

令和元年6月24日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09808

研究課題名(和文) タンパク質分解によるインフラマソーム制御系の解明

研究課題名(英文) The study about inflammasome regulation system by protein degradation

研究代表者

川島 晃 (Kawashima, Akira)

帝京大学・医療技術学部・研究員

研究者番号：60624913

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)：自然免疫機構の一つであるインフラマソームは、糖尿病などの内分泌・代謝疾患において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこで、インフラマソームの調節機構について解析した結果、E3ユビキチンリガーゼARIH2という分子がインフラマソームを構成する分子NLRP3をユビキチン修飾することで抑制的に働くことを明らかにした。本成果は、内分泌・代謝疾患における炎症制御の為にユビキチン修飾を標的とした薬剤の開発に繋がることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症機構の一つであるインフラマソームのユビキチン修飾を介した調節系の責任分子としてARIH2が働くことを明らかにした。ARIH2はインフラマソームの活性化機構に働くNLRP3というタンパクをユビキチン修飾することによって、インフラマソームの活性化を抑制する、つまり炎症反応の抑制を行なっている。本成果は、インフラマソームの関与する内分泌・代謝疾患などにおいてユビキチン修飾系が、治療標的となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Inflammasome is a key component of the innate immune system in endocrine and metabolic disease. We identified E3 ubiquitin ligase ARIH2 in activated NLRP3 inflammasome. ARIH2 ubiquitinates NLRP3 and negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. Our findings suggest ubiquitin regulation system as a potential target for the treatment of endocrine and metabolic disease.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 インフラマソーム ユビキチン修飾 炎症 マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や動脈硬化、メタボリック症候群などの内分泌・代謝疾患における炎症の重要性が明らかになっている。これらの疾患で炎症は、病原体の関与がないことから無菌性炎症と呼ばれており、その惹起経路としてインフラマソームと呼ばれる細胞内分子複合体が注目されている。無菌性炎症に関わる NLRP3 インフラマソームは、アダプター分子 ASC を中心とし、NLR (Nod-like 受容体) である NLRP3 と Caspase-1 から構成される複合体である (図 1)。複合体が形成されると caspase-1 の活性化を介して代表的な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) の成熟化を誘導して、炎症惹起を寄与する。これまで、申請者のグループや他の研究者により、痛風の原因である尿酸結晶や傷害細胞から放出される ATP、活性酸素など、様々な危険シグナルが NLRP3 インフラマソームを活性化して、その病態に寄与していることが報告されていた。

インフラマソームを標的とした薬剤は、痛風治療薬コルヒチンや IL-1 に対する阻害薬アナキナラなどがある。コルヒチンは副作用が強いことや、IL-1 阻害薬は生物学的製剤で非常に高価であることから、それらの適用は限定されている。多様なインフラマソーム関連疾患に適用できる特異性の高い治療法が強く待たれている。

申請者は、これまで自己由来の二本鎖 DNA の受容体とその下流の自然免疫活性化機構の解明を行い、内分泌自己免疫疾患における自然免疫の重要性を明らかにしてきた。その過程において、インフラマソーム構成分子の網羅的な解析を行い、NLRP3 に結合する新規の E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 を同定した。E3 ユビキチンリガーゼの一般的な機能は、標的分子のユビキチン化を誘導し、プロテアソームを介した分解やシグナルの活性化を誘導することにある。その後の解析により、同定した分子 ARIH2 は、NLRP3 に結合し、インフラマソーム構成タンパク NLRP3 のユビキチン化を誘導する。ARIH2 は、インフラマソームの活性化に対して抑制的に働くということを示す結果を得ている。我々は予備的な検討により ARIH2 を介したユビキチン修飾機構が、内分泌・代謝疾患の無菌性炎症における新たな治療標的になり得るとの仮説に至った。

NLRP3 インフラマソームの活性化には、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾の関与が明らかになっている。ユビキチン修飾は、NLRP3 の分解や機能修飾に関与する報告があり、我々は、NLRP3 インフラマソームの活性化に対して E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 がどのような働きを持つかについて解析を行なった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NLRP3 インフラマソームの活性化における分子機構を明らかにすることによって、インフラマソームの関与する炎症疾患の治療応用に向けた基盤研究を行うことである。インフラマソーム活性化の分子機構を解析する過程で明らかになった E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 の働きに関して焦点を当てて研究を遂行した。これらの検討を通して、内分泌・代謝疾患の治療標的の開発に繋がることを目標として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) インフラマソームタンパク複合体の構成分子の解析

