

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15788

研究課題名(和文)炎症性疾患の早期診断システムの確立と応用

研究課題名(英文)Establishment of system for predicting inflammatory diseases

研究代表者

村上 智彦(Murakami, Tomohiko)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50510723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソーム阻害によりインフラマソームの活性化が強く抑制されることを見出した。この結果は、プロテアソームによって分解されるタンパク質がインフラマソームの活性化に關与していることを強く示唆していた。そこで細胞外に分泌あるいは放出されるタンパク質を質量分析にて探索したところ、多くのタンパク質がインフラマソームの活性化を引き金として分泌あるいは放出されていた。これらの因子はインフラマソーム活性化によって検出されることから、新規診断マーカーとして応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activation of inflammasome was strongly suppressed by proteasome inhibition. This result strongly suggested that proteins degraded by the proteasome are involved in inflammasome activation. Therefore, we analyzed proteins secreted from cells in response to inflammasome activation by mass spectrometry. Many proteins were detected by mass spectrometry, indicating that there is a possibility that these proteins are useful as novel markers for predicting diseases related to inflammasome.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：炎症 代謝物

## 1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は、歯周疾患、骨関節疾患、代謝性疾患などの発症に密接に関連している。近年、インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体が慢性炎症の発症に重要であることが判明した。インフラマソームは、センサータンパク質である NOD-like receptor、アダプタータンパク質である apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (ASC)、Caspase-1 から構成される。各センサータンパク質によりインフラマソームが構築されると Caspase-1 は活性化され、炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-1 $\beta$  や IL-18 を成熟させる。インフラマソームの活性化による IL-1 $\beta$  の分泌増大は、局所での炎症を進行させるだけでなく、脂肪細胞や肝細胞などのインスリン抵抗性を増大させ、肥満や糖尿病などの代謝性疾患の病態を悪化させる。また歯周疾患などの骨破壊性疾患では、IL-1 $\beta$  は破骨細胞を活性化させ、骨吸収を引き起こす。このように NLRP3 インフラマソームは細胞レベルだけではなく、組織ならびに個体レベルで大きな影響を及ぼす。

インフラマソームのセンサータンパク質の中でも NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) を中心とする NLRP3 インフラマソームは細菌の感染だけではなく様々な生体内外のストレスに曝されることで活性化することから特に注目されている。NLRP3 インフラマソームは、歯周病などの病原細菌の感染、過剰な脂質摂取など生体内外の様々な刺激により活性化するが、その活性化前後に発生する脂質や DNA などの代謝産物が病態悪化に関連する可能性が示唆されている。一方、遺伝子解析などに比べ、代謝物そのものの解析は未だに進んでおらず、慢性炎症性疾患の病態解明に向けた代謝物の解析はほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

インフラマソーム研究はこれまで遺伝子解析を中心に進められて、インフラマソームと慢性炎症性疾患が関連することが明らかにされてきた。一方、慢性炎症が関連する疾患には代謝産物を含めた動的恒常性の異常が伴うこともよく知られている。しかしながら、遺伝子解析だけではそれらの動的恒常性を捉えることが不可能であり、インフラマソームと動的恒常性との関係は解析が進んでいない。動的恒常性の変化を捉えるためには、動的恒常性が反映される代謝産物の変化を

捉えることが重要である。この代謝物の変化を捉えることができれば、動的恒常性の異常を感知し、疾患の前兆を知ることが可能となり、疾患に対する新たな早期診断法として応用することが期待される。実際、脂質や核酸などの一部の代謝産物がインフラマソームと関連する可能性が報告されているが、それらを含め、代謝物の詳細な解析はなされていない。したがって、従来の遺伝子解析で提唱されてきた概念にとらわれず、インフラマソームに関連する代謝産物を網羅的に探索・同定する技術を構築すれば、同定した代謝物を応用することで、慢性炎症性疾患の発症を早期診断できる可能性がある。そこで本研究では、NLRP3 インフラマソーム活性化前後に生じる代謝産物および関連因子を網羅的に探索・同定する技術を確認し、同定した代謝産物による早期診断法開発の基盤構築に挑戦することとした。

