

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K19877

研究課題名（和文）炎症誘導性の細胞死に着目した、慢性炎症性疾患の病態の解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of chronic inflammatory diseases and development of therapies focusing on inflammatory cell death

研究代表者

浅野 真未（Asano, Mami）

北海道大学・保健科学研究院・客員研究員

研究者番号：00779390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、炎症誘導性細胞死の存在に注目が集まっており、これらが周囲の細胞に様々なシグナルを発信して、炎症、免疫応答、線維化、修復、再生といった細胞死後の生体応答をコントロールしている可能性が明らかになってきている。これらは単球やマクロファージ細胞のような免疫細胞でこれまでに報告されているが、実質細胞では報告は少ない。我々は、マウスの肝実質細胞株に各種脂肪酸を投与し、炎症性サイトカインを生成・分泌するかどうかを検討し、パルミチン酸を投与することで炎症性サイトカインを生成・分泌し、その後の細胞死を誘導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

この結果は、パルミチン酸が肝傷害を誘導するだけでなく、炎症性サイトカインを積極的に分泌することで肝炎を惹起する可能性、さらには脂肪肝から非アルコール性脂肪肝の病態形成・進展へ関与する可能性を示唆している。今後、ステアリン酸などの飽和脂肪酸についても同様の検討を行い、特定の脂肪酸による肝炎発症・促進効果に関して検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：Recent investigations suggest inflammatory cell death release various signals to surrounding cells, and may control biological responses after cell death such as inflammation, immune response, fibrosis, repair, and regeneration. The inflammation cell death have been reported previously in immune cells, such as monocytes and macrophage cells, but rarely in parenchymal cells. We investigated whether various fatty acids were administered to mouse hepatocyte cell lines to produce and secrete inflammatory cytokines, and found that palmitic acid administration induced the production and secretion of inflammatory cytokines and subsequent cell death.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞死 炎症 脂肪酸 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、アポトーシス以外の細胞死の存在に注目が集まっており、これらが周囲の細胞に様々なシグナルを発信して、炎症、免疫応答、線維化、修復、再生といった細胞死後の生体応答をコントロールしている可能性が明らかになってきている。パイロトーシスはカスパーゼ1依存性であり、ネクローシス様に細胞が破裂する細胞死である。細胞死直後にインターロイキン1 やインターロイキン18 といった炎症性サイトカインを放出するため、炎症誘導性の細胞死といわれている。パイロトーシスはマクロファージ細胞などの免疫細胞で報告はされているが、実質細胞ではほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究は、周囲組織に炎症を惹起する壊死性細胞死として、主としてパイロトーシスに着目し、これが炎症の持続と促進に関与していると考え、研究をおこなう。また、他のタイプの「制御された細胞死」との関連性についても検討する。炎症性疾患の原因として細胞死が重要であることが確認できれば、この発生自体を阻害することで、現在の治療法より根本的な炎症発生の予防と治療が可能と考える。

3. 研究の方法

まずはパイロトーシスの生体内での動的解析を目的として、光プローブの作製を行った。パイロトーシスはプロテアーゼであるカスパーゼ1により切断され、活性化されたガスダーミンDが、細胞膜を破壊することで細胞死を実行すると言われている。そこで、カスパーゼ1の活性化を検出するために、不活性化した環状ルシフェラーゼが活性化フォームにもどり活性化する仕組みを利用して、生体内でのカスパーゼ1の活性化を動的かつ経時的に解析できる検出系の確立を目指した。

加えて、肝実質細胞を用いて CRISPR 法や各種脂肪酸投与によりカスパーゼ1の活性化を目指し、細胞死および炎症性サイトカインの放出を確認した。さらに、カスパーゼ1の活性化により誘引される生体内での分子生物学的変化をウェスタンブロット法やPCR法などを用いて解析した。

4. 研究成果

光プローブについては作成して肝実質細胞に導入したものの、カスパーゼ1の活性化を促すのが困難で、検出系の確立までには至らなかった。

そこで肝実質細胞を用いて、CRISPR法や脂肪酸投与によるカスパーゼ1の活性化を目指したところ、脂肪酸の一種であるパルミチン酸を投与するとインターロイキン1、インターロイキン6、TNF- α 、HMGB-1といった炎症性サイトカイン放出を誘導し、その後細胞死することが確認された(図1、2、3、4、5)。

