

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08114

研究課題名（和文）心血管病における炎症を制御する新規E3リガーゼARIH2の分子機構及び役割の解明

研究課題名（英文）Role and Mechanism of a novel E3 ligase ARIH2 in Cardiovascular Disease

研究代表者

高橋 将文（Takahashi, Masafumi）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40296108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：NLRP3インフラマソームはIL-1 β 産生を制御する自然炎症経路の一つであり、心血管病態における無菌性炎症の惹起に寄与する細胞内分子複合体である。本研究では、ARIH2によるNLRP3タンパク分解が、オートファジーではなく、プロテアソームによって誘導されていることを明らかにした。また、LPS投与による敗血症性心筋症がNLRP3インフラマソームを介して惹起されることを示した。特に、この敗血症性心筋症の病態はIL-1 β やIL-18、GSDMDそれぞれの単独欠損では影響を受けず、IL-1 β の欠損とAAVベクターによるIL-18BP発現誘導により抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NLRP3インフラマソームは心血管病態における無菌性炎症で重要な役割を果たしていることが明らかになっているが、その活性化機構や病態への関与については、未だ不明な点も多い。本研究の成果により、ARIH2によるNLRP3インフラマソームの制御機構や、NLRP3インフラマソームの敗血症性心筋症での役割が明らかになったことは、学術的に十分な意義がある。また、敗血症性心筋症は現在でも有効な治療法が確立されていないことから、その分子機構の一部を解明することができたことには、社会的な意義もあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex that regulates IL-1 β release and contributes to sterile inflammatory responses in the pathophysiology of cardiovascular disease. In this study, we showed that ARIH2 promoted the degradation of NLRP3 protein by the proteasome, but not by autophagy in macrophages. We also demonstrated that NLRP3 inflammasome is required for LPS-induced septic cardiomyopathy. IL-1 β deficiency with AAV-mediated overexpression of IL-18BP prevented the development of LPS-induced septic cardiomyopathy although deficiency of IL-1 β , GSDMD, or IL-18 alone failed to prevent it. These findings suggest that NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β and IL-18 contribute to the pathophysiology of septic cardiomyopathy and provide new insights into the mechanism underlying the pathogenesis of septic cardiomyopathy.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン 炎症反応 心血管疾患 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

NLRP3 インフラマソームは強力な炎症性サイトカインである IL-1 β 産生を制御する自然炎症経路の一つであり、心血管疾患の病態に共通する無菌性炎症の惹起に寄与する細胞内分子複合体である。申請者はこれまで、心血管疾患におけるインフラマソームの重要性を報告し、その制御機構の解明が新たな治療法の開発に繋がることを明らかにしてきた。NLRP3 インフラマソームはセンサー分子 NLRP3 とアダプター分子 ASC、エフェクター分子 Caspase-1 (Casp1) から構成され、Casp1 の活性化を介して強力な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) の前駆体 (非活性型) から活性型へのプロセッシングを引き起こす [1]。また、この Casp1 が Gasdermin D (GSDMD) をプロセッシングし、GSDMD の N 末端断片 (GSDMD-NT) が細胞膜で重合して膜の孔形成を引き起こすことで、炎症性細胞死である Pyroptosis を誘導することも明らかになっている。申請者らは、NLRP3 インフラマソーム活性化の分子機構の解明のため、インフラマソーム複合体を精製して質量分析による網羅的な解析を行い、NLRP3 に結合する新規 RBR (RING-between-RING) 型 E3 ユビキチンリガーゼである ARIH2 (Ariadne homolog 2) を同定し、ARIH2 がインフラマソームの活性化を負に制御していることを明らかにした [2]。ARIH2 の役割はほとんどわかっていないため、ARIH2-flox マウスを新たに作成するとともに (全身欠損は胎生致死)、TR-TUBE 法 (Trypsin Resistant-Tandem Ubiquitin-binding Entity) を用いて、ARIH2 によりユビキチン化される新規標的分子 (基質) の探索を行い、いくつかの候補分子を得た。これらの解析により、ARIH2 による NLRP3 インフラマソーム活性化への作用機構や生体での役割、さらには病態における NLRP3 インフラマソームの包括的な理解が進むことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、(1) ARIH2 による NLRP3 インフラマソームの制御機構を明らかにするとともに、(2) 心血管疾患における NLRP3 インフラマソームの役割について解析し、ARIH2 および NLRP3 インフラマソームの制御機構や心血管病態での役割を解明することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ARIH2 による NLRP3 インフラマソームの制御機構

