

令和 6 年 6 月 19 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：2022～2023

課題番号：22K20864

研究課題名（和文）動脈硬化を基盤とする心血管病におけるAIM2インフラマソームの役割の解明

研究課題名（英文）Role of AIM2 inflammasome in atherosclerosis and its related diseases

研究代表者

バートルジャフ・チントグトフ（Chintogtokh, Baatarjav）

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：70962744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：NLRP3インフラマソームは、動脈硬化を基盤とする心血管病での無菌性炎症において重要な役割を果たしている。近年、dsDNAを認識して形成されるAIM2インフラマソームも無菌性炎症を惹起することが報告されているが、その役割は未だ不明である。ApoE欠損マウスにおける動脈硬化病変の形成は、AIM2の欠損により影響を受けなかった。一方、CAWS投与によるマウス川崎病様血管炎では、AIM2の欠損により血管炎の発症率や重症度、線維化が有意に抑制されていた。さらに、骨髄由来樹状細胞を用いた解析により、CAWSが核DNAおよび核膜傷害を引き起こし、AIM2インフラマソームの活性化を誘導す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

無菌性炎症におけるAIM2インフラマソームの活性化機構や病態への関与については、未だ不明な点も多く、これを標的とした臨床応用についても様々な課題が残されている。本研究の成果により、AIM2インフラマソーム活性化の新たな分子機構が明らかになったことは、学術的に十分な意義がある。また、日本人に多い川崎病血管炎の病態についても未だ不明であることから、その血管炎惹起の分子機序の一部を明らかにすることができたことは、社会的な意義もあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The NLRP3 inflammasome contributes to sterile inflammatory responses in the pathogenesis of atherosclerosis-related cardiovascular disease. Recent investigations have suggested that a dsDNA sensor AIM2 could mediate sterile inflammation; however, the role of AIM2 inflammasome in cardiovascular disease remains unclear. We generated ApoE-knockout (-KO) mice lacking AIM2 and observed that AIM2 deficiency had no significant effect on the lesion size of atherosclerosis. On the other hand, we showed that AIM2 deficiency significantly attenuated the incidence and severity of CAWS-induced vasculitis. In vitro experiments showed that CAWS induced DNA leakage from the nucleus into the cytoplasm, leading to activation of AIM2 inflammasome in bone marrow-derived dendritic cells. These findings suggest that AIM2 inflammasome contributes to the development of CAWS-induced vasculitis, and provide new insights into the mechanism underlying the pathogenesis of Kawasaki disease-like vasculitis.

研究分野：免疫学

キーワード：DNAセンサー 炎症反応 心血管病

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化や虚血性心疾患といった心血管病の病態には、病原体の関与がない無菌性炎症が深く関与している。これまで申請者の研究グループでは、これらの無菌性炎症が NLRP3 インフラマソームと呼ばれる自然免疫シグナルを介して惹起されてくることを明らかにしてきた。NLRP3 インフラマソームはセンサー分子 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 (図1) [1]。また、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ている。一方で近年、dsDNA を認識するセンサー分子 AIM2 (Absent in melanoma 2) がウイルスや細菌由来の dsDNA だけでなく、自己の死細胞由来の dsDNA も認識して、ASC や Casp1 とインフラマソームを形成し、IL-1 β 産生と Pyroptosis を引き起こすことで無菌性炎症に寄与することが示唆されている。また、細胞質内に存在する DNA センサーには AIM2 の他に cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) /STING (stimulator of interferon genes) があり、I 型インターフェロン (IFN) や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を介して炎症を引き起こす。さらに最近、AIM2 が細胞の種類によってはインフラマソームとは独立した機能を示すことも報告されている。しかしながら、心血管系細胞における AIM2 の機能や、これら DNA センサーとのクロストークについては、未だ明らかではない。

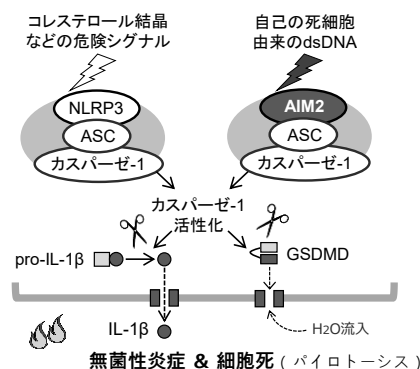


図1. NLRP3およびAIM2インフラマソームは無菌性炎症と細胞死を誘導する

2. 研究の目的

本研究の目的は、無菌性炎症の関与する動脈硬化やそれに起因する心血管病における AIM2 インフラマソームの役割を解明するとともに、AIM2 と DNA センサーとのクロストークや AIM2 のインフラマソームとは独立した機能について解析し、心血管病における AIM2 機能の解明を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成と評価

