来マクロファージで IL-1 β の増加を認めるが、その増加は NLRP3^{-/-}マウス由来および Casp1^{-/-}マウス由来マクロファージでは抑制されなかった (図 10D)。

以上の結果から、マクロファージの酸性刺激における、NLRP3 インフラマソーム非依存的な p20-IL-1 β のプロセッシング機構の関与が示唆された。

図 10



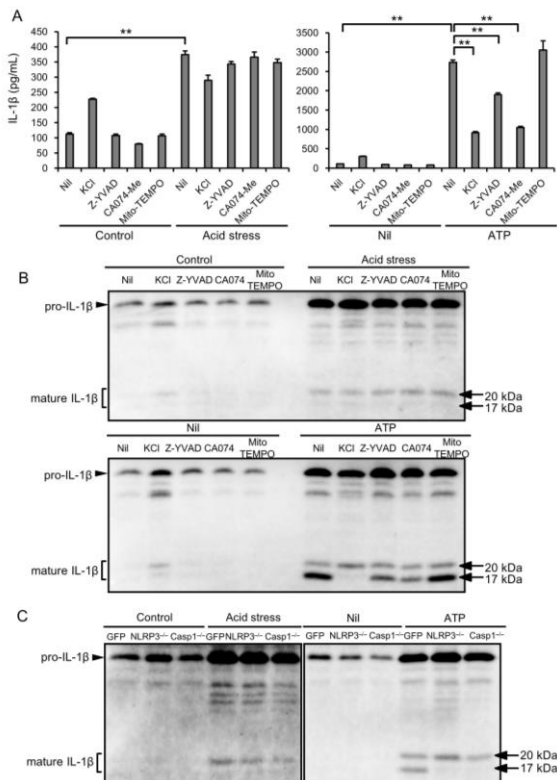
酸性刺激は NLRP3 インフラマソーム非依存的な IL-1 β のプロセッシングを誘導する

インフラマソーム活性化経路との関連を調べるため、NLRP3 インフラマソームの抑制に関与する K 流出阻害剤 (KCl 130 mEq/L)、カスパーゼ-1 阻害剤 (Z-YVAD)、リソソーム阻害剤 (CA074-Me)、ミトコンドリア活性酸素阻害剤 (Mito-TEMPO) を用いたが、酸性刺激による IL-1 β の産生および p20-IL-1 β のプロセッシングは抑制されなかった (図 11A, B)。

CRISPER/Cas9 によって作製した NLRP3^{-/-}

および Casp1^{-/-} THP-1 細胞でも p20-IL-1 β のプロセッシングは抑制されなかった。以上の結果は、p20-IL-1 β のプロセッシングが NLRP3 インフラマソーム非依存的であることを示唆するこれまでの結果に矛盾しないものであった。

図 12



酸性刺激による IL-1 β プロセッシングにはセリンプロテアーゼが関与する

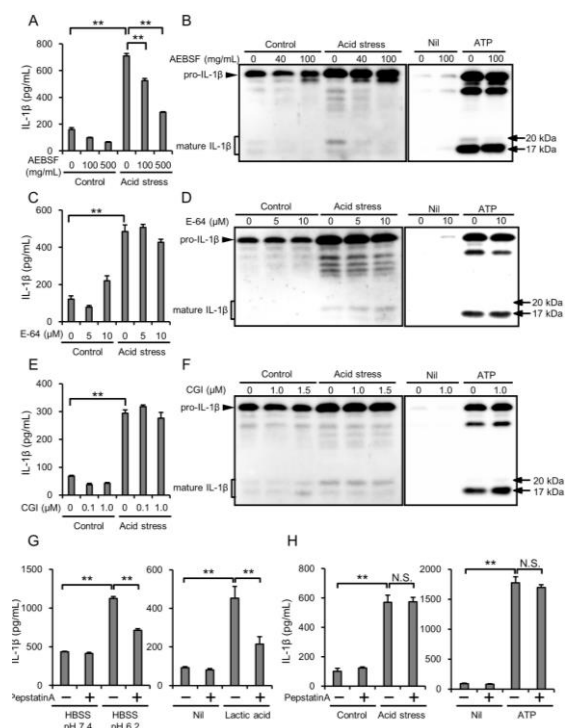
p20-IL-1 β の責任プロテアーゼを同定するため、まずはシステイン・セリンプロテアーゼに対する各種プロテアーゼ阻害剤を用いた解析を行った。AEBSF (セリンプロテアーゼ阻害剤) および E-64 (システインプロテアーゼ阻害剤) を添加したところ、AEBSF により p20-IL-1 β のプロセッシングが抑制され (図 12A, B)、E-64 では抑制されなかった (図 12C, D)。

