

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19544

研究課題名(和文) 動脈硬化での炎症の遷延におけるインフラマソームの役割の解明

研究課題名(英文) The role of inflammasome in prolonged inflammation of atherosclerosis

研究代表者

唐澤 直義 (Tadayoshi, Karasawa)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60631893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP3インフラマソームはコレステロール結晶や飽和脂肪酸などの危険シグナルにより活性化され、炎症性サイトカインIL-1betaの産生を制御することで、炎症の初期応答において重要な役割を果たす。本研究ではインフラマソームが動脈硬化での炎症の遷延過程において果たす役割の解明を目指し研究を行った。動脈硬化病変での炎症の遷延におけるインフラマソームの役割を明らかにするため、薬剤による誘導によりインフラマソーム構成分子の一つであるカスパーゼ1を欠損するモデルを作製した。本研究で確立した手法は、動脈硬化における炎症の収束を目的とした標的遺伝子の探索に有効であると期待される。

研究成果の概要(英文)：NLRP3 inflammasome is a multiple cytoplasmic protein complex which is involved in innate immune response. In response to various DAMPs such as cholesterol crystals and saturated fatty acids, NLRP3 inflammasome regulates caspase-1 activation and subsequent IL-1beta processing. In this study, we aimed to clarify the role of NLRP3 inflammasome in prolonged inflammation of atherosclerosis. In order to investigate this issue, we developed inducible caspase-1 knockout mice using Cre-loxP system in an apoE-deficient background. The developed model is expected to be a useful tool to analyze the mechanisms of prolonged inflammation of atherosclerosis.

研究分野：代謝学

キーワード：動脈硬化 マクロファージ 炎症 細胞死

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化などの代謝病態に炎症が関与することはよく知られていたが、これらの炎症の特徴としてあげられることには、炎症が遷延して収束しないことである。その主要な原因としては炎症が持続して惹起され続けること、抗炎症性のサイトカインなどによる収束機序が機能不全を起こすことの二つの機序が考えられるが、その明確な分子機構はいまだ不明であった。

代謝病態において炎症が惹起される機序については、自然免疫細胞に発現し、Damage/danger-associated molecular patterns (DAMPs) を認識する、“パターン認識受容体”の重要性が近年、明らかになってきた。特に、コレステロール結晶や飽和脂肪酸など様々な脂質を DAMPs として認識する NLRP3 インフラマソームは代謝病態における炎症の惹起機序として注目されている。NLRP3 インフラマソームはパターン認識受容体である NLRP3、アダプター分子 ASC、酵素活性を担うカスパーゼ-1 により構成される分子複合体であり、マクロファージなどの自然免疫細胞に発現している。この分子複合体はコレステロール結晶などの DAMPs に応答してカスパーゼ1を活性化し、強力な炎症性サイトカインである IL-1 β の成熟を介して、炎症惹起を制御している。

私たちは炎症の惹起機構としての NLRP3 インフラマソームに着目し、動脈硬化をはじめ、大動脈瘤、慢性腎臓病などにおいて NLRP3 インフラマソーム構成分子の欠損下では炎症の初期応答が抑えられ、病態の進展が抑制されることを明らかにしてきた。しかしながら、NLRP3 インフラマソームが炎症の遷延過程においてどのような役割を果たしているかは未解明のまま残されていた。

一方、カスパーゼ1の活性化はパイロトーシスと呼ばれる細胞質成分の流出を伴うネクロトーシス様の細胞死を引き起こす。流出した細胞成分は細胞外 ATP などのように DAMPs として機能することが知られている。そこで、パイロトーシスは

DAMPs の放出を介して、近傍の細胞のインフラマソームを活性化し、持続的インフラマソーム活性化ループを形成し、炎症の遷延に寄与しているとの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、パイロトーシスを介した持続的なインフラマソームの活性化ループが動脈硬化における炎症の遷延を引き起こしているとの仮説の下、パイロトーシスが近傍の細胞においてインフラマソームの活性化を誘導するかについて明らかにする。さらに、インフラマソーム経路の抑制が動脈硬化における炎症の遷延を収束させ、動脈硬化病変が退縮するかを検討する。これにより、インフラマソームが動脈硬化での炎症の遷延と収束過程において果たす役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

