

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890171

研究課題名（和文）メタボリック症候群を中心とした生活習慣病におけるインフラマソームの役割の解明

研究課題名（英文）Role of NLRP3 inflammasomes in the metabolic syndrome.

研究代表者

臼井 文武 (USUI FUMITAKE)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：50585560

研究成果の概要（和文）：

脂質異常や肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病の病態基盤における慢性炎症反応の関与が注目されている。本研究では無菌性の炎症反応に関与するインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体に着目し生活習慣病におけるインフラマソームの役割の解明を試みた。その結果動脈硬化および腹部大動脈瘤のモデルマウスにおいて病態の進展にインフラマソームが関与していることが示唆された。今後より詳細なメカニズムを解析することによりインフラマソームが治療標的となり得ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

In recent years, much attention has been paid to findings that involvement of chronic inflammation in the lifestyle-related diseases, such as hyperlipidemia, obesity, diabetes, and hypertension. In this study, we attempted to elucidate the role of inflammasome which is known to be involved in sterile inflammation in the lifestyle-related diseases. Inflammasome contributes to the development of atherosclerosis and angiotensin II-induced aortic aneurysm. Inflammasome is expected to become a therapeutic target for lifestyle-related diseases to clarify the mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,180,000	654,000	2,834,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：循環器、メタボリック症候群、炎症、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は世界でも例をみない高齢化社会を迎え、さらには、欧米的(高脂肪)な食事や運動不足などの生活様式の変化により、脂質

異常や肥満、糖尿病、高血圧といった病態は増加の一途を辿っている。これらの病態はいずれも心血管疾患と結びつきが強く、心血管疾患の死亡率はがんに迫るほどになっている。

また、これらの病態が重複することでメタボリック症候群となり、心血管疾患の発症危険度も大きく増加することが知られていることから、メタボリック症候群を中心とした生活習慣病の病態機序の解明とその予防・治療法の開発は緊急の課題である。

細菌感染では白血球の集簇が生じて炎症反応が惹起されるが、近年、感染がその病態にほとんど関わっていない生活習慣病においても、炎症反応が重要な役割を果たしていることが指摘されている。しかしながら、この炎症反応がどのように惹起されるかは全く分かっていない。この様な経緯の中で、最近、免疫学の分野においてインフラマソームと呼ばれるシグナル分子複合体が細胞の炎症反応の最も初期の段階で重要な役割を果たしていることが発見され (Cell;117:561-574, 2004, Cell;126:659-662, 2006, N Engl J Med;355:730-732, 2006)、さらに、痛風やアスベスト肺といった無菌性の炎症反応がこの経路によって引き起こされていることが報告された (Nature;440:237-241, 2006, Science;320:674-677, 2008)。インフラマソームは、アダプター分子であるASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を中心として、IPAFや Nod、NLRP3 といったNLR (Nod-like受容体) とCaspase-1 から成る分子複合体で構成されており、何らかの刺激 (危険シグナル) が細胞内に入るとNLRがそれを認識してASCと結合し、さらにASCがCaspase-1と結合することでCaspase-1が活性化される。Caspase-1はインターロイキン (IL) -1 β 変換酵素であることから、インフラマソームの活性化により炎症性サイトカインであるIL-1 β およびIL-18の前駆体からの産生・分泌が誘導され、炎症反応が惹起される。

以上のようにインフラマソームは無菌性の炎症反応の惹起に関わりがあり、全身性の慢性炎症状態である生活習慣病にも関与している可能性は非常に高いと考えられる。本研究による炎症惹起の機序の解明を通じて、これらの疾患における新たな治療のための分子標的も明らかとなることから、本研究を行う必要性は非常に高いと考えられた。

2. 研究の目的

脂質異常や肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病の病態基盤における慢性炎症反応の関与が注目されている。しかし、これらの

病態では感染の関与はほとんどなく、その無菌性の炎症反応がどのようにして惹起されるのかは全くわかっていない。最近、新規の自然免疫経路であるインフラマソーム (inflammasome) と呼ばれるシグナル分子複合体が、痛風やアスベスト肺における無菌性の炎症を引き起こしていることが明らかとされた。本研究では、脂質異常や肥満、糖尿病、高血圧といった生活習慣病におけるインフラマソーム、およびその治療標的としての役割を明らかにし、インフラマソーム制御による新規の治療戦略の構築を行うものであった。

3. 研究の方法

生活習慣病における主要な病態のうち脂質異常、高血圧のモデル動物をさくせいするためにApoEノックアウト (KO) マウスをしようした。さらにこのApoE-KOマウスにインフラマソームの構成分子であるASCもしくはCaspase-1を欠損したマウスと交配させたダブルノックアウトマウス (DKO) マウスを作製し実験に使用した。

