

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06146

研究課題名（和文）炎症応答の鍵分子としての低分子量G蛋白質Arf6の解析

研究課題名（英文）The small GTPase Arf6 is a key molecule for inflammatory responses

研究代表者

金保 安則（Kanaho, Yasunori）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00214437

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）：炎症応答は、病原体の排除、損傷組織の修復等に重要な機構である一方、過剰あるいは慢性的な炎症応答は、様々な炎症性疾患を引き起こす。本研究では、気管支喘息モデルマウスを用いて低分子量G蛋白質Arf6の炎症応答における機能解析を行った。その結果、マクロファージ中のArf6が、炎症応答において中心的な役割を果たすインフラマソームのプリオン様細胞間伝搬を促進することにより、過剰な炎症応答を引き起こし、アレルギー性の気管支喘息を増悪させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフラマソームは病原体などの刺激物質を感知し炎症応答を誘導する複合体であるが、形成後細胞外にも放出され、それを周囲のマクロファージが貪食することにより、貪食細胞中で新たなインフラマソームが形成され、連鎖的に炎症応答が誘導・増幅される。本研究では、Arf6がマクロファージによる細胞外インフラマソームの貪食を促進することにより、炎症反応を増強することを明らかにしており、病的な炎症応答の分子メカニズムの一端を明らかにした。また、遺伝子欠損や薬剤によってArf6を阻害することによりアレルギー性気管支喘息が顕著に緩和されたことから、Arf6は炎症性疾患の有効な治療標的となると期待される。

研究成果の概要（英文）：While the inflammatory response is an important mechanism for the elimination of pathogens and the repair of damaged tissues, excessive or chronic inflammatory responses can cause various inflammatory diseases. In this study, we analyzed the function of the small G protein Arf6 in inflammatory responses using a mouse model of bronchial asthma. As a result, we found that Arf6 in macrophages promotes prion-like cell-to-cell transmission of inflammasomes, which play a central role in inflammatory responses, thereby causing excessive inflammatory responses and exacerbating allergic bronchial asthma.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：低分子量G蛋白質Arf6 インフラマソーム 炎症応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症反応は、ウイルスや細菌などの異物や死細胞を、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞が認識し貪食することにより開始される。貪食後、これらの細胞は様々なサイトカインやケモカインを放出することによって、周囲の免疫細胞を活性化し、また標的組織への遊走を促進することにより炎症反応を惹起・増幅する。さらに、リンパ球への抗原提示を行い、獲得免疫系を活性化することにより、感染症からの回復、組織の治癒を行う。その一方で、過剰なサイトカイン放出、自己抗原による免疫細胞の慢性的な活性化は、様々な炎症性疾患に繋がる。従って、マクロファージや樹状細胞による異物の貪食からサイトカイン放出に至る一連の反応を制御する鍵因子の同定と、メカニズムの解明、およびそれらをコントロールする方法の開発は、感染症への対応、各種炎症性疾患の治療において重要な課題である。