ARIH2 欠損マウスは胎生致死であることから、ARIH2-flox マウスを作成し、LysMCre マウスと交配させてマクロファージ特異的 ARIH2 欠損マウス (ARIH2^{f/f};LysMCre) を得た。マウス骨髄細胞を単離して M-CSF を処理することで骨髄由来マクロファージを作成した。ヒト THP-1 細胞を用いて CRISPR/Cas9 システムを利用して ARIH2 欠損 THP-1 マクロファージを作成した。また、ヒト THP-1 細胞に Tet-on 発現誘導システムを用いてドキシサイクリン誘導性 ARIH2 発現 THP-1 マクロファージを作成した。NLRP3 や ARIH2 のタンパク発現は Western blot 法により解析を行った。

(2) 心血管疾患における NLRP3 インフラマソームの役割

野生型 C57BL/6J マウス (wild-type : WT ; ♂、8-12 週齢) および NLRP3 欠損、Casp1 欠損、IL-1 β 欠損、IL-1 α 欠損、GSDMD 欠損マウス (C57BL/6J background) を使用した。敗血症性心筋症は、LPS (Lipopolysaccharide : Escherichia coli O111:B4 : 6 mg/kg) 腹腔内投与により誘導した。心機能は小動物イメージング解析システム (Vevo2100 imaging System, Visual Sonics)、心筋傷害は血中 CK-MB 測定により評価した。炎症性サイトカインはそれぞれ ELISA 法により測定した。

IL-18 binding protein (IL-18BP) 発現系は、アデノ随伴ウイルス (AAV serotype 1、コントロールは AAV-GFP) を用いて構築した。

4. 研究成果

(1) ARIH2 による NLRP3 インフラマソームの制御機構

ARIH2 欠損により NLRP3 発現が増加することを既に報告していることから[2]、マクロファージ特異的 ARIH2 欠損マウス (ARIH2^{f/f};LysM^{Cre}) 由来の骨髄マクロファージおよび ARIH2 欠損 THP-1 マクロファージ、タモキシフェン誘導性 ARIH2 発現 THP-1 マクロファージを作成して解析した。マウス骨髄由来マクロファージおよび THP-1 マクロファージに CHX (タンパク合成阻害) を処理すると NLRP3 の発現は経時的に減少したが、ARIH2 欠損によりこの減少が消失あるいは低下することがわかった (図 1AB)。一方、ドキシサイクリン (DOX) により ARIH2 発現を誘導すると NLRP3 のタンパク発現が著明に減少することも示された (図 1C)。ARIH2 による NLRP3 分解機構を解析するため、プロテアソーム阻害剤 (MG132) およびオートファジー阻害剤 (Bafilomycin A1・Chloroquine) を用いて検討した (図 2)。オートファジー阻害剤では ARIH2 による NLRP3 発現の減少を認めたが、プロテアソーム阻害剤ではその減少が抑制された。従って、ARIH2 は、オートファジーではなく、プロテアソーム系を介して NLRP3 を分解することが示唆された。一方、TR-TUBE 法と質量分析を用いて、ARIH2 によりユビキチン化される新規標的分子 (基質) の探索を行い、分子複合体であるメチロソーム (Methylosome) を構成する PRMT5 と MEP50 を新規基質の候補として同定した。しかし、それぞれの抗体を用いた免疫沈降法では、ARIH2 が PRMT5 あるいは MEP50 に結合することを検証することはできなかった。

(2) 心血管疾患における NLRP3 インフラマソームの役割

敗血症性心筋症では炎症が重要な役割を果たしていることは明らかであるが、その炎症惹起の機序については未だ不明な点が多く、有効な治療法も確立されていないため、LPS 投与によるマウス敗血症性心筋症モデルを作成して NLRP3 インフラマソームの役割を検討した。NLRP3 欠損マウスでは、LPS 投与後の生存率が有意に改善するとともに、WT マウスで LPS 投与 6 時間後に観察された心機能障害や心筋傷害 (CK-MB で評価) も改善した (図 3AB)。Casp1 は NLRP3 インフラマソームのエフェクター分子であることから、Casp1/11 欠損マウスおよび Casp11 変異マウスを用いて検討したところ、LPS による心機能障害と心筋傷害は Casp1/11 欠損で改善した