(1) 脂質異常 (動脈硬化) モデル

ApoE- KOマウスおよびDKOマウスに高コレステロール食 (0.15%) を3ヶ月給餌して作成した。パラメーターとして血中脂質量、体重の変遷を実験開始後から定期的 (4週毎) に解析した。またこれらマウスの血管、心臓、を採取して、SudanIV染色による大動脈全体での動脈硬化病変の評価、Oil Red O染色による大動脈起始部での病変評価、ASC、Caspase-1および各炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6等) の発現 (Real-time PCR法、免疫染色法) や浸潤細胞の同定 (免疫染色法) を行なった。

(2) 高血圧モデル

ApoE- KOマウスおよびDKOマウスに昇圧作用を持つ生理活性物質であるアンジオテンシン II をALEZET ミニポンプで持続投与 (1 μ g/kg/min、4週間) して作成した。また対照群としてApoE-KOマウスに生理食塩水を持続投与した群を設けた。パラメーターとして血中脂質量、血圧、体重の変遷を解析した。また、これらマウスの血管を採取して、大動脈瘤の形成率、最大径の測定、スコアリングを行い病変評価を行った。またASC、Caspase-1 および各炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6等) の発現 (Real-time PCR法、免疫染色法) や浸潤細胞の同定 (免疫染色法) を行なった。

4. 研究成果

(1) 脂質異常（動脈硬化）モデル

高コレステロール食を3ヶ月給餌後のApoE-KOおよびDKOマウスの体重(33.5±0.2g, 35.4±0.8g)、血漿中総コレステロール(1061±63.2mg/dL, 1022±124mg/dL)、中性脂肪(182.2±39.2mg/dL, 215.5±33.5mg/dL)、遊離脂肪酸(5.4±0.5mEq/L, 4.6±0.5mEq/L)で両群に優位な差は認められなかった。

SudanIV染色を行なった結果、ApoE-KOマウスは大動脈全体のうち21.6±2.4%が動脈硬化病変部であると認められた(図1)。一方DKOマウスでは7.8±0.9%が動脈硬化病変部でありインフラマソームの構成分子を欠損することで病変部を約1/3程度に抑制する結果が得られた。続いて心臓の大動脈起始部を60μm毎の連続切片10枚のOil Red O染色で定量した所、ApoE-KOマウスでは1.37±0.14mm²、DKOマウスでは0.67±0.04mm²でありSudanIV染色同様にインフラマソームの構成分子を欠損することで病変部を有意に抑制する結果が得られた。

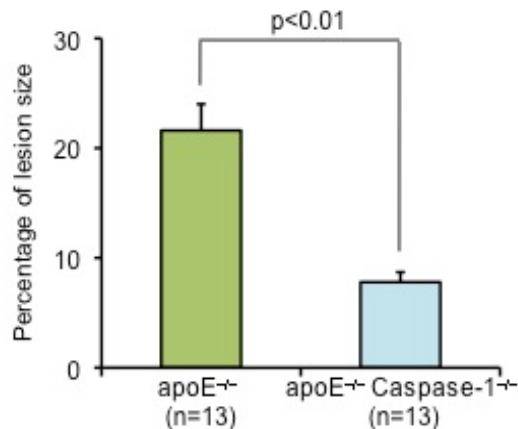


図1 大動脈における動脈硬化病変の割合

病変部における細胞浸潤を免疫染色により判定したところ、病変部においてマクロファージの浸潤が認められた。さらにマクロファージの浸潤部位においてIL-1βの分泌を免疫染色により確認した。さらに血漿中に分泌されたIL-1βをELISA法で測定したところ高脂肪食給餌後3ヶ月においてApoE-KOマウスでは124.7±11.5pg/ml、DKOマウスでは78.1±9.2pg/mlであり有意にIL-1βの分泌が抑制されている事が判明した。また様々な炎症性サイトカインやケモカイン等の遺伝

子発現をReal-time PCR法で確認した所、IL-1β、IL-6、CCL8の発現がインフラマソームの構成分子を欠損することで有意に抑制される結果が得られた。

(2) 高血圧モデル

生理食塩水もしくはアンジオテンシンIIをALEZETミニポンプで4週間持続投与(1μg/kg/min)後の生理食塩水投与群、ApoE-KO群、ApoE/ASC-DKO群、ApoE/Caspase-1-DKO群マウスの体重(27.0±0.8g, 26.0±0.4g, 26.0±1.6g, 27.5±0.6g)、血漿中総コレステロール(622.3±51.3mg/dL, 600.3±63.7mg/dL, 480.3±66.9mg/dL, 524.8±66.2mg/dL)、中性脂肪(137.5±16.5mg/dL, 118.0±17.7mg/dL, 123.6±17.5mg/dL, 125.7±19.5mg/dL)、遊離脂肪酸(6.4±0.8mEq/L, 6.6±1.0mEq/L, 5.2±0.3mEq/L, 6.3±0.5mEq/L)で4群に優位な差は認められなかった。一方血圧に関しては生理食塩水投与群が109.0±4.5mmHgであるのに対しアンジオテンシンIIを投与したApoE-KO群、ApoE/ASC-DKO群、ApoE/Caspase-1-DKO群ではそれぞれ162.4±5.1mmHg, 169.6±4.2mmHg, 165.4±3.4mmHgであり生理食塩水投与群と比較しアンジオテンシンIIを投与した3群はそれぞれ有意に血圧の上昇を認めた。

