

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16199

研究課題名（和文）急性肺傷害における炎症性細胞死Pyroptosisの機序と役割の解明

研究課題名（英文）Investigation of role and mechanism of pyroptosis in acute lung injury

研究代表者

水品 佳子（Mizushina, Yoshiko）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70458321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：急性肺傷害（ALI）におけるPyroptosisの関与を解明する目的で、ナノシリカ誘導性ALIモデルを用いて解析を行った。A549細胞（肺胞上皮細胞株）にナノシリカを添加するとCaspase-3依存性のGSDMEのプロセッシングを認め、Caspase-3欠損A549細胞において細胞死は抑制されず、Necroptosisを抑制するRIP3阻害剤を添加したところ細胞死が抑制された。一方でNecroptosis阻害剤の投与はナノシリカ誘導性マウスALIモデルで肺傷害を軽減せず、ナノシリカによるALIには複数の細胞死が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALIの病態に炎症が関与することが示されているが、その詳細は不明で、有効な治療方法も確立されていない。制御された細胞死（RCD）は様々な病態における炎症の起点となりうるようになってきているが、ALIにおけるRCDの関与については不明な点が多い。本研究ではALIにおける肺胞上皮細胞におけるPyroptosisの関与やプロセッシング機構を明らかにし、さらにPyroptosis以外のRCDの関与についても解析を進めており、本研究成果はALIの病態解明や新たな治療戦略の開発につながるのみならず、無菌性炎症が関与する様々な疾患の病態解明に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of pyroptosis in acute lung injury (ALI) using the nanosilica-induced ALI model. Although nanosilica induced GSDME processing by activating caspase-3 in pulmonary epithelial cell line A549 cells, cell death was not ameliorated in caspase-3 deficient A549 cells. Therefore, we focused on necroptosis, another type of regulated cell death. RIPK1 inhibitor didn't ameliorate lung injury in nanosilica-induced mouse ALI model, although the RIP3 inhibitor (necroptosis inhibition) ameliorated nanosilica-induced A549 cell death. These results suggest that more than one cell death contributes to nanosilica-induced ALI.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：炎症 細胞死 細胞・組織 肺疾患 免疫学

1. 研究開始当初の背景

ALI や急性呼吸窮迫症候群 (Acute respiratory distress syndrome : ARDS) は全身性炎症や肺組織の直接的な傷害によって誘導され、病原体が直接的には関与しない無菌性炎症の関与が示されている。しかし、その炎症惹起機序の詳細は不明で、有効な治療方法も確立されておらず、現在においても ARDS の死亡率は 20 ~ 30% と高い。

近年、様々な病態における炎症が、RCD を起点として起こってくることがわかってきた。特に、細胞膜の破綻を伴うネクローシス様 RCD では、細胞内成分 (核酸や HMGB1) が細胞外に流出することで、炎症が惹起される。このネクローシス様 RCD のうち、Pyroptosis は、インフラマソーム (Inflammasome) を介して誘導される。NLRP3 インフラマソームは、Nod 様受容体である NLRP3 とアダプター分子 ASC、Caspase-1 で構成される細胞内分子複合体で、危険シグナル (DAMPs: Damage-associated molecular patterns) を認識することで形成され、Caspase-1 の活性化を誘導し、強力な炎症性サイトカインである IL-1 の前駆体を活性化型に切断することで炎症を惹起する (図 1)。この Caspase-1 の活性化は IL-1 の放出を伴う炎症性細胞死を起こすことも知られており、この細胞死は 2001 年に Pyroptosis と命名されていた。この Pyroptosis の機序は長い間不明であったが、2015 年に Caspase-1 もしくは Caspase-11 の活性化によって切断された Gasdermin D (GSDMD) の N 末断片が多量体化して細胞膜に孔 (10-20 nm) を形成することが明らかになり、GSDMD が Pyroptosis の実行分子として同定された。IL-1 (径 4.5 nm) はこの孔を通して細胞外に放出され、これによって炎症が惹起される。さらに、細胞の膨化・破裂が生じることで、Pyroptosis が誘導されることも明らかになった (図 2)。また最近、Gasdermin E (GSDME) も同様の機序で Pyroptosis を誘導することが報告された [1]。GSDME を高発現している細胞では、Caspase-3 が GSDME を切断し Pyroptosis が誘導されることが示されている [2]、我々の研究チームは、インフラマソームの活性化が Caspase-8/GSDME 依存的な Pyroptosis を誘導することを見出した (Incomplete pyroptosis と命名)。さらに、この Pyroptosis では IL-1 産生ではなく、IL-1 産生を伴い、一般的なインフラマソーム活性化による炎症惹起とは異なる特徴を示すことを報告している (図 2) [3]。

