

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17222

研究課題名（和文）肺線維症における無菌性炎症の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Investigation into molecular basis of sterile inflammation in pulmonary fibrosis

研究代表者

水品 佳子（Mizushina, Yoshiko）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70458321

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）：特発性肺線維症（IPF）急性増悪におけるPyroptosisの関与を解明する目的で、ナノシリカによる急性肺傷害（ALI）モデルを用いて解析を行った。肺胞上皮細胞株であるA549細胞にナノシリカを添加するとCaspase-3依存的なGSDMEのプロセッシングを認めたが、Caspase-3欠損A549細胞において細胞死は抑制されなかった。次にPyroptosis以外の細胞死に着目しNecroptosisを抑制するRIP3阻害剤を添加したところ細胞死が抑制された。以上の結果よりナノシリカによるA549細胞の細胞死へのNecroptosisの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPF急性増悪やCOVID-19肺炎の重症化機序にはALI/ARDSが関与し、COVID-19肺炎ではNLRP3インフラマソームの活性化やPyroptosisが関与していることが報告されている。しかしながら、ALIの病因におけるPyroptosisの役割や肺胞上皮細胞のPyroptosisは不明な点が多く、本研究の新規性は高い。本研究の成果は、ALIの病態解明や新たな治療戦略の開発にも繋がることが期待される。さらにPyroptosis以外の細胞死の関与やPyroptosisが惹起される機序を解明することで、無菌性炎症が関与する様々な疾患の病態解明にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of pyroptosis in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis using the nanosilica-induced acute lung injury (ALI) model. Although nanosilica induced GSDME processing by activating caspase-3 in pulmonary epithelial cell line A549 cells, cell death was not ameliorated in caspase-3-deficient A549 cells. Therefore, we focused on another type of regulated cell death, necroptosis. The RIP3 inhibitor (necroptosis inhibition) ameliorated nanosilica-induced A549 cell death. These results suggest that necroptosis contributes to nanosilica-induced alveolar epithelial cell death.

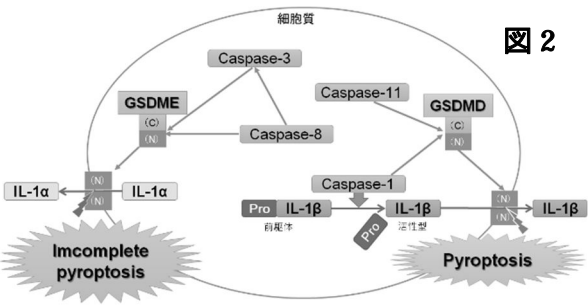
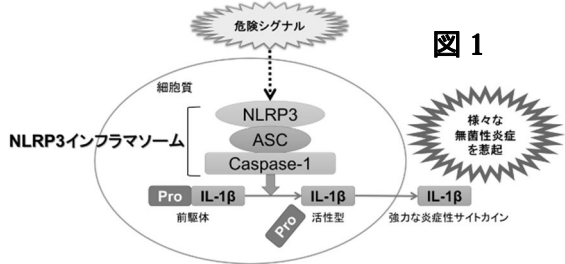
研究分野：呼吸器内科学

キーワード：炎症 細胞死 細胞・組織 肺疾患 免疫学

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は特発性間質性肺炎の一病型であり、慢性に肺が線維化し、徐々に呼吸機能が低下する予後不良の疾患で、診断後の平均生存期間は3~5年とされている。多様な遺伝的背景と環境因子に関連した慢性炎症、繰り返す肺胞上皮の損傷などによって発症するとされているが、その病因は明らかになっていない。

