

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：26860581
研究課題名(和文)血栓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 inflammasome in thrombosis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生活習慣病の増加を背景とする血栓症患者が増加している。本研究では自然炎症経路の1つであり生活習慣病とも関連するNLRP3インフラマソームが血栓症で重要な役割を持つと予想しその役割の解明を試みた。マウス血栓症モデルによる解析を行ったところ、野生型に比べNLRP3インフラマソーム構成分子の1つであるASCを欠損した場合のみ病態が悪化することが判明した。またその原因としてASC-KOマウス由来の血小板ではWTに比べP-selectinの活性化が有意に増加することが判明した。今後ASCの制御により血栓症の新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, thrombosis patients were increasing in association with lifestyle related diseases. In this study, we attempted to elucidate the role of NLRP3 inflammasome which is known to be involved in sterile inflammation in lifestyle-related diseases in arterial and deep vein thrombosis. Analysis of mice thrombosis model (middle cerebral artery thrombosis and caudal vena cava thrombosis), only ASC which is component of NLRP3 inflammasome deficient mice enhanced development of thrombosis compared with those in wild-type and other NLRP3 component deficient mice. In addition to more analysis, P-selectin was more likely to activation in ASC deficient platelets. ASC is expected to become a therapeutic target for thrombosis to clarify the mechanism.

研究分野：循環器疾患

キーワード：自然免疫 炎症 血栓症

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国では、脳血管障害(脳梗塞、脳出血など)の治療を受けている患者数は140万人といわれ、特に脳梗塞の患者数は脳血管障害患者全体の2/3以上をしめ、脳出血患者の約4倍である。また近年ではロングフライト症候群(エコノミークラス症候群)として知られる肺血栓塞栓症や深部静脈血栓症、微小血管の炎症に起因する血栓性臓器障害などが増加している。こうした背景には、生活習慣病の主要因である肥満に加え高血圧症、糖尿病、脂質異常症などの増加にともなう動脈硬化や血管内凝固亢進状態が考えられる。この状況を改善すべく動脈硬化や血栓症の発症メカニズムを解明し、治療法、予防法を開発すること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、免疫学の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、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。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、生活習慣病を背景に増加傾向にある血栓症においてもNLRP3インフラマソームは重要な役割を持つのではないかと考えた。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

生活習慣病の増加を背景とする動脈硬化や血管内凝固亢進状態により血栓症患者が急増しており、その発症メカニズムの解明や治療法の開発は急務である。申請者はこの血栓形成において自然炎症経路の1つであるインフラマソームが関与するのではな

いかと仮説をたてた。インフラマソームは生活習慣病など無菌的な炎症反応の惹起に重要な役割を果たすことが明らかとされてきている。本研究では、静脈血栓、動脈血栓、播種性血管内凝固症候群の各々の血栓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。

3. 研究の方法

静脈血栓モデルとして深部静脈血栓モデルを使用した。右腎静脈直下の下大静脈を結紮し静脈血栓を誘導した。血栓は血栓重量、最大長を評価した。また血栓の凍結切片を作製し、HE染色、シリウスレッド染色を行う事で組織学的な解析を行った。動脈血栓モデルとして中大脳動脈血栓形成による脳梗塞モデルを使用した。頸静脈からローズベンガルを投与した(10mg/kg)。次に中大脳動脈に向け緑色蛍光(540nm)を照射し、動脈血栓を形成させることで脳梗塞を誘導した。脳梗塞は2mm厚にスライスした脳をTTC染色し評価した。各疾患動物モデルにはインフラマソームに関連する各KOマウスとして、NLRP3-KO、ASC-KO、Caspase-1-KO、IL-1 β -KOのマウスを使用し、各疾患モデルにおける病態の変化を検討した。前述した各種パラメーター解析、組織採取による炎症反応やインフラマソームの活性化の検討、病態の重症度評価を行った。血栓形成に直接関連するパラメーターとして1)凝固因子、2)血小板活性化機構、3)線溶機構の3項目について解析を行った。1)はプロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定で評価した。2)は活性化をP-selectinやインテグリン α IIb β 3を指標にFACS解析を用いて検討した。3)はPAI-1の遺伝子発現を肝臓において評価した。

