

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15900

研究課題名(和文)アダプター分子ASCを介した血栓形成における新たな制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文)ASC contributes to thrombus formation independent of NLRP3

研究代表者

渡邊 幸子(Watanabe, Sachiko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80770619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NLRP3インフラマソームの構成分子であるASCがインフラマソームとは独立して血栓形成に寄与していると考え、その役割を明らかにすることを目的に解析を行った。その結果、ASCと相互作用する新規分子の同定に成功した。また、ASC KOマウスの血小板ではCRP刺激による細胞内カルシウム濃度、P-selectinや活性型インテグリンの発現、ERKおよびAktのリン酸化が野生型マウスと比較して優位に上昇していた。以上の結果から、血小板においてはASCと候補分子が相互作用し、コラーゲンの受容体であるGPVI下流のシグナルを負に制御することで血小板の活性化を調節することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、血小板においてASCがインフラマソームとは独立した作用で血栓形成機序に寄与していることが明らかになった。血小板凝集における新たな分子機構の解明、および本邦における心筋梗塞や脳梗塞といった血栓関連疾患の増加という点から、本研究の学術的・社会的な意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：NLRP3 inflammasome is a cytosolic multi-protein complex that regulates IL-1 maturation and plays a key role in sterile inflammatory diseases. ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) is an adaptor protein of NLRP3 inflammasome. In this study, we identified a candidate molecule that interacts with ASC. We also found that mouse platelets expressed only ASC, but not NLRP3 and caspase-1, suggesting NLRP3 inflammasome-independent role of ASC in the process of thrombosis. ASC-KO platelets displayed hyperactivation in response to GPVI agonists and this was associated with enhanced Ca<sup>2+</sup> mobilization and integrin activation downstream of GPVI. Our results demonstrate that ASC negatively regulates GPVI signaling in platelets and enhances thrombus formation, independent of NLRP3 inflammasome. These findings provide novel insights into the mechanism of inflammation-related thrombosis and suggest that ASC is a novel potential therapeutic target for thrombosis.

研究分野：炎症免疫学

キーワード：血小板 血栓症 インフラマソーム ASC

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の欧米化などに伴って心筋梗塞や脳梗塞といった血栓症を基盤とする脳・心血管疾患が増加しており、その発症機序の解明と有効な治療法の確立は重要な課題である。申請者のグループは、心血管疾患に着目して研究を行い、心筋梗塞や動脈硬化、腹部大動脈瘤、血管傷害後の内膜肥厚などの病態におけるインフラマソームの重要性を明らかにしてきた (*Circulation* 2008, 2011; *Trend Cardiovasc Med* 2011; *BBRC* 2012; *Int Heart J* 2014; *ATVB* 2015 など)。

NLRP3 インフラマソームは、アダプター分子 ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 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。危険シグナルを NLRP3 が認識すると、この複合体が形成されて Caspase-1 の活性化が誘導され、強力な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の前駆体 (非活性型) から活性型へのプロセッシングが起こり、細胞外に分泌されることで周囲の組織に炎症反応を引き起こす。これまで、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 などの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病態に関与していることが報告されている。

そこで申請者は、血栓症におけるインフラマソームの役割を明らかにするため、NLRP3・ASC・IL-1 $\beta$  の各遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、深部静脈血栓症や脳梗塞モデルを作製して解析を行った。その結果、両モデルとも ASC-KO マウスでのみ、血栓形成が促進して病態が増悪することを見出した。さらに、マウス血小板における NLRP3 インフラマソーム構成分子の発現を解析すると、ASC のみが血小板に発現していることが明らかになった。このことから血小板を介した血栓形成では、ASC がインフラマソームとは独立した役割を持つことが示唆された。また、ASC は CARD と PYRIN ドメインという 2 つの結合モチーフを持つことから、ASC がアダプター分子として血小板活性化で働いている未知の分子と会合することで、血栓形成に寄与しているのではないかと仮説を立てた。そして、血小板検体を ASC 抗体で免疫沈降した後、2 次元電気泳動で展開・分離し、有意なスポットを質量分析 (LC-MS/MS) を行うことで、ASC との結合が推測される 5 つの候補分子を同定した。以上より、ASC はこれら候補分子のいずれか、あるいは複数と相互作用して血栓形成や他の生体反応に関与しているとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が独自に同定した候補分子と ASC が、血小板においてどのように相互作用をするのかを解明し、血栓形成における役割を明らかにすることである。さらに、他の心血管疾患モデルを用いて、ASC / 新規同定分子の相互作用の新たな機能を検証することで、これを利用した血栓症のみならず他の心血管疾患における新たな治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

