

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17536

研究課題名(和文) E3ユビキチンリガーゼARIH2によるNLRP3インフラマソーム制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of NLRP3 inflammasome regulation by ARIH2

研究代表者

鎌田 諒 (Kamata, Ryo)

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60801420

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)：動脈硬化や動脈瘤といった血管疾患における病態に無菌性炎症の関与が知られている。この無菌性炎症の惹起経路としてNLRP3インフラマソームが注目されている。我々はこれまでに、様々な疾患におけるNLRP3インフラマソームの役割とその制御機構を明らかにしてきた。本研究では、NLRP3インフラマソーム複合体から新たに同定したE3ユビキチンリガーゼARIH2はNLRP3発現をユビキチン-プロテアソームによって制御していることを見出した。さらに、マクロファージ特異的ARIH2欠損マウスを用いた解析によって、生体内においてもARIH2はNLRP3インフラマソームを負に制御していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ARIH2はNLRP3の発現をユビキチン-プロテアソーム系によって制御し、炎症反応を制御していることを明らかにした。これまでに、NLRP3インフラマソームは様々な疾患の発症機構への関与が示されていることから、ARIH2によるNLRP3インフラマソームの制御機構の一端を明らかにしたことで、様々な疾患の病態解明や新たな治療方法の確立に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sterile inflammation is known to be involved in the development of vascular diseases such as atherosclerosis and aneurysms. The NLRP3 inflammasome, an intracellular protein complex, has been focused on as one of the pathways to induce sterile inflammation.

We have clarified the role of the NLRP3 inflammasome and its regulatory mechanism in various diseases.

In the present study, we found that the E3 ubiquitin ligase ARIH2, newly identified from the NLRP3 inflammasome complex, ubiquitinates NLRP3, and as a result, NLRP3 is degraded by the proteasome. Furthermore, by using macrophage-specific ARIH2-deficient mice (ARIH2^{flox/flox}; CreLyzM), we found that ARIH2 negatively regulates the NLRP3 inflammasome in vivo.

研究分野：分子生物学

キーワード：インフラマソーム ユビキチン ARIH2

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化や大動脈瘤といった心血管疾患における炎症の重要性が示されている。これら心血管疾患で生じる炎症は、病原体の関与がないことから無菌性炎症と呼ばれ、その惹起経路として自然炎症経路の一つであるNLRP3インフラマソームが注目されている。NLRP3インフラマソームは危険シグナルを感知してアダプター分子ASCを中心にNLR(Nod-Like Receptor)ファミリーのNLRP3とCaspase-1によって細胞内に形成される分子複合体である。種々の刺激によりNLRP3インフラマソームが形成されると、Caspase-1活性化を介して、強力な炎症性サイトカインであるIL-1βのプロセッシングが誘導される(図1; 引用1,2)。申請者の所属するグループでは、これまで動脈硬化や心筋梗塞、腹部大動脈瘤、血管傷害後の内膜肥厚といった様々な心血管疾患におけるNLRP3インフラマソームの役割と、その制御が治療標的となり得ることを明らかにしてきた(引用3,4,5,6)。最近、NLRP3インフラマソームの制御機構を解明することを目的として、インフラマソーム複合体を単離・精製して質量分析による網羅的な解析を行った結果、インフラマソーム複合体中に新規E3ユビキチンリガーゼであるARIH2(Ariadne homolog 2)が含まれていることを見出した。さらに、ARIH2はNLRP3のNACHTドメインに直接結合してユビキチン修飾を行い、インフラマソーム活性化とIL-1β産生を負に制御していることも明らかにしている。しかしながら、これらのユビキチン修飾がNLRP3インフラマソームの活性を制御しているかは不明である。さらに、ARIH2欠損マウスは胎生致死であり(引用7)、生体におけるARIH2の役割についても明らかでない。

