

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790775

研究課題名(和文)動脈硬化および大動脈瘤形成におけるインフラマソームの役割の解明

研究課題名(英文)Role of inflammasomes in atherosclerosis and aortic aneurysms

研究代表者

臼井 文武 (Usui, Fumitake)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50585560

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)：脂質異常や肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病の病態基盤における慢性炎症反応の関与が注目されている。本研究では無菌性の炎症反応に関するインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体に着目し動脈硬化および大動脈瘤におけるインフラマソームの役割の解明を試みた。その結果動脈硬化形成および大動脈瘤の形成においてその炎症反応においてCaspase-1が重要な役割を持つことが明らかとなった。また腹部大動脈瘤の形成においてもNLRP3インフラマソームがその炎症惹起に重要であることが示された。今後より詳細なメカニズムを解析することによりインフラマソームが治療標的となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, much attention has been paid to findings that involvement of chronic inflammation in the lifestyle-related diseases, such as hyperlipidemia, obesity, diabetes, and hypertension. In this study, we attempted to elucidate the role of inflammasome which is known to be involved in sterile inflammation in the atherosclerosis and aortic aneurysms. Our findings suggest that caspase-1 plays a critical role in vascular inflammation and atherosclerosis. Also, the importance of the NLRP3 inflammasome in the initial inflammatory responses in abdominal aortic aneurysms. Inflammasome is expected to become a therapeutic target for lifestyle-related diseases to clarify the mechanism.

研究分野：炎症学

キーワード：無菌性炎症 自然免疫 循環器疾患

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は世界でも例をみない高齢化社会を迎え、さらには、欧米的(高脂肪)な食事や運動不足などの生活様式の変化により、脂質異常や肥満、糖尿病、高血圧といった病態は増加の一途を辿っている。これらの病態はいずれも心血管疾患と結びつきが強く、心血管疾患の死亡率はがんに迫るほどになっている。なかでも大動脈瘤はその成因の大部分が動脈硬化性のものを占めており、これらの疾患に対する治療法、予防法の開発は重要な課題である。

細菌感染では白血球の集簇が生じて炎症反応が惹起されるが、近年、感染がその病態にほとんど関わっていない生活習慣病においても、炎症反応が重要な役割を果たしていることが指摘されている。しかしながら、この炎症反応がどのように惹起されるかは全く分かっていない。この様な経緯の中で、最近、免疫学分野においてインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体が細胞の炎症反応の最も初期の段階で重要な役割を果たしていることが発見され (Cell;117:561-574,2004, Cell;126:659-662,2006, N Engl J Med;355:730-732,2006)、さらに、痛風やアスベスト肺といった無菌性の炎症反応がこの経路によって引き起こされていることが報告された (Nature;440:237-241,2006, Science;320:674-677,2008)。インフラマソームは、アダプター分子であるASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)を中心として、IPAFや Nod、NLRP3といったNLR(Nod-like受容体)とCaspase-1から成る分子複合体で構成されており、何らかの刺激(危険シグナル)が細胞内に入るとNLRがそれを認識してASCと結合し、さらにASCがCaspase-1と結合することでCaspase-1が活性化される。Caspase-1はインターロイキン(IL)-1変換酵素であることから、インフラマソームの活性化により炎症性サイトカインであるIL-1およびIL-18の前駆体からの産生・分泌が誘導され、炎症反応が惹起される。

以上のようにインフラマソームは無菌性の炎症反応の惹起に関わりがあり、無菌性の慢性炎症疾患である動脈硬化やそれともなう大動脈瘤の形成にも関与している可能性は非常に高いと考えられる。本研究による炎症惹起の機序の解明を通じて、これらの疾患における新たな治療のための分子標的も明らかとなることから、本研究を行う必要性は非常に高いと考えられた。

2. 研究の目的

脂質異常や肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病の病態基盤における慢性炎症反応の関与が注目されている。しかし、これらの病態では感染の関与はほとんどなく、その無菌性の炎症反応がどのようにして惹起されるのかは全くわかっていない。最近、新規の自然炎症経路であるインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体が、痛風やアスベスト肺における無菌性の炎症を引き起こしていることが明らかとされた。本研究では、無菌的な慢性炎症である動脈硬化および大動脈瘤の形成におけるインフラマソームの役割、およびその治療標的としての有効性を明らかにし、インフラマソーム制御による新規の治療戦略の構築を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