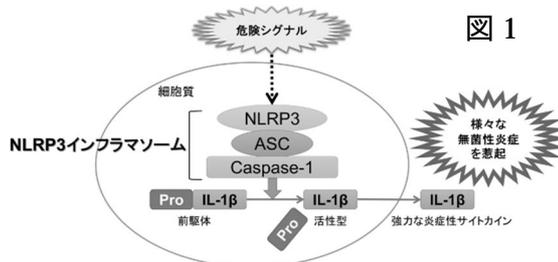


図 1

ALI における Pyroptosis の役割は不明な点が多いが、予備的検討により肺胞上皮細胞において DAMPs (ナノシリカ) による Caspase-8 の活性化によって GSDME が優位に切断されることを観察していることや、シリカ等の粒子が IL-1 放出を伴う肺胞マクロファージの細胞死を誘導することが報告されている [4]。以上のことから、ALI における Pyroptosis の役割に着目し、その機序を解明し、ALI の新たな治療標的を同定する目的で本研究を行った。

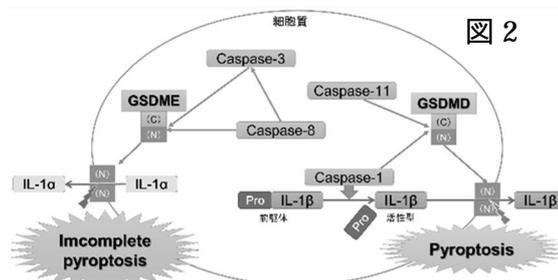


図 2

2. 研究の目的

- 以下の 2 点を目的として本研究を遂行した。
- (1) ALI の病態における Pyroptosis の役割を解明する
- (2) Pyroptosis 惹起の分子機序を解明し、ALI の新たな治療標的を同定する

3. 研究の方法

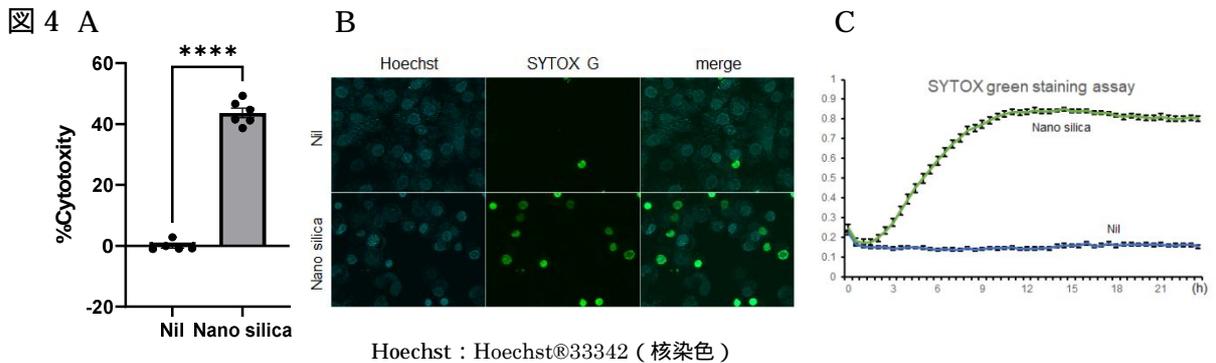
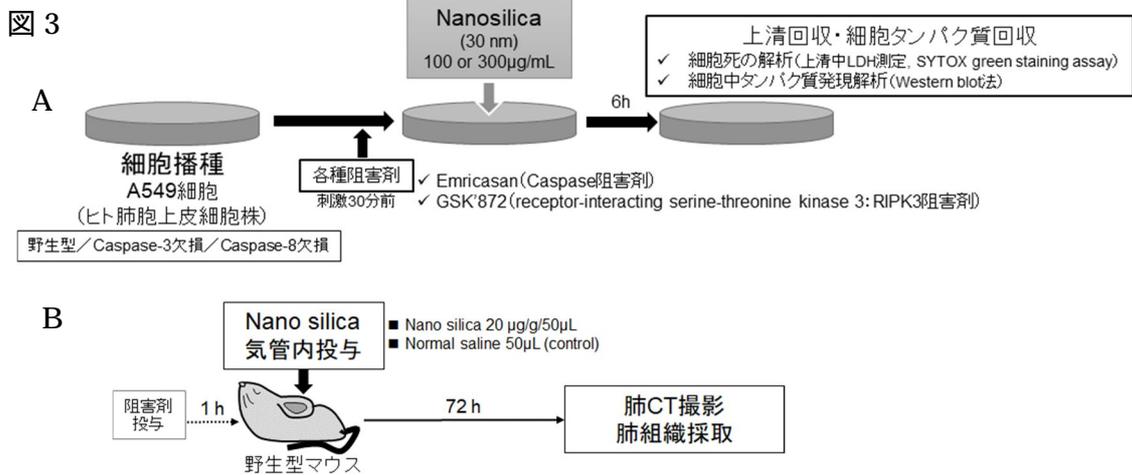
ALI モデルとして、A549 細胞 (肺胞上皮細胞株、野生型 / Caspase-3 欠損 / Caspase-8 欠損) にナノシリカ (二酸化ケイ素のナノマテリアル、粒子径 30 nm) を最終濃度 100 μg/mL もしくは 300 μg/mL で添加した。添加 6 時間後に細胞上清・細胞タンパク質を回収し解析を行った。各種阻害剤および遺伝子欠損細胞を作製し同様の解析を行った (図 3A)。次にナノシリカ誘導マウス ALI モデルを確立し in vivo の解析を行った。C57BL/6 マウス (8 ~ 12 週齢・雄) の気管内にナノシリカ (粒子径 30nm, 20 μg/g) を投与し、72 時間後に胸部 CT 撮影し、その後肺組織を採取し組織染色を行った (図 3B)。

