

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08406

研究課題名（和文）結晶性インフラマソーム活性化異物の認識機構とスタチンによる制御の解明

研究課題名（英文）The mechanism by which statins repress endogenous pathogenic crystal- or needle-like nanomaterial-induced inflammasome activation in macrophages

研究代表者

最上 知子（Nishimaki-Mogami, Tomoko）

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・客員研究員

研究者番号：90174333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：アスベスト類似の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）、コレステロールや尿酸の結晶など病原性結晶性異物はマクロファージのインフラマソームを活性化する。この応答をコレステロール低下薬スタチンが抑制することを発見し、各種スタチンがプレニル中間体低下を介してMWCNTの細胞への取り込みを抑制し、NLRP3インフラマソーム活性化によるIL-1 β 産生を抑制する機序を明らかにした。MWCNT刺激によるIL-1 β 産生へのスカベンジャー受容体MSR1の部分的関与とスタチンによる発現抑制を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレステロールや尿酸など内在性の結晶性異物によるNLRP3インフラマソーム活性化は、動脈硬化や痛風など慢性炎症の病態進展に深く関わる。本研究において、スタチンが顕著な抑制作用を示すことを発見するとともに、インフラマソームを介するスタチンの新しい抗炎症メカニズムが明らかになった。この成果は、MWCNTやアスベスト等の外来性異物が誘発する炎症病態の解明や治療薬創製、健康被害防止に道を拓くものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Endogenous and exogenous pathogenic crystals, such as cholesterol crystals, monosodium urate crystals, and asbestos-like multiwall carbon nanotubes (MWCNT) induce inflammasome activation in macrophages. We found that statins repress the crystal-stimulated the NLRP3 inflammasome activation and mature IL-1 β release by inhibiting the internalization of crystals. Various statins exerted the inhibition by decreasing prenyl-intermediates. The scavenger receptor MSR1 partly contributed to MWCNT-stimulated IL-1 β production and statins repressed the expression.

研究分野：環境衛生系薬学 生化学 代謝学 分子毒性学

キーワード：インフラマソーム IL-1 β NLRP3 スタチン コレステロール カーボンナノチューブ

1. 研究開始当初の背景

NLRP3 インフラマソームは尿酸やコレステロールなど内在性の微細結晶やアミロイド β 凝集体などの貪食により活性化されて IL-1 β ・IL-18 を産生し、炎症応答を介して痛風や動脈硬化、2 型糖尿病などの病態進展と深く関わる。私達は多層カーボンナノチューブ (MWCNT) やフラーレンナノウィスカーなど針状繊維状ナノマテリアル (長さ数ミクロン、100~数 100nm 径) がマクロファージの NLRP3 インフラマソームを活性化し、炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を顕著に促進する応答を報告している (文献①)。MWCNT はアスベストと類似した形状・大きさを有し、アスベスト同様に炎症、線維症やがん (中皮腫) を誘発することから、健康被害が懸念される。そこで MWCNT 刺激による IL-1 β 産生を抑制する薬物の検索を行い、スタチン類に顕著な抑制作用を見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、結晶性異物刺激による IL-1 β 産生をスタチンが抑制するメカニズムを明らかにする。特に、スタチンの抑制作用が結晶性異物による刺激に選択的であることから、結晶性異物を認識する受容体の役割に着目し、責任受容体の同定とスタチンによる抑制機構の解明を行う。LDL コレステロール低下薬スタチンの顕著な抗動脈硬化作用には、抗炎症作用の寄与が示唆されている。本研究により、インフラマソームを介する新しい抗炎症作用のメカニズム解明とともにカーボンナノチューブ等外来性異物が誘発する病態の治療薬創製への貢献が期待される。

3. 研究の方法

(1) 各種刺激によるインフラマソーム活性化については、THP-1 細胞を PMA でマクロファージ様に分化し (THP-1 マクロファージ)、スタチンを含む培地 (脱脂血清を添加) で 24 時間培養後、MWCNT や各種結晶を 2-6 時間暴露した。培地に放出される IL-1 β は Milliplex assay あるいは Immunoblot により測定した。組織マクロファージの比較には、マウスより腹腔マクロファージを採取、あるいはマウス骨髄単球を mCSF でマクロファージに分化し、LPS で priming 後に MWCNT を暴露した。

(2) MWCNT の認識・取り込みを担う受容体については、THP-1 マクロファージにおいてスカベンジャー受容体 MARCO、MSR1、および SR-B1 の発現を特異的 siRNA でノックダウンしたのち、あるいは特異的抗体の存在下に MWCNT を暴露し、IL-1 β 産生におけるそれぞれの役割を解析した。またスタチンによる遺伝子発現への影響は mRNA の発現により解析した。

4. 研究成果

(1) 結晶性異物刺激による IL-1 β 産生のスタチンによる抑制 (文献②)

THP-1 マクロファージを pitavastatin (10 μ M) で 24 時間前処理すると、MWCNT、コレステロール結晶、あるいは尿酸結晶暴露による IL-1 β 産生は、それぞれ非処理細胞の 23%、21%、39% に低下した。Pitavastatin の効果は濃度に依存し、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生への IC₅₀ 値は 1.7 μ M であった。Pitavastatin は IL-1 β 前駆体や CASP1 mRNA の発現量には影響せず、MWCNT 刺激におい

て、成熟型の IL-1 β とともに活性型 caspase-1 (p10)の産生を抑制しており、インフラマソームでの caspase-1 活性化を抑制することが判明した。