細胞が貪食を行う際には、細胞膜のダイナミックな変化を伴う。これを可能にしているのがアクチン細胞骨格のリモデリングである。また、免疫細胞の遊走や浸潤においても細胞膜のダイナミクスが重要となる。一方、サイトカイン放出や抗原提示、細胞の遊走に必要な接着因子の取り込みや輸送には、膜小胞を介した細胞内物質輸送が必要となる。これらの機能を制御する因子として我々が着目したのが低分子量 G 蛋白質 Arf6 である。Arf6 は、アクチン細胞骨格のリモデリングと細胞内膜小胞輸送を制御する低分子量 G 蛋白質であり、細胞外物質の取り込み、取り込まれた物質の細胞内輸送、分泌反応、そして細胞の遊走において中心的な役割を果たす。このことから、Arf6 は、自然免疫担当細胞の機能制御、それによって誘導される炎症反応における鍵分子であることが予想される。しかしながら、免疫細胞や炎症応答における Arf6 の機能に関する知見は少なく、個体を用いた解析はこれまでにない。このような状況下、我々はマクロファージ特異的 *Arf6* コンディショナルノックアウト (*Arf6*-cKO) マウスを用いて喘息モデルを作製し、解析したところ、同マウスではアレルギー性の気管支喘息が顕著に抑制されることを見出した。この知見は、Arf6 が炎症反応を引き起こす重要な因子であることを強く示唆しており、その機能解析が前述の課題の解決に繋がると考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の予備的知見から、マクロファージに発現する Arf6 の働きにより炎症反応が促進され、アレルギー性気管支喘息を増悪させることが想定される。そこで本研究では、炎症応答におけるマクロファージ中の Arf6 の生理機能を明らかにすることにより、炎症反応の誘導・増幅メカニズム、および喘息を含めた炎症性疾患の発症機構を明らかにすることを目的とする。また、Arf6 が炎症性疾患の治療標的となりうることを証明し、新たな治療法として提唱することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### マウス

マクロファージ特異的 *Arf6*-cKO マウスは、*Arf6*<sup>lox/lox</sup> マウス (1) と LysM-Cre マウスを交配することにより作製した。LysM-Cre マウスは、筑波大学高橋教授より供与いただいた。

#### OVA の免疫と経鼻投与

8-12 週齢のマウスに 100 µg / 匹の OVA を 1、7、14 日目に腹腔内投与し、OVA 感作を成立させた。最後の OVA 免疫から 7、10、あるいは 13 日後にマウスを麻酔し、100 µg OVA を経鼻投与した。

#### フローサイトメトリー解析

マウス肺胞洗浄液 (BALF) より細胞を回収し、赤血球を除去するためにバッファー (154 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA) に懸濁した。その後細胞を 2% 牛胎児血清 (FBS) を含む PBS で洗浄し、各種抗体と反応させた。抗体でラベルした細胞を、Guava easyCyto flow cytometer (Merk Millipore) を用いて定法に従いフローサイトメトリーにて解析した。

#### 炎症性サイトカインの定量

IL-1β はじめ炎症性サイトカインの定量は、R&D Systems 社より各サイトカインの定量キットを購入し、マニュアルに従い ELISA 方にて行った。

#### 細胞外 ASC speck の調整

GFP-ASC を恒常的に発現する THP-1 細胞を 20% FBS、100 ng/ml PMA を含む RPMI1640 で 2 日間培養し、マクロファージ様に分化させた。その後 200 ng/ml LPS、250 µg/ml alum で 48 時間細胞を刺激し、培養上清を回収した。細胞片を遠心分離にて除いた後、培養上清と等量の Buffer A (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA) を加え、4,600g で 10 分間遠心分離することで細胞外 ASC speck を沈殿させた。細胞外 ASC speck を Buffer A に再懸濁し、Percoll 密度勾配で 16,000g、60 分間遠心分離し、ASC speck を精製した。PBS で洗浄後、各実験に用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) マクロファージ中の Arf6 は、アレルギー性の気管支喘息を増悪させる

気道マクロファージによる喘息悪化のメカニズムを解明するために、野生型およびマクロファージ *Arf6*-cKO マウスに、OVA 投与によるアレルギー性気管支喘息様の炎症応答を誘導した。これら喘息モデルマウスにおいて、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の浸潤白血球を解析したところ、野生型マウスでは、OVA 負荷による各種白血球の肺への遊走が観察され、特に好酸球が著しく増加しており、アレルギー性の炎症応答が誘導されていることが確認された。また、BALF 中の炎症性サイトカインや OVA に対する IgE の増加も観察された。一方、マクロファージ *Arf6*-cKO マウスでは、OVA 負荷によって誘導される肺への白血球(特に好酸球)浸潤、BALF 中の炎症性サイトカインや OVA 特異的 IgE の増加が顕著に抑制されていた。さらに、肺の組織学的な解析を行ったところ、野生型マウスの肺組織では OVA 負荷により好酸球や単球系の炎症細胞の強い浸潤と気管支の狭窄が観察されたのに対し、マクロファージ *Arf6*-cKO マウスの肺組織ではこれらの炎症反応が軽減されていた(図1)。以上の結果より、マクロファージは *Arf6* を介して気管支喘息様のアレルギー性炎症反応を増悪させることが明らかとなった。