動脈硬化モデルは ApoE 欠損マウス (C57BL/6J 背景) を使用し、申請者らが作成した AIM2 欠損マウス (C57BL/6J 背景) [2]と交配させて ApoE/AIM2 の 2 重欠損 (DKO) マウスを作成した。動脈硬化は、高コレステロール食 (リサーチダイエツト社 D12079B) を 12 週間負荷することにより誘導した。川崎病様血管炎モデルは、野生型 C57BL/6J マウス (wild-type : WT ; ♂、8-12 週齢) に *Candida albicans* 培養上清 (CAWS : 1 mg) を 5 日間連続で腹腔内投与することにより作成した[3]。すべての動物実験は、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。組織学的な評価は、大動脈起始部のヘマトキシリン

エオジン (HE) 染色や Oil Red O 染色、Picrosirius red 染色により解析した。また、Dectin-2 および CD11c、 γ H2AX に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(2) 細胞実験

マウス骨髄細胞を単離して GM-CSF 処理により樹状細胞(DC)を作成した。DNA 傷害は γ H2AX 抗体を用いた免疫染色および Western blot 法で解析した。核膜の破綻および核 DNA の漏出は、Lamin B1 抗体および、DNA 特異的に結合して蛍光を発する NucleoSeeing (Live Nucleus Green) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化における AIM2 の役割

動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスと AIM2 欠損マウスを交配することで ApoE/AIM2-2 重欠損マウスを得た。高コレステロール食負荷によって動脈硬化を誘導したが、ApoE/AIM2 の 2 重欠損マウスでは ApoE 欠損マウスと比較して動脈硬化病変や脂質沈着、そして線維化の形成に有意な差を認めなかった (図 2)。代表的な動脈硬化モデル (ApoE 欠損マウス) とヒト動脈硬化病変の RNA-seq データベース (PRJNA609051&PRJNA493259) を用いて解析してみたところ、AIM2 の発現は、高度に進行した病変で不安定化したプラークで、より増加していることが確認された。つまり、動脈硬化ステージによって AIM2 インフラマソームの役割は異なる可能性があるため、今後、より進行した病変での解析を行う必要があると考えられた。

(2) CAWS 誘導性血管炎における AIM2 の役割

CAWS 投与によって大動脈起始部および冠動脈周囲に血管炎が誘導されたが、AIM2 欠損により CAWS で誘導される血管炎の発症率や重症度、線維化が有意に抑制された (図 3A)。CAWS は mannoprotein- β -glucan complex であり、C 型レクチン受容体の 1 つである Dectin-2 に認識される。そこで、Dectin-2 の免疫染色を行ったところ、血管炎部位では Dectin-2 陽性の DC (CD11c 陽性) が集簇していることが示された (図 3B)。さらに、これら DC の一部では γ H2AX 陽性の DNA 傷害が起こっていることが観察された。CAWS による AIM2 インフラマソーム活性化の分子機序を検討するため、マウス骨髄細胞から DC を作成して解析し、CAWS 処理によって DNA 傷害マーカーである γ H2AX 発現が増加することがわかった (図 4)。また、CAWS を処理した DC では、核膜の破綻とそれに伴う核 DNA の細胞質への漏出が起こっていることも明らかになった (図 5)。これらの研究結果は、川崎病における血管炎形成機序の一部を明らかにするとともに、AIM2 インフラマソームが新たな治療標的の候補となることを示唆している。

