

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02098

研究課題名（和文）グルタチオン放出を介したNLRP3インフラマソームの新規活性化機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activation via glutathione efflux

研究代表者

澤 智裕（Sawa, Tomohiro）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：30284756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：インフラマソームは、感染や組織損傷、環境異物への暴露などにより活性化されるタンパク質複合体で、インターロイキン-1などの炎症性サイトカイン生成をもたらす自然炎症応答を担っている。本研究では、内因性のインフラマソーム活性化因子であるアデノシン3リン酸（ATP）により細胞を刺激すると、抗酸化ペプチドであるグルタチオンが細胞外へ速やかに排出されることを発見した。さらに細胞外にグルタチオンを添加すると、グルタチオン排出が抑制され、かつ、インフラマソームの活性化も抑制されることを見出した。以上より、ATP依存性のグルタチオン排出が新しいインフラマソームの活性化機構であ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

NLRP3インフラマソームの慢性的な活性化はクリオピリン関連周期熱症候群や痛風、さらにはごく最近では新型コロナウイルス感染症の重症化に関与することが報告されている。効果的な治療法の検討が進められている中で、今回の成果は、NLRP3インフラマソームの新しい活性化経路を明らかにしたことで、今後、それを標的とした新しい治療薬の探索や、感受性宿主の同定など、に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：NLRP3 inflammasome involves in host defense and inflammatory responses through maturation of precursor forms of interleukin-1beta into active proinflammatory cytokines and initiation of pyroptosis. This study was conducted to clarify the impact of cellular glutathione (GSH) towards NLRP3 inflammasome activation. We found that ATP induces rapid GSH decline in LPS-primed macrophages. Simultaneously, comparable level of GSH was detected in culture supernatants, suggesting ATP induced GSH efflux. Moreover, exogenous addition of GSH or oxidized form of GSH (GSSG) attenuated this GSH efflux. Importantly, activation of the NLRP3 inflammasome both in vitro and in vivo were strongly inhibited by adding GSH or GSSG extracellularly. These data suggest that GSH efflux triggers NLRP3 inflammasome activation, and hence constitute a potential therapeutic strategy for NLRP3 inflammasome-associated inflammatory disorders.

研究分野：細菌学、生化学

キーワード：NLRP3インフラマソーム グルタチオン 超硫黄分子 レドックス 自然炎症

1. 研究開始当初の背景

インフラマソームは、感染や組織損傷、環境異物への暴露などにより活性化されるタンパク質複合体であり、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の生成を通して、自然炎症応答に重要な役割を担っている。なかでも NLRP3 インフラマソームはもっとも研究が進んでおり、その活性化は多段階を経て進行することが分かっている (1)。すなわち、第 1 段階では、病原体成分 (例えばグラム陰性菌のリポ多糖 [LPS] など) が Toll 様受容体に結合し、NLRP3 インフラマソームの構成タンパク質 (NLRP3, ASC, procaspase-1 等) と、炎症性サイトカインである IL-1 β などの前駆体 (pro-IL-1 β) の発現が誘導される。続いて、組織損傷などにより放出された細胞成分 (ATP など) が、細胞膜受容体 (ATP の場合は P2X7 受容体) を活性化し、細胞内に様々なイベントが誘導され、NLRP3 インフラマソームの活性化型複合体が形成される。活性化型複合体は、pro-caspase-1 を caspase-1 へと活性化し、最終的に pro-IL-1 β が成熟型の IL-1 β へと変換され、細胞外へと分泌される。ATP 刺激後の細胞内イベントには、カリウムの細胞外放出、活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) 生成、リソソーム酵素の漏出などが報告されているものの、インフラマソーム複合体形成の詳細な活性化機構は未だ不明な点が多い。

グルタチオン (GSH) は、システインを含むペプチドで、細胞内にミリモラーレベルで存在する最も豊富な低分子チオール化合物である。システインのチオール基 (SH 基) の還元力・求核性のため、GSH は細胞内で ROS の消去をはじめとする重要な抗酸化作用を担っている。我々は ROS の制御を担う新規イオウ代謝物の探索を行う中で、GSH のチオール基にさらに過剰なイオウ原子が付加したグルタチオンパースルフィド (GSSH) が、もとの GSH の数%を占めて細胞内に存在することを世界に先駆けて発見した (2)。さらにこの GSSH は、その抗酸化力がもとの GSH よりも遥かに強力で、細胞内で極めて重要な抗酸化物質として機能していることを見出した (2-4)。NLRP3 インフラマソームの活性化に ROS が関わることを示唆されていたが、抗酸化ペプチドである GSH や GSSH がインフラマソームの活性化にどのように関わっているのかは、これまで全く検討されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、NLRP3 インフラマソームの活性化における細胞内グルタチオンの変動を解析した。その結果、ATP 刺激により GSH が細胞外に排出されることを見出した。そこで、さらにこの ATP 刺激による GSH 排出が NLRP3 インフラマソームの活性化にどのように関わっているのか、その機能連関を解析した。このような GSH 排出と NLRP3 インフラマソームの活性化が細胞レベルのみならず、個体レベルで起こっているかを動物モデルを用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞内および培養液中のグルタチオンおよび関連分子の定量解析