近年、マクロファージには NLRP3 に加え、NLRC4 や PYRIN、さらにはコレステロール蓄積により活性化される AIM2 など多彩なインフラマソームの存在が明らかになっている。MWCNT あるいはコレステロール結晶暴露による IL-1 β 産生についてこれらのインフラマソームの関与を調べたところ、*NLRP3*のみ siRNA ノックダウンにより IL-1 β 産生が低下し、*AIM2*、*MEFV*、*NLRC4* ノックダウンは全く影響せず、結晶刺激による IL-1 β 産生はもっぱら NLRP3 インフラマソームが担うことが判明した。Pitavastatin 処理により *AIM2*mRNA レベルは50%に低下したが、*NLRP3*、*MEFV*、*NLRC4* については mRNA 発現の有意な低下はなく、pitavastatin は NLRP3 活性化に至るまでの過程を抑制することが推定された。NLRP3 を直接活性化する細胞外 ATP や nigericin 刺激による IL-1 β 産生は pitavastatin により影響されず、フローサイトメトリーでの側方散乱光(SSC)の測定により、pitavastatin は MWCNT の細胞への取り込みを抑制することが判明した。

HMG-CoA 阻害剤である各種スタチン類 (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin) は、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生に対して pitavastatin に匹敵する抑制効果を示したが、スクアレン合成酵素阻害剤 YM-53601 は影響しなかった。Pitavastatin の抑制効果は、細胞にメバロン酸経路の中間代謝物メバロン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸、あるいはファルネシルピロリン酸を補給すると消失した。したがって、コレステロール生合成ではなく、タンパクのプレニル化の低下が抑制効果をもたらすことが推定される。

(2) スタチンの抑制効果はマクロファージの由来により異なる (文献②)

Pitavastatin はマウス腹腔マクロファージにおいて THP-1 マクロファージと同様に、MWCNT 刺激による IL-1 β 産生を抑制した。一方、マウス骨髄由来マクロファージでは抑制効果を示さなかった。マウス骨髄由来マクロファージでは、priming 時に LPS と pitavastatin が協調して IL-1 β 前駆体発現量を劇的に高め、またスタチンが活性化をもたらす Pypin の発現が高く、その結果、pitavastatin 前処理により MWCNT 刺激による IL- β 産生はむしろ増加した。自然免疫応答における組織マクロファージの機能の違いが示唆された。

(3) MWCNT の認識・取り込みを担うスカベンジャー受容体

MWCNT の認識・取り込みを担う受容体の同定を試みた。THP-1 マクロファージでの MWCNT 暴露による IL-1 β 産生において、スカベンジャー受容体 MARCO の特異的抗体の共存、あるいは MARCO または SR-B1 の siRNA ノックダウンは影響を与えなかった。MSR1 をノックダウンした場合には、IL-1 β 産生が約 30%した。Pitavastatin 処理により MSR1 の mRNA 発現は約 40%低下した。一方、IL-1 β 産生の低下は 75%であり、この抑制効果において MSR1 発現低下の寄与は部分的 (約 12%) と推定された。MARCO および SR-B1 mRNA 発現は影響されなかった。

<引用文献>

- ① Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452 : 593–9
- ② Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T. Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2021; 188: 114580

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimaki-Mogami T., Cui H., Soga K., Tamehiro N., Adachi R., Hachisuka A., Hirose A., Kondo K.	4. 巻 350
2. 論文標題 Statins repress multi-wall carbon nanotube-stimulated IL-1b release through inhibiting the uptake by macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 S159 ~ S160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S0378-4274(21)00617-2	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 Cui Hongyan, Soga Keisuke, Tamehiro Norimasa, Adachi Reiko, Hachisuka Akiko, Hirose Akihiko, Kondo Kazunari, Nishimaki-Mogami Tomoko	4. 巻 188
2. 論文標題 Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114580 ~ 114580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114580	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nishimaki-Mogami T., Cui H., Soga K., Tamehiro N., Adachi R., Hachisuka A., Hirose A., Kondo K
2. 発表標題 Statins repress multi-wall carbon nanotube-stimulated IL-1b release through inhibiting the uptake by macrophages
3. 学会等名 EUROTOX 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishimaki-Mogami T., Cui H., Soga K., Tamehiro N., Adachi R., Hachisuka A., Hirose A., Kondo K
2. 発表標題 Statins repress cholesterol crystal-induced IL-1b production by decreasing the internalization of crystals by macrophages
3. 学会等名 ISA 2021, The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 最上(西巻)知子, 崔 紅艷, 曾我慶介, 為広紀正, 安達玲子, 蜂須賀暁子, 広瀬明彦, 近藤一成
2. 発表標題 多層カーボンナノチューブによるIL-1 産生を抑制する化合物の同定
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishimaki-Mogami T, Cui H, Soga K, Adachi R, Tamehiro N, Hachisuka A, Kondo K, Hirose A
2. 発表標題 Discovery of an inhibitor of multiwall carbon nanotubes-stimulated IL-1 secretion via inflammasome activation.
3. 学会等名 EUROTOX 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohoka N, Cui H, Tamehiro H, Adachi R, Okuhira K, Naito M, Kondo K, Nishimaki-Mogami T
2. 発表標題 Identification of a sterol-responsive distal enhancer element for liver-specific ABCA1 gene expression. A novel mechanism for sterol-responsive hepatic ABCA1 gene regulation.
3. 学会等名 HDL Workshop: Structure, novel functions, and therapeutic applications (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------