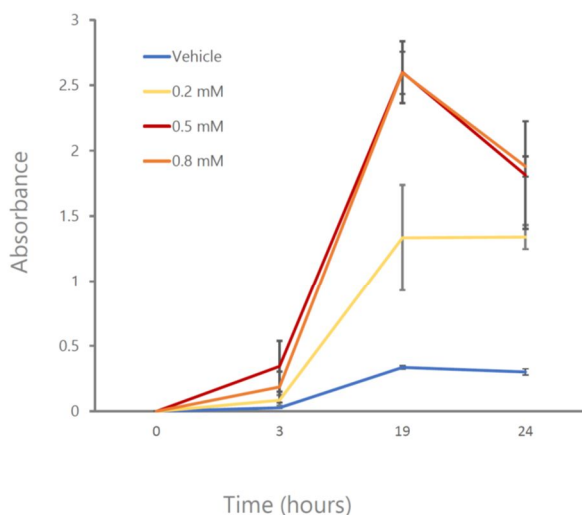


図1. LDH release (absorbance) in AML12 treated with 0.2, 0.5, 0.8 mM palmitate

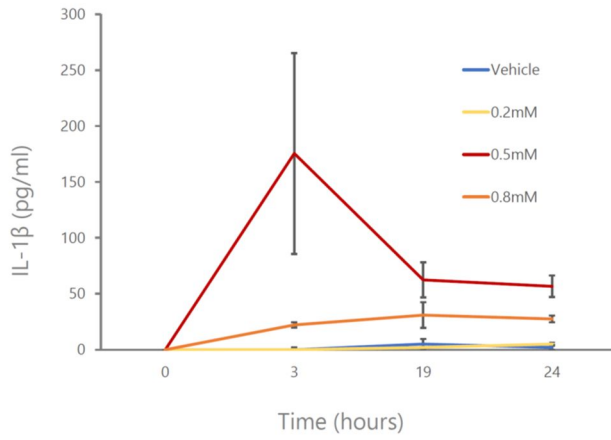


Figure 2. IL-1β release (pg/ml) in AML12 treated with 0.2, 0.5, 0.8 mM palmitate

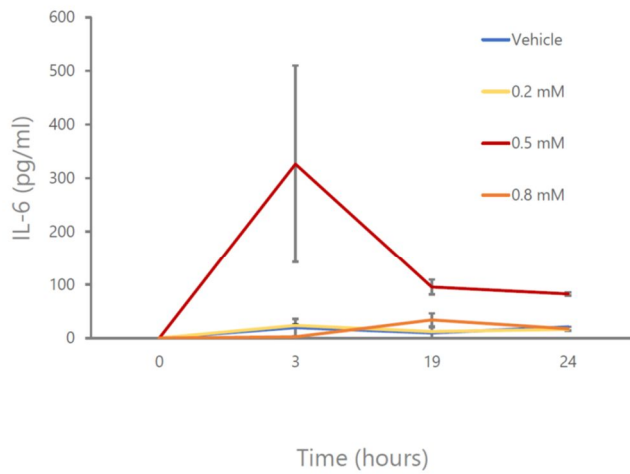


Figure 3. IL-6 release (pg/ml) in AML12 treated with 0.2, 0.5, 0.8 mM palmitate

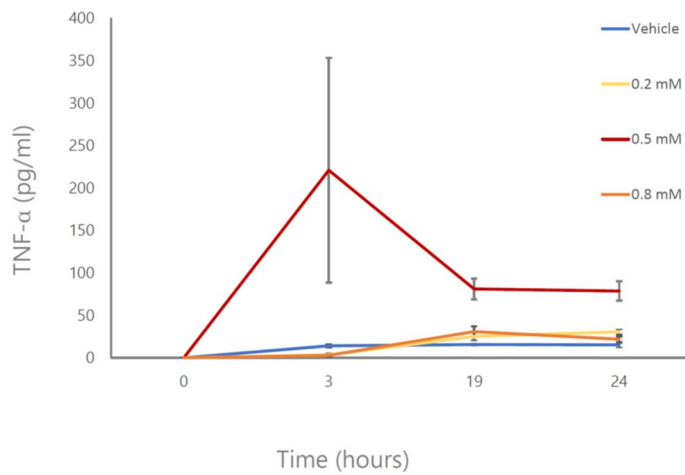


Figure 4. TNF-α release (pg/ml) in AML12 treated with 0.2, 0.5, 0.8 mM palmitate

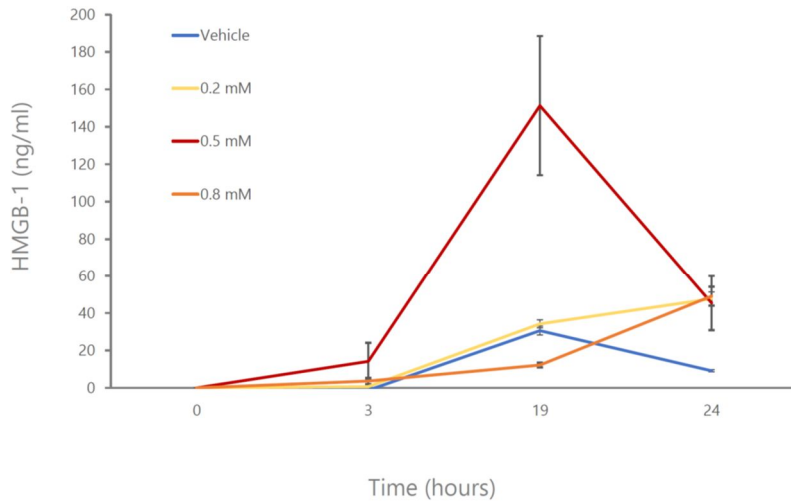


図 5. HMGB-1 release (ng/ml) in AML12 treated with 0.2, 0.5, 0.8 mM palmitate

これらの炎症性サイトカインの細胞外への放出のタイミングは、インターロイキン1、インターロイキン6、TNF- α については細胞死がおきる前のタイミングで細胞外に放出されており、HMGB-1 については細胞死がおきたタイミングと同時に細胞外に放出されていた。加えて、パルミチン酸投与後の細胞内のメッセンジャーRNA 発現量を経時的に確認したところ、インターロイキン1 の前駆体と HMGB-1 のメッセンジャーRNA 発現上昇がパルミチン酸投与後比較的早期にみられた (図 6, 7)。

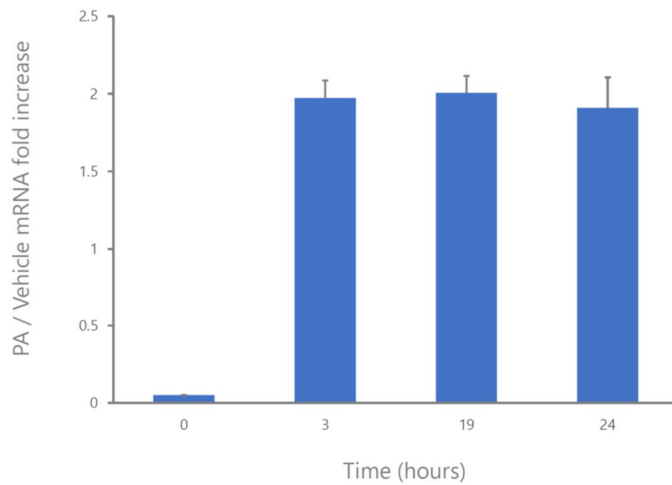


図 6. The mRNA expression levels of proIL-1 β in AML12 treated with 0.5 mM palmitate (PA)

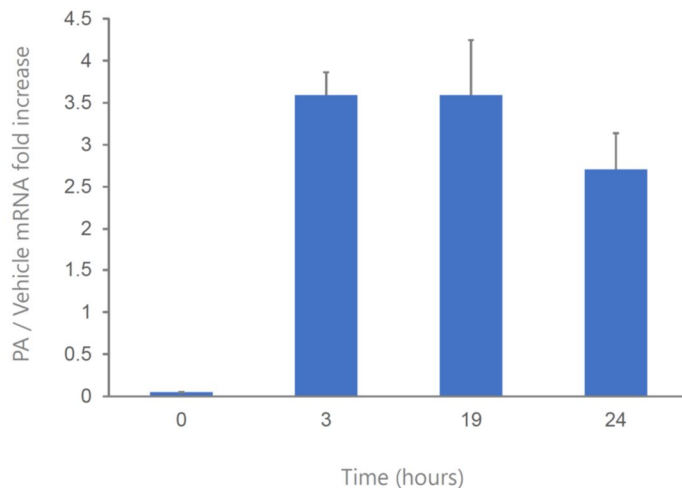


図 7. The mRNA expression levels of HMGB-1 in AML12 treated with 0.5 mM palmitate (PA)

インターロイキン6、TNF- α の発現については確認できていないが、おそらくこれらも比較的早期に発現していると考えられた。