4. 研究成果

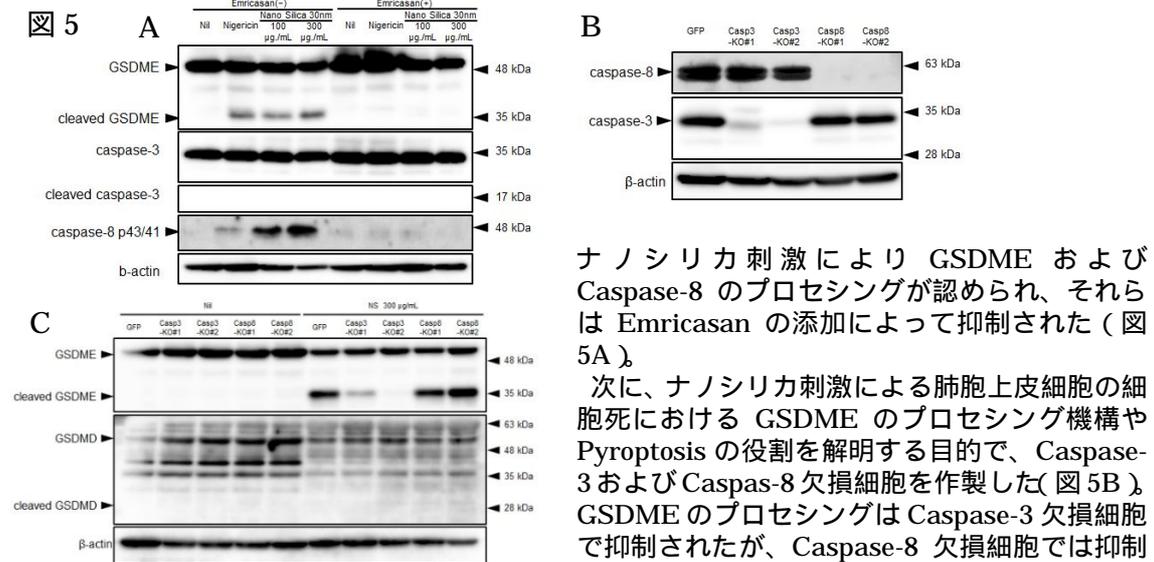
ナノシリカ刺激は肺胞上皮細胞の細胞死を誘導する

A549 細胞にナノシリカを添加すると細胞上清中の LDH は有意に増加し (図 4A)、共焦点顕微鏡では SYTOX green 陽性細胞の増加が認められた (図 4B)。SYTOX green staining assay

でもナノシリカ添加により細胞死の増加が認められた (図 4C)。



ナノシリカ刺激は肺胞上皮細胞の Caspase-3 依存的な GSDME プロセッシングを誘導する
 ナノシリカ刺激後の A549 細胞のタンパク質を回収し、Western blot 法で解析を行った。



