

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09521

研究課題名(和文) インフラマソームとは独立したアダプター分子ASCの役割の解明

研究課題名(英文) Role of adapter molecule ASC independent of inflammasome

研究代表者

河西 文武 (Kawanishi, Fumitake)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：50585560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生活習慣病など無菌的な炎症反応の惹起に重要なインフラマソームが静脈血栓、動脈血栓モデルでの血栓形成に関与すると考え、療標的としての有用性を明らかにし、インフラマソーム制御による新規の治療戦略の構築を目的とした。その結果、これらの疾患ではインフラマソームとは独立にASC分子がP-selectinの活性化に寄与し、血栓形成に関与することを明らかにした。今後、ASCがP-selectinの活性化にどのように寄与しているか詳細なメカニズムの検討を行なうことで、ASCによるP-selectin制御機構が明らかにし、血栓に関連する様々な疾患の病態解明や新たな治療法の開発に取り組みたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NLRP3インフラマソームは痛風の原因となる尿酸結晶など生体外の無菌的な危険因子を認識し活性化することから注目され、動脈硬化(Nature;464, 2010)や肥満(Cell Metab;12, 2010, Nat Med;17, 2011)といった生活習慣病においても重要な役割を持つことが報告されている。に関してはこれまで血小板におけるインフラマソームの活性化についての報告はあるが(Blood;122, 2013)、血栓形成に直接関与する報告は全くない。本研究により、血栓に関連する様々な疾患の病態解明や新たな治療法の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we thought that the inflammasome, which is important for inducing aseptic inflammatory reactions such as lifestyle-related diseases, was involved in thrombus formation in venous thrombosis and arterial thrombosis models, clarified its usefulness as a therapeutic target, and regulated inflammasome control. The objective was to construct a new treatment strategy by as a result, it was clarified that in these diseases, ASC molecule contributes to the activation of P-selectin independently of inflammasome and was involved in thrombus formation. In the future, by examining the detailed mechanism of how ASC contributes to the activation of P-selectin, the mechanism of P-selectin regulation by ASC would be clarified, and the pathology of various diseases related to thrombosis and I would like to work on the development of new treatment methods.

研究分野：炎症・免疫

キーワード：炎症 免疫 生活習慣病 血栓症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフラマソームの中でも NLRP3 インフラマソームは痛風の原因となる尿酸結晶、傷害により細胞外へ放出された ATP といった生体内の無菌的な危険因子や石綿肺の原因となる石綿や珪肺の原因となる二酸化珪素といった生体外の無菌的な危険因子を認識し、カリウムの流出、リソソームの傷害、ミトコンドリア由来の活性酸素種 (ROS) を介して活性化することが知られている。このことから NLRP3 インフラマソームは最近最もよく研究されているインフラマソームであり、動脈硬化(Nature;2010)や肥満(Cell Metab;2010, Nat Med;2011)といった生活習慣病において、無菌性の炎症反応を引き起こす原因であるという報告がなされている。しかし、これらの報告とは逆に動脈硬化や肥満から引き起こされる脂肪肝において、インフラマソームの構成分子を欠損しても病態が改善されないという報告や、むしろ増悪するという報告もある (Cell Death Dis;2011, Nature;2012)。我々はこれまで様々な循環器疾患モデルにおけるインフラマソームの重要性についてこれまで報告してきているが(Circulation;2008, 2011, BBRC;2012, ATVB;2015)、静脈血栓形成モデルでは ASC を欠損することで病態が増悪化することが分かってきた。さらに動脈硬化発症モデルでは、抗生剤を投与することにより、ASC 欠損マウスの動脈硬化形成の増悪化を抑制するということが判明した。これらのことから、我々は ASC 欠損マウスにはインフラマソームとは独立した分子機構が存在し、腸内細菌叢の変化等を介し病態を増悪化させているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

当初本研究では、動脈硬化形成、静脈血栓形成、脂肪肝形成における ASC のインフラマソームとは独立した役割を分子的な機序を解明することを目的とし、その上で新たな治療法の開発として ASC が治療標的となり得るかの検討を行った。そのために研究期間内に次の3点の達成を目標とした。

- (1) 動脈硬化形成モデル、静脈血栓形成モデル、脂肪肝モデル動物における ASC の役割を検討
- (2) 各疾患における病態を増悪化させる ASC の独立した分子機構を明らかにする
- (3) ASC 制御によるモデル動物での治療効果を検証する。

(1) その結果から各病態モデルの中で特に深部静脈血栓症モデルにおいて ASC 欠損マウスでは病態が増悪する結果が再現よく得られたため、(2) 以下の検討をまずは深部静脈血栓症モデルを中心に先行しインフラマソームとは独立した ASC の役割について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 疾患動物モデルにおけるインフラマソームの関与の解明

各疾患動物モデルには野生型 (Wild-type: WT) マウスに加え、インフラマソームを構成する各分子 (NLRP3、ASC、Caspase-1) および、インフラマソームの活性化により分泌される炎症性サイトカインの IL-1 の欠損 (KO) マウス (NLRP3-KO、ASC-KO、Caspase-1-KO、IL-1⁻KO) を使用し、疾患モデルにおける病態の変化を検討した。

静脈血栓モデル

静脈血栓モデルとして深部静脈血栓モデルを使用した。右腎静脈直下の下大静脈を結紮し静脈血栓を誘導する。血栓は血栓重量、最大長を評価した。

動脈血栓モデル

動脈血栓モデルとして中大脳動脈血栓形成による脳梗塞モデルを使用した。頸静脈からローズベンガルを投与した(10mg/kg)。次に中大脳動脈に向け緑色蛍光(540nm)を照射し、動脈血栓を形成させることで脳梗塞を誘導した。脳梗塞は2mm厚にスライスした脳を TTC 染色し評価した。