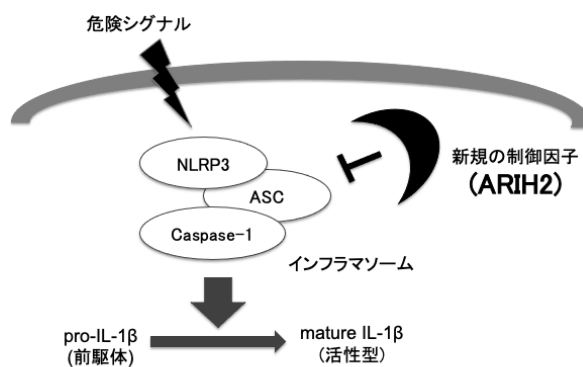


図1:インフラマソームを制御する新規分子の探索

2. 研究の目的

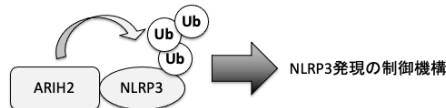
本研究は、申請者らが独自に同定したARIH2が、どのようにしてインフラマソーム活性を制御するかを解明し、マウスモデルを用いて生体における役割を明らかにすることを目的としている。心血管疾患への新たな治療戦略の確立に次の観点から挑む(図2)。

・ARIH2によるユビキチン修飾を介したNLRP3インフラマソーム制御機構解明

・ARIH2遺伝子改変マウスを用いて、生体内におけるARIH2の役割を検討する。

無菌性炎症惹起経路の一つであるインフラマソームは多くの疾患に関与することから、本研究による成果は、疾患の病態解明、新規治療法の開発にも大きく貢献することが期待できる。さらに、心血管疾患や生活習慣病は高齢化や食生活の変化とともに増加の一途を辿っていることから、臨床的・社会的にも大きなインパクトをもたらす可能性がある。

【目標1】ARIH2によるインフラマソーム活性の制御機構を解明する



【目標2】生体および疾患におけるARIH2の役割の検証を行う

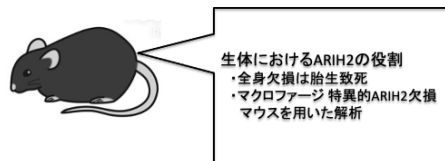


図2:本研究における研究計画および達成目標

3. 研究の方法

本研究ではARIH2によるNLRP3インフラマソームの制御機構を解明するとともに、既に作製したARIH2遺伝子改変マウスを用いて生体におけるARIH2の役割を検討する。

・ARIH2によるユビキチン修飾を介したNLRP3インフラマソーム制御機構解明について

ユビキチン修飾にはユビキチンにあるリシン残基(K48やK63など)を介した結合の種類によって、機能が異なることが知られている。申請者らは既に、ARIH2はNLRP3の発現量を負に制御していることを突き止めた。また、ARIH2はNLRP3に対して、K48およびK63を介したユビキチン修飾を行うことをARIH2欠損または過剰発現したヒトマクロファージTHP-1細胞(CRISPR/Cas9システムとレンチウイルスベクターにより作製)を用いて見出している。ARIH2によるNLRP3の発現制御機構について、K48/K63ユビキチン修飾を介したその後の分解系の関与を考えた。そこで、ユビキチン化されたNLRP3の分解経路を解明するため、プロテアソーム阻害剤MG132、オートファジー経路を阻害するChloroquineとBafilomycin A1を添加し、NLRP3タンパクの発現をウェスタンブロット法により解析した。

・生体内におけるARIH2の役割について

これまでにマクロファージ細胞株で見出した、ARIH2 による NLRP3 インフラマソーム制御機構について、Cre-loxP システムを利用したマクロファージ特異的欠損(ARIH2^{fllox/fllox}; CreLyzM)マウスから骨髓由来マクロファージの採取や、チオグリコレート腹腔内投与による腹腔内細胞由来マクロファージを回収し、初代マクロファージ培養細胞における検討を行った。さらに、マクロファージ特異的欠損マウスの腹腔内へ LPS を投与した際の血清中サイトカインの発現について検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、ARIH2 の NLRP3 インフラマソーム活性化制御機序を解明するとともに、遺伝子改変マウスの作製を行い、ARIH2 の生体における役割を検討した。