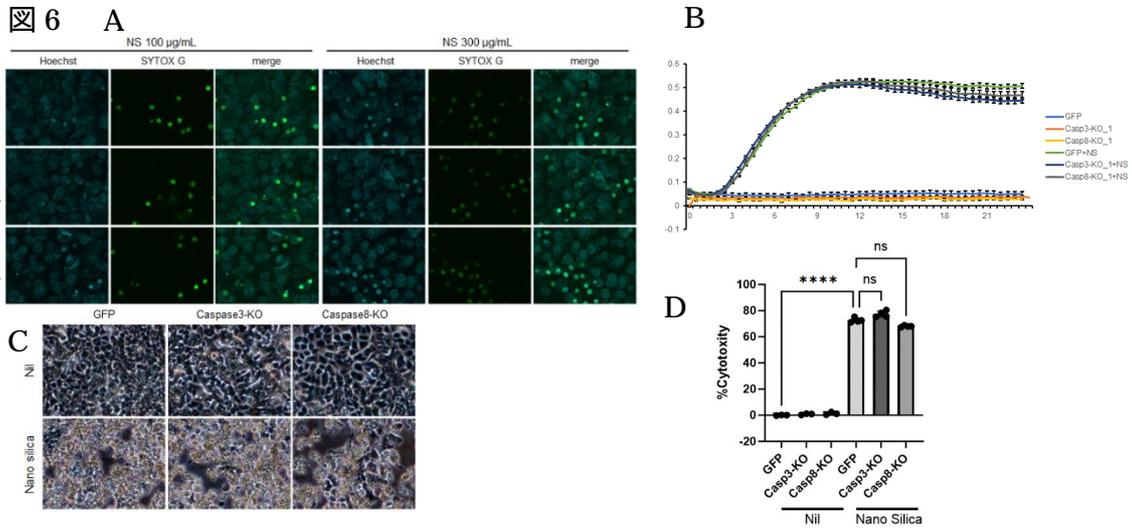
ナノシリカ刺激により GSDME および Caspase-8 のプロセッシングが認められ、それらは Emricasan の添加によって抑制された (図 5A)。

次に、ナノシリカ刺激による肺胞上皮細胞の細胞死における GSDME のプロセッシング機構や Pyroptosis の役割を解明する目的で、Caspase-3 および Caspase-8 欠損細胞を作製した (図 5B)。GSDME のプロセッシングは Caspase-3 欠損細胞で抑制されたが、Caspase-8 欠損細胞では抑制されなかった (図 5C)。以上の結果より、ナノシリカ刺激は肺胞上皮細胞に Caspase-3 依存的な GSDME プロセッシングを誘導することが示唆された。