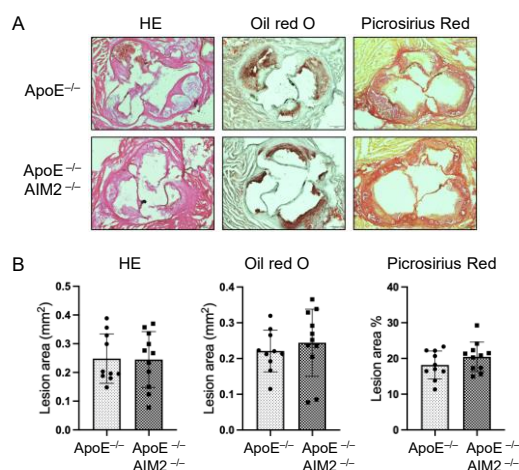


図2. 動脈硬化におけるAIM2インフラマソームの役割

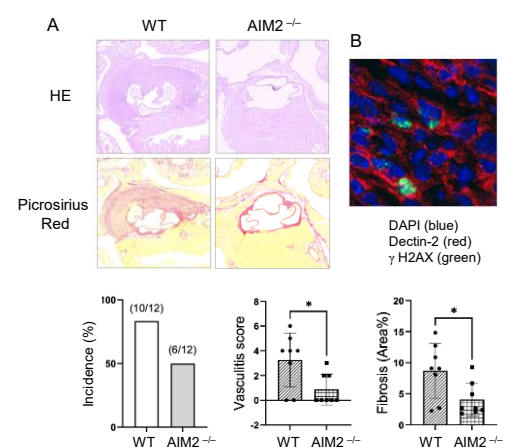


図3. CAWS誘導性血管炎における AIM2インフラマソームの役割

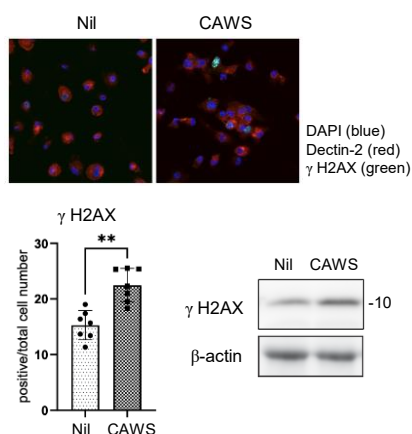


図4. CAWSによるDNA傷害の誘導 (Vitro)

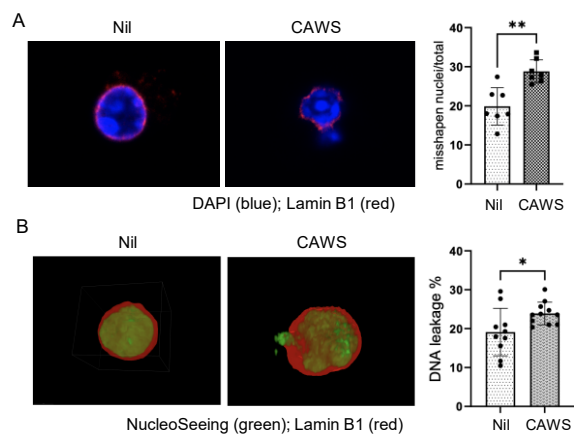


図5. CAWSによる核膜破綻とDNA漏出 (Vitro)

<引用文献>

1. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res* 118: 372-385, 2022
2. Baatarjav C, Komada T, Karasawa T, Yamada N, Sampilvanjil A, Matsumura T, Takahashi M. dsDNA-induced AIM2 pyroptosis halts aberrant inflammation during rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Cell Death Differ* 29: 2487-2502, 2022
3. Anzai F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, Karasawa T, Komada T, Nakamura J, Nagi-Miura N, Ohno N, Takeishi Y, Takahashi M. Crucial role of NLRP3 inflammasome in a murine model of Kawasaki disease. *J Mol Cell Cardiol* 138: 185-196, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Baatarjav Chintogtokh, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Fujimura Kenta, Gunji Yoshitaka, Komori Satoko, Aizawa Hidetoshi, Jing Tao Cantona Billton, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 686
2. 論文標題 Caspase-11 deficiency attenuates neutrophil recruitment into the atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149158 ~ 149158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.149158	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimura Kenta, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Mizushina Yoshiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Otsu Kinya, Takeda Norihiko, Mizukami Hiroaki, Kario Kazuomi, Takahashi Masafumi	4. 巻 180
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome-driven IL-1 and IL-18 contribute to lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 58 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2023.05.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baatarjav Chintogtokh, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Yamada Naoya, Sampilvanjil Ariunaa, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 29
2. 論文標題 dsDNA-induced AIM2 pyroptosis halts aberrant inflammation during rhabdomyolysis-induced acute kidney injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 2487 ~ 2502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-022-01033-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Aizawa Emi, Mizushina Yoshiko, Watanabe Sachiko, Baatarjav Chintogtokh, Matsumura Takayoshi, Takahashi Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cryo-sensitive aggregation triggers NLRP3 inflammasome assembly in cryopyrin-associated periodic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e75166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.75166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chintogtokh Baatarjav. Takanori Komada. Masafumi Takahashi
2. 発表標題 Double-stranded DNA-induced AIM2 pyroptosis limits excessive inflammation during rhabdomyolysis-induced acute kidney injury.
3. 学会等名 ASN(米国腎臓学会) Kidney Week 2022(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 https://www.jichi.ac.jp/inflammation/

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