[計画 1] パイロトーシスによるインフラマソーム活性化ループの検証

インフラマソーム活性化により、危険シグナルの放出を介して近傍の細胞にインフラマソーム活性化が波及するかを細胞レベルの検証にて明らかにする。方法として、ヒト単球培養細胞株である THP-1 細胞にテトラサイクリン誘導性に恒常活性化型 NLRP3 (D303N 変異体) と橙色蛍光タンパク質 (クサビラオレンジ 1: KO1) を発現するインフラマソーム活性化誘導細胞を作成した。この細胞と非導入 THP-1 細胞を共培養し、ドキシサイクリンによるインフラマソーム活性化誘導後に非導入細胞においてインフラマソーム活性化が認められるか解析した。

[計画 2] インフラマソーム欠損の誘導が炎症の遷延に及ぼす影響の解析

すでに形成された動脈硬化病変においてインフラマソーム欠損が炎症の遷延に及ぼす影響を明らかにするため、誘導型の遺伝子欠損マウスを作成した。具体的には Apoe 欠損マウスバックグラウンドにて Casp1^{fllox/fllox} マウスと ROSA26CreERT2 (CreER) マウスを掛け合わせ、

タモキシフェン誘導型 Casp1 欠損マウスを作製した。この Apoe^{-/-} Casp1^{flox/flox} CreER マウスと対照の Apoe^{-/-} Casp1^{flox/flox} マウスとに対して8週齢よりウエスタンダイエット(41%脂肪, 0.21%コレステロール)を負荷し, 4週間後にタモキシフェンを投与し, 遺伝子欠損の誘導した。さらに4週間の食餌負荷を行った後, 動脈硬化形成について解析を行った。

4. 研究成果

[計画 1] パイロトーシスによるインフラマソーム活性化ループの検証

作成したインフラマソーム活性化誘導細胞に対して, PMA 処理することによりマクロファージ様に分化させ, ドキシサイクリンにより恒常活性化型の NLRP3 を発現誘導したところ, IL-1 β の産生と LDH 放出が確認された(図 1)。

図 1

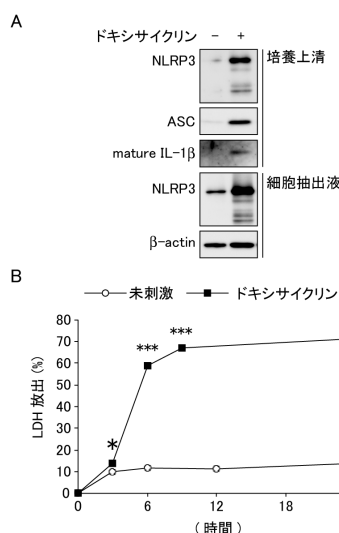


図 1. 恒常活性化型 NLRP3D303N を発現する THP-1 細胞の樹立ドキシサイクリンによる NLRP3 発現誘導時の Western Blot (A), LDH 放出 (B).

さらに, パイロトーシスが近傍の細胞に及ぼす影響のうち, IL-1 β 非依存的な作用を検証するために, CRISPR/Cas9 システムを利用し, IL-1 β を欠損した細胞を樹立した。この細胞と非導入 THP-1 細胞を共培養し, 近傍の細胞のパイロトーシスがインフラマソーム活性化に及ぼす影響を検討した。しかしながら, パイロトーシスの誘導は近傍の細胞における IL-1 β 産生を誘導しなかつた。

[計画 2] インフラマソーム欠損の誘導が炎症の遷延に及ぼす影響の解析

作成した Casp1^{flox/flox} CreER マウスに対して, タモキシフェンを5日間連続投与後, 2週間後の脾臓, 骨髄細胞におけるカスパーゼ 1 発現を Western blot 法により解析したところ, それぞれの組織におけるカスパーゼ 1 の減少が認められた(図 2)。