インフラマソームタンパク複合体の主要な構成タンパクとして、NLRP3, ASC, Caspase-1 からなることが分かっている。それに加えて、様々な酵素などが結合して、調節を行っていると思定されているが、不明な点も多い。インフラマソームに対する制御性分子の探索を行う為、我々はインフラマソームの構成タンパクを質量分析器を用いて、網羅的な解析を行った。まず、インフラマソームタンパク複合体を単離する為に、ヒトの単球由来細胞株 THP-1 のインフラマソームの構成分子 ASC に蛍光タンパク GFP を融合させた ASC-GFP を強制発現させる遺伝子導入株を作成した。インフラマソームを活性化させると ASC-GFP が凝集して、インフラマソーム複合体を形成する (図 2A)。それを単離して (図 2B)、トリプシン処理後に質量分析器による解析を行った。

(2) 新規 E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 による NLRP3 インフラマソーム活性化制御機構の解析

インフラマソームの質量分析解析により ARIH2 が含まれることが分かり、この分子について解析を行った。ヒト由来単球細胞株 THP-1 とマウス腹腔マクロファージを用いて、ARIH2 の細胞内局在を解析した。また、ヒト胎児由来の腎臓細胞株 HEK293T 細胞に ARIH2 とインフラマソーム構成分子の強制発現株を作成し、免疫沈降法を用いて分子間の結合を解析した。ARIH2 のインフラマソームに対する機能の解析をする為に、CRISPR/CAS9 システムを使った遺伝子組み換え法を用いて、ARIH2 の欠

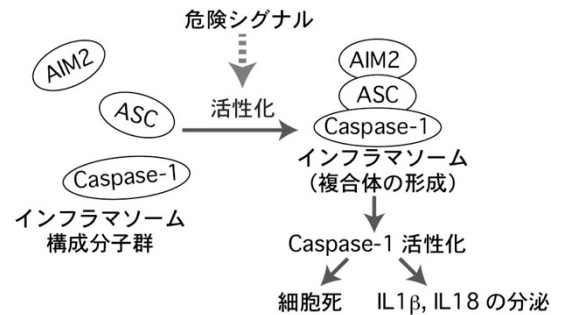


図 1. 危険シグナルを AIM2 が認識すると、インフラマソームが形成され、Caspase-1 の活性化が引き起こされてサイトカイン産生・細胞死が誘導される

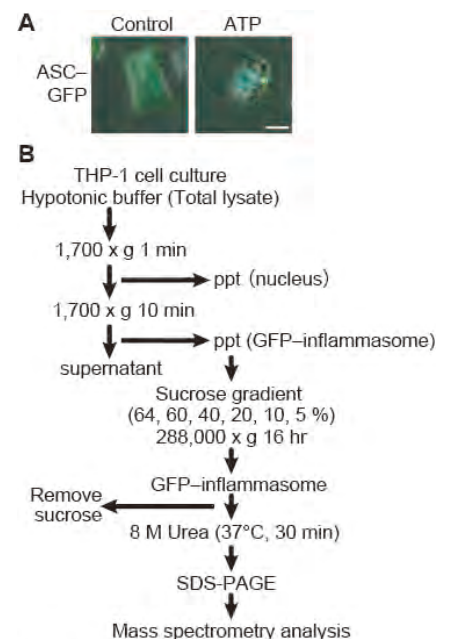


図 2. THP-1 に ASC-GFP を強制発現させ、GFP を指標としてインフラマソームを単離した

損と強制発現株を作成した。更に、ARIH2 の欠損マウスを作成する為に、アテロコラーゲンを
用いた遺伝子導入法によりマウスに ARIH2 の siRNA を導入した。

4. 研究成果

インフラマソームの制御性分子の探索を質量分析器によって解析した結果、スコアの上位に機能性タンパク質 ARIH2 が候補として hit したので、ARIH2 に関して解析を進めた。

E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 は、インフラマソームの活性化前は細胞質内に拡散しており、活性化後にインフラマソーム中に含まれることを THP-1 (図 3) とマウス腹腔マクロファージにおいて明らかにした。

