

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670192

研究課題名(和文) 生体内不溶物質によるサイズ依存的なIL-1 産生経路の存在

研究課題名(英文) IL-1beta production depending on size of insoluble material generated in vivo

研究代表者

稲葉 カヨ (Inaba, Kayo)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00115792

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)：微細粒子/蛋白凝集体はマクロファージ(M $\phi$ )の炎症応答を惹起する。1000 nmと20 nm径のラテックスビーズ(LxB)は脳M $\phi$ 様細胞ミクログリア(MG)のIL-1 $\beta$ 産生を誘導したが、100 nm LxBはしなかった。また、アルツハイマー病原因物質であるアミロイド(A $\beta$ )凝集体の中で数ナノメートル径のA $\beta$ オリゴマーはMGのIL-1 $\beta$ 産生を誘導したが、繊維状A $\beta$ はしなかった。さらに、A $\beta$ オリゴマーによるMGのIL-1 $\beta$ 産生は活性酸素種(ROS)および蛋白分解酵素cathepsin B依存性であった。よって、微細粒子/凝集体のサイズ/形状はMGのIL-1 $\beta$ 産生に影響することが示された。

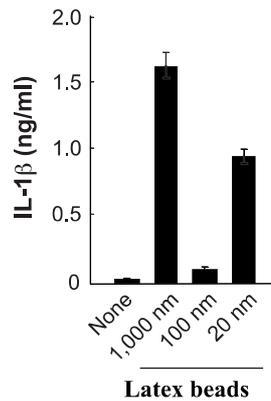
研究成果の概要(英文)：Small particles/aggregates are known to provoke inflammatory response of macrophages (M $\phi$ ). In this study, latex beads (LxB) of 1000 nm and 20 nm, but not 100 nm in diameter, were shown to induce IL-1 $\beta$  production of M $\phi$ -like microglia in the brain. Although aggregates of amyloid (A $\beta$ ) are believed as causative agent of Alzheimer disease, only nano-sized A $\beta$  oligomers, but not large A $\beta$  fibril, stimulated IL-1 $\beta$  production of MG. In addition, the induction of IL-1 $\beta$  by nano-sized A $\beta$  oligomers was dependent on reactive oxygen species (ROS) and protease cathepsin B. These results suggest that size/form of small particles/aggregates affects IL-1 $\beta$  production of MG.

研究分野：免疫生物学

キーワード：微細粒子 IL-1 アミロイド 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

食作用のあるマクロファージ (Mφ) / 樹状細胞 (DC) は微生物および病原菌だけでなく、非病原性の微細粒子等も捕捉し、サイトカインおよび活性酸素種 (ROS) 産生など炎症応答を誘導することが知られる。例えば、Mφ/DC は中皮腫誘導の要因となる石綿に対して、強力な炎症性サイトカイン IL-1β を産生することが明らかである (Destert et al, 2008, Science, 320, 674-677)。申請者等は平成 23~24 年度の科学研究費挑戦的萌芽研究において、リポ多糖存在下で、サイズ分画したシリカおよびラテックスビーズ (LxB) で骨髄由来 Mφ (BMDM) を刺激し、細胞の形態変化や IL-1β の産生等を検討した。その結果、粒子サイズに依り Mφ の IL-1β 産生誘導能が異なる事が示された (右図)。さらに、マイクロメーター径の粒子は mitochondria 由来の ROS を、ナノメーター系の粒子は食胞の不安定化とそれに続く cathepsin B の漏出を生じ、これらが NLRP3 インフラマソームを介して IL-1β に働くことを突き止めた (Adachi et al, 2013, Plos One, 8:e68499)。



一方で、生体内においても、アミロイドβ (Aβ) 等内因性の凝集体が生じ、これによる無菌炎症応答が Alzheimer 病の一因と考えられている (Knowles et al, 2011, Nature Nanotech, 6, 469-479)。これらの Aβ 凝集体は細胞の ROS 産生および食胞からの cathepsin B の細胞質への漏出を引き起こし、続いて NLRP3 を介した IL-1β の産生を惹起すると考えられている。また、この IL-1β が Alzheimer 病の病態に関与する事も報告されている (Di Giovine et al, 1987, J Immunol, 138, 3213-3218, Mark et al, 2001, Neurobiol Aging, 22, 903-908)。しかし、Aβ 凝集体は、生体内で異なった形状、即ち大きく分けて monomer、oligomer および fibril の 3 形態をとることが知られているが、これら Aβ の形態と特に脳初代培養ミクログリア (MG) の IL-1β 産生誘導における相関に関しては明確な報告はなかった。

## 2. 研究の目的

これまで、微細粒子/生体不溶性物質に対する細胞応答の研究では、多くの場合、被検サンプルとして様々なサイズ/形状の混合物が用いられてきた。しかし、先の我々の研究よ

り、粒子サイズが細胞の応答経路に影響することが明らかになり、その点を考慮する必要が生じた。一方で、前述の様に、異なった形状の Aβ 凝集体による脳内 Mφ 様細胞 MG に対する影響については明確では無い。そこで、本計画では、