近年、様々な病態における炎症が、制御された細胞死 (Regulated cell death: RCD) を起点として起こってることがわかってきた。特に、細胞膜の破綻を伴うネクローシス様 RCD では、細胞内成分 (核酸や HMGB1) が細胞外に流出することで、炎症が惹起される。このネクローシス様 RCD のうち、Pyroptosis はインフラマソーム (Inflammasome) を介して誘導される。NLRP3 インフラマソームは、Nod 様受容体である NLRP3 とアダプター分子 ASC、Caspase-1 で構成される細胞内分子複合体で、危険シグナル (DAMPs: Damage-associated molecular patterns) を認識することで形成され、Caspase-1 の活性化を誘導し、強力な炎症性サイトカインである IL-1 の前駆体を活性型に切断することで炎症を惹起する (図 1)。この Caspase-1 の活性化は IL-1 の放出を伴う炎症性細胞死を起こすことも知られており、この細胞死は 2001 年に Pyroptosis と命名されていた。この機序は長い間不明であったが、2015 年に Caspase-1 もしくは Caspase-11 の活性化によって切断された Gasdermin D (GSDMD) の N 末断片が多量体化して細胞膜に孔 (10-20 nm) を形成することが明らかになり、GSDMD が Pyroptosis の実行分子として同定された。IL-1 (径 4.5 nm) はこの孔を通して細胞外に放出され、これによって炎症が惹起される。さらに、細胞の膨化・破裂が生じることで、Pyroptosis が誘導されることも明らかになった (図 2)。また最近、Gasdermin E (GSDME) も同様の機序で Pyroptosis を誘導することが報告された [1]。GSDME を高発現している細胞では、Caspase-3 が GSDME を切断し Pyroptosis が誘導されることが示されている [2]、申請者らの研究チームは、インフラマソームの活性化が Caspase-8/GSDME 依存的な Pyroptosis を誘導することを見出した (Incomplete pyroptosis と命名)。さらに、この Pyroptosis では IL-1 産生ではなく、IL-1 産生を伴い、一般的なインフラマソーム活性化による炎症惹起とは異なる特徴を示すことを報告している (図 2) [3]。



急性肺傷害 (acute lung injury : ALI) や急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome : ARDS) は全身性炎症や肺組織の直接的な傷害によって誘導される。その病態の詳細は不明で、現在においても ARDS の死亡率は 20~30% と高く、その病態の解明と新たな治療法の開発は重要な課題である。IPF の進行過程で、新規の肺野浸潤影の出現や呼吸不全の進行を 1 ヶ月未満の経過で認めることがあり、それを IPF の急性増悪と定義している。急性増悪の年間発生率は 5~15% 程度とされ、病理学的には ALI / ARDS と同様のびまん性肺胞傷害 (diffuse alveolar damage: DAD) を特徴とする。

申請者は、これまで様々な ALI モデルにおけるインフラマソームおよび IL-1 の関与について研究し報告を行ってきたが [4, 5]、IPF の急性増悪を含めた ALI / ARDS における Pyroptosis の役割はほとんどわかっていない。

また、Pirfenidone (PFD) は抗線維化薬として IPF における肺線維化の進行抑制に関与することが示されており、2008 年より臨床応用されているが、その作用機序は十分に解明されていない。IPF を含めた間質性肺炎合併肺癌の手術後に急性増悪を生じることがあり、その予防に PFD が有効であることが報告され、2017 年 10 月より NEJ043 試験でもその効果が検証されている。現在報告されている PFD の作用機序の一つに IL-1 の産生抑制効果があることから、IPF の急性増悪および PFD の作用機序においてもインフラマソームや IL-1 の関与が強く示唆される。

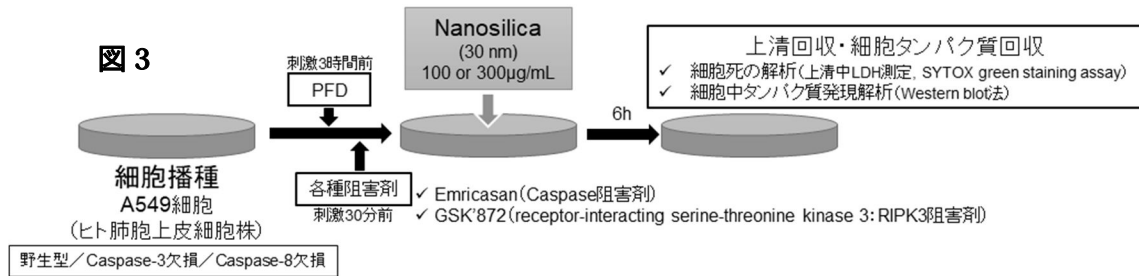
## 2. 研究の目的

以下の2点を明らかにすることを目的に研究を行った。

- (1) IPFの急性増悪の病態へのインフラマソームおよびPyroptosisの関与を明らかにする。
- (2) IPFの急性増悪およびALIにおけるPFDの作用機序をインフラマソームおよびPyroptosisの視点から解明し、それによりIPFおよびALIの病態を明らかにし、新たな治療標的を同定する。