4. 研究成果

静脈血栓モデル、動脈血栓モデルにおいてWTおよび各KOマウス(NLRP3-KO、ASC-KO、Caspase-1-KO、IL-1 β -KO)を使用し疾患モデルにおける病態の変化を検討したところ、意外なことにWTマウスに比べASC-KOマウスでのみ病態が増悪することが判明した。WTマウスとASC-KOマウス間で骨髄置換マウスを作成し、静脈血栓モデルを作成したところ、血球系および非血球系のどちらかがASCが欠損されることでも血栓形成は促進するが、ASCが全身で欠損されたマウスと比べると血栓形成が抑制されていることが判明した。そこで血栓形成で重要とされる1)凝固因子、2)血小板凝集・活性化機構、3)抗凝固機構、4)線溶機構の4項目に着目し更なる検討を行なったところ、ASC-KOマウス由来の血小板ではWTに比べP-selectinの活性化が有意に増加することが判明した。一方 Western Blotting法により、血小板におけるP-selectin

の発現量を確認したところ、WT マウスと ASC-KO マウスで P-selectin の発現量に差は認められなかった。

本研究は ASC 分子が P-selectin の活性化に寄与し、血栓形成に関与することを明らかにした。今後、ASC が P-selectin の活性化にどのように寄与しているか詳細なメカニズムの検討を行なうことで、ASC による P-selectin 制御機構が明らかにし、血栓が関連する様々な疾患の病態解明や新たな治療法の開発に取り組みたい。

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 13 件)

1. Komada T, Usui F, 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* 184: 1287-1298, 2014
2. Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, 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* 192: 4342-51, 2014
3. Hara K, Shirasuna K, Usui F, 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
4. Usui F, 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
5. Shirasuna K, Usui F, 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* 5: 554-567, 2015
6. Usui F, 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
7. Mizushina Y, Shirasuna K, Usui F, 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
8. Karasawa T, Kawashima A, Usui F, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Sagara J, Takahashi M. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1 processing. *FEBS Open Bio* 5: 348-356, 2015
9. Komada T, Usui F, 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* 5: 10901, 2015 (first equal contribution)
10. Shirasuna K, Karasawa T, Usui F, Kobayashi M, Komada T, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Taniguchi S, Takahashi M. NLRP3 deficiency improves angiotensin II-induced hypertension but not fetal growth restriction during pregnancy. *Endocrinology* 156: 4281-4292, 2015
11. Kimura H, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Suzuki K, Iwasaki Y, Yada T, Caturegli P, Takahashi M. Immunoproteasome subunit LMP7 Deficiency Improves Obesity and Metabolic Disorders. *Sci Rep* 5: 15883, 2015
12. Shirasuna K, Karasawa T, Usui F, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Iwata H, Kuwayama T, Takahashi M. Possible role of inflammasomes in angiotensin II-induced preeclampsia in mice. *J Reprod Immunol* 112: 124-125, 2015

13. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushima Y, Shirasuna K, Mizukami H, Kasahara T, Hsebe N, Takahashi M. NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Sci Rep* 6: 26489, 2016

[学会発表](計4件)

1. 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)
2. 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)
3. 臼井文武、木村博昭、唐澤直義、川島晃、谷口俊一郎、高橋将文. 動脈硬化および大動脈瘤形成における NLRP3 インフラマソームの役割. 第 26 回日本生体防御学会学術総会. 東京、2015 年 7 月 (若手シンポジウム、口頭)
4. 臼井文武、駒田敬則、唐澤直義、川島晃、木村博昭、武藤重明、長田太助、高橋将文. 横紋筋融解症による急性腎障害における NLRP3 インフラマソームの役割. 第 36 回日本炎症・再生医学会、東京、2015 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