

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870624

研究課題名(和文) NSAIDs起因性消化管傷害におけるインフラマソームの役割の解明と新治療法の確立

研究課題名(英文) Roles of inflammasome in the development of NSAID-induced enteropathy

研究代表者

灘谷 祐二(Nadatani, Yuji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨床研究医

研究者番号：00634007

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)：本研究は本研究ではNSAIDs消化管傷害とインフラマソームの関連を明らかとすることを目的とした。本研究により種々あるインフラマソームの中でもNLRP3インフラマソームによるIL-1 β の成熟化がNSAIDs起因性小腸傷害の発生に極めて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、このNLRP3インフラマソーム活性化にTLR4とP2X7を介した経路が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Aim of this study is to investigate the role of inflammasomes in Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) induced enteropathy. This study showed that the NLRP3 inflammasome-associated IL-1 β plays a critical role in NSAIDs-induced small intestinal enteropathy. In addition, the TLR4 and P2X7 signalings plays an improtant roles in developing this NLRP3 inflammasome associated enteropathy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：小腸傷害 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

消炎鎮痛剤である Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)は、食道から大腸にかけての全消化管に傷害を惹起し、消化管出血や穿孔などの重篤な病態をきたす。しかしながら、その粘膜傷害作用のメカニズムは現在不詳であり、特に小腸以深の病変に対しては現在有効な治療がなく、メカニズムの解明と有効な治療法の開発が急務である。

我々は NSAIDs 起因性小腸傷害発症のメカニズムのひとつに細胞膜受容体である Toll-like receptor (TLR) 4 が key となる自然免疫があることを報告している。すなわち、小腸粘膜傷害の病態では TLR4 が病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs)であるグラム陰性菌由来の Lipopolysaccharide (LPS)を認識し TNF や ILs などのサイトカイン発現を活性化し炎症を誘導、組織傷害を惹起している。(Watanabe et al. , Gut, 2008)

TLR4はPAMPsの他にダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns : DAMPs)も認識する。我々は核タンパクである High-Mobility Group Box1 (HMGB1)が、炎症刺激により細胞内、血中に放出されることによって、DAMPs としての作用を持ち、TLR4 を介して NSAIDs 起因性消化管粘膜傷害形成を促進させている事を報告している。(Nadatani et al. , Am J Pathol. 2012)

このように、我々は PAMPs、DAMPs/TLR4 を介したシグナルは NSAIDs 起因性消化管傷害形成の促進因子である事を示した。しかし、TLR4 遺伝子欠損による NSAIDs 起因性小腸傷害抑制効果は、抗生剤投与が発揮する NSAIDs 起因性小腸傷害抑制効果に比べ弱いため、腸内細菌が小腸傷害を引き起こす経路が TLR4 以外に存在する可能性が高い。(Watanabe et al. , Gut, 2008)

我々は、後述する PAMPs や DAMPs により刺激されるインフラマソームを介したシグナルがその経路であると考えている。

インフラソームとは、カスパーゼ1と ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) および自然免疫に 関与する分子群である NOD-Like receptor (NLR)で構成される、カスパーゼ1を活性化させるための分子基盤である。活性化したカスパーゼ1が IL-1 、 IL-18 の分泌を促進させることにより、自然免疫の一翼を担っている。

PAMPs や DAMPs を認識することにより活性化された NLRs はアダプタータンパク質の ASC を介し、カスパーゼ1の前駆体であるプロカスパーゼ1を集合させ、巨大タンパク複合体であるインフラマソームを形成する。形成されたインフラマソームのカスパーゼ1により pro- IL-1 や pro- IL-18 が炎症性サイトカインである IL-1 、 IL-18 に活性化、放出され、その結果炎症反応の誘導や進展、細胞死(pyroptosis)を引き起こす。現在では、刺激の種類に応じて様々な種類の NLR がインフラマソームを構成することが知られており、NLRP1~4、AIM2 インフラマソームなどが同定されている。その中でも特に NLRP3 インフラマソームは痛風や2型糖尿病の原因として最近注目されている。

2. 研究の目的

本研究では NSAIDs 消化管傷害とインフラマソームの関連を明らかとすることを目的とした。具体的には

NSAIDs 起因性小腸傷害におけるインフラマソームとその産物である IL-1 の役割を明らかにした。

同時に NSAIDs 起因性小腸傷害形成時の TLR4 および細胞外 ATP の働きも明らかにした。

3. 研究の方法

動物は Wild-type マウス (C57BL/6J), caspase-1KO マウス, NLRP3KO マウスを使用した。

NSAIDs 起因性小腸傷害をインドメタシン (10 mg/kg body weight) をマウスに経口投与することにより作成した。

実験群

上記マウスに対し、

外因性 IL-1, IL-1 中和抗体の腹腔内投与を行った。

TLR4 のリガンドである lipopolysaccharide (LPS) や high mobility group box 1 (HMGB1) の腹腔内投与を行った。