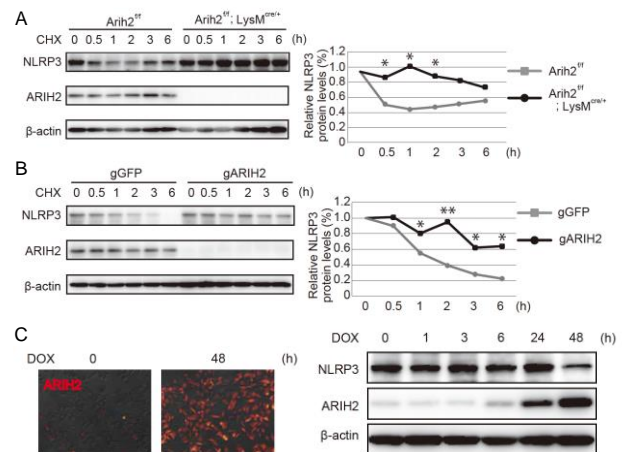


図1. ARIH2欠損マウスマクロファージにおけるNLRP3の発現

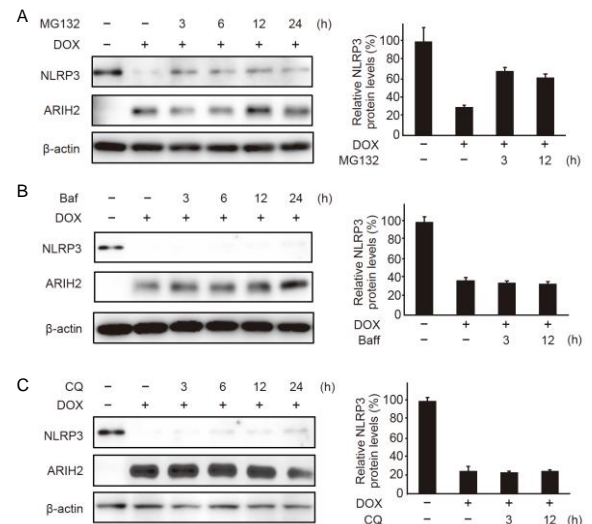


図2. ARIH2欠損下でのNLRP3発現に対するプロテアソームおよびオートファジーの影響

が、Cas11 変異では影響がなかった (図 3C)。さらに、NLRP3 欠損マウスでは、LPS 投与による血中 IL-1 β や IL-6、TNF α 、IL-18 の増加が抑制されており、特に IL-1 β と IL-18 の産生はほぼ完全に抑制されていた (図 4)。これらの結果から、LPS による敗血症性心筋症は NLRP3 インフラマソームを介して誘導されていることが示された。

NLRP3 インフラマソームの下流には IL-1 β や IL-18、および GSDMD があり、ある種の刺激によっては IL-1 α も NLRP3 インフラマソームを介して産生されることが報告されている。しかしながら、IL-1 β と IL-1 α 、そして GSDMD のそれぞれの欠損マウスでは、LPS による心機能障害と心筋傷害に影響を与えなかった (図 5)。そこで、IL-18 が寄与している可能性を考え、AAV ベクターによる IL-18BP (内因性 IL-18 阻害因子) 発現系を構築した (図 6A)。実際、AAV-IL-18BP を導入した WT マウスでは血中 IL-18BP が著明に増加することを確認した (図 6B)。AAV-IL-18BP を導入した WT マウスでは、LPS 投与による心機能障害は軽度で改善していた (図 6C)。一方、興味深いことに AAV-IL-18BP を導入し IL-1 β 欠損マウスでは、その心機能障害が著明に改善していた。この結果から、LPS による敗血症性心筋症では NLRP3 インフラマソームによって誘導される IL-1 β と IL-18 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらの所見は、敗血症性心筋症の発症機序の一部を解明するとともに、NLRP3 インフラマソーム/IL-1 β /IL-18 が新たな治療標的の候補となり得ることを示唆している。