図 2

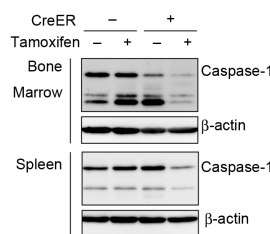


図 2. タモキシフェン投与による Casp1 欠損の誘導 Casp1^{flox/flox} マウス及び Casp1^{flox/flox} CreER マウスにタモキシフェンを5日間腹腔内投与し, 2週間後の骨髄細胞と脾臓における Casp1 発現を Western blot 法により解析した。

そこで, Apoe^{-/-} Casp1^{flox/flox} CreER マウスに対し, 4週間のウエスタンダイエット負荷後にタモキシフェン投与を行い, カスパーゼ 1 の欠損を誘導した。しかしながら, 欠損誘導4週間後においては動脈硬化病変の形成については有意な差は認めなかつた。

本研究は動脈硬化の炎症の遷延における NLRP3 インフラマソームの役割について明らかにしようと試みた。In vitroでの検討としてインフラマソームの活性化により誘導されるパイロトーシスが近傍の細胞に及ぼす影響を検討したが, パイロトーシスは近傍細胞のインフラマソーム活性化については影響しないことが明らかになった。パイロトーシスが近傍の細胞にどのような影響を及ぼすかについては, 本研究により作成されたインフラマソーム活性化誘導細胞を用いて, 今後検討を進める予定である。

一方, 誘導型カスパーゼ 1 欠損マウスを用いた検討においては, 大動脈における動脈硬化病変の面積については, カスパーゼ 1 の欠損によっては抑制されなかつた。現在, カスパーゼ 1

の欠損誘導が、動脈硬化における炎症とプラークの安定性について及ぼす影響についてさらなる解析を進めている。また、本研究により作成された誘導型遺伝子欠損マウスを用いた実験系は動脈硬化の炎症の収束、病変の退縮を標的にする上で有効な手法として利用されることが期待される。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 9 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 and Takahashi M: Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018; 38:744-756
- 2) Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mizushima Y, Nakamura J, Kamata R, Kasahara T, Horie H, Sata N and Takahashi M: Interaction of Neutrophils with Macrophages Promotes IL-1beta Maturation and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol*, 2017; 199:3306-3315
- 3) Kobayashi M, Usui-Kawanishi F, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mise N, Kayama F, Kasahara T, Hasebe N and Takahashi M: The cardiac glycoside ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction. *PLoS One*, 2017; 12:e0176676
- 4) 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 and Takahashi M: ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *J Immunol*, 2017; 199:3614-3622
- 5) Karasawa T and Takahashi M: Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 2017; 24:443-451
- 6) Karasawa T and Takahashi M: The crystal-induced activation of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *Inflamm Regen*, 2017; 37:18
- 7) Shirasuna K, Takano H, Seno K, Ohtsu A, Karasawa T, Takahashi M, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Iwata H and Kuwayama T: Palmitic acid induces interleukin-1beta secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. *J Reprod Immunol*, 2016; 116:104-112
- 8) Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushima Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hasebe N and Takahashi M: NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Sci Rep*, 2016; 6:26489
- 9) Kimura H, Karasawa T, Usui F, Kawashima A, Endo Y, Kobayashi M, Sadatomo A, Nakamura J, Iwasaki Y, Yada T, Tsutsui H, Kasahara T and Takahashi M: Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016; 311:E881-E890

[学会発表] (計 3 件)

1. 唐澤 直義, 渡邊 幸子, 木村 博昭, 高橋 将文, 飽和脂肪酸は結晶形成を介して好中球浸潤を誘導する, 第 38 回日本炎症・再生医学会, 2017 年 7 月 18 日, 大阪国際会議場

(大阪)

2. 唐澤 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 学術集会, 2016 年 7 月 15 日, 京王プラザホテル(東京)
3. 唐澤 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 (優秀演題賞受賞), 第 37 回日本炎症・再生医学会, 2016 年 6 月 16 日, 京都市勧業館みやこめっせ(京都)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐澤 直義 (KARASAWA, Tadayoshi)

自治医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 60631893