

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24890217

研究課題名(和文)インフラマソームの生活習慣病の病態における役割の解明とその新規制御法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of novel regulatory mechanisms of inflammasome in metabolic disease

研究代表者

唐澤 直義 (Karasawa, Tadayoshi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60631893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、さまざまな代謝病態に炎症が関与することが明らかになってきたが、この過程においてインフラマソームはカスパーゼ1の活性化を介して炎症の惹起に重要な役割を果たす。本研究では新たなインフラマソームの制御機構を明らかにするために、カスパーゼ1のホモログ分子であるCARD-only proteins (COPs)の役割について検討した。ヒト末梢血単核球においてCOPsの中で特にCARD16が高発現すること、CARD16は多量体形成することで、カスパーゼ1活性化を引き起こすことを見出した。これらの結果はCARD16がカスパーゼ1の活性化を介して炎症を促進する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Increasing evidences indicate that inflammation is involved in various aspects of metabolic disease. In this process, inflammasome plays critical role to initiate inflammatory response by activation of caspase-1. To investigate the novel regulatory mechanisms of inflammasome, I examined the role of CARD-only proteins (COPs) which are known as homologs of caspase-1. I identified that CARD16 exhibits higher expression levels than other COPs in human peripheral blood mononuclear cells. Furthermore, functional analysis in transfected HeLa cells revealed that oligomerization activity allows CARD16 to function as a caspase-1 activator. These results suggest CARD16 might promote inflammatory response by activation of caspase-1 and subsequent interleukin-1 release.

研究分野：代謝学

キーワード：炎症 インフラマソーム インターロイキン 脂肪酸 カスパーゼ1

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患は日本人の死因の上位を占め、予防、治療策が急務となっている。脂質異常症はその重要なリスク因子であるが、食事、運動を含めた生活様式の改善の難しさもあり、その管理は容易ではないことも多い。また、これらの管理だけでは除ききれない残余リスクも課題であり、脂質の量的管理だけでなく他の角度からの治療アプローチも必要とされている。申請者は最近、内因性の脂肪酸合成系を支配する転写因子 Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP-1) や、その標的遺伝子である脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の欠損マウスの解析から脂質の量的な改善とともに、脂肪酸の組成変化が、動脈硬化の進展に重要であることを明らかにした (Karasawa, T. et al. ATVB, 31:1788, 2011), (Saito, R. et al. ATVB, 31:1973, 2011)。これらの知見から、脂質の質的変容が動脈硬化に影響する機序として、脂肪酸組成の違いによって活性が変化する自然炎症シグナルに着目した。

動脈硬化の進展における炎症応答の重要性については、近年、広く知られるようになりつつあり、予防や治療の糸口としても期待されている。特に、無菌性炎症を制御するタンパク複合体であるインフラマソームはさまざまな脂質分子や結晶により活性化することから、炎症応答の初期の認識機構として注目されるようになっている。

無菌性炎症を制御する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、NLR (Nod-like 受容体) の一種である NLRP3 と Caspase-1 から成る分子複合体で構成されており、何らかの危険シグナルに応答して、Caspase-1 を活性化することで、IL-1 β や IL-18

の成熟を促し、炎症惹起を制御している。代謝性疾患への関連としては、動脈硬化病変においてコレステロール結晶により活性化されることで、炎症を惹起し、動脈硬化の進展に寄与することが明らかになり、病態における脂質の蓄積と炎症を結ぶ経路としても認識されるようになってきた (Nature 464, 1357, 2010)。また、肥満に伴うインスリン抵抗性の惹起に対しても、脂肪酸やセラミドなどの脂質分子種によるインフラマソームの活性化の関与が示唆されている (Nat Immun 12, 408, 2011)。これらの知見から申請者は、脂質蓄積からの炎症の惹起と代謝性疾患の発症を関連づける存在としてのインフラマソームに着目し、インフラマソーム活性の制御法を開発することがメタボリックシンドロームの病態治療の上でも非常に有用であると考えた。

一方、インフラマソームの制御への関与が示唆される因子として、caspase recruitment domain (CARD)-only protein (COPs)、PYD-only proteins (POPs) と呼ばれるそれぞれ Caspase-1、ASC と相同性の高いドメインを持つ遺伝子群が存在する。しかし、これら因子の発現制御機構及び、炎症惹起における役割はほとんど明らかになっておらず、これらの分子の役割を明らかにすることはインフラマソームの活性制御を試みる上で有効であると期待された。

