

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18274

研究課題名(和文)急性肺傷害に対する新規インフラマソームシグナル経路を介した傷害保護効果の検討

研究課題名(英文) Injury protection through a novel inflammasome signaling pathway against acute lung injury

研究代表者

倉敷 達之 (KURASHIKI, Tatsuyuki)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10722069

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)：上皮細胞のタイトジャンクション(TJ)は生体の内腔と外腔を隔てる上皮バリア機能に必須である。本研究では、急性炎症傷害前のインフラマソームの活性化は、急性傷害で惹起される上皮バリア機能の破綻を抑制できるか検討した。その結果、高濃度LPS刺激により誘導される肺傷害や肝障害とTJの異常は、低濃度LPSの前処理により抑制された。また、培養上皮細胞を用いた検討から低容量LPSによるインフラマソーム活性化は、カルシウム除去によるTJの消失を抑制した。この効果は、インフラマソーム活性化阻害によりキャンセルされた。これら結果から、インフラマソームシグナルが上皮バリア機能の保護に関わることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフラマソームの活性化に関する既存の報告の多くは炎症応答による細胞傷害についての解析であった。本研究は、細胞傷害保護に作用する新規インフラマソームシグナル経路の存在に着目し検討した。弱い炎症刺激によるインフラマソームの活性化が上皮バリア機能の保護に働くことが明らかとなった。敗血症、急性肺傷害、感染、癌の進展などに共通した分子病態として上皮バリア機能の破綻が生じる。インフラマソームの活性化は、上皮バリア機能の破綻を抑制できることから、それら病態の治療や予防の確立に本研究が貢献できる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The epithelial tight junctions (TJs) are essential for the epithelial barrier function that seals the intercellular and intracellular space.

In this study, we investigated whether activation of the inflammasome before acute inflammatory injury could suppress the disruption of epithelial barrier function caused by acute injury. As a result, lung injury and liver injury induced by high-concentration of LPS and disappear of TJs were suppressed by pretreatment with low-concentration LPS. In cultured epithelial cells, low-dose LPS mediated inflammasome activation suppressed the disappearance of TJs by calcium depletion. However, this effect was canceled by inhibited of inflammasome activation.

The present results indicated that the inflammasome signal is involved in the protection of epithelial barrier function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：急性肺傷害 上皮バリア機能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症などの急性臓器傷害では、組織の細胞間接着構造の異常が確認される。この異常を抑制することができれば、臓器傷害を抑えることが可能となる。

申請者らは、急性肝傷害モデルマウスや肺傷害モデルマウスにおいて細胞間接着構造の異常が細胞死よりも早く観察されることを見いだした。また、LPS 投与による敗血症モデルマウスの肝細胞の細胞間接着構造の異常が低容量 LPS の前処理によって抑制される事を発見した。一方、培地中のカルシウム除去によって起こる上皮細胞間接着構造の消失が低容量 LPS の前処理により抑制されることが明らかとなってきた。さらに、予備的な実験から、これら効果は、インフラマソームの活性化を阻害すると抑制された。しかし、その詳しい分子機構については不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では以下の点について検討することを目的とした。第一目標：培養上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) 消失に対するインフラマソーム活性化による保護効果の検討。第二目標：新規インフラマソームシグナルと細胞極性制御シグナルにおけるクロストークの検討。第三目標：新規インフラマソームシグナル経路の活性化を介する急性肺傷害マウスの肺保護効果の検討。

### 3. 研究の方法

(1) 培養上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) 消失に対するインフラマソーム活性化による保護効果の検討

培養上皮細胞への酸化ストレス刺激による TJ の異常 (消失) が低濃度 LPS や低容量 AMVN (脂溶性ラジカル発生剤) の前処理により抑制されるか TJ マーカーの ZO-1 の発現・局在変化をウェスタンブロットティング法 (WB) および免疫蛍光染色 (IF) により検討する。さらに電気抵抗値測定法 (TER 法) により上皮バリア機能を評価する。また、インフラマソーム活性化阻害剤 (カスパーゼ阻害剤) を処理した際の効果を検証する。