ナノシリカによる肺胞上皮細胞死は Caspase-3 欠損で抑制されない

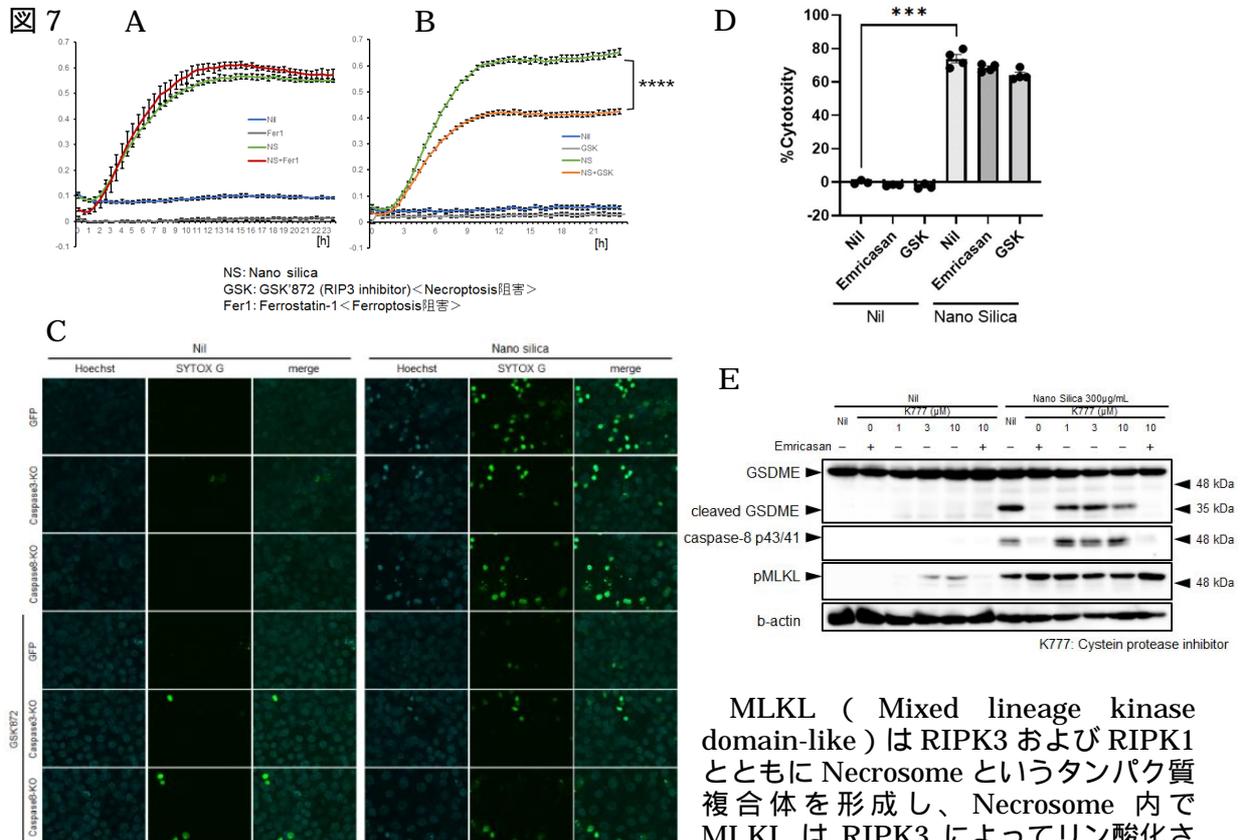
次に Caspase-3 および Caspase-8 の細胞死への関与を明らかにする目的で、Caspase-3 および Caspase-8 欠損 A549 細胞をナノシリカで刺激し共焦点顕微鏡で観察した。

Caspase-3 および Caspase-8 欠損細胞ともにナノシリカ刺激後の SYTOX green 陽性細胞の減少は認められず (図 6A)、SYTOX Green staining assay および細胞形態も両細胞ともに細胞死の抑制は認められなかった (図 6B, C)。細胞上清中 LDH 上昇の有意な抑制も認めなかった (図 6D)。以上の結果より、ナノシリカによる肺胞上皮細胞死は Pyroptosis 以外の細胞死が関与していることが示唆された。



ナノシリカによる肺胞上皮細胞死に Necroptosis が関与する

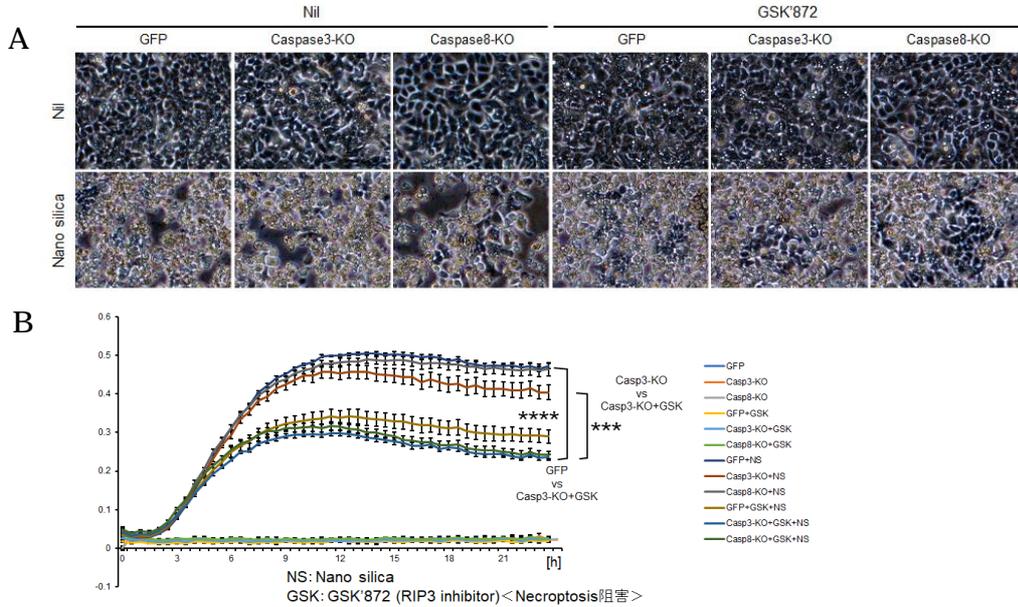
ナノシリカによる肺胞上皮細胞死に關与する Pyroptosis 以外の RCD として、Ferroptosis と Necroptosis に着目した。SYTOX Green staining assay では、ナノシリカ刺激による A549 細胞の細胞死は Ferrostatin-1 (Ferroptosis 阻害剤) を添加によって抑制されなかったが (図 7A) GSK'872 (RIPK3 阻害剤: Necroptosis 阻害剤) の添加により抑制された (図 7B)。共焦点顕微鏡でも、ナノシリカによる SYTOX green 陽性細胞数増加は GSK'872 の添加によって抑制された (図 7C)。ナノシリカ刺激による A549 細胞上清中の LDH 上昇は GSK'872 添加により抑制される傾向を認めた (図 7D)。