P2X7 受容体拮抗薬である brilliant blue G (BBG) や ATP 消去薬である apyrase (APY) の腹腔内投与を行った。

検討項目

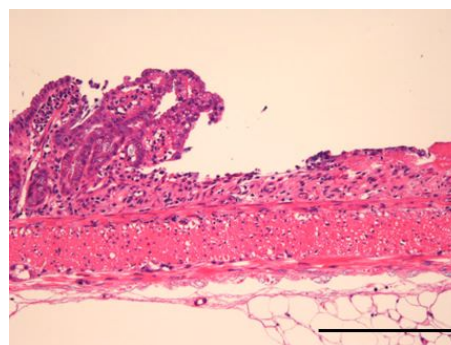
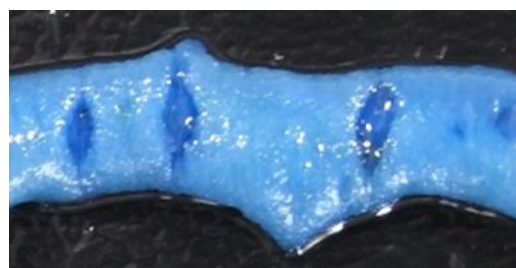
経口投与後 0, 3, 6, 12, 24 時間における炎症性サイトカイン (TNF, IL-1) の発現は定量的 PCR 法にて検討した。

活性型 caspase-1 と成熟型 IL-1 の発現は western blotting 法により検討した。

IL-1, NLRP3, 活性型 caspase-1 の局在、発現は免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

NSAIDs 投与により 24h をピークとする小腸傷害形成が認められた。また、その小腸傷害形成には、NSAIDs 投与後 12h をピークとする IL-1 mRNA の誘導と、6h、12h をピークとする IL-1 蛋白濃度の上昇を伴っていた。また、NSAIDs 投与により Western Blotting 計測した pro-1, Mature IL-1 の蛋白濃度も共に上昇を認めた。NLRP3 インフラマソームの局在は主にマクロファージであった。



PCR を IL-1 の成熟化を制御するインフラマソームのタイプを用いて検討を行ったところ、AIM2、NLRP4、NLRP6 の mRNA の上昇を認めず、NLRP3 の mRNA のみ 6, 12h をピークとする上昇を認めた。そのため、本 NSAIDs 起因性小腸傷害においては、NLRP3 インフラマソームのみ関与していると考えられた。また、インフラマソームのキーコンポーネントである Caspase-1 は mRNA レベルでの変化は認められなかったが、活性型である cleaved caspase-1 の蛋白の上昇を Western Blotting にて確認した。

以上の結果より、NSAIDs 起因性小腸傷害形成時には、NLRP3 インフラマソームの活性化により IL-1 が誘導されることが明らかとなった。

次に NSAIDs 起因性小腸傷害における IL-1 の役割をさらに検討するために、外因的に IL-1 もしくは、IL-1 中和抗体の投与を行った。外因的 IL-1 の投与により NSAIDs 起因性小腸傷害は増悪し、IL-1 中和抗体投与により NSAIDs 起因性小腸傷害は軽減した。以上の結果より IL-1 は NSAIDs 起因性小腸傷害の悪化因子であることが証明された。

次に NLRP3 もしくは、caspase-1 の果たす役割について検討を行った。NLRP3 もしくは、

caspase-1 の遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ NSAIDs 起因性小腸傷害形成は抑制された。同時に IL-1 の発現が抑制されるとともに、Caspase-1 と IL-1 が mRNA レベル、タンパクレベルの双方で抑制された。

また、TLR4 の遺伝的欠損により、NSAIDs 起因性小腸傷害が抑制されるとともに IL-1 と NLRP3 の mRNA 発現も抑制された。同時に caspase-1 と IL-1 の活性化も抑制された。反対に TLR4 のリガンドである LPS、HMGB1 の投与では、IL-1 と NLRP3 の mRNA の発現量の増加をみとめた。

次に、インフラマソームの活性化に必須とされる ATP の影響を検討した。ATP 阻害薬である BBG と APY の投与により、NSAIDs 起因性小腸傷害が抑制され、IL-1 と NLRP3 の mRNA の発現が抑制されるとともに、caspase-1 と IL-1 の活性化が抑制された。

結語

NLRP3 インフラマソームによる IL-1 の成熟化が NSAIDs 起因性小腸傷害の発生に極めて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

NLRP3 インフラマソーム活性化に TLR4 と P2X7 を介した経路が重要である可能性が示唆された。

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 1 件)

1. Mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its role in NSAID-induced enteropathy.
Higashimori A, Watanabe T, Nadatani Y, Takeda S, Otani K, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T.

Mucosal Immunol. 査読あり 2016 May ;9(3): 659-68. doi: 10.1038/mi.2015.89. Epub 2015 Sep 9.

[学会発表](計 3 件)

1. NSAIDs 起因性小腸傷害におけるインフラマソームの活性化機構
大谷 恒史、渡辺 俊雄、東森 啓、武田 翔伍、灘谷 祐二、谷川 徹也、富永 和作、藤原 靖弘、荒川 哲男
2014 年 11 月 1 日 潰瘍学会 慶応義塾大学 薬学部 芝浦キャンパス(東京都港区)

2. NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS INJURE THE SMALL INTESTINE THROUGH NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION
Toshio Watanabe, Akira Higashimori; Yuji Nadatani; Tetsuya Tanigawa; Kazunari Tominaga; Yasuhiro Fujiwara; Tetsuo Arakawa
2014 年 10 月 22 日 欧州消化器病学会週間 オーラルプレゼンテーション ウィーン(オーストリア)

3. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Injure the Small Intestine Through NLRP3 Inflammasome Activation
Akira Higashimori, Toshio Watanabe, Yuji Nadatani, Shogo Takeda, Tetsuya Tanigawa, Hirokazu Yamagami, Masatsugu Shiba, Kenji Watanabe, Kazunari Tominaga, Yasuhiro Fujiwara, Tetsuo Arakawa
2014 年 5 月 5 日 米国消化器病週間 ポスタープレゼンテーション シカゴ(アメリカ合衆国)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

灘谷 祐二（NADATANI YUJI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・後期臨

床研究医

研究者番号：00634007