このパルミチン酸投与により誘導された細胞死がパイロトーシスであるかどうか、およびカス

パーゼ1依存性であるかどうかをガスダーミンDおよび活性型ガスダーミンD、カスパーゼ1のウェスタンブロット法による検出により確認したが、ガスダーミンDおよび活性型ガスダーミンD、カスパーゼ1は検出されなかった。よって、パルミチン酸投与により誘導される細胞死はパイロトーシスではない他の機序が関与している可能性が示唆された。しかし、本研究によりパルミチン酸が肝傷害を誘導するだけでなく、炎症性サイトカインを積極的に分泌することで肝炎を惹起する可能性、さらには脂肪肝から非アルコール性脂肪肝の病態形成・進展へ関与する可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mami Asano, Sanae Haga, Shiina Itashiki, Sae Kamada, Aya Mikami, Michitaka Ozaki
2. 発表標題 Palmitate induces release of pro-inflammatory cytokines prior to cell death in mouse AML12 hepatocytes
3. 学会等名 Liver, Biology, Diseases&Cancer 2019 Cold Spring Harbor Asia Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mami Asano, Sanae Haga, Naoki Morita, Michitaka Ozaki
2. 発表標題 Palmitate induces release of pro-inflammatory cytokines prior to cell death in mouse AML12 hepatocytes
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021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	小澤 岳昌 (Ozawa Takeaki) (40302806)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授 (12601)	
研究分担者	尾崎 倫孝 (Ozaki Michitaka) (80256510)	北海道大学・保健科学研究所・教授 (10101)	

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
---------	---------