まずは、ARIH2 によりユビキチン化された NLRP3 の発現制御機構について、ARIH2 発現レベル上昇に伴う NLRP3 発現レベルの変化を調べるため、Tet-On システムにより作製したドキシサイクリン(DOX)添加による ARIH2 の発現誘導を可能にした THP-1 細胞を用いた解析を行った。その結果、DOX により誘導された ARIH2 の発現レベルの上昇に伴い、NLRP3 の発現が低下することが明らかとなった。その後の分解経路を解明するため、プロテアソーム阻害剤 MG132、オートファジー経路を阻害する Chloroquine と Bafilomycin A1 を添加し、NLRP3 タンパクの発現変化を解析した。その結果、ARIH2 発現上昇に伴う NLRP3 発現レベルの低下はプロテアソーム阻害剤 MG132 によって抑えられることが分かった。さらに詳細な解析を進めると、ARIH2 発現上昇によって NLRP3 への K48 を介したユビキチン修飾は促進されることが明らかとなった。これらの結果は、ARIH2 によって NLRP3 は K48 を介したユビキチン修飾がされ、プロテアソーム系によって分解されることを示した(図 3)。

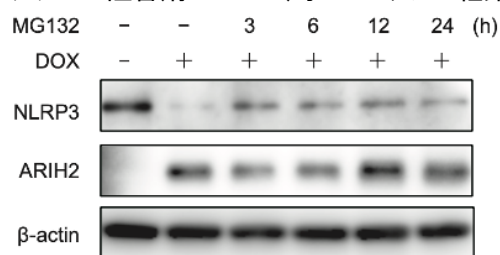


図3: ARIH2発現誘導に伴うNLRP3発現レベルの減少はプロテアソーム阻害剤MG132の添加によって抑えられた

Cre-loxP システムを利用したマクロファージ特異的 ARIH2 欠損(ARIH2^{fllox/fllox}; CreLyzM)マウスから骨髓液を採取し骨髓由来マクロファージ(BMDM)の分化を行い、初代マクロファージ培養細胞(ARIH2 欠損 BMDM)における NLRP3 発現とインフラマソーム活性の制御について検討を行った。その結果、ARIH2 欠損 BMDM において、LPS 刺激による NLRP3 プライミング増強効果が見られ、ATP 刺激によるインフラマソーム活性に続く IL-1β 産生・放出は ARIH2 欠損により増強することが明らかとなった。さらに、マクロファージ特異的 ARIH2 欠損マウス腹腔内への LPS 投与実験から、ARIH2 欠損マウスではコントロール(ARIH2^{fllox/fllox})マウスと比較して、血清中 IL-1β 量がより増加した。これらの結果から、生体内においてマクロファージ中の ARIH2 はインフラマソーム活性を負に制御していることが明らかとなった(図 4)。

ARIH2 欠損(-/-)マウスは胎生致死になることが報告されており、申請者が作製したマウスにおいても欠損(-/-)マウスを得ることができなかった。そのため、本研究では Cre-loxP システムを利用したマクロファージ特異的 ARIH2 欠損マウスを作製し、解析に用いた。

ARIH2 を発現している組織や細胞は多岐にわたり特に精巣・肝臓・脳・脾臓に高い発現が確認できている。今後、ARIH2 によるインフラマソーム制御だけでなく、ARIH2 の新たな基質を探索し、生体内における ARIH2 のさらなる機能を見出すことで、生命現象の理解とそれを基盤とした治療法に繋げたい。

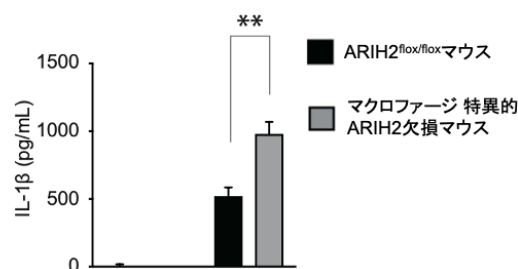


図3: マクロファージ特異的ARIH2欠損マウスではLPS腹腔内投与による血清中IL-1β放出はより増加する

<引用文献>

- ① Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J.* 2014;55(2):101-5.
- ② Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res.* 2021 Jan 23:cvab010.
- ③ Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, Sagara J, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury

in mice. *Circulation*. 2008 Jun 17;117(24):3079-87.