れ Necroptosis を誘導する。ナノシリカ刺激により A549 細胞で MLKL リン酸化が誘導され (図 7E) 以上の結果から、ナノシリカによる肺胞上皮細胞死に Necroptosis が関与していることが示唆された。

なお、Caspase-3 および Caspase-8 欠損 A549 細胞にも GSK'872 を添加したが、ナノシリカによる細胞死は、細胞形態・SYTOX Green staining assay とともに野生型と比較して有意な抑制は認めなかった (図 8A,B)。

図 8

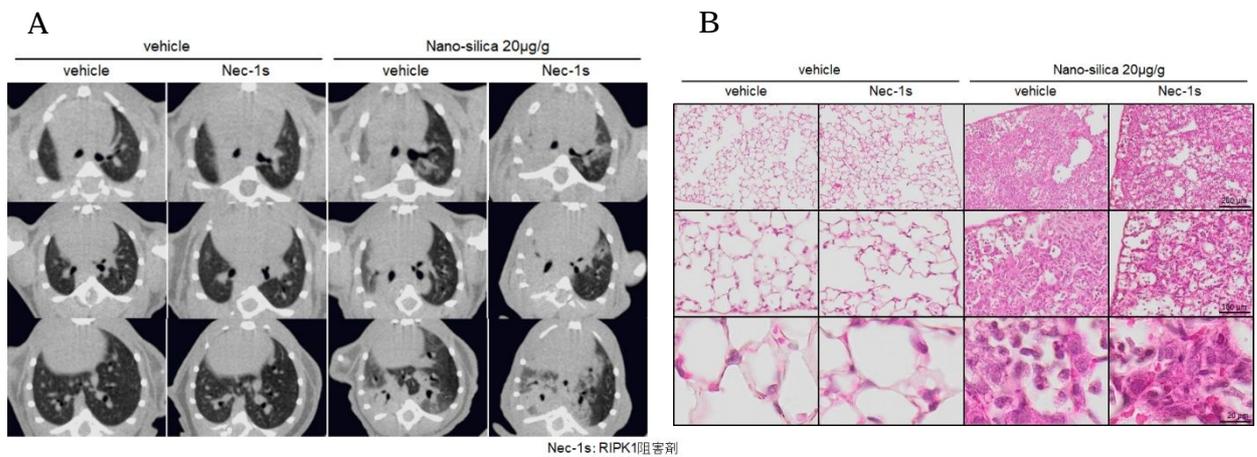


Necroptosisの阻害はナノシリカによる急性肺傷害を軽減しない

次に *in vivo* の解析で、マウスの気管内にナノシリカを投与し、ナノシリカ誘導性マウス ALI モデルを確立した。ナノシリカの気管内投与により ALI が誘導されるが、それは Necroptosis を阻害する Nec-1s (RIPK1 阻害剤) を投与しても有意な抑制を認めなかった (図 9A: 胸部 CT, 図 9B: 肺組織 HE 染色)。

ナノシリカによる急性肺傷害には複数の RCD が関与している可能性があり、今後は GSDME 欠損マウスを用いた解析を行うことを検討している。

図 9



<引用文献>

1. Broz, P., P. Pelegrín, and F. Shao, *The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2020. 20(3): p. 143-157.
2. Wang, Y., et al., *Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin*. Nature, 2017. 547(7661): p. 99-103.
3. Aizawa, E., et al., *GSDME-Dependent Incomplete Pyroptosis Permits Selective IL-1a Release under Caspase-1 Inhibition*. iScience, 2020. 23(5): p. 101070.
4. Kuroda, E., et al., *Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1a Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation*. Immunity, 2016. 45(6): p. 1299-1310.

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