

令和元年6月20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：2017～2018

課題番号：17H07055

研究課題名(和文)新規に同定したE3ユビキチンリガーゼによるインフラマソーム制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of NLRP3 inflammasome regulation mechanism by E3 ubiquitin ligase

研究代表者

鎌田 諒 (Kamata, Ryo)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：60801420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化や心筋梗塞といった心血管疾患の病態には無菌性炎症が関与しており、この無菌性炎症の惹起経路としてNLRP3インフラマソームと呼ばれる細胞内タンパク複合体が注目されている。NLRP3インフラマソームの制御機構を解明することは、新たな治療法の開発に繋がることが期待されているが、未だ不明な点が多い。本研究では、NLRP3インフラマソーム複合体から新たに同定したE3ユビキチンリガーゼARIH2を中心に解析を行い、ARIH2がNLRP3をユビキチン化することにより、NLRP3がプロテアソームによって分解されて発現量が減少することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ARIH2がNLRP3の発現量を調節して炎症を制御していることを明らかにした。これまでに、NLRP3インフラマソームは心血管疾患のみならず、無菌性炎症に関わる多くの疾患の発症機構に関与することから、ARIH2によるNLRP3インフラマソームの制御機構の一端を明らかにしたことは、インフラマソームが関与する様々な疾患の病態解明や治療法開発にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Sterile inflammation is involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases such as arteriosclerosis and myocardial infarction. Recent investigations have suggested that sterile inflammation is mediated by NLRP3 inflammasome. Elucidating the regulatory mechanism of NLRP3 inflammasome is expected to lead to the development of new therapeutic methods. However, its regulatory mechanism is still unknown. In this study, we focused on ARIH2, an E3 ubiquitin ligase newly identified from the NLRP3 inflammasome complex, and revealed that ARIH2 ubiquitinated NLRP3 and regulated the expression level of NLRP3 via proteasomal degradation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器 免疫学 ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化や心筋梗塞などの心血管疾患の発症に共通する“炎症”は、病原体の関与がないことから無菌性炎症と称され、この無菌性炎症の惹起経路として“インフラマソーム”と呼ばれる細胞内分子複合体が注目されている。

NLRP3 インフラマソームは、アダプター分子である ASC を中心に、NLR (Nod-Like Receptor) ファミリーの NLRP3 と Caspase-1 によって構成される分子複合体である。種々の刺激によって細胞内にインフラマソームが形成されると、Caspase-1 の活性化を介して強力な炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  のプロセッシングが誘導される (Takahashi, *Int Heart J* 55:101, 2014, *Trends Cardiovasc Med* 21:37, 2011)。申請者のグループでは、インフラマソームは心虚血再灌流や動脈硬化、腹部大動脈瘤、血管傷害後の内膜肥厚といった様々な心血管疾患の発症に関与することを明らかにしてきた (*Circulation* 117:3079, 2008; 123:594, 2011; *Biochem Biophys Res Commun* 425:162, 2012; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:127, 2015 など)。NLRP3 インフラマソームの制御機構を解明する事は、心血管疾患の新たな治療法の開発に大きく貢献することが予想されるが、その制御機構は不明な点が多い。申請者のグループは、最近、マクロファージにおける NLRP3 インフラマソーム制御機構を解明する事を目的として、インフラマソーム複合体を単離・精製して質量分析による網羅的な解析を行った結果、E3 ユビキチンリガーゼである Ariadne Homolog 2 (ARIH2) を新たに同定した。ARIH2 は NLRP3 に直接結合し、ユビキチン修飾をすることで、インフラマソームを負に制御していることを明らかにした (*J Immunol* 199:3614 2017, 図1)。しかしながら、ARIH2 による NLRP3 の発現制御機構は不明である。さらに、ARIH2 欠損マウスは胎生致死であることから、生体における ARIH2 の役割については明らかでない。

