

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20753

研究課題名（和文）インフラマソームの細胞間伝播を介した炎症応答制御機構の解明

研究課題名（英文）the mechanism of cytokine storm induction via cell-to-cell transmission of inflammasome

研究代表者

小倉 由希乃 (Ogura, Yukino)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60966597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：インフラマソームの細胞間伝播を介したサイトカインストーム誘導機構の解明を目指した。マクロファージ特異的な低分子量Gタンパク質Arf6欠損マウスにおいて、インフルエンザウイルス感染後の病態が著しく改善することを明らかにした。メカニズム解明に向けてin vitroにおける評価系を構築し、マクロファージがArf6の活性化を介して、インフラマソーム構成因子ASCのプリオン様凝集体（ASC speck）を貪食することで、炎症性サイトカインの分泌を促すことを見出した。これにより、感染に応答してArf6依存的に細胞外ASC speckが貪食されることで、サイトカインストームが誘導される可能性が示唆された。

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やダメージ関連分子を認識して炎症性サイトカインの放出を誘導するタンパク質複合体である。一方で、インフラマソームは細胞間を伝播し、非感染細胞においても炎症を誘導するシードとなる。本研究では、インフルエンザウイルス感染病態において、インフラマソームの細胞間伝播にはArf6が必要とされることを明らかにし、Arf6が過剰な炎症応答の治療標的となる可能性を見出した。この機構は感染病態のみならず、各種炎症疾患の治療法開発に応用できると期待される。加えて、本研究で確立された細胞間伝播インフラマソームによる炎症応答の評価系は、更なる炎症シグナル伝達機構の理解に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanism of cytokine storm induction via cell-to-cell propagation of inflammasomes. In mice deficient in the macrophage-specific small GTPase Arf6, the pathogenesis after influenza virus infection was markedly improved. To clarify its mechanism, we established an in vitro evaluation system and found that macrophages phagocytose prion-like aggregates of inflammasome component ASC (ASC speck) via Arf6 activation, thereby stimulating the secretion of proinflammatory cytokines. This suggests that Arf6-dependent phagocytosis of extracellular ASC speck in response to infection may induce a cytokine storm.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス インフラマソーム 急性炎症応答 サイトカインストーム ウイルス学 Arf6 ASC

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや細菌感染により炎症応答が惹起されると、感染組織にマクロファージや好中球が遊走し、感染細胞は貪食・排除される。一方、遊走したマクロファージから過剰に炎症性サイトカインが産生されると、生体防御とのバランスが破綻し病態は増悪する(サイトカインストーム)。インフラマソームは細胞内に取り込まれた異物を認識するセンサー分子と、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る。センサー分子が病原体などの刺激物質をリガンドとして認識すると、ASC の多量体化が誘導され、プリオン様の ASC 自己凝集体 (ASC speck) が形成される。続いて、pro Caspase-1 が ASC にリクルートされ、自己切断することで、活性化型 Caspase-1 となり、下流の炎症性サイトカインである IL-1 を切断・成熟化し、細胞外への IL-1 放出を制御する。興味深いことに、ASC speck はこのようなセンサー分子を介した炎症応答の誘導のみならず、細胞外に放出されて周囲のマクロファージに貪食されることで、非感染細胞でも炎症反応を誘導するシードとなる。これにより、サイトカインが大量放出され、炎症応答が増幅される。従って、このようなインフラマソームの細胞間伝搬機構の解明は、各種炎症疾患や過剰な炎症応答のメカニズム理解、治療法開発において重要である。しかしながら、マクロファージによる ASC speck の貪食機構は明らかでなく、貪食後にファゴソームに取り込まれた ASC speck がどのような経路を辿ってサイトカイン分泌に機能するのか、その過程で ASC はどのような活性制御を受けるのか、ASC speck の細胞間伝搬による炎症増強機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)マクロファージによる細胞外 ASC speck の貪食機構と、(2)伝播後の ASC 動態に着目した炎症シグナル制御機構を明らかにすることで、過剰な炎症応答が誘導されるメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

マクロファージによる細胞外 ASC speck の貪食機構を解析するにあたり、低分子量 G タンパク質 Arf6 に着目した。Arf6 は、アクチン細胞骨格のリモデリングや細胞内膜小胞輸送において中心的な役割を果たす。これまでに、ASC speck が感染細胞から放出される過程の解析に組んでおり、Arf6 をロックダウンしたマクロファージでは、ASC speck の細胞外への放出が抑制されたことから、Arf6 はインフラマソーム細胞間伝播に必須の因子であることが示唆された。そこで、本研究では Arf6 が放出された後の過程である、インフラマソームの取り込みにも重要な働きを示す可能性を考え、マクロファージ特異的な低分子量 G タンパク質 Arf6 欠損マウス (Arf6-cKO) を作製し、このマウスから分離したマクロファージと、精製インフラマソームを用いて、マクロファージによるインフラマソームの貪食や炎症応答を解析した。さらに、Arf6-cKO マウスを用いてインフルエンザウイルス感染後の病態を評価した。