1) MG に対してサイズの異なる LxB、ならびにサイズ/形状の異なる Aβ oligomer および fibril 間で IL-1β 産生誘導能に差があるかどうか。

2) 上記において、産生能が異なるとすると、いずれのサイズ/形状がどのような細胞内経路を介して IL-1β 産生に働いているのか。の 2 点を明らかにすることを目的とした。

これにより、MG の Aβ に対する応答性と IL-1β 産生の機序を明らかにし、Alzheimer 病発症の基礎的知見を得ると共に、治療の新たな端緒となることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) LxB による MG の刺激とサイトカイン産生:

MG は生後 5~6 日のマウス脳より調製した (Nakajima et al, 1992, Brain Research, 557, 285-292)。CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>low</sup> 細胞を MG とし、純度は 90% 以上であることを flow cytometry で確認し用いた。LxB は 1,000、100 および 20 nm 径のサイズ標準品を用いた。MG 細胞を LPS (100 ng/ml) 存在下で各サイズの LxB と培養し、24 時間後の上清中の IL-1β、TNF-α および IL-6 等を測定した。Cathepsin B の細胞質内漏出は当該蛍光基質および蛍光顕微鏡を用いて検討した。

(2) 阻害剤を用いた MG 細胞内応答経路の検討:

MG の IL-1β 産生における ROS ならびに cathepsin B の関与は ROS 阻害剤 NAC (N-acetylcysteine) (2.5 mM) と cathepsin B 阻害剤 CA-74-Me (5 μM) を用いて検討した。細胞をこれらの阻害剤で 1 時間前処理した後、刺激を加えた。

(3) Aβ oligomer と fibril の作製:

Aβ (1-42) ペプチドは hexafluoroisopropanol に溶解し減圧乾燥の後に -20 に保存した。次に、これを DMSO に溶解した後に、RPMI1640 培地または 100 mM の HCl に再懸濁し、それぞれ 4 で 24 時間静置して oligomer を、37 で 24 時間静置して fibril を作製した (Karie et al, 2002, J Biol Chem, 277, 32046-32053)。Aβ 凝集体の形状およびサイズ分布は原子間力顕微鏡 (AFM) ならびに PAGE 電気泳動で確認した。Aβ fibril の場合は、遠心による洗浄操作によって混入する oligomer を除いて使用した。

(4) Aβ oligomer および fibril による MG

の刺激とサイトカイン産生：

作製した A $\beta$  oligomer および fibril (monomer 換算で□□□□□) で MG および BMDM を刺激し、上記(1)(2)と同様に A $\beta$ の形状/サイズによって IL-1 $\beta$ 産生が異なるかを検討した。A $\beta$ の細胞への取り込みは免疫染色で確認した。

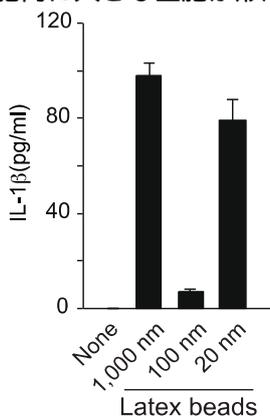
(5) A $\beta$  oligomer の架橋による IL-1 $\beta$ 産生誘導能の変化：

A $\beta$  oligomer を ethylene glycol bis(sulfosuccinimidylsuccinate)(sulfo-EGS)にて架橋し、サイズ/形状を AFM および PAGE 電気泳動で確認した後に、これを MG の刺激に用いて IL-1 $\beta$ 産生を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) サイズの異なる LxB による MG の IL-1 $\beta$ 産生：

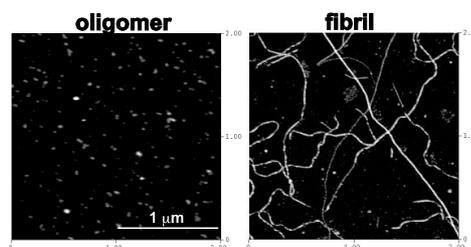
BMDM をリポ多糖と共に 1,000、100 および 20 nm 径の LxB で刺激すると 1,000 および 20 nm LxB のみが、それぞれ ROS および cathepsin B 依存的に IL-1 $\beta$ 産生する。そこで、同様に MG にも LxB サイズ依存性な IL-1 $\beta$ 産生経路が存在するかを検討した。始めに生後 5 日目のマウス脳より初代 MG を調製し、リポ多糖と LxB で刺激したところ、BMDM の場合と同様に 20 nm LxB でのみ細胞内に大きな空胞が形成された。また、1,000 および 20 nm LxB は IL-1 $\beta$ の産生を誘導したが、100 nm LxB はしなかった(右図)。次に、活性酸素 ROS 阻害剤 NAC および cathepsin B 阻害剤 CA-74-Me の IL-1 $\beta$ 産生に対する作用を検討した。その結果、1,000 および 20 nm LxB による IL-1 $\beta$ 産生は共に NAC (2.5 mM)の影響を受けなかった。一方で、20 nm LxB による IL-1 $\beta$ 産生は CA-74-Me により阻害されたが、1,000 nm LxB の場合は影響が認められなかった。また、蛍光基質を用いた実験では、食胞の不安定化に起因すると思われる cathepsin B の MG 細胞質への漏出が 20 nm LxB のみで認められた。他の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生は CA-74-Me の影響を受けなかった。よって、少なくとも MG は 20 nm LxB に対して ROS 非依存的かつ cathepsin B 依存的経路で IL-1 $\beta$ 産生を生じる事、すなわち MG に LxB のサイズに依存した細胞内応答経路が存在する事が明らかになった。これに対して、1000 nm LxB による IL-1 $\beta$ 産生においては、ROS や cathepsin B 以外の経路が関与していることも示唆され