ARIH2 と結合するインフラマソーム構成分子を探索した結果、NLRP3 と特異的に結合することを明らかにした (図 4A)。他のインフラマソーム構成分子である ASC や Caspase-1 との結合は見られなかった。また、ARIH2 は NLRP3 の NACHT domain に結合することを明らかにした (図 4B)。

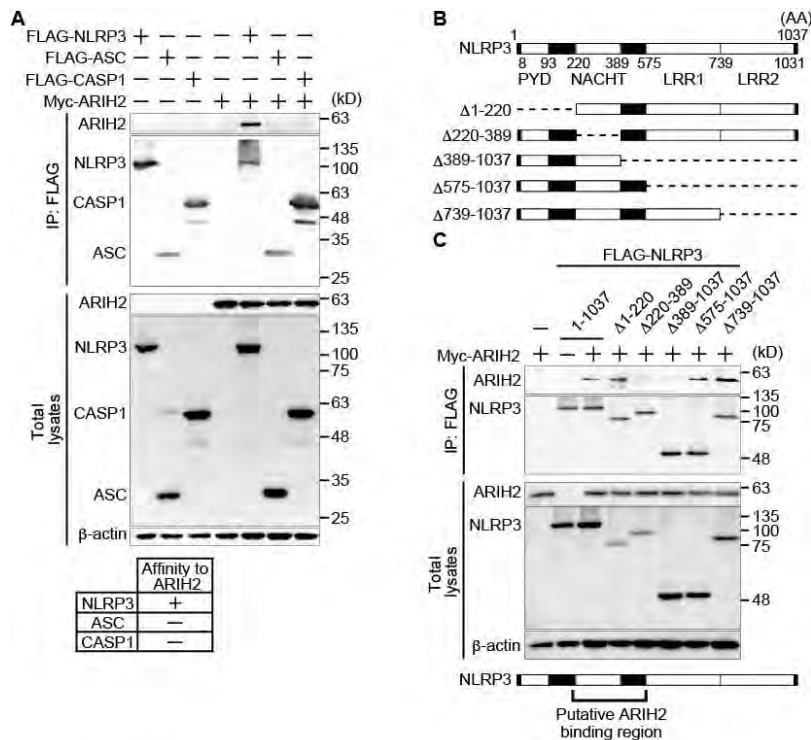


図 4. (A) インフラマソーム構成分子 NLRP3 は ARIH2 と結合する。(B) NLRP3 と ARIH2 の結合には NLRP3 の NACHT ドメイン (220-575 AA) が必要である。

さらに ARIH2 によるユビキチン修飾について解析を行った。ARIH2 はインフラマソーム構成分子である NLRP3 特異的にユビキチン化を誘導した (図 5A)。ASC, Caspase-1 に対してはユビキチン化を誘導しなかった。さらに変異型のユビキチン K48R と K63R (K48R は 48 番目の Lysine を Arginine に組み替えたもの) を作成し、ユビキチン鎖について解析を行った結果、K48, K63 以外にもユビキチン鎖が NLRP3 に修飾されていることを明らかにした (図 5B)。

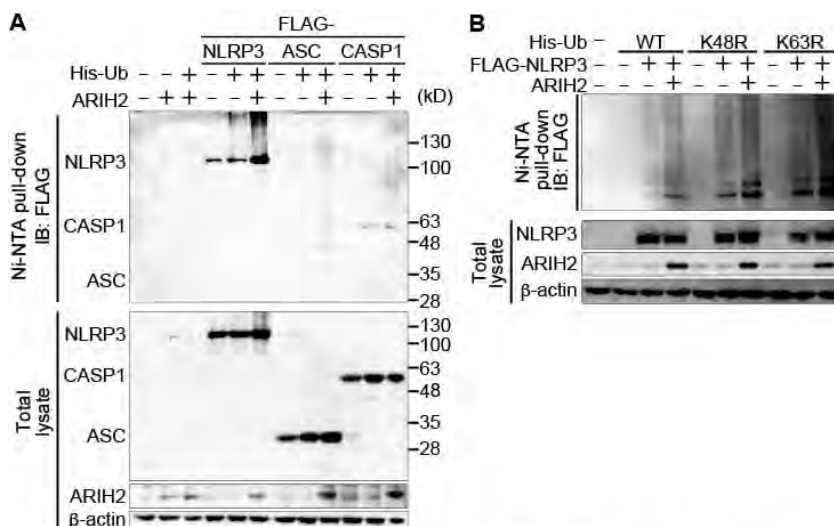


図 5. (A) ARIH2 は NLRP3 特異的にユビキチン化 (スミア状のバンド) を誘導する。(B) K48 と K63 のユビキチン変異型でも NLRP3 のユビキチン化は誘導された。K48, K63 以外のユビキチン鎖である可能性が示された。