(2) 新規インフラマソームシグナルと細胞極性制御シグナルにおけるクロストークの検討

低容量 LPS・AMVN 処理によりインフラマソームの活性化が生じるかインフラマソームマーカーである NLRP3、ASC の発現および複合体形成について WB 法と免疫沈降実験にて検証する。また、IL-1、Caspase-1 の活性化、発現変化を WB 法により検討する。細胞極性制御分子である aPKC、Par-3 の発現および局在変化について WB 法 と IF 法を用いて検討する。

(3) 新規インフラマソームシグナル経路の活性化を介する急性肝傷害および急性肺傷害モデルマウスの臓器保護効果の検討

LPS 投与により急性臓器傷害の誘導前に低容量 LPS (傷害誘導量の 1/10~1/20 量) を投与しインフラマソームの活性化と肺胞上皮バリア機能の傷害抑制効果について検討する。また、TJ、インフラマソームの活性化、極性制御分子の発現・局在変化について免疫組織化学的手法により検討する。

### 4. 研究成果

(1) 培養上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) 消失に対するインフラマソーム活性化による保護効果の検討

培地中のカルシウム除去によって誘導される培養上皮細胞である MDCK の TJ の消失は、低容量 LPS や低容量 AMVN の処理により抑制された (図.1)。また、低容量 LPS 処理は、ヒト臍帯静脈内皮細胞の細胞間接着構造の破壊も抑制した。さらに、ウェスタンブロットティング法による解析から、低容量 LPS、低容量 AMVN を処理した MDCK では、NLRP3、カスパーゼ 1、IL-1 の発現上昇が確認された (図.2)。インフラマソームの活性化および、細胞間接着構造の消失は、インフラマソーム活性化阻害剤であるカスパーゼ 1 阻害剤の処理により抑制された (図.1)。一方、低容量 LPS 処理によるインフラマソームの活性化について免疫組織化学により検討した。その結果、TJ の消失 (破壊) が抑制された細胞群ではインフラマソームの活性化時に観察される ASC の細胞内への凝集が観察された (データ未提示)。

図.1 インフラマソームの活性化は細胞間接着構造の消失を抑制した。

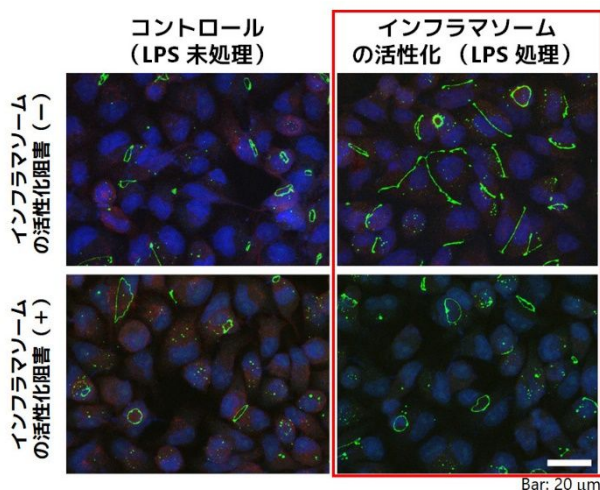
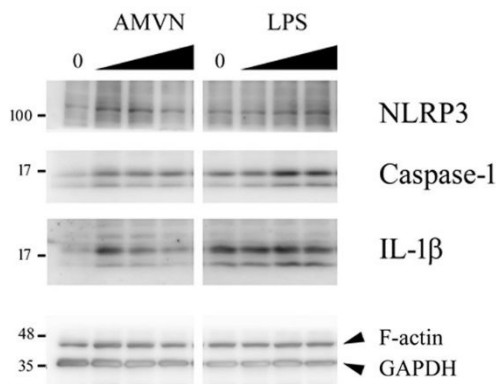


図.2 LPS、AMVN処理は上皮細胞のインフラマソームの活性化を誘導した。



(2) 新規インフラマソームシグナルと細胞極性制御シグナルにおけるクロストークの検討

MDCK や HUVEC に低容量 LPS を処理すると、カルシウム除去により誘導される細胞間接着構造の消失は抑制された。低容量 LPS 処理した MDCK 細胞では、上皮細胞の接着構造の形成・維持に関わる極性制御分子である aPKC (atypical protein kinase C) T560 リン酸化の上昇が確認され、aPKC の活性化が確認された (図.3)。