動脈硬化モデルは apoE KO マウスに通常食、Western Diet (Research Diets 社)、を3ヶ月給餌し作成した。腹部大動脈瘤モデルは apoE KO マウスに昇圧作用を持つ生理活性物質であるアンジオテンシン II を ALZET ミニポンプで持続投与(1000ng/kg/min、4週間)して作成した。パラメーターとして血中脂質量、血圧、体重、血糖値の変遷を定期的(1~2週毎)に解析した。動脈硬化病変の評価は大動脈全体の Sudan IV 染色、大動脈起始部の Oil Red O 染色により評価した。大動脈瘤の評価は瘤形成率、瘤の最大径の計測、severity score により評価した。なお大動脈瘤に関する評価基準は Daugherty らの報告に従った(Br J Pharmacol;134:865-870, 2001)。更に組織学的な解析として H&E 染色、シリウスレッド染色、エラスチカ・ワンギーソン染色を行った。分子生物学的な解析としては Real-time PCR 法で各種炎症性サイトカインやケモカイン(IL-1、IL-6、IL-18、MCP-1等)の定量や大動脈瘤形成に関与するマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP-2、MMP-9)の活性化をゼラチンゼイモグラフィで評価した。インフラマソームに関連する解析としては採取した血管における ASC、Caspase-1 の発現(Real-time PCR 法・免疫染色法)や活性化(ウェスタンブロット法)、血漿中や組織中での IL-1 と IL-18 の産生(ELISA 法・Real-time PCR 法・免疫染色法)について解析を行った。またインフラマソームは炎症反応の惹起に関与することから動脈硬化モデルでは給餌開始から4週間、大動脈瘤モデルではアンジオテンシン II の持続投与が7日間の短期モデルを作成し各種上記パラメーターについて解析を行った。インフラマソーム活性化の責任細胞の同定には、ASC、Caspase-1 と各種細胞マーカー(マクロファージマーカー: MOMA-2、F4/80、血管平滑筋マーカー: SMA、線維芽細胞マーカー: ER-TR7)に対する抗体との多重面液染色法や ASC KO もし

くはCaspase-1 KOをどなーとした骨髓細胞異色モデルの解析により行なった。

4. 研究成果

(1)動脈硬化モデル

高コレステロール食を3ヶ月給餌後の apoE K0 および apoE K0 マウスにインフラマソームの構成分子を欠損させた二重欠損マウス (DKO)から血管を採取し、 SudanIV 染色を行なった結果、apoE K0 マウスに比べ DKO マウスでは大動脈全体の動脈硬化病変部を約 1/3 程度に有意に抑制する結果が得られた。続いて心臓の大動脈起始部を Oil Red O 染色で定量したところ、こちらも apoE K0 マウスに比べ DKO マウスでは病変部を有意に抑制する結果が得られた。

病変部における細胞浸潤を免疫染色により判定したところ、病変部においてマクロファージの浸潤が認められた。さらにマクロファージの浸潤部位において IL-1 の分泌を免疫染色により確認した。さらに血漿中に分泌された IL-1 を ELISA 法で測定したところ高脂肪食給餌後 3 ヶ月において apoE K0 マウスに比べ DKO マウスでは有意に IL-1 の分泌が抑制されている事が判明した。また様々な炎症性サイトカインやケモカイン等の遺伝子発現を Real-time PCR 法で確認した所、IL-1、IL-6、CCL8 の発現がインフラマソームの構成分子を欠損することで有意に抑制される結果が得られた。

さらに、invitro の解析では動脈硬化の形成にもインフラマソームが重要であり、血管石灰化に重要なリン酸カルシウム結晶がマクロファージにおけるインフラマソーム活性化の危険シグナルとなっており、インフラマソームの活性化とそれともなう IL-1 の産生がマウスマクロファージの細胞株である J774 を用いることで明らかになった (図 1)。

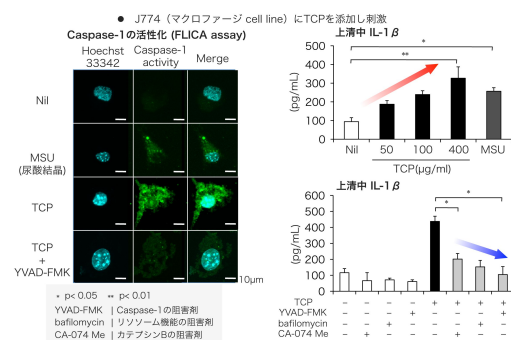


図 1 リン酸カルシウム結晶によるインフラマソーム活性化の解析

(2)大動脈瘤

アンジオテンシン II 投与後、4 週間の血管を採取し大動脈瘤の形成率および大動脈の最大径を比較したところ、apoE K0 マウスに比べインフラマソームの構成分子を欠損し