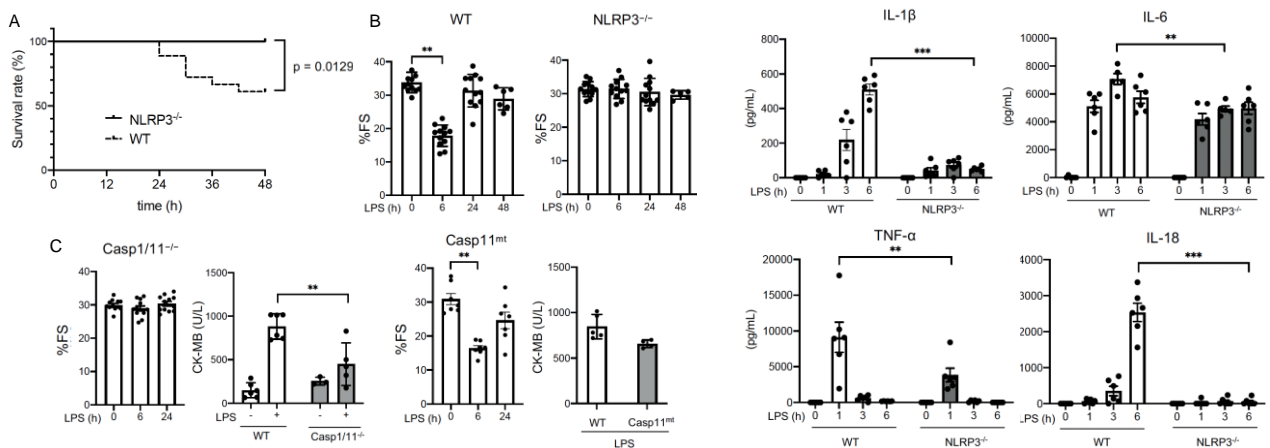


図3. LPS投与による敗血症性心筋症におけるNLRP3インフラマソームの役割

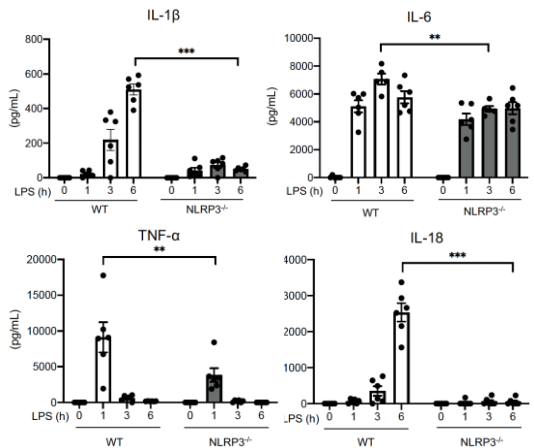


図4. 炎症性サイトカイン産生におけるNLRP3欠損の影響

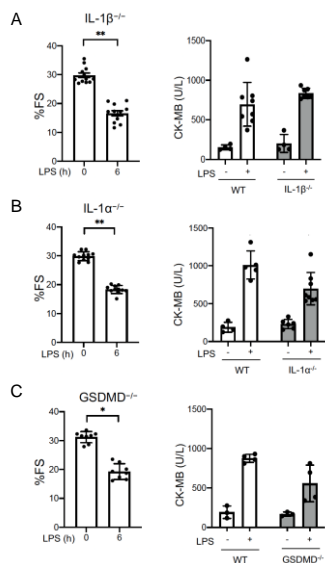


図5. LPS投与による敗血症性心筋症に対するIL-1 β 、IL-1 α 、GSDMD欠損の影響

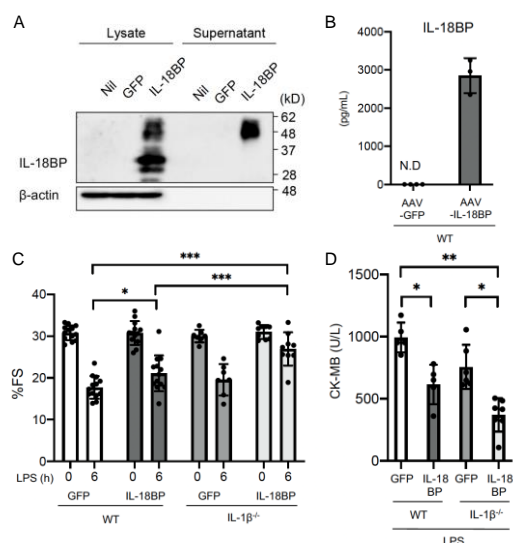


図6. LPS投与による敗血症性心筋症におけるIL-1 β とIL-18の役割

<引用文献>

1. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res* 118: 372-385, 2022
2. Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Kimura H, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Yanagisawa K, Karasawa T, Suzuki K, Takahashi M. ARIH2 ubiquitinates NLRP3 and negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *J Immunol* 199: 3614-3622, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Baatarjav Chintogtokh, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Fujimura Kenta, Gunji Yoshitaka, Komori Satoko, Aizawa Hidetoshi, Jing Tao Cantona Billton, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 686
2. 論文標題 Caspase-11 deficiency attenuates neutrophil recruitment into the atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149158 ~ 149158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.149158	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 Kadoya Hiroyuki, Hirano Akira, Umeno Reina, Kajimoto Eriko, Iwakura Tsukasa, Kondo Megumi, Wada Yoshihisa, Kidokoro Kengo, Kishi Seiji, Nagasu Hajime, Sasaki Tamaki, Taniguchi Shun'ichiro, Takahashi Masafumi, Kashihara Naoki	4. 巻 37
2. 論文標題 Activation of the inflammasome drives peritoneal deterioration in a mouse model of peritoneal fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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) 10.1096/fj.202201777RRR	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 Fujimura Kenta, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Mizushina Yoshiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Otsu Kinya, Takeda Norihiko, Mizukami Hiroaki, Kario Kazuomi, Takahashi Masafumi	4. 巻 180
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome-driven IL-1 and IL-18 contribute to lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 58 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2023.05.003	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 Matsumura Takayoshi, Totani Haruhito, Gunji Yoshitaka, Fukuda Masahiro, Yokomori Rui, Deng Jianwen, Rethnam Malini, Yang Chong, Tan Tze King, Karasawa Tadayoshi, Kario Kazuomi, Takahashi Masafumi, Osato Motomi, Sanda Takaomi, Suda Toshio	4. 巻 13
2. 論文標題 A Myb enhancer-guided analysis of basophil and mast cell differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34906-1	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 Baatarjav Chintogtokh, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Yamada Naoya, Sampilvanjil Ariunaa, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 29
2. 論文標題 dsDNA-induced AIM2 pyroptosis halts aberrant inflammation during rhabdomyolysis-induced acute kidney injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 2487 ~ 2502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-022-01033-9	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 Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Watanabe Sachiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cryo-sensitive aggregation triggers NLRP3 inflammasome assembly in cryopyrin-associated periodic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e75166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.75166	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 Takahashi Masafumi	4. 巻 118
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 372 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvab010	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 Dominic Abishai, Le Nhat-Tu, Takahashi Masafumi	4. 巻 36
