

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16457

研究課題名（和文）腸管虚血再灌流障害におけるカスパーゼ11およびPyroptosisの役割の解明

研究課題名（英文）Role of caspase-11 and pyroptosis in intestinal ischemia-reperfusion injury

研究代表者

伊藤 誉 (Ito, Homare)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60625573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：腸管虚血再灌流（I/R）障害は、腸管自体の障害のみならず、全身性の炎症や多臓器不全を惹起する重篤な疾患であるが、その分子機構は未だ不明な点が多い。本研究では、腸管I/R障害におけるCasp11およびPyroptosisの実行因子であるGSDMD/GSDMEの役割を解明することを目的に研究を行い、Casp11変異マウスでは腸管I/R後の生存率が著明に延長することや腸管においてGSDMD/GSDMEが強く発現することを明らかにした。特に、小腸においてGSDMDの活性化が検出され、定常状態においても腸管ではGSDMDの活性化が起こっていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腸管I/R障害においてCasp11およびGSDMD/GSDMEを介したPyroptosisが重要な役割を果たしていることが示された。今後の研究の発展により、腸管I/R障害の新たな分子機序の解明や新規治療法の手がかりが得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury causes intestinal injury and leads to inflammation and remote organ injury; however, the mechanism of intestinal I/R injury remains unclear. Here, we investigated the role of caspase-11 (Casp11) and gasdermin D (GSDMD)-mediated pyroptosis in intestinal I/R injury. Missense mutation of Casp11 markedly prolonged survival after intestinal I/R injury. Western blot analysis showed that GSDMD was expressed in various organs. Notably, the expression of GSDMD-NT (N-terminal fragment) was detected in the small intestine, indicating the activation of intestinal GSDMD. The expression of GSDME was also detected in the small intestine. These findings suggest the role of Casp11, GSDMD, and GSDME in the pathophysiology of intestinal I/R injury.

研究分野：消化器外科学

キーワード：インフラマソーム 炎症 サイトカイン 細胞死 消化器疾患

1. 研究開始当初の背景

腸管虚血再灌流 (ischemia-reperfusion : I/R) 障害は、急性腸間膜虚血症や腸管捻転、外傷、出血性ショック、絞扼性イレウス、小腸移植など様々な原因によって引き起こされる。この病態には、活性酸素種や好中球浸潤、炎症による組織障害が主要な役割を果たしていると考えられるが、その分子機序は不明であり、有効な治療法も確立されていない。特に、腸管 I/R 障害の研究が敬遠される原因として、腸管は血流が豊富であり再現性のあるモデル作製が困難であることがあげられる。申請者は、この問題点を独自の手法で克服し、再現性・信頼性の高い新規腸管 I/R 障害モデルを確立し (図 1)、腸管 I/R に続発する肺障害において肺血管内皮細胞の NLRP3 インフラマソーム (NLRP3 inflammasome) と呼ばれる細胞内分子複合体が重要な役割を果たすことを明らかにした[1]。

NLRP3 インフラマソームは、様々な病態における無菌性炎症の新規惹起経路の一つであり、センサー分子 NLRP3 とアダプター分子 ASC、エフェクター分子 Caspase-1 (Casp1) から構成され、Casp1 の活性化を介して強力な炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) の前駆体 (非活性型) から活性型へのプロセッシングを引き起こす [3]。近年、この Casp1 が Gasdermin D (GSDMD) をプロセッシングし、GSDMD の N 末端断片 (GSDMD-NT) が細胞膜で重合して膜の孔形成を引き起こすことで、炎症性細胞死である Pyroptosis を誘導することも明らかになった。一方、Casp11 は Casp1 と類似した酵素活性を示す炎症性カスパーゼであるが、その役割は明らかになっていなかった。しかし最近、Casp11 が細胞内 LPS (lipopolysaccharide) を認識するセンサー分子として機能し、GSDMD を介した Pyroptosis を誘導すること、これによってさらに NLRP3 インフラマソームの活性化を引き起こすという、いわゆる非標準型インフラマソーム (non-canonical inflammasome) が存在することが報告されている。一方で最近、インフラマソーム下流で Pyroptosis を引き起こす実行分子として GSDME も寄与していることが報告された[4]。しかし、現在のところ、腸管 I/R における Casp11 および GSDMD/GSDME を介した Pyroptosis の役割はわかっていない。