2. 研究の目的

本研究は、インフラマソーム活性化を制御する分子機序について明らかにすることにより、生活習慣病の予防、治療へと応用することを目的として行った。そこで、(1) 脂質の蓄積によって活性化されるインフラマソームの活性化機序に着目し、脂肪酸組成に介入することで、インフラマソーム活性化を制御することを試みた。また、

(2) Caspase-1 ホモログ分子群である COPs に着目し、その発現制御機構、及び Caspase-1 活性調節における役割を明らかにすることで、インフラマソーム活性調節に応用することを検討した。

3. 研究の方法

(1)-①. インフラマソーム活性化の新規評価系の確立

脂肪酸によるインフラマソーム活性化調節機序の解明のため、インフラマソーム活性の簡便な評価系の構築を試みた。マウスマクロファージ細胞株 J774 細胞にヒト IL-1 β 遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入し、ヒト IL-1 β 恒常発現株 (J774hIL-1 β) を作製した。

(1)-②. 脂肪酸組成介入時のインフラマソーム活性化の検証

作製した J774hIL-1 β 細胞に飽和脂肪酸であるパルミチン酸、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸を共処理し、IL-1 β 産生の変動を評価した。

(2)-①. ヒト血球における COPs 発現の検討

カスパーゼ 1 の活性制御への関与が疑われるそのホモログ分子群 COPs について、そのヒト血球細胞における発現量について検証した。ヒト末梢血単核球を単離し、Caspase-1 及び 3 種類の COPs 遺伝子、CARD16、CARD17、CARD18 の発現について real-time PCR 法により定量した。

(2)-②. COPs がカスパーゼ 1 活性化に及ぼす影響の検討

COPs について過剰発現ベクターを構築し、その Caspase-1 活性化と IL-1 β 産生における機能を検討した。それぞれの発現ベクターを

培養細胞株に遺伝子導入し、Caspase-1 の集合に及ぼす影響について免疫細胞染色により、IL-1 β の分泌に及ぼす影響に ELISA 法、Western Blot によって検証した。

4. 研究成果

(1)-①. J774hIL-1 β 細胞の作製と評価

ヒト IL-1 β 恒常発現株 IL-1 β 産生は転写レベルとインフラマソーム活性化の 2 段階にて調節されることから、一般的な ELISA 法による IL-1 β 産生の評価では直接的にインフラマソーム活性を評価することができなかった。そこで、ヒト IL-1 β 遺伝子をマウス培養細胞株である J774 に導入したヒト IL-1 β 恒常発現株を樹立した。ヒト IL-1 β 抗体がマウス IL-1 β を認識しないことから、産生させるヒト IL-1 β を ELISA により評価することで、インフラマソーム活性化を関節的に評価することが可能となった。

(1)-②. J774hIL-1 β を利用した脂肪酸組成の変化によるインフラマソーム活性調節の評価

飽和脂肪酸はインフラマソーム活性化だけでなく、Toll 様受容体 (TLR) 4 の経路の活性化にも関わることを示唆されている。そこで、TLR4 の活性化によるマウス IL-1 β mRNA 発現の変化に関わらずヒト IL-1 β を発現する J774hIL-1 β 細胞を用いて、パルミチン酸によって引き起こされる IL-1 β 産生を脂肪酸組成の変容により改善できるかを検討した。細胞内の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比率がインフラマソーム活性化に重要であると考え、一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸を添加した所、IL-1 β の産生は完全に抑制された。最近、申請者の結果と同様にヒト

単球細胞株 THP-1 細胞においても、飽和脂肪酸によって活性化される IL-1 β 産生が不飽和脂肪酸によって抑制されることが報告されたが(J Lipid Res, 54(11):2998-3008, 2013), その機序については明らかにされていない。飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比によるインフラマソーム活性の制御メカニズムについては、今後の研究課題として取り組んでいく予定である。

(2)-①. ヒト血球における COPs 発現の検討

ヒト末梢血単核球, ヒト単球培養細胞株 THP-1 における Caspase-1, CARD16, CARD17, CARD18 の発現を real-time PCR 法により検討した所, CARD16 のみが Caspase-1 に近いレベルの発現を示した(図 1)。いずれの細胞においても CARD17, CARD18 の発現は Caspase-1 と比較して 1/100 以下の発現量であり, 血球細胞における主要な COPs 遺伝子は CARD16 であることが示唆された。また, Caspase-1 と CARD16 のプロモーター領域を比較した所, 翻訳開始点から約上流 1300bp にわたって Caspase-1 と CARD16 では高度に保存されており, Caspase-1 の発現制御に重要なインターフェロン応答配列 IRF-E が CARD16 プロモーター上にも認められた。実際に CARD16 は Caspase-1 と同様に IFN- β による発現誘導を受けることも明らかにした。