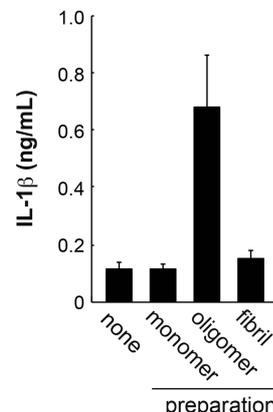
た。

(2) 形状の異なる A $\beta$ に対する MG の IL-1 $\beta$ 産生：

始めに A $\beta$ (1-42)ペプチドを RPMI 培地又は 100 mM HCl で希釈し、それぞれ oligomer および fibril 凝集体を作製した。これら凝集体の形状/サイズを電気泳動及び AFM (下図)で確認した。Fibril 凝集体には若干の oligomer の混在が認められたので、これを遠心洗浄することで除いた。A $\beta$  oligomer の平均高(z-height)は 0.4  $\pm$  0.2 nm、fibril の平均高ならびに長さは 4.1  $\pm$  0.5 nm ならびに 246-719 nm であった。



これらの凝集体をリポ多糖と共に MG に加え、IL-1 $\beta$ の産生を検討したところ、oligomer に強い産生誘導能が見られた(右図)。この際、oligomer および fibril 凝集体ともに MG に取り込まれることを免疫染色にて確認した。また、BMDM においても A $\beta$  oligomer が強い IL-1 $\beta$ 産生を誘導することが確認された。



次に、A $\beta$ を取り込んだ食胞の不安定化に起因する cathepsin B の細胞質への漏出を検討した結果、oligomer のみに当該現象が確認された。また、cathepsin B 阻害剤 CA-076-Me を加えたところ MG からの IL-1 $\beta$ 産生が低下した。さらに、ROS 阻害剤 NAC を用いたところ、IL-1 $\beta$ の産生が低下した。

以上の結果から、アルツハイマー病の原因物質である A $\beta$ 凝集体の中で oligomer が MG からの IL-1 $\beta$ 産生を cathepsin B および ROS 依存的に誘導する事が明らかとなった。

次に、IL-1 $\beta$ 産生能の強い A $\beta$  oligomer を sulfo-EGS で処理し架橋・重合させた。AFM で観察したところ、平均高さ 5.3  $\pm$  0.9 nm の球形状の重合体となっていることが確認された。これを用いて MG を刺激した結果、元の oligomer と比較して IL-1 $\beta$ 産生が大きく低下した。よって、A $\beta$ は oligomer 化により IL-1 $\beta$ 産生誘導を獲得し、fibril 化もしくは高分子化することでその特性を失うものと考えられる。

## 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 3 件)

Taneo, J., Adachi, T., Yoshida, A., Takeyasu, K., Takahara, K. and Inaba, K. (2015) Amyloid  $\beta$  oligomers induce interleukin-1 production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**:561-567 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.006. (査読有り)  
京 都 大 学 リ ポ ジ ト リ  
<http://hdl.handle.net/2433/196665>.

Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Murata, K., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. (2014) Functional Evaluation of Activation-dependent Alteration of Sialoglycans in T Cells. *J.Bio.Chem.* **289**:1564-1579. doi: 10.1074/jbc.M113.523753. (査読有り)

Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, FH., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., Ueha, S., Tsutsui, H., Inaba, K., Matsushima, K., Miyawaki, A., Kabashima, K., Watanabe, T. and Kanagawa, O. (2014) Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep06030. (査読有り)

### 【学会発表】(計 3 件)

Kazuhiko Takahara and Kayo Inaba. N-glycan of *C. albicans* mannoprotein effectively induces IL-10 production in the presence of LPS. 日本免疫学会 (12/12/2013) 千葉幕張.

Toshifumi Ishiguro, Tetsuya Fukawa, Kazuhiko Takahara, Yoichiro Iwakura, Kayo Inaba. Ameliorated acute liver injury in DCIR1-deficient mice. 日本免疫学会 (12/12/2013) 千葉幕張.

Takumi Adachi, Kazuhiko Takahara, Jun Taneo and Kayo Inaba. Amyloid  $\beta$  oligomers, but not fibrils, induced IL-1 $\beta$  production by mouse microglia. 日本免疫学会 (12/12/2013) 千葉幕張.

### 【その他】

ホームページ等

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/>

### (1) 研究代表者

稲葉 カヨ (INABA, Kayo)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号：00115792

### (2) 研究分担者

高原 和彦 (TAKAHARA, Kazuhiko)

京都大学・大学院生命科学研究科・講師  
研究者番号：90301233