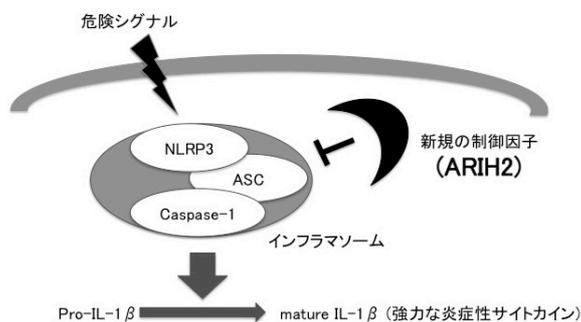


図1: インフラマソームを制御する新規分子ARIH2

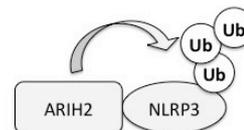
## 2. 研究の目的

本研究は ARIH2 による NLRP3 インフラマソームの制御機構解明と、マウスモデルを用いて、生体における ARIH2 の役割を明らかにし、心血管疾患への新たな治療戦略の確立に次の観点から挑む(図2)。

- ・ ARIH2 によるユビキチンシグナルを介した NLRP3 インフラマソームの制御機構解明
- ・ ARIH2 遺伝子改変マウスを用いて、生体内における ARIH2 の役割を解明

インフラマソームが惹起する無菌性炎症は、多くの病態に関する事から、本研究による成果は、疾患の病態解明や治療法開発にも大きく貢献することが期待される。また、近年、高齢化や食生活の変化とともに心血管疾患や生活習慣病は増加の一途を辿っていることから、臨床的・社会的にも大きなインパクトをもたらす可能性がある。

### 【目的1】ARIH2によるNLRP3インフラマソームの制御機構の解明



### 【目的2】生体および疾患におけるARIH2の役割の検証



図2: 本研究における研究目的

## 3. 研究の方法

本研究では、新たに同定した E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 による NLRP3 インフラマソーム活性化の制御機構を解明するとともに、ARIH2 遺伝子改変マウスを作製して、ARIH2 の生体における役割を検証する。

### 【ARIH2 による NLRP3 インフラマソームの制御機構について】

E3 ユビキチンリガーゼによる基質へのユビキチン修飾は、ユビキチンにあるリシン残基(K48 や K63 など)を介した結合の種類によって、機能が異なる事が知られている。ARIH2 を欠損または過剰発現したヒトマクロファージ THP-1 細胞(CRISPR/Cas9 システムとレンチウイルスベクターにより作製)を用いて、NLRP3 への K48 および K63 を介したユビキチン修飾を見出していることから、ARIH2 によるユビキチン修飾後の NLRP3 タンパク発現量への影響を検討するため、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)を添加し、NLRP3 タンパクの発現をウェスタンブロット法により解析した。

#### 【ARIH2 の生体における役割について】

ARIH2 欠損マウスは胎生致死であることから ARIH2-flox マウスを作製、Cre-loxP システムを利用し、Cre-LyzM および R26CreER マウスとの交配により、マクロファージ特異的 ARIH2 欠損およびタモキシフェン誘導性(時期特異的)ARIH2 全身欠損マウスを作製した。

## 4. 研究成果

本研究では、ARIH2 の NLRP3 インフラマソーム活性化制御機序を解明するとともに、遺伝子改変マウスの作製を行い、ARIH2 の生体における役割を検討した。

まずは、ARIH2 の発現を制御している因子について探索を試みるために、J774 細胞に LPS、ATP 刺激による各種インフラマソーム活性化刺激や炎症刺激により解析を行ったが、ARIH2 の発現に変化は認められなかった。次に、ARIH2 による NLRP3 の発現制御機構について、ARIH2 欠損 THP-1 細胞を用いて、タンパク合成阻害剤である CHX 添加によって、NLRP3 発現量の変化を解析した。その結果、THP-1 細胞(コントロール群)は CHX の添加に伴い、NLRP3 発現量は減少したが、ARIH2 欠損 THP-1 細胞における NLRP3 の発現量に有意な変化は認められなかったことから、ARIH2 は NLRP3 の発現量を負に制御していることを示唆した。さらに、Tet-On システムにより作製したドキシサイクリン(DOX)添加による ARIH2 の発現誘導を可能にした THP-1 細胞を用いた解析では、DOX

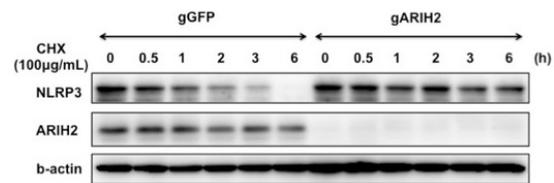


図3: ARIH2欠損によりNLRP3の発現量の減少は抑えられた

により誘導された ARIH2 の発現上昇に伴い、NLRP3 の発現が低下することが明らかとなった。これらの結果から、ARIH2 は NLRP3 の発現レベルを制御していることを明らかにした(図3)。