また、上述の接着構造の消失抑制効果は、aPKC 特異的阻害剤である Myristoylated-PKC-pseudosubstrate (10 μM) を処理することにより、その効果が阻害されることが明らかとなった (図.4)。これらの結果は、低用量 LPS 処理による上皮細胞の接着構造保護効果は、aPKC の活性化を介している事が分かった。

上述 (1) と (2) からインフラマソームシグナルの活性化に aPKC を介した極性制御シグナルが関わる事が示唆され、これらシグナルが上皮バリア機能の形成や保護に関わる細胞内情報伝達経路となりうる事が明らかとなった。

図.3 インフラマソームの活性化過程において PI3K シグナルおよび aPKC の活性化を誘導した。

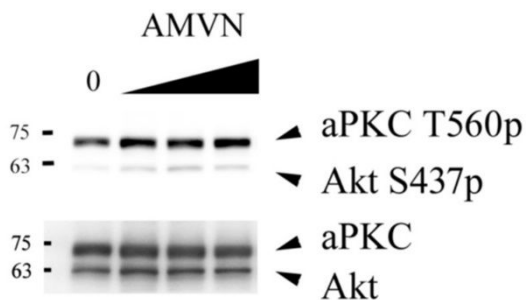
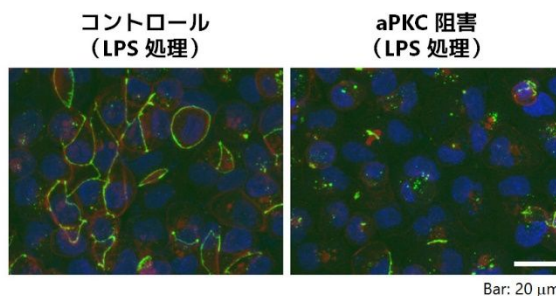


図.4 aPKC の活性阻害はインフラマソーム活性化に伴う細胞間接着構造の保護作用が抑制された。



(3) 新規インフラマソームシグナル経路の活性化を介する急性肝傷害および急性肺傷害モデルマウスの臓器保護効果の検討

高濃度の LPS 刺激により誘導される肺傷害マウスおよび、肺傷害モデルマウスを用いて、低濃度 LPS の前処理し、それら組織の細胞間接着構造の保護作用について検討した。その結果、低濃度 LPS の前処理により、肝傷害および肺傷害が抑制された。さらに、それら組織の細胞間接着構造の変化も抑えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Morimoto Masaki, Horikoshi Yosuke, Nakaso Kazuhiro, Kurashiki Tatsuyuki, Kitagawa Yoshinori, Hanaki Takehiko, Sakamoto Teruhisa, Honjo Soichiro, Umekita Yoshihisa, Fujiwara Yoshiyuki, Matsura Tatsuya	4. 巻 470
2. 論文標題 Oncogenic role of TYRO3 receptor tyrosine kinase in the progression of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.11.028	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 堀越洋輔, 野村聡子, 新藤有夏, 松井亮仁, 森本昌樹, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 新規インフラマソーム経路は上皮細胞の極性形成を介し傷修復を促進する
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀越洋輔, 野村聡子, 新藤有夏, 松井亮仁, 森本昌樹, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 酸化ストレス刺激/炎症刺激によるaPKCの機能制御を介した修復促進効果の検討
3. 学会等名 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第27回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本昌樹, 堀越洋輔, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 本城総一郎, 藤原義之, 松浦達也
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼTAMは肺癌の増悪化に関与する
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野中智生, 堀越洋輔, 森本昌樹, 倉敷達之, 中曽一裕, 松浦達也
2. 発表標題 コエンザイムQ10の上皮細胞極性形成に対する作用
3. 学会等名 第17回コエンザイムQ10研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉敷達之, 北川良憲, 足立雄基, 船木一美, 大槻明広, 稲垣喜三
2. 発表標題 デクスメドミジンはヒト株化ケラチノサイトHaCaT細胞においてリポポリサッカライドによる創傷治癒の遅延を改善する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021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