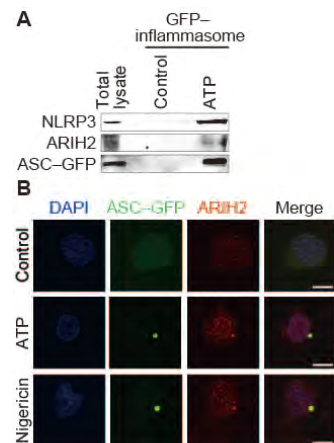


図 3. (A) THP-1 中の GFP-inflammasome にはインフラマソームを構成する NLRP3, ASC に加えて ARIH2 が存在している。(B) 凝集した GFP-inflammasome には ARIH2 (赤) が含まれている。

次に ARIH2 のインフラマソームに対する機能を解析する為、THP-1 細胞に対して、ARIH2 の遺伝子欠損株と強制発現株を作成した。ARIH2 を欠損させても、NLRP3 のタンパク量は変動が無かった結果より ARIH2 の NLRP3 ユビキチン化は分解の誘導では無かった。インフラマソームの活性化に関して解析すると、欠損株ではインフラマソームの結果としておこる ASC の凝集、caspase-1 の活性化、IL-1 β の分泌などが増強した (図 6)。

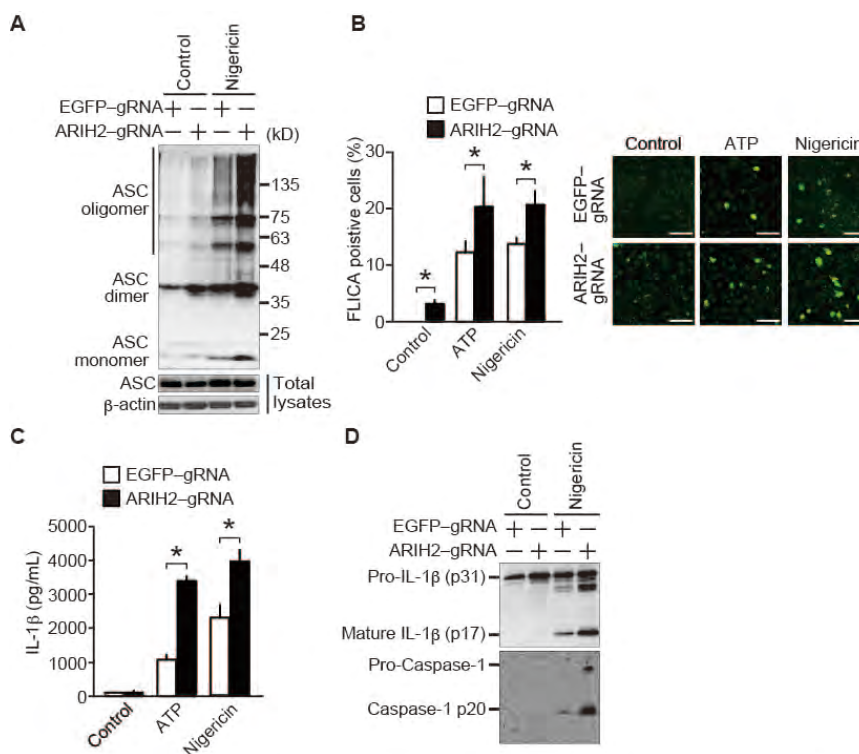


図 6. (A)ARIH2 を欠損するとインフラマソームの活性化の結果起きるインフラマソームの凝集が強くなり、高分子の ASC oligomer が増加する。(B) caspase-1 の活性化を FLICA positive (緑) で評価すると、ARIH2 の欠損株で増加した。(C) ARIH2 欠損株で IL-1 β の分泌が増加し、(D) 活性化型の caspase-1 の量も増加した。