## 3. 研究の方法

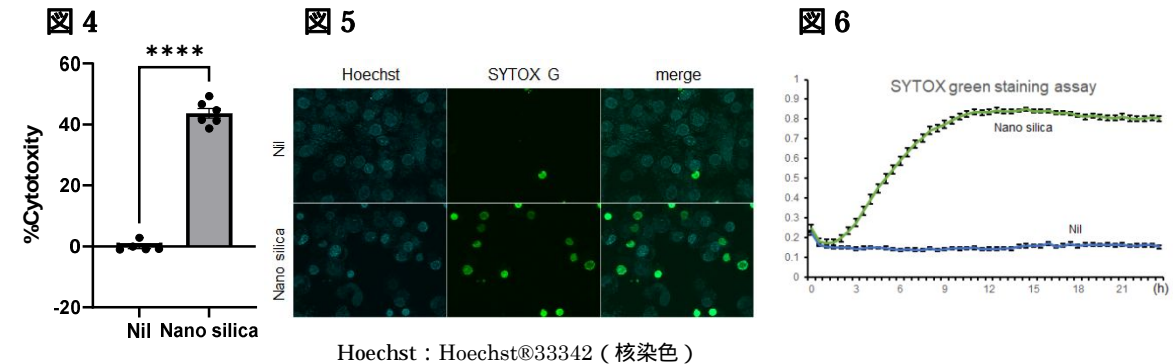
ALIモデルとして、A549細胞(肺胞上皮細胞株。野生型/Caspase-3欠損/Caspase-8欠損)にナノシリカ(二酸化ケイ素のナノマテリアル。粒子径30nm)を最終濃度100 µg/mLもしくは300 µg/mLで添加した。添加6時間後に細胞上清・細胞タンパク質を回収し解析を行った。各種阻害剤およびPFDを添加し同様の解析を行った(図3)。



## 4. 研究成果

### ナノシリカ刺激は肺胞上皮細胞の細胞死を誘導する

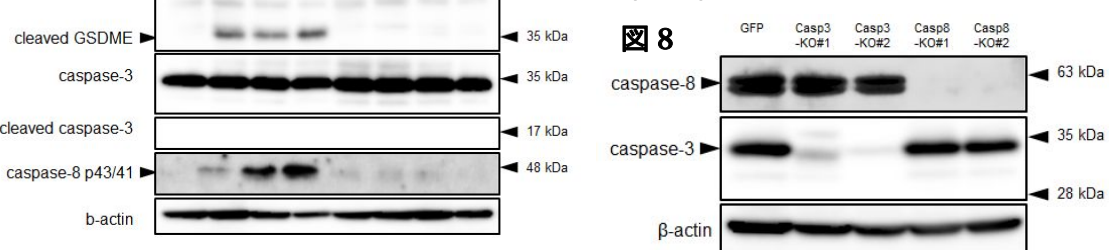
A549細胞にナノシリカを添加すると細胞上清中のLDHは有意に増加し(図4)、共焦点顕微鏡ではSYTOX green陽性細胞の増加が認められた(図5)。SYTOX green staining assayでもナノシリカ添加により細胞死の増加が認められた(図6)。



### ナノシリカ刺激は肺胞上皮細胞のCaspase-3依存的なGSDMEプロセッシングを誘導する

ナノシリカ刺激後のA549細胞のタンパク質を回収し、Western blot法で解析を行った。

ナノシリカ刺激によりGSDMEおよびCaspase-8のプロセッシングが認められ、それらはEmricasanの添加によって抑制された(図7)。



次に、ナノシリカ刺激による肺胞上皮細胞の細胞死におけるGSDMEのプロセッシング機構やPyroptosisの役割を解明する目的で、Caspase-3およびCaspase-8欠損細胞を作製した(図8)。

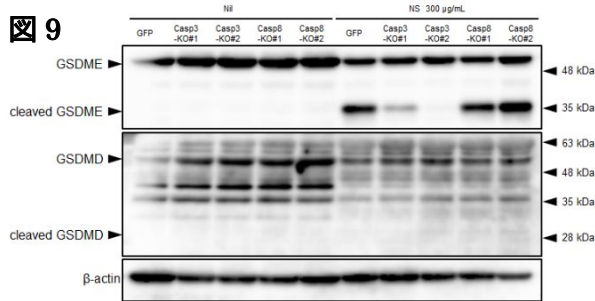


図 9 GSDME のプロセッシングは Caspase-3 欠損細胞で抑制されたが、Caspase-8 欠損細胞では抑制されなかった (図 8)。以上の結果より、ナノシリカ刺激は肺胞上皮細胞に Caspase-3 依存的な GSDME プロセッシングを誘導することが示唆された。