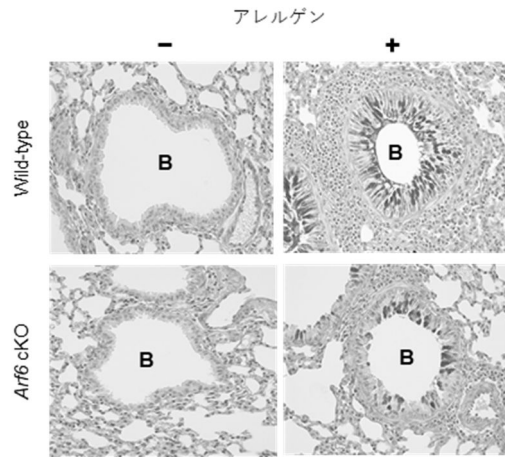


図1 *Arf6*-cKO マウスではアレルギー添加による気管支の狭窄が軽減される(B: 細気管支)

##### (2) Arf6 は、アレルギー性炎症応答におけるマクロファージからの IL-1 $\beta$ 産生を促進する

気道マクロファージはアレルギー刺激によって様々な炎症性サイトカインを放出するが、中でも NLRP インフラマソームによって誘導・分泌される IL-1 $\beta$ は、炎症反応誘導の中心となるサイトカインである。マクロファージ中の *Arf6* に依存したアレルギー性喘息様の炎症が観察されたことから、マクロファージ *Arf6*-cKO マウスにおける OVA 負荷時の IL-1 $\beta$ 分泌を解析した。その結果、マクロファージ *Arf6*-cKO マウスでは、野生型マウスと比較して BALF 中の IL-1 $\beta$ が約 30%減少していた。

##### (3) Arf6 は細胞外 ASC speck の貪食を促進することにより二次的な IL-1 $\beta$ 産生を誘導する

マクロファージは、外因性あるいは内因性刺激物質を感知するとインフラマソームを形成し、IL-1 $\beta$ の成熟・分泌を誘導する。インフラマソームは、細胞内に取り込まれた異物を感知するセンサーと、アダプタータンパク質 ASC、および Caspase-1 から構成される複合体であり、マクロファージでは NLRP3 がセンサーとして機能する。NLRP3 は刺激物質を認識すると自己会合しオリゴマーを形成する。このオリゴマーはアダプターの ASC をリクルートし、プリオン様の ASC 自己凝集体 (ASC speck) の形成を促進する。次いで、プロテアーゼである Caspase-1 をリクルートして自己活性化することにより、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ が切断・成熟化され、炎症反応が惹起される。*Arf6* がどのように IL-1 $\beta$ 産生を促進するのかを明らかにするために、野生型およびマクロファージ *Arf6*-cKO マウスから単離した気道マクロファージにおけるインフラマソーム形成を *in vitro* で解析した。LPS とミョウバンで刺激した際のインフラマソーム形成を観察したところ、野生型、*Arf6*-cKO マクロファージどちらにおいても同程度の細胞内 ASC speck の形成が観察された。また、pro-IL-1 $\beta$ や pro-Caspase 1 の発現および切断による活性化にも差はみられなかった。これらの結果は、*Arf6* はアレルギーなどの刺激物質による初期(一次的)インフラマソームには必須ではないことを示唆している。