ARIH2 の強制発現株では、逆にインフラマソームの活性化が抑制された (図 7)。ARIH2 の機能ドメインを解析するため、アミノ酸置換による変異型タンパクを作ると C300A の変異で ARIH2 による抑制効果が消失した (図 7 BC)。

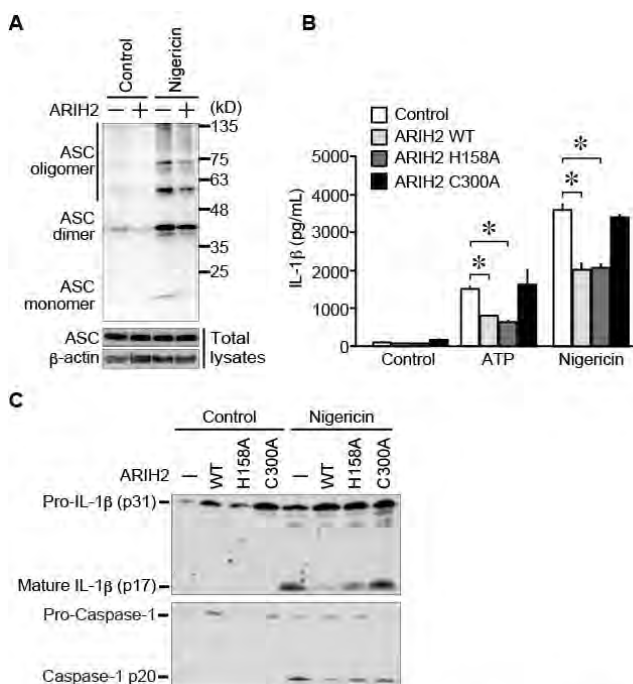


図 7. (A)ARIH2 を過剰発現させると高分子の ASC oligomer が減少した。(B) ARIH2 (野生型、変異型 H158A, C300A) を強制発現させると、C300A では ARIH2 の抑制効果が消失した。(C) ARIH2 強制発現株で IL-1 β の分泌は、減少し、活性化型の Caspase-1 p20 の量も減少した。

これらの結果より、ARIH2 は NLRP3 のユビキチン化を誘導し、インフラマソームの活性化に抑制的に働くことを明らかにした。

次にインフラマソームの関与する内分泌・代謝疾患において ARIH2 がどのような働きを持つか解析する為に ARIH2 の欠損マウスの作成を試みた。過去の報告より ARIH2 の KO マウスは胎生致死である為、一過性の発現抑制が可能であるか検討を行った。野生型の C57BL/6J マウスに ARIH2 を標的とした siRNA とアテロコラーゲンを加えて、腹腔マクロファージの ARIH2 の発現を解析したが、ARIH2 の発現抑制は十分行うことが出来なかった (data not shown)。

総括すると、ARIH2 は NLRP3 と特異的に結合し、ユビキチン修飾を介してインフラマソームの活性化に抑制的に働くことを、細胞株を用いて証明した。これらの結果は、インフラマソームの活性化に対してユビキチン修飾に関与する酵素が、インフラマソームの関与する内分泌・代謝疾患などの治療標的になる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Karasawa T, Kawashima A, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, Shirasuna K, Koyama Y, Sato-Tomita A, Matsuzaka T, Tomoda H, Park SY, Shibayama N, Shimano H, Kasahara T, Takahashi M. Saturated fatty acids undergo intracellular crystallization and activate the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38: 744-756, 2018
2. En J, Kitamoto S, Kawashima A, Yonezawa S, Kishi Y, Ishii N, Goto M. Mycolactone cytotoxicity in Schwann cells could explain nerve damage in Buruli ulcer. *PLoS Negl Trop Dis* 4:11(8):e0005834, 2017
3. Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Kimura H, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Yanagisawa K, Kasahara T, Suzuki K, Takahashi M. ARIH2 ubiquitinates NLRP3 and negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *J Immunol* 199: 3614-3622, 2017
4. 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. Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311: E881-890, 2016
5. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushima Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hasebe N, Takahashi M. NLRP3 reduces macrophage interleukin-10 production and enhances the susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Sci Rep* 6: 26489, 2016

[学会発表] (計 11 件)