### ナノシリカによる肺胞上皮細胞死は Caspase-3 欠損で抑制されない

次に Caspase-3 および Caspase-8 の細胞死への関与を明らかにする目的で、Caspase-3 および Caspase-8 欠損 A549 細胞をナノシリカで刺激し共焦点顕微鏡で観察した。

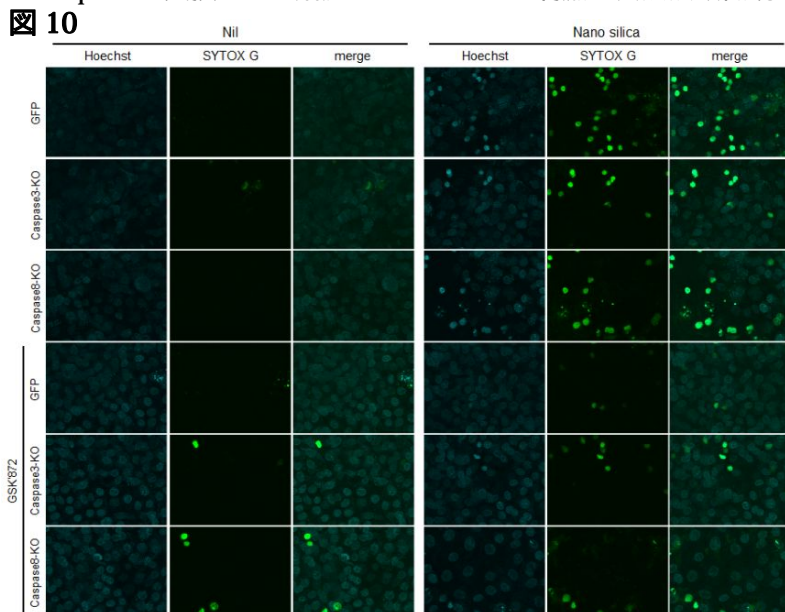


図 10 Caspase-3 および Caspase-8 欠損細胞ともに SYTOX green 陽性細胞の減少は認められず (図 9)。SYTOX Green staining assay でも両細胞ともに細胞死の抑制は認められなかった (図 11)。

以上の結果より、ナノシリカによる肺胞上皮細胞死は Pyroptosis 以外の細胞死が関与していることが示唆された。

図 11 ナノシリカ刺激により A549 細胞で MLKL (Mixed lineage kinase domain-like) リン酸化が誘導された (図 12)。MLKL は RIPK3 および RIPK1 とともに Necrosome というタンパク質複合体を形成し、Necrosome 内で MLKL は RIPK3 によってリン酸化され Necroptosis を誘導する。そこでナノシリカによる肺胞上皮細胞死に、RCD の 1 つである Necroptosis が関与している可能性を考えた。

図 11

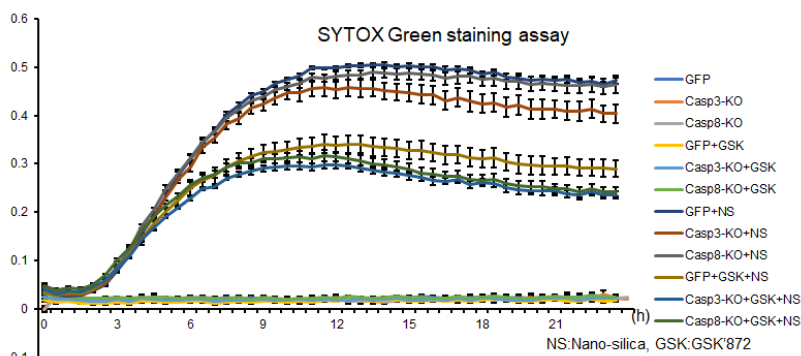
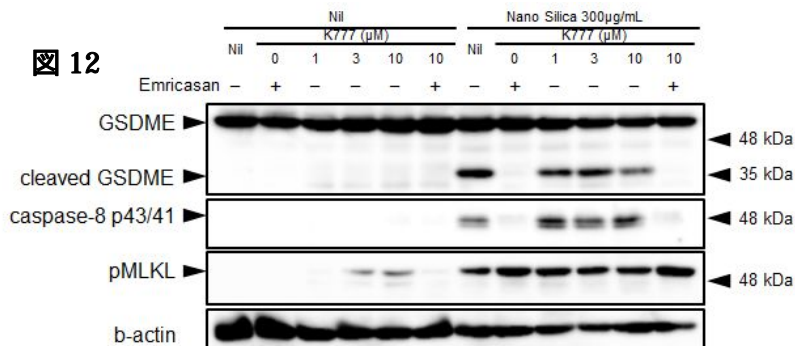