- ・血小板から ASC 結合タンパクを回収・質量分析 (LC-MS/MS) を行い、5 つの結合分子候補

を得た。そこで、これら新規分子の構造・機能による絞り込み (NCBI データベース等を利用) と、免疫沈降法による ASC への結合の検証を行った。

・レンチウイルスベクターによる強制発現・発現抑制 (CRISPR/Cas9 システムを利用) 系を構築し、血小板への活性化刺激 (ADP・CRP・トロンビン) を加えた際の血小板凝集能・細胞内シグナル (Syk・PLC・PI3K-Akt 等) ・細胞内カルシウム濃度について評価を行った。さらに、候補分子の蛍光融合タンパクを作製して、細胞内での局在や挙動、ASC との結合・解離について共焦点顕微鏡で解析した。血小板はマウスから単離して使用し、遺伝子導入実験ではヒト巨核球細胞株 (CMK11-5) を使用した。

・ASC の欠失変異 (CARD・PYRIN ドメイン等) を作製して、候補分子とともに HEK293 細胞および HeLa 細胞に導入し、ASC と候補分子の結合部位の同定を試みた。

・血栓症以外での ASC/新規候補分子の役割を明らかにするため、心血管細胞 (血管内皮・平滑筋・心筋・線維芽細胞) や炎症細胞 (マクロファージ・樹状細胞・リンパ球) における新規同定分子の発現とその制御を解析した。

#### 4. 研究成果

まず初めに、得られた候補分子の機能から本研究での解析対象を PDZ and LIM domain protein 1 (PDLIM1) と Peroxiredoxin-6 (Prdx6) に絞り込んだ。PDLIM1 は CLP36 としても知られ、GPVI を介した血小板の活性化を負に制御することが知られている (*Circ Res* 2012)。また、Prdx6 は脳梗塞により壊死した組織から放出され、浸潤したマクロファージを活性化させることにより炎症を引き起こすことが知られている (*Nat Med* 2012)。申請者はこれら 2 つの分子が ASC と相互作用し、血小板の活性化を制御する可能性が高いと予想し、その後の解析を進めた。

Flag タグを融合した ASC および Myc タグを融合した PDLIM1 および Prdx6 を HeLa 細胞へ強制発現させ、それぞれを蛍光標識し共焦点顕微鏡下での観察を行ったところ、ASC とこれら分子は細胞内で部分的に共局在しており、相互作用することが示唆された。また、免疫沈降法により ASC と PDLIM1・Prdx6 との結合部位の同定を試みたが、HeLa 細胞および HEK293 細胞では結果が得られず、結合部位の同定には至らなかった。同様に、マクロファージ様細胞株 (RAW264.7, J774) ・ヒト巨核球細胞株 (CMK11-5) ・ヒト T 細胞細胞株 (Jurkat) ・マウス組織由来細胞 (腹腔細胞・脾細胞・胸腺細胞) における ASC・PDLIM1・Prdx6 の発現および相互作用の有無を検討したが、これら細胞では結果が得られなかった。さらに、CMK11-5 およびレンチウイルスベクターを使用した ASC の発現抑制 (CRISPR/Cas9 システムを利用) 系を構築し、活性化刺激を加えた際の細胞内シグナル・細胞内カルシウム濃度について評価を行った。その結果、ASC の発現を抑制した (ASC-KD) CMK11-5 細胞ではコントロール細胞と比較して細胞内カルシウム濃度に上昇傾向が見られたものの、有意な差は認められなかった。また、細胞内シグナルについても同様に、ASC-KD とコントロールの間に有意な差は認められなかった。

しかし、マウスの血小板においては免疫沈降法でも ASC との結合が確認でき、ASC と PDLIM1・Prdx6 が相互作用することが示唆された。さらに、マウスの血小板では CRP やトロンビン刺激に

よって ASC スペック様の凝集塊や多量体形成が認められた。また、ASC KO マウスの血小板ではこれら刺激による細胞内カルシウム濃度が野生型マウスと比較して優位に上昇しており、特に CRP 刺激においては、その下流の P-selectin や活性型インテグリンの発現も優位に上昇し、ERK および Akt のリン酸化も強く亢進していた。興味深いことに、ASC KO マウスの血小板では PDLIM1 の発現が野生型マウスと比較して低下していた。PDLIM1 は CRP によって活性化される GPVI 下流のシグナルを負に制御しており、PDLIM1 を欠損する血小板では CRP 刺激による細胞内カルシウム濃度や P-selectin・活性型インテグリンの発現が上昇することが報告されている。本研究の結果は、ASC が PDLIM1 に作用することで血小板の活性化を制御することを強く示唆している。