マクロファージ中で形成された ASC speck は、それ自身が細胞外へと分泌され周辺のマクロファージによって貪食される。貪食された ASC speck は貪食細胞中で新たに ASC のオリゴマー化を促進する。このような ASC のプリオン様の伝搬、凝集誘導により、アレルギーや病原体に依存しない二次的なインフラマソーム形成が誘導され、連鎖的な炎症誘導・増幅が引き起こされる。野生型マウスでは、OVA 負荷時に OVA 用量依存的に BALF 中の細胞外 ASC speck が増加していたことから、細胞外 ASC speck を介した炎症応答への *Arf6* の関与を検討した。GFP-ASC を発現する THP-1 細胞をマクロファージ様に分化させ、細胞外 ASC-speck を調整し、それをマウスに投与したところ、野生型では細胞外 ASC speck 投与量依存的に BALF 中の IL-1 $\beta$ が増加したのに対し、*Arf6*-cKO マウスでは ASC speck 依存の IL-1 $\beta$ 誘導が抑制されていた。

*Arf6* はアクチン細胞骨格のリモデリングを制御することにより、マクロファージのファゴサイトーシスを促進することが知られていることから、細胞外 ASC speck のマクロファージによ

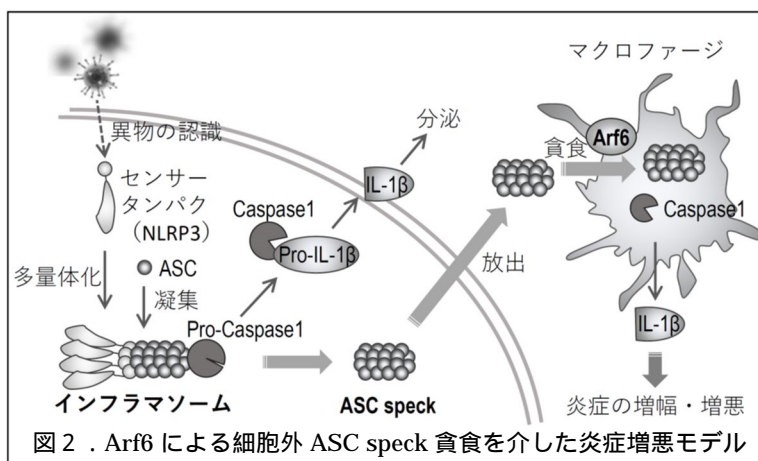
る取り込みへの Arf6 の関与を検討した。野生型およびマクロファージ *Arf6*-cKO マウスより単離した気道マクロファージを、精製した GFP-ASC speck と培養し、共焦点顕微鏡にて観察した。なお、細胞質を可視化するために Alexa Fluor 568 phalloidin による染色も行った。その結果、野生型マクロファージでは約 65% の細胞で細胞外 ASC の取り込みがみられたのに対し、*Arf6*-cKO マクロファージでは 15% 程度にまで抑制されていた。また、細胞外 ASC speck 依存の IL-1 $\beta$  産生も、細胞外 ASC の取り込み低下に相関して *Arf6*-cKO マクロファージでは顕著に抑制されていた。以上の結果より、マクロファージ中の Arf6 は細胞外 ASC speck の取り込みを促進することにより貪食細胞中でプリオン様に ASC 凝集を促し、インフラマソームを活性化して IL-1 $\beta$  産生を増強することが明らかとなった。

#### (4) Secin H3 は喘息様アレルギー性炎症を抑制する

低分子量 G 蛋白質である Arf6 は、GDP 結合型から GTP 結合型に変換することにより活性化する。このグアニンヌクレオチドの交換反応を促進するのが Guanine nucleotide-exchange factor (GEF) である。野生型マウスより単離した気道マクロファージを、Arf6 GEF の一つである Cytohesin ファミリーの阻害剤 Secin H3 で処理したところ、細胞外 ASC speck によって誘導される IL-1 $\beta$  放出が、Secin H3 未処理時の 20% ほどにまで低下した。さらに、マウスに Secin H3 を投与することにより、OVA 負荷による BALF 中の IL-1 $\beta$  や他の炎症性サイトカインの増加が抑制され、浸潤好酸球数の上昇も抑制されていた。また、OVA 負荷に伴った気管支狭窄も軽減されていた。これらの結果より、Arf6 を薬剤によって阻害することにより、アレルギー性気管支喘息が抑制されることが示唆された。

