

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03955

研究課題名（和文）炎症促進性細胞死パイロトーシスの代謝産物による制御

研究課題名（英文）Regulation mechanism of pyroptosis by metabolites

研究代表者

秋 利彦（Aki, Toshihiko）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60304474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：炎症促進性細胞死であるパイロトーシスの代謝産物による制御機構を解析した。まず、マクロファージ細胞をリポポリサッカリドを用いてパイロトーシスを起こしたところ、解糖系が盛んなほどパイロトーシスも盛んであることがわかった。解糖系の副産物であるメチルグリオキサルによるHIF1の不活性化がその一因であることが示唆された。次に解糖系が盛んになる程パイロトーシスの実行因子であるガスダーミンDの発現が増え、またもう一つの実行因子であるガスダーミンEの発現は減ることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症は様々な病態で見られる普遍的な所見であるが、その制御機構はあまりよくわかっていない。パイロトーシスは近年発見された炎症促進性の細胞死であるが、その制御機構の詳細は未だ明らかでない。免疫細胞の一種であるマクロファージにおいて、解糖系はパイロトーシスを促進させることを見出した。これは糖尿病における炎症の増悪などとの関連を予想させるものである。また、二つの全く別なパイロトーシス実行因子であるガスダーミンDとEの発現が解糖系により全く逆方向に制御されていることも見出し、ガスダーミン分子の機能分担に新たな知見を加えた。

研究成果の概要（英文）：Regulation mechanism of pyroptosis by metabolites was investigated. Firstly, it was shown that pyroptosis was activated by glycolysis in RAW264.7 murine macrophage cells stimulated with lipopolysaccharides. Inactivation of HIF1, hypoxia-inducible factor, through methylglyoxal seems to be involved in this phenomenon. Second, we found that higher glycolysis is accompanied by not only higher GSDMD expression but also lesser GSDME expression.

研究分野：分子細胞毒性学

キーワード：パイロトーシス マクロファージ 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

パイロトーシスは炎症誘導性の細胞死でありアポトーシスと同じくカスパーゼによって仲介される。アポトーシスとは異なり炎症性のカスパーゼであるカスパーゼ1 (またはカスパーゼ11) によって実行される。ガスダーミンと呼ばれるタンパク質が細胞内で不活性型前駆体として存在し、カスパーゼによって切断されるとN端側の約30kDaのドメイン(p30)が細胞膜へと移行して会合し膜にチャンネルを形成する。この膜チャンネルを介して、炎症促進性のインターロイキン(IL-1 $\beta$ , IL-18)のみならず、HMGB1などの炎症促進物質が放出される。一方でこのチャンネルを介して細胞外から水が流入し、細胞はバルーンング(ballooning)と呼ばれる風船状の特徴的な膨張を呈し、光学顕微鏡でも容易に確認できる。ガスダーミンには少なくともA~Eの5種類が存在し、どれもN端側に約30kDaのドメインを有していてチャンネル形成能があることが確認されている。しかしながら炎症時のカスパーゼ1によるガスダーミンDの切断・活性化、抗がん剤などの薬毒物暴露細胞におけるカスパーゼ3によるガスダーミンEの切断・活性化以外の機構は未だ知られていない。

申請者は法医学教室に在籍し、特に実務上問題になることが多い敗血症の病態と鑑別の研究を、主にラットなどの実験動物を用いて行ってきた。我々がLPS刺激した肝細胞からミトコンドリアや抗酸化タンパク質であるペルオキシレドキシシンが放出されることなどをプロテオミクス的手法を用いて発見するのに並行して、世界的にパイロトーシスの分子機構の解明が急速に進行した。他の細胞死からパイロトーシスを特徴付ける機構として、特に代謝産物による厳密な制御機構があげられる。メタボロミクスとプロテオミクスを同時に行えるという教室の利点を生かし、特に免疫細胞を用いたin vitroのシステムによる詳細なパイロトーシスの分子機構の解析を行うことが、敗血症・パイロトーシス研究の世界的な流行・進展に追いつくために必要であると考えた