以上の結果から、血小板の ASC はインフラマソームとは独立した機能を持っており、PDLIM1 と相互作用することでコラーゲンの受容体である GPVI 下流のシグナルを負に制御し、血小板の活性化を調節することが示唆された。血栓症は適切な治療を行った場合でも再発や出血のリスクのある疾患であり、その詳細な発症機序の解明と有効な治療法の確立は重要な課題である。本研究で ASC や PDLIM1 を対象とした治療効果を明らかにすることはできなかったが、今後、*in vivo* での病態解明が進み、新たな治療法が開発されることを期待する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>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<br>38              |
| 2. 論文標題<br>Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages  | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>744 ~ 756 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1161/ATVBAHA.117.310581   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura Jun, Watanabe Sachiko, Kimura Hiroaki, Kobayashi Motoi, Karasawa Tadayoshi, Kamata Ryo, Usui-Kawanishi Fumitake, Sadatomo Ai, Mizukami Hiroaki, Nagi-Miura Noriko, Ohno Naohito, Kasahara Tadashi, Minota Seiji, Takahashi Masafumi | 4. 巻<br>8          |
| 2. 論文標題<br>Adeno-associated Virus Vector-mediated Interleukin-10 Induction Prevents Vascular Inflammation in a Murine Model of Kawasaki Disease  | 5. 発行年<br>2018年    |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>7601 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-018-25856-0   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Mizushima Yoshiko, Karasawa Tadayoshi, Aizawa Kenichi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Komada Takanori, Mato Naoko, Kasahara Tadashi, Koyama Shinichiro, Bando Masashi, Hagiwara Koichi, Takahashi Masafumi | 4. 巻<br>203             |
| 2. 論文標題<br>Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1 Contributes to Acid Aspiration-Induced Acute Lung Injury  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>236 ~ 246 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4049/jimmunol.1900168  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Hishida Erika, Ito Homare, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Aizawa Emi, Kasahara Tadashi, Morishita Yoshiyuki, Akimoto Tetsu, Nagata Daisuke, Takahashi Masafumi | 4. 巻<br>9           |
| 2. 論文標題<br>Crucial Role of NLRP3 Inflammasome in the Development of Peritoneal Dialysis-related Peritoneal Fibrosis  | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>10363 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-019-46504-1   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Ito Homare, Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Hishida Erika, Kamata Ryo, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Horie Hisanaga, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi | 4. 巻<br>519           |
| 2. 論文標題<br>Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>15 ~ 22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2019.08.083  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Watanabe S, Usui-Kawanishi F, Karasawa T, Kimura H, Kamata R, Inoue Y, Mise N, Kasahara T, Takahashi M | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Glucose regulates hypoxia-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages.                       | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cellular Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>木村博昭、中村潤、渡邊幸子、唐澤直義、鎌田諒、笠原忠、三浦典子、大野尚仁、高橋将文 |
| 2. 発表標題<br>飽和脂肪酸の結晶形成を介した炎症惹起機構の解明                   |
| 3. 学会等名<br>第55回日本臨床分子医学会学術集会                         |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木村博昭、唐澤直義、渡邊幸子、鎌田諒、鈴木幸一、高橋将文 |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞分化における免疫プロテアソームの役割       |
| 3. 学会等名<br>第91回日本内分泌学会学術総会              |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊藤誉、佐田友藍、井上賢之、鎌田諒、渡邊幸子、唐澤直義、木村博昭、佐田尚宏、高橋将文 |
| 2. 発表標題<br>腸管虚血再灌流障害におけるNLRP3インフラマソームの役割の解明           |
| 3. 学会等名<br>第39回日本炎症・再生医学会                             |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡邊幸子、河西文武、木村博昭、唐澤直義、鎌田諒、高橋将文  |
| 2. 発表標題<br>低酸素刺激によるNLRP3インフラマソーム活性化機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第39回日本炎症・再生医学会                |
| 4. 発表年<br>2018年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木村博昭、唐澤直義、渡邊幸子、鎌田諒、駒田敬則、笠原忠、高橋将文 |
| 2. 発表標題<br>脂肪細胞分化におけるLMP7の役割                |
| 3. 学会等名<br>第39回日本肥満学会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ito H, Inoue Y, Sadatomo A, Yamada N, Kamata R, Watanabe S, Karasawa T, Kimura H, Sakuma Y, Horie H, Hosoya Y, Kitayama J, Sata N, Takahashi M |
| 2. 発表標題<br>NLRP3 inflammation and regeneration in radiation-induced enteritis   |
| 3. 学会等名<br>Digestive Disease Week(DDW2018)  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>唐澤直義、渡邊幸子、笠原忠、高橋将文       |
| 2. 発表標題<br>飽和脂肪酸は結晶形成を介して好中球浸潤を誘導する |
| 3. 学会等名<br>第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会      |
| 4. 発表年<br>2019年                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|