(2) 血栓形成に関与する機構とインフラマソームの関与の解明

血栓形成で重要とされる 1)凝固因子、2)血小板活性化機構、3)線溶機構の3項目に着目し、以下の解析を行なうことで血栓形成のどの機構にインフラマソームが関与するかを解析した。

- 2) プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定で評価を行った。
- 3) 血小板に発現するタンパク解析をウエスタンブロッティングで行い、各種発現マーカーや活性化の評価を P-selectin やインテグリン α IIb β 3 等を指標に FACS 解析を用いて検討した。
- 4) PAI-1 の遺伝子発現で評価をおこなった。

(3) ASC 結合分子の精製・分離

WT マウスおよび ASC-KO マウスから血小板を採取し、血小板活性化刺激を加えたのち、抗 ASC 抗体を結合させた磁性ビーズを用いて免疫沈降を行った。得られたタンパク質を二次元電気泳動によって分離、比較し ASC 存在下でのみ存在するスポットを切り出し ASC 結合分子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 疾患動物モデルにおけるインフラマソームの関与の解明

深部静脈血栓モデル DVT モデルでは WT および IL-1 β -KO マウスと比較して、ASC-KO マウスでは血栓が有意に長く、重量も増していた。一方インフラマソーム成分は主に炎症性細胞で発現するため、血栓におけるマクロファージと好中球の浸潤をフローサイトメトリー分析で評価したところ、WT、ASC-KO、および IL-1 β -KO マウスの血栓中を構成比に差は認められなかった。同様に、脳梗塞モデルでも WT マウスの梗塞エリアと比較して、ASC-KO マウスの梗塞エリアは有意に拡大した。これらの結果から ASC の欠損により動脈血栓と静脈血栓の形成は促進することが判明した。

(2) 血栓形成に関与する機構とインフラマソームの関与の解明

- 1) プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定
血液凝固カスケードの外因性および内因性経路を評価するために、PT および APTT を測定したところ、ASC-KO マウスと WT または IL-1 β -KO マウス間で PT および APTT に有意差は認められなかった。
- 2) 血小板の解析

ASC 欠損により、IL-1 および浸潤した炎症細胞とは無関係に血栓形成を増強したため、次に血小板の役割に焦点を当て、マウス血小板における NLRP3 インフラマソーム成分の発現を評価した。ウエスタンブロッティングの結果から、WT マウスからの血小板が ASC のみを発現したが、NLRP3 もカスパーゼ-1 も発現しないことが判明した。一方で、ASC-KO マウス由来の血小板の数と形状は、WT 由来のそれと変化はなかった。血小板に発現する各種マーカーをフローサイトメトリーで解析したところ、無刺激では GP IIb / IIIa (JON / A)、GPVI、CD31、CD49f、および CD61 の発現が WT および ASC-KO 由来の血小板で同等であることが示された。CD29、および CD49b は、WT マウス由来の血小板と比較して、ASC-KO マウス由来の血小板ではわずかに減少していた。これらの発見は、ASC が NLRP3 インフラマソームとは無関係に血栓形成に役割を果たすことを示唆しているものと思われた。

次に、血小板活性化における ASC の役割を検討したところ、CRP (GPVI 選択的アゴニスト) による活性化誘導では、P-セレクチンおよび GPIIb / IIIa の C 発現は、WT 由来の血小板と比較して、ASC-KO 由来の血小板で有意に増強された。一方で、トロンビン刺激による活性化ではそれらの発現には WT および ASC-KO 間で有意な差は生じなかった。

(3) ASC 結合分子の精製・分離

WT マウスおよび ASC-KO マウスから血小板を採取し、血小板活性化刺激を加えたのち、抗 ASC 抗体を結合させた磁性ビーズを用いて免疫沈降を行った。得られたタンパク質を二次元電気泳動によって分離、比較し ASC 存在下でのみ存在するスポットを切り出し ASC 結合分子の同定を試みたところ、いくつかのタンパクの同定に成功した。

今後はこれらのタンパクについて ASC との結合能および結合条件について詳細な検討を行い、これらの疾患における ASC の独立した役割を明らかにし新たな治療法の開発を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Kawashima Akira, Karasawa Tadayoshi, Tago Kenji, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Usui-Kawanishi Fumitake, Watanabe Sachiko, Ohta Satoshi, Funakoshi-Tago Megumi, Yanagisawa Ken, Kasahara Tadashi, Suzuki Koichi, Takahashi Masafumi	4. 巻 199
2. 論文標題 ARH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3614 ~ 3622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Karasawa Tadayoshi, Kawashima Akira, Usui-Kawanishi Fumitake, Watanabe Sachiko, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Shirasuna Koumei, Koyama Yutaro, Sato-Tomita Ayana, Matsuzaka Takashi, Tomoda Hiroshi, Park Sam-Yong, Shibayama Naoya, Shimano Hitoshi, Kasahara Tadashi, Takahashi Masafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in MacrophagesHighlights	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 744 ~ 756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.117.310581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 29. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, kimura H, Mizushina Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hsebe N, Takahashi M.	4. 巻 6
2. 論文標題 NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 26489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep26489.	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 -
1. 著者名 30. Kimura H, Karasawa T, Usui F, Kawashima A, Endo Y, Kobayashi M, Sadatomo A, Nakamura J, Iwasaki Y, Yada T, Tsutsui H, Kasahara T, Takahashi M.	4. 巻 311
2. 論文標題 Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 American journal of physiology. Endocrinology and metabolism	6. 最初と最後の頁 E881-E890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00174.2016.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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)	
研究分担者	木村 博昭 (Kimura Hiroaki) (70593622)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究分担者	渡邊 幸子 (Watanabe Sachiko) (80770619)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	