図 12

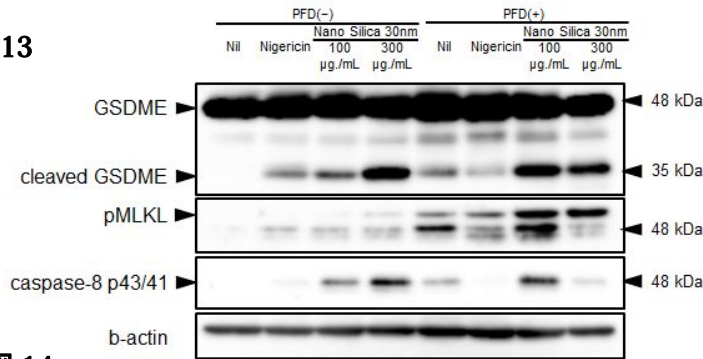


K777: Cystein protease inhibitor

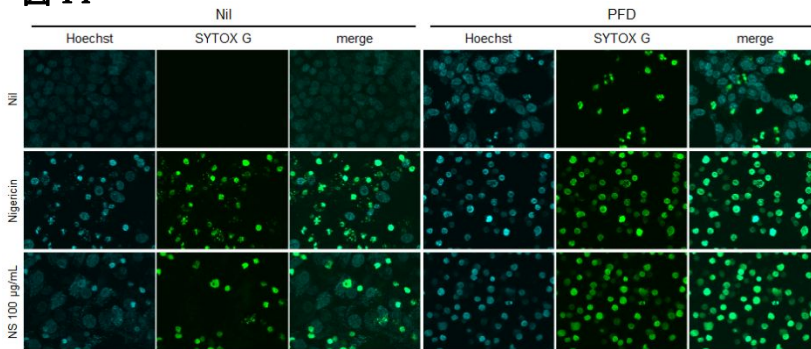
図 12 GSK'872(RIPK3 阻害剤)の添加により細胞死の抑制が認められ (図 10, 図 11) 以上の結果から、ナノシリカによる肺胞上皮細胞死に Necroptosis が関与していることが示唆された。

**PFD はナノシリカによる肺胞上皮細胞の GSDME プロセッシングを抑制しない**

**図 13**



**図 14**



ナノシリカ刺激 3 時間前に PFD を添加した。PFD を添加しても、GSDME および Caspase-8 のプロセッシングは抑制されず、MLKL のリン酸化は増加していた(図 13)。共焦点顕微鏡による観察では、PFD の添加による SYTOX green 陽性細胞の減少は認めなかった。一方で Nigericin による核断片化の抑制が観察され、PFD による Apoptosis の抑制効果が示唆された。

以上の結果から、今後はナノシリカ刺激による肺胞上皮細胞死について in vivo を含めてさらに解析を進める予定である。また ALI における PFD の作用機序についても解析を進めていく予定である。

< 引用文献 >

1. Broz, P., P. Pelegrín, and F. Shao, *The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(3): p. 143-157.
2. Wang, Y., et al., *Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin*. Nature, 2017. **547**(7661): p. 99-103.
3. Aizawa, E., et al., *GSDME-Dependent Incomplete Pyroptosis Permits Selective IL-1α Release under Caspase-1 Inhibition*. iScience, 2020. **23**(5): p. 101070.
4. Mizushima, Y., et al., *Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1β Contributes to Acid Aspiration-Induced Acute Lung Injury*. J Immunol, 2019. **203**(1): p. 236-246.
5. Mizushima, Y., et al., *NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1β*. J Biol Chem, 2015. **290**(8): p. 5065-5077.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------