## 3. 研究の方法

NLRP3 インフラマソーム活性化に関する代謝産物あるいは関連因子を網羅的に探索・同定する技術を確認し、同定した因子を用いた疾患の早期診断法の開発基盤の構築を目指した。NLRP3 の活性化前後に関連する代謝物の同定を目指し、プロテオーム解析とマイクロアレイ解析を組み合わせる解析法を樹立し、NLRP3 の活性化に重要な代謝産物あるいは関連因子の網羅的解析を行った。

### (1) 細胞の分化誘導および培養法

強いインフラマソーム活性を示すマクロファージに着目し、解析に用いた。プロジェクト当初、マクロファージ細胞株を用いることも検討したが、安定した活性化を誘導できなかったことからマクロファージ初代培養を用いることとした。マクロファージ初代培養は、マウス骨髄から骨髄細胞を単離し、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を含む培地にて 6-7 日間分化誘導を行うことで入手した。

### (2) インフラマソームの活性化誘導と測定法

インフラマソームを誘導する刺激としては、炎症あるいはインフラマソーム構築のプライミングを行う刺激として Lipopolysaccharide (LPS)、インフラマソームを活性化させるトリガーの刺激として ATP、カリウムイオノフォアである Nigericin、尿酸塩 (MSU) などを用いた。またプロテオーム阻害薬等を用いた代謝産物の絞り込み

を行った。

インフラマソーム活性化の判定には、細胞培養上清中に分泌される IL-1b の量を高感度で定量測定できる ELISA 法を用いた。ELISA の測定と共に、IL-1b には前駆体タイプと成熟型タイプがあるので、成熟型が産生されていることをウエスタンブロット法にて確認を行った。また IL-1b の ELISA に加え、活性化型 Caspase-1 をウエスタンブロット法にて検出し、インフラマソームの活性化の指標とした。

### (3) NLRP3 インフラマソームに關与する代謝産物を探索・同定法

NLRP3 インフラマソームの活性化には少なくとも二つのシグナルが必須であることが示されている。シグナル1と呼ばれる LPS などによるプライミングと呼ばれるシグナルで、遺伝子発現等が誘導される。続いてシグナル2と呼ばれるトリガーとなるシグナルで、インフラマソームの活性化をダイレクトに引き起こす。シグナル2は、タンパク質合成を阻害しても NLRP3 インフラマソームは活性化される。したがって、シグナル1のように遺伝子の転写や翻訳ではなく、タンパク質、ペプチドなどの代謝物が NLRP3 の上流に作用している可能性がある。同時に、NLRP3 インフラマソームの下流で作られる何らかの生理活性を保持した代謝物の存在も考えられる。そこで、NLRP3 インフラマソームの活性化前後に変動する代謝産物の同定を目指し、初代マウスマクロファージから培養上清および NLRP3 インフラマソーム凝集体を回収・精製し、質量分析解析を行ってタンパク質あるいはペプチドの同定を目指した。また、外来タンパク質の混入等により、質量分析解析の感度や再現性が低い場合が多く見受けられる。この点を鑑みて、安定同位体アミノ酸標識によりタンパク質の変化を鋭敏に検出することが可能な SILAC 法を用いた質量分析解析を並行して実施した。質量分析解析は、大阪大学の共通機器である最新鋭の質量分析機器 LC-ESI-MS/MS を用いた。これに加え、シグナル1では遺伝子発現が誘導されることからマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析も行った。

## 4. 研究成果

歯周疾患、骨関節疾患、代謝性疾患などの発症に慢性的な炎症が密接に關与している。近年、炎症性サイトカインである IL-1b の産生に必須であるインフラマソームと呼ばれ