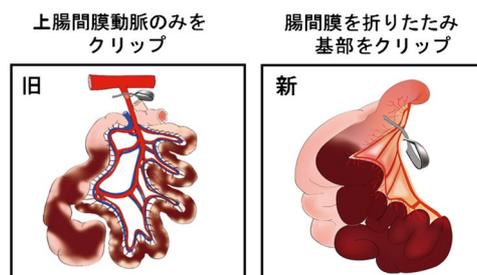


図1. 腸間膜基部を折りたたみ基部をクリップすることで再現性、信頼性の高い腸管I/Rモデルを確立した

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が独自に確立した信頼性・再現性の高い新規マウス腸管 IR 障害モデルを用いて、腸管 IR における Casp11 および GSDMD/GSDME を介した Pyroptosis の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウス腸管 I/R モデルの作成

野生型 C57BL/6J マウス (wild-type: WT; ♂、8-12 週齢) および Casp11^{mt/mt} マウス (C57BL/6J 背景) を使用した。マウス腸管 I/R 障害モデルは、腸管膜を折り畳み、その基部をクリップする

ことにより作成した [1]。全ての動物実験は、自治医科大学動物実験倫理委員会に許可されたプロトコールで実施し、動物愛護の精神のもとで行った。

(2) GSDMD 欠損および GSDME 欠損マウス

GSDMD 欠損マウスは、Dr. K. Schroder (University of Queensland, Australia) を介して Genentech より供与を受けた[2]。また、GSDME 欠損マウスは、C57BL/6J マウス受精卵に GSDME 遺伝子を標的とした gRNA (exon 3 を標的) および組換え Cas9 タンパク質を投与することにより作製し、遺伝子の欠損が確認された個体について、C57BL/6J マウスと交配することにより欠損系統を樹立した。

(3) GEDMD および GSDME の発現

GEDMD および GSDME タンパクの発現は、Western blot 法により解析した。1 次抗体は、抗 GSDMD 抗体 (Abcam : EPR19828 ; ab209845) および抗 DFNA5/GSDME 抗体 (Abcam : EPR19859 ; ab215191) を使用した。また、β アクチン (抗 β-actin 抗体 : SIGMA : A5441) あるいは GAPDH (抗 GAPDH 抗体 : Santa Cruz : sc-3223) の発現を内因性コントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) Casp11^{mt/mt} マウスの作成と腸管 I/R での役割

Casp11 研究が遅れていた要因の一つに、以前から国内外で使用されていた Casp1 欠損マウスには、Casp11 にミスセンス変異があるため、Casp1/11 欠損となっていたことがあげられる。これは、遺伝子欠損マウスの作成に用いられてきた 129 系統に Casp11 ミスセンス変異があり、変異遺伝子がゲノム上で隣接する Casp1 と連鎖して遺伝するためである。我々は、Casp1-flox マウスを 129 系統から作成したが、このマウスも Casp11 ミスセンス変異を保有していることが明らかになった (Casp11^{mt/mt} マウス) (図 2A)。WT および Casp11^{mt/mt} マウスから腹腔マクロファージを単離して、Casp11 発現の確認を行った。WT マクロファージでは、Pam3CSK (TLR2 リガンド) 刺激により Casp11 発現が誘導されたが、Casp11^{mt/mt} マクロファージでは Casp11 発現が認められなかった (図 2B)。これに腸管 I/R モデルを作成したところ、Casp11^{mt/mt} マウスでは WT マウスと比較して腸管 I/R 後の生存率が著明に延長することが明らかになった (図 3)。

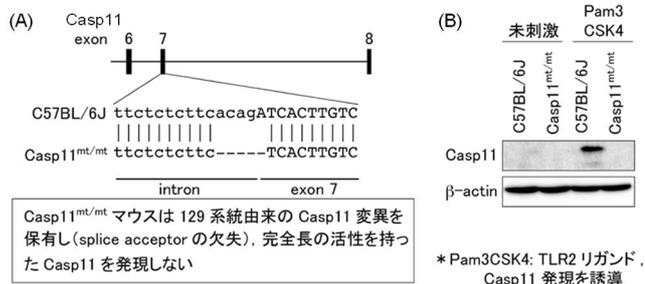


図2. (A) Casp11^{mt/mt} マウスにおける Casp11 遺伝子のシーケンス解析 (B) WT および Casp11^{mt/mt} マウスから単離した腹腔マクロファージにおける Casp11 の発現