- ④ Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011 Feb 15;123(6):594-604.
- ⑤ Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 24;425(2):162-8.
- ⑥ 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*. 2018 Apr;38(4):744-756.
- ⑦ Lin AE, Ebert G, Ow Y, Preston SP, Toe JG, Cooney JP, Scott HW, Sasaki M, Saibil SD, Dissanayake D, Kim RH, Wakeham A, You-Ten A, Shahinian A, Duncan G, Silvester J, Ohashi PS, Mak TW, Pellegrini M. ARIH2 is essential for embryogenesis, and its hematopoietic deficiency causes lethal activation of the immune system. *Nat Immunol*. 2013 Jan;14(1):27-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 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 203
2. 論文標題 Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1 Contributes to Acid Aspiration-Induced Acute Lung Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 236 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900168	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 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 9
2. 論文標題 Crucial Role of NLRP3 Inflammasome in the Development of Peritoneal Dialysis-related Peritoneal Fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46504-1	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 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 519
2. 論文標題 Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.083	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 Anzai Fumiya, Watanabe Sachiko, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Nakamura Jun, Nagi-miura Noriko, Ohno Naohito, Takeishi Yasuchika, Takahashi Masafumi	4. 巻 138
2. 論文標題 Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2019.11.158	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 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Wakiya Taiichi, Sadatomo Ai, Ito Homare, Kamata Ryo, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kimura Hiroaki, Sanada Yukihiro, Sakuma Yasunaru, Mizuta Koichi, Ohno Nobuhiko, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 1606 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.15773	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 Yamada Naoya, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kamata Ryo, Sampilvanjil Ariunaa, Ito Junya, Nakagawa Kiyotaka, Kuwata Hiroshi, Hara Shuntaro, Mizuta Koichi, Sakuma Yasunaru, Sata Naohiro, Takahashi Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2334-2	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 Watanabe Sachiko, Usui Kawanishi Fumitake, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Komada Takanori, Inoue Yoshiyuki, Mise Nathan, Kasahara Tadashi, Takahashi Masafumi	4. 巻 235
2. 論文標題 Glucose regulates hypoxia induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7554 ~ 7566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29659	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 Sampilvanjil Ariunaa, Karasawa Tadayoshi, Yamada Naoya, Komada Takanori, Higashi Tsunehito, Baatarjav Chintogtokh, Watanabe Sachiko, Kamata Ryo, Ohno Nobuhiko, Takahashi Masafumi	4. 巻 318
2. 論文標題 Cigarette smoke extract induces ferroptosis in vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H508 ~ H518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00559.2019	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 Aizawa Emi, Karasawa Tadayoshi, Watanabe Sachiko, Komada Takanori, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Ito Homare, Hishida Erika, Yamada Naoya, Kasahara Tadashi, Mori Yoshiyuki, Takahashi Masafumi	4. 巻 23
2. 論文標題 GSDME-Dependent Incomplete Pyroptosis Permits Selective IL-1 Release under Caspase-1 Inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101070 ~ 101070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101070	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 Ito Homare, Kimura Hiroaki, Karasawa Tadayoshi, Hisata Shu, Sadatomo Ai, Inoue Yoshiyuki, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Hishida Erika, Kamata Ryo, Komada Takanori, Watanabe Sachiko, Kasahara Tadashi, Suzuki Takuji, Horie Hisanaga, Kitayama Joji, Sata Naohiro, Yamaji-Kegan Kazuyo, Takahashi Masafumi	4. 巻 205
2. 論文標題 NLRP3 Inflammasome Activation in Lung Vascular Endothelial Cells Contributes to Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1393 ~ 1405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000217	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 Watanabe Sachiko, Usui-Kawanishi Fumitake, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kamata Ryo, Yamada Naoya, Kimura Hiroaki, Dezaki Katsuya, Ohmori Tsukasa, Takahashi Masafumi	4. 巻 531
2. 論文標題 ASC regulates platelet activation and contributes to thrombus formation independent of NLRP3 inflammasome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 125 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.063	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 Wolfe Kara, Kamata Ryo, Coutinho Kester, Inoue Takanari, Sasaki Atsuo T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolic Compartmentalization at the Leading Edge of Metastatic Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 554272 ~ 554272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.554272	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 Kamata Ryo, Takahashi Masafumi	4. 巻 59
2. 論文標題 Role of NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis and Aortic Aneurysm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Japanese College of Angiology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7133/jca.19-00022	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 -

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

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
---------	---------