た二重欠損マウス (DKO) では形成率、最大径共に有意に減少していた (図 2)。

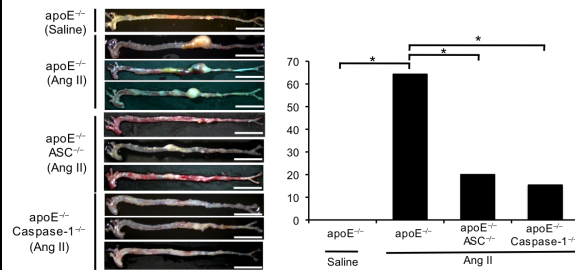


図 2 腹部大動脈瘤の形成率の比較

また免疫染色により病変部の外膜にマクロファージの浸潤及び ASC の発現を認めた。さらに病変組織の mRNA を解析したところ、炎症性サイトカインである IL-1 や毛も下院である MCP-1、マトリクスメタロプロテアーゼの MMP-2 および MMP-9 の発現が DKO マウスで有意に減少していた。また、大動脈径に変化のない AII 投与 7 日目の ApoE-K0 マウスで、すでにエラスチンの膨化と血管壁内出血、病変組織 IL-1 の増加を認め、これらは DKO マウスで改善していた。特に、血管外膜に浸潤しているマクロファージでインフラマソームの活性化を認め、この浸潤マクロファージではミトコンドリアの酸化ストレス (Mito-ROS) が亢進していた。Invitro での検討により、AII がマクロファージの AT1 受容体を介して Mito-ROS を増加させてインフラマソームの活性化を誘導することが確認され、Mito-ROS 阻害やインフラマソーム構成分子 (NLRP3・ASC・Caspase-1) 欠損マクロファージではその活性化が消失することも示された。

以上より、動脈硬化および大動脈瘤の形成におけるインフラマソームの役割が明らかとなり、その制御が新たな治療標的となりえることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 9 件)

1. Komada T, Usui E, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Inoue Y, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes for rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. **Sci Rep** (in press)
2. Karasawa T, Kawashima A, Usui E, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Sagara J, Takahashi M. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1β processing. **FEBS Open Bio** (in press)

3. Mizushina Y, Shirasuna K, Usui E, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y, Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 290: 5065-5077, 2015
4. Usui E, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Yoshimura K, Aoki H, Tsustui H, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 127-136, 2015
5. Shirasuna K, Usui E, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Mizukami H, Ohkuchi A, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Ozawa K, Taniguchi S, Takahashi M. Nanosilica-induced placental inflammation and pregnancy complications: Different roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC. *Nanotoxicology* (in press)
6. Usui E, Kobayashi M, Takahashi M. Letter regarding article "Inhibition of interleukin-1beta decrease aneurysm formation and progression in murine model of thoracic aortic aneurysm". *Circulation* 131: e399, 2015
7. Hara K, Shirasuna K, Usui E, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Matsuyama S, Kimura K, Takahashi M. IFNT attenuates uptake of nanoparticle and secretion of interleukin-1beta in macrophages. *PLoS One* 9: e113974, 2014
8. Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui E, Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Dezaki K, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M. NLRP3 Regulates Neutrophil Functions and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Independently of Inflammasomes. *J Immunol* 2014:192:4342-5
9. Komada T, Usui E, Shirasuna K, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Kusano E, Takahashi M. ASC in Renal Collecting Duct Epithelial Cells Contributes to Inflammation and Injury after Unilateral Ureteral Obstruction. *Am J Pathol* 2014:184:1287-1298
- 〔学会発表〕(計4件)
1. 臼井文武、木村博昭、白砂孔明、谷口俊一郎、高橋将文. 腹部大動脈瘤の形成におけるインフラマソームの役割. 第33回日本炎症・再生医学会、福岡、2012年7月(ポスター)
 2. 臼井文武、木村博昭、白砂孔明、谷口俊一郎、高橋将文. 腹部大動脈瘤の形成におけるインフラマソームの役割の解明. 第16回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、東京、2012年11月(口頭)
 3. 臼井文武、木村博昭、唐澤直義、川島晃、高橋将文. 大動脈瘤形成におけるNLRP3インフラマソームの役割の解明. 第35回日本炎症・再生医学会、沖縄、2014年7月(ポスター)
 4. 臼井文武、木村博昭、唐澤直義、川島晃、高橋将文. 大動脈瘤形成におけるNLRP3インフラマソームの役割. 第46回日本動脈硬化学会. 東京、2014年7月(ポスター)
- 〔図書〕(計1件)
1. 臼井文武、高橋将文. 疾患モデルの作製と利用 脂質代謝異常と関連疾患<<下巻>> 第三節 ASC、株式会社エル・アイ・シー、東京、2015、p43-51
6. 研究組織
- (1) (1)研究代表者
 臼井 文武 (USUI FUMITAKE)
 自治医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50585560