還元型 GSH のチオール基をアルキル化剤で安定化させ、細胞から抽出した。同じく培養上清に含まれる GSH についてもアルキル化剤処理して安定化させた後、解析に供した。タンデム質量分析法によりアルキル化した GSH 関連分子を定量解析した。

(2)炎症性サイトカインの ELISA 解析

過去の文献を参考にし、マウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞をまず LPS で処理し、その後、ATP で刺激することで NLRP3 インフラマソームを活性化した。それに伴って細胞外に産生される炎症性サイトカインを ELISA を用いて定量解析した。

(3)NLRP3 インフラマソーム複合体の形成解析

NLRP3 インフラマソームが活性化される際には、順次、タンパク質複合体が形成されている。それぞれの段階におけるタンパク質複合体を既報にしたがって解析した。

(4)動物実験

マウス腹腔内に LPS (0.2 mg/kg) を投与し、さらに 90 分後に同じく腹腔内に ATP (35 mM, 0.1

mL) を投与した。それから 60 分後に血液を採取し、産生されたサイトカインを ELISA にて定量解析した。

4. 研究成果

(1) NLRP3 インフラマソームの活性化に伴う細胞内 GSH 含量の変動

LPS で前処理した細胞に対して、様々な刺激を与えると NLRP3 インフラマソームが活性化され、細胞外に IL-1 β が産生される。このときの細胞内 GSH 含量を測定すると、ATP で刺激したときに著しい GSH 含量の低下が観察された (図 1)。そこで ATP 刺激後の細胞内 GSH を経時的に測定すると、ATP 刺激した 15 分後には大幅に GSH が減少していた (図 2)。また、このとき、培養上清中の GSH を測定した結果、細胞内の減少量と培養上清中の増加量がよく一致した (図 2)。このことから、ATP 刺激によって、細胞内の GSH が細胞外に排出されていることがわかった。

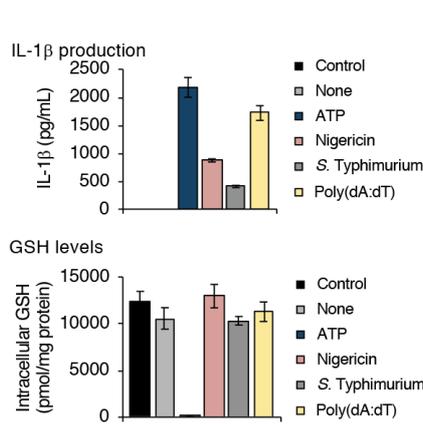


図1. マウスマクロファージにおけるNLRP3インフラマソームの活性化と細胞内グルタチオン含量の変動.

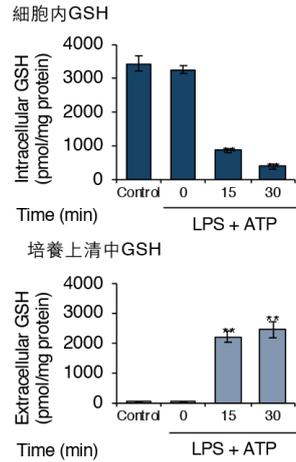


図2. NLRP3インフラマソームの活性化における細胞内グルタチオン含量と培養上清中グルタチオン量の変動.

(2) GSH 排出における P2X7 受容体の作用

ATP の受容体として P2X7 受容体が知られている。そこで、ATP 刺激による GSH 排出に P2X7 受容体が関わっているかを解析した。P2X7 受容体を発現していない HEK293 細胞に、P2X7 受容体を強制発現させると、ATP 刺激に応じて、細胞内から細胞外への GSH 排出が観察された (図 3)。このとき、機能欠損型の P2X7 受容体を発現させてもそのような減少は見られなかった。さらに、P2X7 受容体のアンタゴニスト (A-804598) を ATP 刺激時に加えると、濃度依存的に GSH 排出が阻害された (図 4)。以上の結果から、ATP 刺激は P2X7 受容体によって細胞内へ伝えられ、それによって GSH の細胞外への排出が起こっていることが示唆された。