本研究により、マクロファージ中の Arf6 は細胞外 ASC speck のファゴサイトーシスを促進することにより、貪食したマクロファージ中でのインフラマソーム形成を誘導し、二次的な IL-1 $\beta$  産生を誘導することが明らかとなった。このような Arf6 に依存した ASC speck のプリオン様細胞間伝搬により、連鎖的なマクロファージによる IL-1 $\beta$  放出が誘導され、気管支喘息をはじめ病的な炎症反応が引き起こされると考えられる。

*Arf6*-cKO マウスでは、マクロファージによる細胞外 ASC speck の取り込み阻害とそれに伴う二次的なサイトカイン放出の低下により、気管支喘息が顕著に抑えられる一方で、刺激物質による初期の ASC speck 形成には影響がみられなかった。このことは、Arf6 は初期の ASC speck の形成には関与しない一方で、細胞間の伝播に必要であること、また、インフラマソームの細胞間伝播による連鎖的な炎症誘導が過剰・病的な炎症応答の主要因であることを示唆している。さらに、Arf6 という単独の因子を阻害することによって顕著に気管支喘息が抑制されたことから、インフラマソーム細胞間伝播の鍵因子を阻害する薬剤は、喘息を含む炎症性疾患の有効な治療薬となることが期待される。



< 謝辞 >

本研究を実施するにあたり、LysM-Cre マウスをご供与いただきました筑波大学高橋教授に深く感謝申し上げます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogura Yukino, Ohbayashi Norihiko, Kanaho Yasunori, Kawaguchi Atsushi, Funakoshi Yuji	4. 巻 298
2. 論文標題 Ubiquitin-specific protease TRE17/USP6 promotes tumor cell invasion through the regulation of glycoprotein CD147 intracellular trafficking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102335 ~ 102335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102335	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 Lee SangJoon, Ishitsuka Akari, Kuroki Takahiro, Lin Yu-Hsien, Shibuya Akira, Hongu Tsunaki, Funakoshi Yuji, Kanaho Yasunori, Nagata Kyosuke, Kawaguchi Atsushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Arf6 exacerbates allergic asthma through cell-to-cell transmission of ASC inflammasomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e139190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.139190	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 Gamara Jouda, Davis Lynn, Leong Andrew Z., Pag? Nathalie, Rollet-Labelle Emmanuelle, Zhao Chenqi, Hongu Tsunaki, Funakoshi Yuji, Kanaho Yasunori, Aoudji Fawzi, Pelletier Martin, Bourgoin Sylvain G.	4. 巻 172
2. 論文標題 Arf6 regulates energy metabolism in neutrophils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 550 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.001	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 該当する

〔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 小倉由希乃、大林典彦、金保安則、川口敦史、船越祐司
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素TRE17/USP6による膜タンパク質の輸送制御を介した腫瘍細胞の浸潤促進機構
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船越祐司、小倉由希乃、大林典彦、川口敦史、金保安則
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素 TRE17/USP6は、CD147の細胞内輸送制御を介してがん細胞浸潤能を亢進する
3. 学会等名 第19回生命科学研究会
4. 発表年 2022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 祐司  (Funakoshi Yuji)  (30415286)	筑波大学・医学医療系・准教授   (12102)	

	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
研究協力者	川口 敦史  (Kawaguchi Atsushi)	筑波大学・医学医療系・教授	
研究協力者	小倉 由希乃  (Ogura Yukino)	筑波大学・医学医療系・助教	

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