

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09923

研究課題名(和文)インフラマソームの制御機構の解明と自己免疫疾患治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of control mechanism of inflammasome and application to treatment of autoimmune diseases

研究代表者

三苦 弘喜 (HIROKI, MITOMA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60467909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCD16陽性単球は活性型IL-1 β の分泌能が高かった。高疾患活動性の関節リウマチ(RA)ではLPS刺激後の末梢血単球からの活性型IL-1 β の分泌が健常人と比較して高く、RAではCD16陽性単球が増加していることがその要因と考えられた。IL-1 β 分泌抑制因子を検討した。コルヒチンは高濃度でLPS刺激単球からのIL-1 β 分泌を抑制した。ヒドロキシクロロキンもLPS刺激単球からのIL-1 β 分泌を抑制した。単球の細胞質成分の細胞外への放出はなく、細胞死もみられなかった。従って単球からの活性型IL-1 β 分泌はマクロファージのpyroptosisとは異なる経路を介していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの自己免疫疾患におけるインフラマソームの病態形成への役割は明らかとなっていない。今回我々は関節リウマチの単球において、インフラマソーム経路が活性化していることを明らかにした。また現在全身性エリテマトーデスの治療薬として使用されているヒドロキシクロロキン(HCQ)はインフラマソームの活性化を抑制することを見出した。インフラマソームの関与が想定される病態、疾患においてHCQが有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human CD16-positive monocytes had high ability to secrete active form of IL-1 β . Secretion of active IL-1 β from peripheral blood monocytes after LPS stimulation was higher in rheumatoid arthritis (RA) with high disease activity compared to healthy controls, because CD16 positive monocytes were increased in active RA. The suppressive reagents for IL-1 β secretion was examined. Colchicine inhibited IL-1 β secretion from LPS-stimulated monocytes at high concentrations. Hydroxychloroquine also suppressed IL-1 β secretion from LPS stimulated monocytes. There was no extracellular release of the cytoplasmic components of monocytes and no cell death was observed. Therefore, it was considered that the secretion of active IL-1 β from monocytes was mediated by a different pathway from pyroptosis in macrophages.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：自己免疫疾患 マクロファージ インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフラマソームの制御機構；2002年にインフラマソームの概念が提唱されて以降、複数の種類のインフラマソームが存在することが明らかとなり、それぞれにおいて様々なPAMPsやDAMPsがリガンドとなることが明らかとなった。最近ではリガンドがどのようにインフラマソームを活性化するのかということが精力的に研究されており、我々も2本鎖RNAの新規細胞質内受容体DHX33を同定し、微生物RNAによってNLRP3インフラマソームが活性化される機序を明らかにした(Mitoma et al. *Immunity* 2013)。さらにDHX33は2本鎖RNAの刺激依存性にTRIM分子によるK63-linked ubiquitinationを受け、NLRP3と会合するようになることを報告した(Weng L et al. *J Immunol* 2014)。Type 1 interferonやサイトカイン産生を誘導する細胞質内核酸受容体シグナルにおいては、そのシグナル伝達を制御・抑制するメカニズムが詳細に検討されている。細胞質内ウイルスRNA受容体であるRIG-Iはアダプター分子MAVSに結合してシグナルを伝達するが、RIG-Iを分解する分子(TRIM25, Riplet, REUL, RNF125, ISG15, HSP90), RIG-IとMAVSの結合を抑制する因子(Atg5-Atg12, gC1qR, NLRX1, EYA4), MAVSを分解する分子(PSMA7, PCBP2/AIP4, Smurf2)などシグナルの各段階で制御機構が存在することが明らかとなっている(Oshiumi H et al. *J Biochem* 2012)。内因性にインフラマソーム構成分子を発現していないHEK293T細胞にNLRP3, ASC, caspase-1蛋白を再構成すると無刺激でもインフラマソームが活性化されるため、マクロファージなどではその制御機構が存在していると考えられる。最近LRRFP2がNLRP3へ直接結合する(Jin J et al. *Nat Commun* 2013)、あるいはIKKがASCに直接結合する(Martin BN et al. *Nat Commun* 2014)ことにより、インフラマソームの活性化を抑制することが報告されたが、他にも明らかとなっていない抑制的な結合分子やユビキチン-プロテアソームによる分解機序が複数存在していると考えられる。

インフラマソームのIL-1, IL-18分泌以外の機能：caspase-1の活性化によりpyroptosisというprogrammed cell deathが誘導され、その際に細胞膜にpore形成がおこり細胞質成分が放出される。これに伴ってHMGB1などの炎症性物質(DAMPs)や活性化したインフラマソームの複合体が放出され、他の免疫細胞を活性化させることが報告されている(Lu B et al. *Nature* 2012)。我々も2本鎖RNAで刺激したマクロファージからRNA受容体Mda5が細胞外に放出されることを培養上清のWestern-blotting(WB)で見出した(unpublished data)。急速進行性の間質性肺炎を合併するclinically amyopathic dermatomyositis (CADM)患者ではこのMda5に対する自己抗体が陽性であることが明らかとなっており(Nakashima R et al. *Rheumatology(Oxford)* 2010)、我々は免疫活性化の悪循環としてマクロファージにおけるインフラマソームの活性化が関与した機序を想定している。LPS+ATPによるNLRP3インフラマソームの活性化に伴ってミトコンドリアから酸化ミトコンドリアDNAが細胞質へ放出されることが報告されており(Shimada K et al. *Immunity* 2012)、pyroptosisを起こした際に酸化したミトコンドリアDNAがDNA結合能を有するHMGB1等と共に細胞外へ放出され、TLR9を介してtype 1 interferonやサイトカインを産生誘導する可能性が考えられる。インフラマソームリガンドの慢性的な刺激によって肺や腎の線維化を起こすことが報告されているが、その機序については不明瞭である。