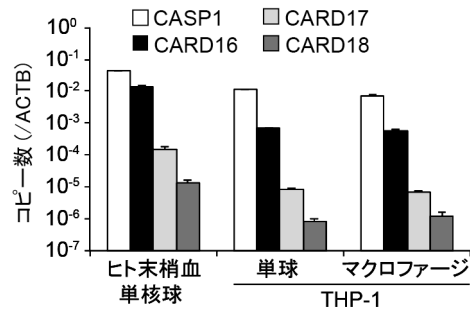


図 1. ヒト末梢血単核球, ヒト単球培養細胞株 THP-1 における Caspase-1, COPs の発現

(2)-②. COPs が Caspase-1 活性化に及ぼす影響の検討

CARD16 遺伝子と CARD17 遺伝子を発現するベクターを作製し, その分子機能を比較したところ, CARD16 は CARD17 と異なり, 多量体形成する活性を持つことが明らかになった。この際の CARD16 の細胞内局在を検討すると CARD16 のフィラメント形成が認められた。近年 CARD によるフィラメント形成がインフラマソームの集合に重要であることが示されていることから, CARD16 が Caspase-1 の集合に及ぼす影響について検証した。その結果, CARD16 は Caspase-1 をフィラメント状に集合させることが明らかになった。実際にこの際 CARD16 により IL-1 β 産生が促進され, CARD16 は Caspase-1 の集合を促進することで, IL-1 β 産生を亢進させると推測された。

一方, インフラマソームの形成に重要な ASC の CARD と CARD16 の相互作用を検討したところ, CARD16, CARD17 とともに Caspase-1 とは相互作用するものの, CARD16 だけが ASC の CARD と相互作用することが明らかになった。さらに CARD16 と ASC の共局在を検討したところ, インフラマソームに形成時に特徴的に認められる ASC の凝集体である” Speck” に CARD16 は集積することが明らかになり,

CARD16 はインフラサーム活性を調節する可能性が推測された (図 2).

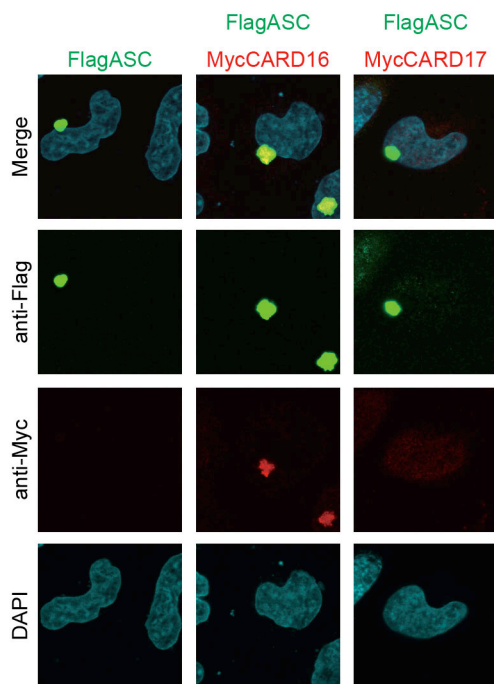


図 2. CARD16 と ASC は共局在し, Speck を形成する.

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 1 件)

- ① Karasawa T, Kawashima A, Usui F, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushima Y, Sagara J, Takahashi M. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1beta processing. *FEBS open bio* 5: 348-356, 2015.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 唐澤 直義, 川島晃, 白井文武, 木村博昭, 高橋将文, カスパーゼ 1 ホモログ分子 CARD16 による新規炎症惹起機序の解析, 第 35 回日本炎症・再生医学会, 2014 年 7 月 1 日, 万国津梁館 (沖縄)
- ② 唐澤 直義, 川島晃, 白井文武, 木村博昭,

高橋将文, カスパーゼ 1 ホモログ COPs による炎症制御機構の解析, 第 46 回日本動脈硬化学会 学術集会, 2014 年 7 月 11 日, 京王プラザホテル (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/inflammation/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐澤 直義 (KARASAWA, Tadayoshi)

自治医科大学 医学部 助教

研究者番号:60631893