血管を採取し大動脈瘤の形成率を比較したところ、生理食塩水投与群では形成率0%であるのに対しアンジオテンシンIIを投与したApoE-KO群では形成率が63.4%であり、有意に形成する事が確認された。一方インフラマソーム構成分子を欠損させたApoE/ASC-DKO群、ApoE/Caspase-1-DKO群ではそれぞれ形成率は20.0%、15.4%でありApoE-KO群と比較し有意に形成が抑制される事が判明した(図2)。

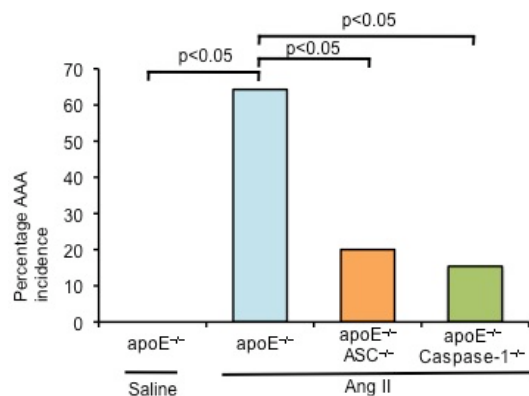


図2 腹部大動脈瘤の形成率の比較

大動脈瘤における細胞浸潤を免疫染色により判定した外膜側においてマクロファージの浸潤が認められた。さらにマクロファージの浸潤部位ならびに肥厚部位においてASCの発現を確認した。続いて血漿中に分泌されたIL-1 β をELISA法で測定したところ生理食塩水投与群では60.0 \pm 19.1pg/ml、アンジオテンシンIIを投与したApoE-KO群、ApoE/ASC-DKO群、ApoE/Caspase-1-DKO群ではそれぞれ363.8 \pm 97.1pg/ml、180.0 \pm 64.9pg/ml、102.4 \pm 29.2pg/mlでありアンジオテンシンIIを投与した3群間で比較したところApoE-KO群にくらべApoE/Caspase-1-DKO群ではIL-1 β の分泌が有意に抑制される事を確認した。様々な炎症性サイトカインやケモカイン等の遺伝子発現をReal-time PCR法で確認した所、IL-1 β 、IL-6といった炎症性サイトカインやケモカインのMCP-1の発現量がインフラマソーム構成分子を欠損する事により有意に抑制することが確認された。またそれら以外にもMMP-2、MMP-9といったマトリクスメタロプロテアーゼ発現もどのようにインフラマソームの構成分子を欠損することで有意に抑制される結果が得られた。

以上の結果から動脈硬化および腹部大動脈瘤モデルにおいてその病態の発症・進展にインフラマソームが関与する結果が得られた。また両モデルにおける共通のイベントとして病変部にマクロファージの浸潤が挙げられ、無菌性炎症の惹起においてインフラマソームを含む自然免疫経路の重要性が改めて認められた。今後腹腔内のマクロファージや骨髄由来のマクロファージを培養しこれら病態におけるインフラマソーム活性化の要因ならびにそのメカニズムを詳細に解析する事でインフラマソームがこれらの病態の治療標的になりうる事が期待される。

また生活習慣病の基本病態のうち本研究で行なった、脂質異常、高血圧以外である糖尿病、肥満モデルのマウスを作製しそれらの病態におけるインフラマソームの関与を明らかにしインフラマソーム制御による新規の治療戦略の構築を試みる所存である。

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)

- ① Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammation activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*, 123, 2011, 594-604.
- ② Hata T, Takahashi M, Hida S, Kawaguchi M, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Nishiyama A, Izawa A, Koyama J, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17 cells in inflammation and neovascularization after ischemia. *Cardiovasc Res*, 90, 2011, 364-372
- ③ Usui F, Kimura H, Ohshiro T, Tatsumi K, Kawashima A, Nishiyama A, Iwakura Y, Ishibashi S, Takahashi M. Interleukin-17 deficiency reduced vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-induced apoE-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 420, 2012, 72-77.

[学会発表] (計3件)

- ① 白井文武、木村博昭、岩倉洋一郎、高橋将文. 動脈硬化の形成におけるIL-17の役割. 第32回日本炎症・再生医学会, 2011年6月3日, 国立京都国際会館.
- ② 白井文武、木村博昭、岩倉洋一郎、高橋将文. 動脈硬化の形成におけるIL-17の役割. 第32回日本肥満学会, 2011年9月23日, 淡路夢舞台国際会議場.
- ③ 白井文武、木村博昭、谷口俊一郎、高橋将文. 動脈硬化形成におけるインフラマソームの役割. 第32回日本肥満学会, 2011年9月23日, 淡路夢舞台国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 文武 (USUI FUMITAKE)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター
研究者番号：50585560