ARIH2 を発現している組織と細胞の探索、発現制御について、野生型マウスを用いて各組織における ARIH2 の発現を確認した。その結果、精巣、肝臓、脳、脾臓において ARIH2 は特に高く発現していた。また、様々な細胞株および初代細胞培養系を用いて解析した結果、マウスマクロファージ細胞株 J774、RAW264.7、マウス骨髄由来マクロファージ(BMDM)および樹状細胞(BMDC)、ヒト巨核球細胞株 CMK11-5 および Meg01、マウス血管平滑筋細胞 MOVAS、ラット大動脈平滑筋細胞 A7r5 において高く発現していた。

ARIH2 遺伝子改変マウスの作製および解析について、ARIH2 欠損(-/-)マウスは胎生致死になることが報告されており、申請者が作製したマウスにおいても欠損(-/-)マウスを得ることができなかつた。

一方で、ヘテロ欠損(+/-)マウス生存が確認できたため、解析に用いた。この解析により、ヘテロ欠損(+/-)マウスの骨髄細胞において、NLRP3 の発現が上昇していることが分かった。これらの結果から、ARIH2 を発現している細胞及び組織を同定し、ARIH2 の発現を変動する要因は見出せなかつたが、NLRP3 の発現量の調節に関わっていることを示唆した。

さらに、ARIH2 欠損マウスは胎生致死であることから ARIH2-flox マウスを作製し、Cre-loxP システムを利用し、Cre-LyzM および R26CreER マウスとの交配により、マクロファージ特異的 ARIH2 欠損およびタモキシフェン誘導性(時期特異的)ARIH2 全身欠損マウスを作製して、腹腔内マクロファージや肝臓組織で ARIH2 の欠損が誘導されていることを確認した(図4)。

これらの結果から、ARIH2 は細胞および生体において、NLRP3 の発現量を調節している可能性を示唆した。

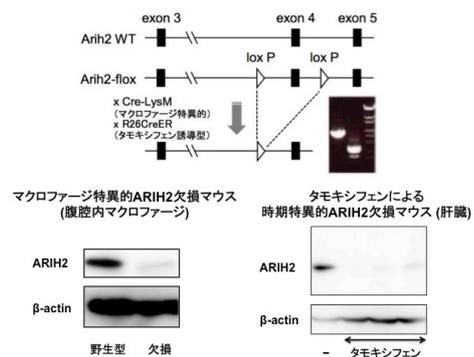


図4: Cre-loxPシステムを用いた細胞・時期特異的ARIH2欠損マウスの作製

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

（査読あり）

1. Nakamura J, Watanabe S, Kimura H, Kobayashi M, Karasawa T, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Sadatomo A, Mizukami H, Nagi-Miura N, Ohno N, Kasahara T, Minota S, Takahashi M. Adeno-associated vector-mediated interleukin-10 induction prevents vascular inflammation in a murine model of Kawasaki disease. *Sci Rep* 8: 7601, 2018
2. Karasawa T, Kawashima A, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, Shirasuna K, Koyama Y, Sato-Tomita A, Matsuzaka T, Tomoda H, Park SY, Shibayama N, Shimano H, Kasahara T, Takahashi M 『Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages.』 *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38(4) 744-756. 2018 Apr
3. Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Kimura H, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Yanagisawa K, Kasahara T, Suzuki K, Takahashi M 『ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages.』 *The Journal of Immunology* 15;199(10) 3614-3622. 2017 Nov
4. Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mizushima Y, Nakamura J, Kamata R, Kasahara T, Horie H, Sata N, Takahashi M 『Interaction of Neutrophils with Macrophages Promotes IL-1 $\beta$  Maturation and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury.』 *The Journal of Immunology* 199(9) 3306-3315 2017 Nov

〔学会発表〕（計1件）

1. 鎌田 諒, 川島 晃, 木村 博昭, 唐澤 直義, 渡邊 幸子, 高橋 将文  
「E3 ユビキチンリガーゼ ARIH2 による NLRP3 インフラマソーム制御機構の解明」  
『第59回日本脈管学会』 0-8-1、広島、10月 2018年

〔その他〕

ホームページ

自治医科大学 炎症・免疫研究部

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

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。