そこで THP-1 細胞に発現していることが報告されているセリンプロテアーゼであるカテプシン G の阻害剤である CGI を添加したが、p20-IL-1 β のプロセッシングは抑制されなかった (図 12E, F)。

過去の報告で弱酸性刺激 (pH 6.2) および乳酸刺激により THP-1 細胞で p20-IL-1 β がプロセッシングされ、それはカテプシン D 阻害剤である pepstatin A により抑制されることが示されている。そこで THP-1 細胞に弱酸性刺激および乳酸刺激を行ったところ、過去の報告と同様に、IL-1 β の産生は増加し、それは pepstatin A により抑制された (図 12G)。一方で pH 1.75 酸性刺激による IL-1 β 酸性は pepstatin A では抑制されず (図 12F)、異なる

プロテアーゼが p20-IL-1 β のプロセシングに
関与していることが示された。

図 12



酸性刺激では未知のアミノ酸切断部位で IL-1 β がプロセシングされる

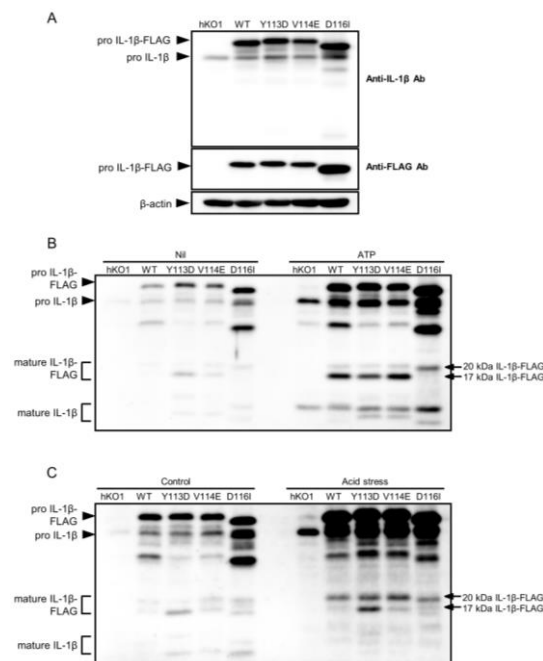
次に、p20-IL-1 β プロセシングにおけるアミノ酸切断部位を明らかにする目的で、既知の IL-1 β のプロセシング部位のアミノ酸配列に変異を導入した IL-1 β (Y113D・V114E・D116I) を THP-1 細胞に導入し解析を行った (図 13A)。

カスパーゼ 1 の切断部位の変異体である D116I は ATP による p17-IL-1 β のプロセシングが抑制されたが (図 13B)、いずれの変異においても p20-IL-1 β のプロセシングは抑制されなかった (図 13C)。

以上の結果から、酸性刺激による p20-IL-1 β のプロセシングは既知のプロセシング部位とは異なるアミノ酸配列でプロセシングされていることが示された。

続いて、プロセシングされた IL-1 β を質量分析 (MS) で解析し、アミノ酸の切断部位を同定することを試みた。まず初めに Flag-tag・His-tag 付き IL-1 β を THP-1 細胞に導入し、酸刺激を添加して、大量の THP-1 培養上清を作製した。それを限外ろ過カラムで精製・濃縮し、さらに Ni アガロースビーズ、抗 Flag 抗体アフィニティーゲルを用いて精製した。精製した IL-1 β を SDS-PAGE ゲルから抽出し、質量分析を行い、p20-IL-1 β のアミノ酸のプロセシング部位の候補を選定した。現在はその結果を受けて、追加実験を行っている。

図 13



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 2 件)

1. Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mizushina Y, Nakamura J, Kamata R, Kasahara T, Horie H, Sata N, Takahashi M. Interaction of Neutrophils with Macrophages Promotes IL-1 β Maturation and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol* 199;3306-3315, 2017.

2. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushina Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hasebe N, Takahashi M. NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Sci Rep* 6:26489, 2016.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

水品 佳子 (MIZUSHINA, Yoshiko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70458321

(2)研究協力者

高橋 将文 (TAKAHASHI, Masafumi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40296108