## 2. 研究の目的

パイロトーシスは主にマクロファージなどの免疫細胞に見られる炎症促進性の細胞死であり、法医実務上重要な敗血症はじめ様々な病態に関与している。パイロトーシスは細胞内外の環境、特に栄養環境によって制御されており、敗血症発症時に見られる高血糖や糖尿病などに見られる炎症の遷延などと密接に関係している。パイロトーシスを司るタンパク質の活性は細胞内代謝産物による制御を受けており、栄養状態と炎症を相関させる分子の実態を成している。本研究では細胞内代謝産物の網羅的解析(メタボロミクス)からパイロトーシスに関与する代謝産物の候補をスクリーニングし、更に代謝産物により活性制御を受けるタンパク質の網羅的解析(プロテオミクス)から新規な活性制御機構の同定を目指す。法医学的に重要な炎症促進性細胞死であるパイロトーシスの制御機構の解明と、合わせて新規な敗血症の鑑別マーカーの開発が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

主にマウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞を用い、パイロトーシスの誘導には大腸菌細胞壁成分であるリポポリサッカリドを用いた。タンパク質の網羅的解析であるプロテオミクス、代謝産物の網羅的解析であるメタボロミクスを用い、パイロトーシスを制御する代謝産物の同定を行った。

## 4. 研究成果

解糖系がパイロトーシスを促進することを見出し、その分子実態の一つとして解糖系代謝産物の一つであるメチルグリオキサールによる低酸素誘導性因子 HIF1 の分解促進を同定した。また、パイロトーシスの実行分子であるガスダーミンファミリータンパク質のうちガスダーミン D とガスダーミン E は解糖系により逆方向へ制御されていることを見出した。すなわち、解糖系によりガスダーミン D の遺伝子発現は増加し、逆にガスダーミン E の遺伝子発現は低下する。興味深いことに、ガスダーミン D の遺伝子発現を制御する転写因子である IRF2 はこの現象に関与しておらず、新たな転写因子による新規な制御機構の存在が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Aki Toshihiko, Unuma Kana, Uemura Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Peroxiredoxins in the Regulation of Sepsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 126 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11010126	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 Aki Toshihiko, Funakoshi Takeshi, Unuma Kana, Uemura Koichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Inverse regulation of GSDMD and GSDME gene expression during LPS-induced pyroptosis in RAW264.7 macrophage cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Apoptosis	6. 最初と最後の頁 14 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10495-022-01708-1	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 Wen Shuheng, Unuma Kana, Funakoshi Takeshi, Aki Toshihiko, Uemura Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Altered cardiac mitochondrial dynamics and biogenesis in rat after short-term cocaine administration	5. 発行年 2021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/s41598-021-03631-y	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 Aki Toshihiko, Uemura Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell Death and Survival Pathways Involving ATM Protein Kinase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1581 ~ 1581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12101581	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 Aki Toshihiko、Funakoshi Takeshi、Noritake Kanako、Unuma Kana、Uemura Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Extracellular glucose is crucially involved in the fate decision of LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10581-10581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67396-6	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋 利彦, 船越丈司, 佐野智美, 則竹香菜子, 上村公一
2. 発表標題 LPS 刺激マクロファージ様細胞におけるパイロトーシスと一酸化炭素発生剤の抑制作用
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会、京都府、京都市
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村萌夏, 鶴沼香奈, 永井みどり, 秋 利彦, 上村公一
2. 発表標題 コカイン反復投与ラットにおける主要臓器変性の検索
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会、京都府、京都市
4. 発表年 2020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
研究 分担者	船越 丈司  (Funakoshi Takeshi)  (40444715)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	則竹 香菜子  (Noritake Kanako)  (40758067)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教    (12602)	変更：2020年9月1日（0）東京医科歯科大学 （30,000）東京大学

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