1. 川島晃, 鈴木幸一, 高橋将文. ARIH2 によるユビキチン修飾を介した NLRP3 インフラマソーム抑制機構。第 41 回日本分子生物学会年会。2018 年 11 月 28-30 日。横浜市
2. 谷村優太, 川島晃, 丸山航平, 石藤雄子, 近藤哲夫, 加藤良平, 鈴木幸一. 濾胞内サイログロブリンは inhibitor of DNA-binding protein (ID) 発現を抑制し甲状腺内分泌機能を制御する。第 61 回日本甲状腺学会。2018 年 11 月 22-24 日。川崎市。(トラベルグラント)
3. 牟禮優菜, 川島晃, 鈴木幸一. 自然免疫活性化甲状腺細胞死誘導機構の解明。第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会。2018 年 8 月 17-19 日。札幌市。(優秀発表賞)
4. 川島晃, Yuqian, Chen Fei, 木村博昭, 石藤雄子, 鈴木幸一. 甲状腺細胞の自然免疫活性化が誘導する細胞死機構の解明。第 91 回日本内分泌学会学術総会。2018 年 4 月 26-28 日。宮崎
5. Fei Chen, Yuqian Luo, 川島晃, 石藤雄子, 吉原彩, 鈴木幸一. 夏枯草 (*Prunella vulgaris*) の抗甲状腺炎作用分子機構の解明。第 34 回甲状腺病態生理研究会。2018 年 2 月 3 日。東京
6. 吉原 彩, 臼倉健世, Yuqian Luo, 川島晃, 小田健三郎, 石藤雄子, 廣井直樹, 鈴木幸一. 甲状腺ホルモン合成におけるヨード代謝調節の検討。第 90 回 日本内分泌学会学術総会。2017 年 4 月 20-22 日。京都
7. 唐沢直義, 臼井文武, 川島晃, 木村博昭, 高橋将文. 飽和脂肪酸によるインフラマソーム活性化機構の解析。第 48 回日本動脈硬化学会 (東京) 2016 年 7 月 14-15 日
8. 木村博昭, 唐沢直義, 川島晃, 臼井文武, 笠原忠, 鈴木幸一, 高橋将文. 高脂肪食誘導型肥満における免疫プロテアソーム (LMP7) の役割。第 37 回日本炎症・再生医学会 (京都) 2016 年 6 月 16-17 日
9. 唐沢直義, 臼井文武, 川島晃, 木村博昭, 高橋将文. 脂肪酸結晶による NLRP3 インフラマソームを介した炎症惹起機構の解析。第 37 回日本炎症・再生医学会 (京都) 2016 年 6 月 16-17 日
10. 高橋将文, 駒田敬則, 臼井文武, 唐沢直義, 川島晃, 木村博昭. 横紋筋融解症による急性

腎障害における NLRP3 インフラマソームの役割. 第 37 回日本炎症・再生医学会 (京都)
2016 年 6 月 16-17 日

11. 木村博昭、臼井文武、唐沢直義、川島晃、笠原忠、鈴木幸一、岩崎有作、矢田俊彦、高橋将文. 高脂肪酸による肥満・メタボリック病態における免疫プロテアソーム欠損の有益な効果. 第 89 回日本内分泌学会学術総会 (京都) 2016 年 4 月 21-23 日

〔図書〕 (計 1 件)

1. 川島晃、吉原彩、鈴木幸一: 自己免疫性甲状腺疾患 -その分子機構-. 最新医学 73(5): 657-661, 2018.

〔その他〕

ホームページ

自治医科大学

分子病態研究センター

炎症・免疫研究部

<http://www.jichi.ac.jp/inflammation/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 高橋 将文

ローマ字氏名: **Takahashi Masafumi**

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 40296108

研究分担者氏名: 木村 博昭

ローマ字氏名: **Kimura Hiroaki**

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 70593622

研究分担者氏名: 唐沢 直義

ローマ字氏名: **Karasawa Tadayoshi**

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 60631893

研究分担者氏名: 渡邊 幸子

ローマ字氏名: **Watanabe Sachiko**

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 80770619

研究分担者氏名: 鈴木 幸一

ローマ字氏名: **Suzuki Koichi**

所属研究機関名: 帝京大学

部局名: 医療技術学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20206478