るタンパク質複合体が慢性炎症の発症に重要であることがわかってきた。インフラマソームは、歯周病などの病原細菌の感染、過剰な脂質など生体内外の様々な刺激により活性化するが、その活性化前後に産生される様々な代謝産物が病態悪化に關連する可能性が示唆されていた。インフラマソームの活性化前後に關連する代謝物を探索するために、まずは代謝物の経路や種類を絞り込む必要があった。そこで、代謝物が關連する様々な刺激や阻害薬を用いた実験を行ったところ、プロテアソーム阻害薬 MG132 によりインフラマソームの活性化が強く抑制されることを見出した。MG132 はプロテアソーム阻害に加え、カルパインを阻害することも知られていることから、他のプロテアソーム阻害薬である lactacystin あるいは epoxomicin を投与し、インフラマソームの活性を測定した。その結果、lactacystin と epoxomicin は共に MG132 と同様、インフラマソームの活性化を強く抑制したことから、代謝産物の中でもタンパク質あるいはペプチドに着目することとした。新規のタンパク質合成を阻害してもインフラマソームは活性化することから、この結果は、プロテアソームによって分解されるタンパク質あるいはペプチドがインフラマソームの活性化に關与していることを強く示唆していた。そこでタンパク質に着目し、実際に細胞外に分泌あるいは放出される代謝物を質量分析によるショットガン解析あるいは SILAC 法で探索したところ、多くのタンパク質がインフラマソームの活性化を引き金として分泌あるいは放出されていることが判明した。この中にはすでに報告がされているサイトカインなどの既知の因子も含まれていたが、通常は細胞内にある因子など、細胞外に出ることが報告されていない因子も多数含まれていた。同様の条件でマイクロアレイ解析を行い、プロテオーム解析とマイクロアレイ解析の結果を分析した。炎症性サイトカインなどのよく知られた既知の因子は除外して、未報告あるいは報告の少ない因子に着目し、分子細胞生物学的手法でそれら因子の動向を確認した。複数の因子を確認したところ、マクロファージ細胞上清で実際に検出できる因子が存在した。これらの因子はインフラマソーム活性化によって検出されることから、代謝性疾患の新規診断マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

## 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4件)

Riko Nishimura, Kenji Hata, Eriko Nakamura, Tomohiko Murakami, Yoshifumi Takahata. Transcriptional network systems in cartilage development and disease. Histochemistry and Cell Biology. 2018;149(4):353-363. 査読有  
doi: 10.1007/s00418-017-1628-7

Nishimura R, Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nakamura E, Yagi H. Regulation of Cartilage Development and Diseases by Transcription Factors. J Bone Metab. 2017;24(3):147-153. 査読有  
doi: 10.11005/jbm.2017.24.3.147

Kenji Hata, Yoshifumi Takahata, Tomohiko Murakami and Riko Nishimura. Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification. J Bone Metab. 2017;24(2):75-82. 査読有  
doi: 10.11005/jbm.2017.24.2.75

村上智彦(2016)慢性炎症を基盤にした歯周疾患の病態の理解と治療戦略 CLINICAL CALCIUM Vol.26 No.5 P114(766)-120(772) 査読無  
doi: CliCa1605766772

〔学会発表〕(計2件)

Murakami T, Novel aspect of inflammatory molecule in articular cartilage destruction  
Bone Biology Forum, Chiba, Japan (2017/8/19)

村上智彦、高畑佳史、波多賢二、西村理行  
骨吸収を誘導する炎症性サイトカイン IL-1bの産生に関わるインフラマソームの制御機構解析 第2回日本骨免疫学会 沖縄 (2016/7/6)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission\\_000294.html](http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 智彦 (Tomohiko Murakami)

大阪大学・歯学研究科・講師  
研究者番号: 50510723

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

西村 理行 (Riko Nishimura)  
大阪大学・歯学研究科・教授  
研究者番号: 60294112

波多 賢二 (Kenji Hata)

大阪大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号: 80444496

(4)研究協力者

該当なし