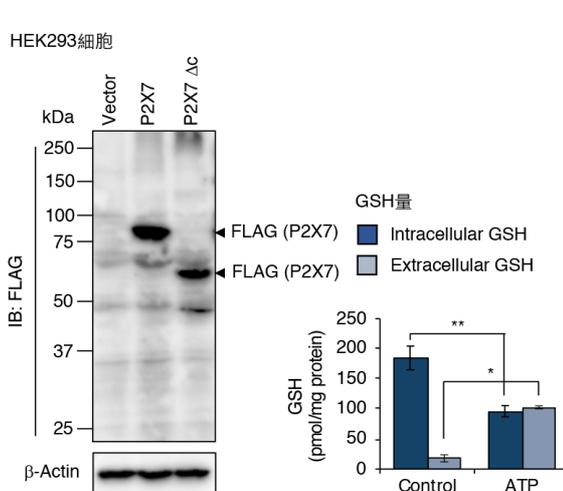


図3. P2X7受容体を発現させたHEK293細胞 (左図)とその細胞をATPで刺激したときのGSH量の変動.

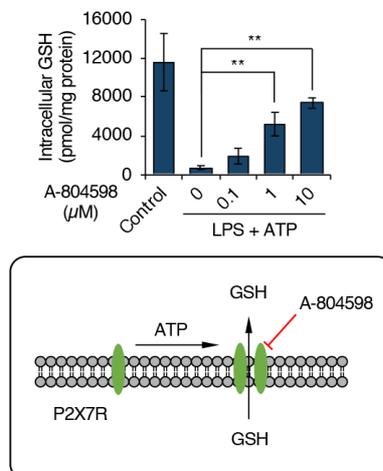


図4. マウスマクロファージをATPで刺激したときに起こるGSH減少とそれに対するP2X7受容体アンタゴニスト(A-804598)の影響. 下図はグルタチオン排出の模式図.

(3) 細胞外 GSH 添加による GSH 減少の抑制と NLRP3 インフラマソーム活性化の阻害
ATP 刺激時に細胞外液に GSH あるいはその酸化型である GSSG を添加しておく、細胞内の GSH 減少が顕著に抑制されることがわかった (図 5)。一方、これまで ATP 刺激によって細胞内のカリウムが細胞外に排出されること、およびそのカリウム排出が NLRP3 インフラマソームの活性化の引き金として重要であることが報告されていた。また、このとき細胞外液にカリウムを添加すると、NLRP3 インフラマソームの活性化が抑制されることも知られていた。そこで ATP 刺激時に細胞外液にカリウムを添加して解析したところ、GSH の細胞外への排出は変化がなかった。これらの結果から、GSH 排出はカリウム排出とは独立した経路で起こっていることが示された。

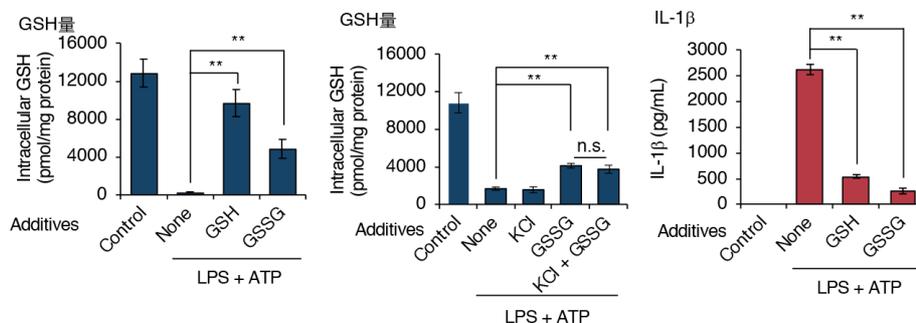


図5. GSH/GSSG(左)およびカリウム(中央)の細胞外液への添加によるマウスマクロファージからのGSH排出ならびにIL-1β産生(右)に対する効果.

(4) マウスモデルにおける GSH/GSSG の NLRP3 インフラマソーム抑制作用

マウス腹腔内に LPS と ATP を投与すると、血中の IL-1β 量が顕著に増加する (図 6)。このとき、GSH あるいは GSSG を ATP と同時に投与すると、IL-1β の増加が有意に抑制されることがわかった。このことから、個体内においても ATP 刺激によって GSH が細胞外へと排出され、それが NLRP3 インフラマソームの活性に関わること、さらにそれを GSH/GSSG 投与によって抑制できることが示された。

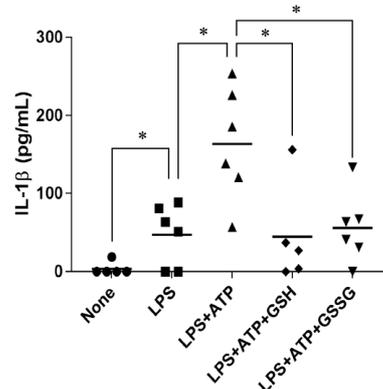


図6. LPS/ATP刺激によるマウスからのIL-1βの産生とGSH/GSSG投与による抑制作用.