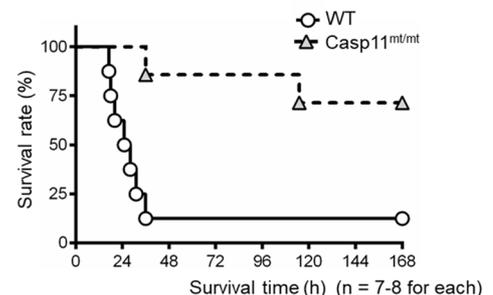


図3. WT マウスに比べて Casp11^{mt/mt} マウスでは腸管 I/R 後の生存期間が延長した

(2) 腸管における GSDMD の発現

Gasdermin の名称は、“gastro (消化管)”と“dermato (皮膚)”に主に発現していることに由来しており、GSDMD が腸管において重要な役割を担っていることが示唆されている。そこで、WT マウスの腸管を含む様々な臓器における GSDMD の発現を Western blot 法で解析した。肺や肝臓、脾臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、大腸、骨髄由来マクロファージといった様々な臓器や細胞において GSDMD (全長 53-kD) の発現が認められた (図 4)。興味深いことに、十二指腸、空腸および回腸では GSDMD の N 末端断片 (GSDMD-NT) も検出され、定常状態においても腸管では GSDMD の活性化が起こっていることが明らかになった。

(3) GSDME 欠損マウスの作成と GSDME の発現

GSDMD のファミリー分子である

GSDME は、ある種の抗がん剤によって活性化される Casp3 によってプロセシングされて Pyroptosis を惹起することが報告されている。最近、申請者らは、GSDME が Casp1 の阻害下で生じる Pyroptosis の実行因子であることを見出し、このシグナルが ASC/Casp8/Casp3 を介して誘導されてくることを報告した[4]。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いて GSDME 欠損マウスを作成した。WT マウスでは、空腸と回腸で GSDME の強い発現を認め、GSDME 欠損マウスではその発現が消失していた (図 5)。このことから、GSDMD と比較して GSDME は小腸に比較的限局して発現しており、腸管における GSDME 特異的な機能が示唆された。現在、Casp11^{mt/mt} マウスにおける腸管 I/R 障害抑制機構の解析や、腸管 I/R 障害における GSDMD/GSDME の役割を継続して行っており、本研究の成果が腸管 I/R 障害の分子機序の解明につながることを期待される。

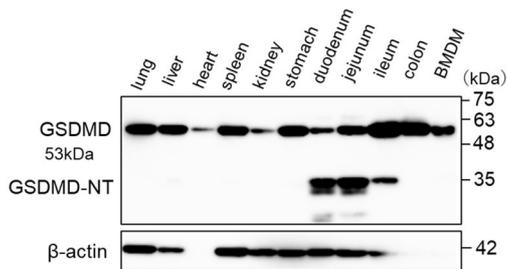


図4. WTマウスの臓器・組織におけるGSDMDの発現 (NT: N末端断片; BMDM: 骨髄由来マクロファージ)

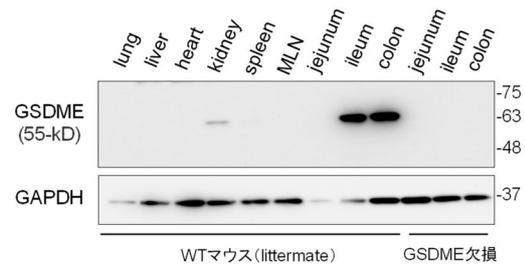


図5. WTおよびGSDME欠損マウスにおけるGSDMEの発現

< 引用文献 >

1. Ito H, Kimura H, Karasawa T, Hisata S, Sadatomo A, Inoue Y, Yamada N, Aizawa E, Hishida E, Kamata R, Komada T, Watanabe S, Kasahara T, Suzuki T, Horie H, Kitagawa J, Sata N, Takahashi M. NLRP3 Inflammasome activation in lung vascular endothelial cells contributes to intestinal ischemia/reperfusion- induced acute lung injury. *J Immunol* 205: 1393-1405, 2020
2. N. Kayagaki, I.B. Stowe, B.L. Lee, K. O'Rourke, K. Anderson, S. Warming, T. Cuellar, B. Haley, M. Roose-Girma, Q.T. Phung, P.S. Liu, J.R. Lill, H. Li, J. Wu, S. Kummerfeld, J. Zhang, W.P. Lee, S.J. Snipas, G.S. Salvesen, L.X. Morris, L. Fitzgerald, Y. Zhang, E.M. Bertram, C.C. Goodnow, V.M. Dixit, Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling, *Nature* 526(7575) (2015)

666-71.

3. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res* 118: 372-385, 2022
4. Aizawa E, Karasawa T, Watanabe S, Komada T, Kimura H, Kamata R, Ito H, Hishida E, Yamada N, Kasahara T, Mori Y, Takahashi M. GSDME-dependent incomplete pyroptosis permits selective IL-1 α release under caspase-1 inhibition. *iScience* 23:5, 101070, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|