自己免疫性疾患におけるインフラマソームの役割：成人スティル病(AOSD)、若年性全身型特発性関節炎(SoJIA)、ベーチェット病(Behcet)および関節リウマチ(RA)などの自己免疫性疾患ではインフラマソームの活性化に伴って分泌されるIL-1とIL-18の上昇が明らかとなっており、従来の治療に抵抗性の症例で抗IL-1療法の有効例が報告されている。また間質性肺炎合併CADMでも血清IL-18濃度が疾患活動性と密接に相関しており、病態形成にインフラマソームの活性化が重要であることが示唆される。しかしながら、これらの疾患においてどの細胞でどういった機序でどのインフラマソームが活性化されているのかについては不明である。これまでのところインフラマソーム活性化の産物の一つであるIL-1を抑制する治療が試みられているが、抗IL-1療法に抵抗性の病態が存在することや、間質性肺炎合併CADMではIL-1よりもIL-18が疾患活動性と相関しており、IL-1を抑制するだけでは不十分と考えられる。インフラマソームの活性化そのものを抑制することができれば、より有効な治療法となる可能性がある。

2. 研究の目的

インフラマソームはPathogen associated molecular patterns (PAMPs)やDamage-associated molecular patterns (DAMPs)を認識し、IL-1, IL-18の分泌とpyroptosisを誘導する細胞質内タンパク複合体である。その活性化機序については明らかになってきているが、制御機構については未だ不明な部分が多い。またIL-1, IL-18の分泌以外の生理的意義についても十分な解析はなされていない。一部の自己免疫性疾患ではインフラマソームが病態形成に深く関与していると考えられているが、その機序は不明である。そこでインフラマソームの制御に関わる分子、インフラマソーム活性化細胞が他の細胞へ与える影響を解析し、さらに疾患でのインフラマソーム活性化の機序を明らかにすることにより、インフラマソーム制御による治療への応用を目的とする。

3. 研究の方法

インフラマソームの制御機構を解明するために、ヒトマクロファージを種々のインフラマソームリガンドで刺激をし、刺激の前後で内因性の免疫沈降を行う。共沈された蛋白を電気泳動

し、刺激前後で異なるバンドについて質量分析法でアミノ酸配列を決定する。得られた分子をヒトマクロファージで shRNA 法により knockdown を行い、機能解析する。さらに健常人と自己免疫性疾患患者 (AOSD, RA, Behcet) の末梢血単球を分離し、定常状態および刺激後のインフラマソームの活性化を調べる。さらにインフラマソーム構成因子ならびに同定した制御因子について健常人と患者間で発現量の比較検討を行う。間質性肺炎合併 CADM 患者については BAL 液中の細胞でインフラマソームの活性化の有無を検討し、また 2 本鎖 RNA ウイルスの存在を PCR 法で確認する。

4. 研究成果

ヒト末梢血単球の各分画を cell sorting して LPS で刺激をしたところ、CD14 陽性 CD16 陰性の classical monocytes と比較して、CD14 陽性 CD16 陽性の intermediate monocytes で活性型 IL-1 の分泌能が有意に高かった。定常状態で pro-IL-1 や NLRP3 の発現量が CD16 陽性単球で高く、活性型 caspase-1 も intermediate monocytes で高かった。以上より CD16 陽性単球では NF- κ B の活性化と恒常的な caspase-1 の活性化があり、それが活性型 IL-1 の分泌能が高い主たる要因と推察された。

高疾患活動性の関節リウマチ (RA) では LPS 刺激後の末梢血単球からの活性型 IL-1 の分泌が健常人と比較して高い傾向が認められた。活性型 caspase-1 は各単球分画間の比較で RA において有意な亢進はみられなかった。RA では CD16 陽性単球が増加している症例があり、このことが末梢血単球の IL-1 分泌亢進に寄与していると考えられた。

次に単球からの IL-1 分泌を抑制する製剤について検討を行った。コルヒチンは高濃度でのみ LPS 刺激した単球からの IL-1 分泌抑制効果を示した。ヒドロキシクロロキンも LPS で刺激した単球からの IL-1 分泌を有意に抑制した。LPS 刺激した健常人と RA 症例の末梢血単球の細胞質成分の細胞外への放出はほとんど認められず、また PI 陽性の細胞死もみられなかった。従って単球からの活性型 IL-1 分泌はマクロファージの pyroptosis とは異なる経路を介していると考えられ、コルヒチンやヒドロキシクロロキンは活性型 IL-1 の細胞外への輸送経路にも作用している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

猪口翔一郎, 三苫弘喜, 河野正太郎, 綾野雅宏, 木本泰孝, 赤星光輝, 有信洋二郎, 赤司浩一, 堀内孝彦, 新納宏昭. Activation of caspase-1 in CD16-positive monocyte and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2019.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。