2. 論文標題 Loop Between NLRP3 Inflammasome and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 784 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2020.8257	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 Sano Michiya, Komiyama Hiromu, Shinoda Riina, Ozawa Ren, Watanabe Hiroyuki, Karasawa Tadayoshi, Takahashi Masafumi, Torii Yasushi, Iwata Hisataka, Kuwayama Takehito, Shirasuna Koumei	4. 巻 87
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome is involved in testicular inflammation induced by lipopolysaccharide in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13527	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 Anzai Fumiya, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Miura Yutaka, Sampilvanjil Ariunaa, Baatarjav Chintogtokh, Fujimura Kenta, Matsumura Takayoshi, Tago Kenji, Kurosu Hiroshi, Takeishi Yasuchika, Kuro-O Makoto, Takahashi Masafumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Calciprotein Particles Induce IL-1 / ?Mediated Inflammation through NLRP3 Inflammasome-Dependent and -Independent Mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 602 ~ 614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2100066	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 Takahashi Masafumi	4. 巻 85
2. 論文標題 NLRP3 Inflammasome as a Common Denominator of Atherosclerosis and Abdominal Aortic Aneurysm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2129 ~ 2136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-21-0258	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 炎症反応から考える病態生理
3. 学会等名 第96回日本産業衛生学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 心血管腎臓病における自然免疫経路インフラマソームの役割
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 無菌性炎症とインフラマソーム
3. 学会等名 第461回国際治療談話会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 急性腎障害におけるdsDNAセンサーAIM2依存性Pyroptosisの役割
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会第19回学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masafumi Takahashi. Chintogtokh Baatarjav. Takanori Komada.
2. 発表標題 Double-stranded DNA-induced AIM2 pyroptosis limits excessive inflammation during rhabdomyolysis-induced acute kidney injury.
3. 学会等名 ASN(米国腎臓学会) Kidney Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 老化関連疾患における慢性炎症
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 インフラマソームと心血管病
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 慢性炎症とインフラマソーム
3. 学会等名 第67回日本透析医学会学術集会・総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋将文、駒田敬則.
2. 発表標題 老化関連疾患における慢性炎症とインフラマソーム
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chintogtokh Baatarjav, Takanori Komada, Masafumi Takahashi.
2. 発表標題 AIM2-dependent pyroptosis is crucial for resolution after rhabdomyolysis-induced acute kidney injury
3. 学会等名 64th Annual meeting of the Japanese Society of Nephrology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋将文
2. 発表標題 様々な病態における無菌性炎症とインフラマソーム
3. 学会等名 第5回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高橋将文	4. 発行年 2023年
2. 出版社 一般社団法人 日本臓器保存生物医学会	5. 総ページ数 3
3. 書名 Organ Biology	

1. 著者名 高橋将文	4. 発行年 2023年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 2
3. 書名 アンチエイジング医学の基礎と臨床	

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 https://www.jichi.ac.jp/inflammation/

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	松村 貴由 (Matsumura Takayoshi) (80436485)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	唐澤 直義 (Karasawa Tadayoshi) (60631893)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究分担者	駒田 敬則 (Komada Takanori) (90824730)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

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