まとめ

過剰なインフラマソームの活性化は痛風炎をはじめとする多くの炎症性疾患の進展に関わることが知られている。インフラマソームの活性化において、細胞内の GSH 排出を阻害するアプローチは新しい抗炎症戦略として期待される。本成果は、2021 年の Redox Biology 誌に発表した (5)。

<引用文献>

- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 140: 821-32, 2010.
- Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7606-11, 2014.
- Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Abdul Hamid H, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, Akaike T. Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-Dependent Redox Signaling in Neuronal Cells. *Chem Res Toxicol* 30: 1673-1684, 2017.
- Kunikata H, Ida T, Sato K, Aizawa N, Sawa T, Tawarayama H, Murayama N, Fujii S, Akaike T, Nakazawa T. Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci Rep* 7: 41984, 2017.
- Zhang T, Tsutsuki H, Islam W, Ono K, Takeda K, Akaike T, Sawa T. ATP exposure stimulates glutathione efflux as a necessary switch for NLRP3 inflammasome activation. *Redox Biol* 41: 101930, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang Tianli, Fang Jun, Tsutsuki Hiroyasu, Ono Katsuhiko, Islam Waliul, Sawa Tomohiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Synthesis of Pegylated Manganese Protoporphyrin as a Catalase Mimic and Its Therapeutic Application to Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Tianli, Ono Katsuhiko, Tsutsuki Hiroyasu, Ihara Hideshi, Islam Waliul, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 686 ~ 698.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harada Ayaka, Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Lee Ruda, Yahiro Kinnoy, Sawa Tomohiro, Niidome Takuro	4. 巻 68
2. 論文標題 Preparation of Biodegradable PLGA-Nanoparticles Used for pH-Sensitive Intracellular Delivery of an Anti-inflammatory Bacterial Toxin to Macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 363 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Tianli, Ono Katsuhiko, Tsutsuki Hiroyasu, Ihara Hideshi, Islam Waliul, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamid Hisyam Abdul, Tanaka Akira, Ida Tomoaki, Nishimura Akira, Matsunaga Tetsuro, Fujii Shigemoto, Morita Masanobu, Sawa Tomohiro, Fukuto Jon M., Nagy P?ter, Tsutsumi Ryouhei, Motohashi Hozumi, Ihara Hideshi, Akaike Takaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101096 ~ 101096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2019.101096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Khan Shahzada, Fujii Shigemoto, Matsunaga Tetsuro, Nishimura Akira, Ono Katsuhiko, Ida Tomoaki, Ahmed Khandaker Ahtesham, Okamoto Tatsuya, Tsutsuki Hiroyasu, Sawa Tomohiro, Akaike Takaaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Reactive Persulfides from Salmonella Typhimurium Downregulate Autophagy-Mediated Innate Immunity in Macrophages by Inhibiting Electrophilic Signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1413.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2018.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sawa Tomohiro, Ono Katsuhiko, Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Ida Tomoaki, Nishida Motohiro, Akaike Takaaki	4. 巻 72
2. 論文標題 Reactive Cysteine Persulphides: Occurrence, Biosynthesis, Antioxidant Activity, Methodologies, and Bacterial Persulphide Signalling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Microbial Physiology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ampbs.2018.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Shigemoto, Sawa Tomohiro, Motohashi Hozumi, Akaike Takaaki	4. 巻 176
2. 論文標題 Persulfide synthases that are functionally coupled with translation mediate sulfur respiration in mammalian cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 607 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.14356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Tianli, Tsutsuki Hiroyasu, Islam Waliul, Ono Katsuhiko, Takeda Kohsuke, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 41
2. 論文標題 ATP exposure stimulates glutathione efflux as a necessary switch for NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101930 ~ 101930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2021.101930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Zhang, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Ihara, H., Islam, W., Akaike, T., Sawa, T.
2. 発表標題 N-Acetyl-L-cysteine polysulfides act as potent polysulfide donors and mitigate lethal endotoxin shock via their anti-inflammatory effects.
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤 智裕
2. 発表標題 細菌のシステイン合成酵素阻害剤の探索とその抗菌作用
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤 智裕
2. 発表標題 活性イオウによるNLRP3インフラマソームのレドックス調節機構
3. 学会等名 第19回分子予防環境医学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤 智裕
2. 発表標題 システインパースルフィドを介した酸化ストレス防御機構の発見
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤 智裕，張 田力，津々木博康，小野勝彦
2. 発表標題 ・活性イオウによる自然免疫応答の制御機構
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	津々木 博康 (Tsutsuki Hiroyasu) (40586608)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	
研究分担者	小野 勝彦 (Ono Katsuhiko) (80573592)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------