4 . 研究成果

(1) マクロファージによる ASC speck の貪食には Arf6 が必要とされる

マクロファージにおける ASC speck の取り込みに Arf6 が関与するのかを検討した。野生型マウス分離したマクロファージに、精製 ASC speck を添加すると、炎症性サイトカインである IL-1 が分泌された。一方で、Arf6-cKO マウスから分離したマクロファージでは、精製 ASC speck を添加すると IL-1 の分泌が抑制された。同様に、Arf6 活性化因子の阻害によっても、IL-1 の分泌が抑制された、これらの結果から、マクロファージが Arf6 の活性化を介して、ASC speck を貪食することで、炎症性サイトカインの分泌を促すことを見出した。

(2) ホスファチジルセリン (PS) 経路はマクロファージによる ASC speck の貪食に関与しない

マクロファージによる ASC speck 貪食機構の詳細を明らかにするため、上記の系を用いて、ASC speck の貪食に必要とされる貪食レセプターの同定を試みた。最も主要な貪食誘導シグナルである PS 経路の関与を検証したところ、AnnexinV の添加により PS 経路を阻害した際に、マクロファージによる細胞外 ASC speck の貪食は抑制されなかった。よって、PS 以外の経路が ASC speck の貪食に関わることが示唆された。

(3) Arf6-cKO 欠損マウスでは、インフルエンザウイルス感染後の病態が改善する

マクロファージにおける Arf6 が、個体においてインフラマソームの細胞間伝播を介した炎症応答制御に関与しているのかを検討するために、Arf6-cKO マウスに A 型インフルエンザウイルスを感染させ、感染後の病態を評価した。この結果、Arf6-cKO マウスではウイルス感染後の生存率と体重減少率が著しく改善した。さらに、Arf6-cKO マウスでは血中炎症性サイトカインレベルが有意に低下した。よって、マクロファージにおける Arf6 が感染後のサイトカインストームを誘導し、病態を増悪させる因子であることが示唆された。

これらの結果から、Arf6 はマクロファージにおけるインフラマソームの細胞間伝播を制御することで、ウイルス感染後のサイトカインストームを誘導することが示唆された。Arf6 は過剰な炎症応答の治療標的となる可能性があると考えられる。この機構は感染病態のみならず、各種炎症疾患の治療法開発に応用できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iijima Masumi, Kawaguchi Atsushi, Ogura Yukino, Yoshimoto Ryotaro, Kaneda Moemi, Kera Kota, Kuroda Shun'ichi, Nakayama Tsutomu	4. 巻 86
2. 論文標題 Nano-visualization of the <i>in vitro</i> antiviral activity of black tea based on production area using a liposome-based virus membrane model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac163	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 Sekiya Takeshi, Ogura Yukino, Kai Hirayasu, Kawaguchi Atsushi, Okawa Shino, Hirohama Mikako, Kuroki Takahiro, Morii Wataru, Hara Akira, Hiramatsu Yuji, Hitomi Shigemi, Kawakami Yasushi, Arakawa Yoshihiro, Maruo Kazushi, Chiba Shigeru, Suzuki Hiromichi, Kojima Hiroshi, Tachikawa Hirokazu, Yamagata Kunihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 TMPRSS2 gene polymorphism common in East Asians confers decreased COVID-19 susceptibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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） 10.3389/fmicb.2022.943877	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3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、川口敦史
2. 発表標題 浸潤制御を介したSARS-CoV-2ウイルス血症誘導機構の解明
3. 学会等名 第17回ウイルス学キャンプ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉由希乃、川口敦史
2. 発表標題 宿主細胞の浸潤制御を介したSARS-CoV-2血中移行メカニズムの解明
3. 学会等名 第75回細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉由希乃、川口敦史
2. 発表標題 細胞浸潤を介したSARS-CoV-2ウイルス血症誘導機構の解明」
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術大会
4. 発表年 2023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
研究協力者	川口 敦史 (Kawaguchi Atsushi)		
研究協力者	船越 祐司 (Funakoshi Yuji)		
研究協力者	加藤 広介 (Kato Kohsuke)		

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