

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670027

研究課題名(和文) 微小管を介して誘導される炎症応答の分子機序解明と統御法開発

研究課題名(英文) Understanding and manipulation of microtubule-mediated inflammatory response

研究代表者

齊藤 達哉 (Saitoh, Tatsuya)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：60456936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫機構は、炎症応答の誘導に深く関わっている。自然免疫機構は、パターン認識受容体により病原体成分を認識し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、自然免疫機構は自己由来の刺激性成分や栄養成分にも反応することがあり、しばしば炎症性の疾患の発症を惹起する。我々は、自然免疫の活性化制御に関する解析を行い、微小管が炎症応答の誘導において重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Innate immune system is critically involved in induction of inflammatory responses. Innate immune system detects microbial components by pattern-recognition receptors and induces production of inflammatory cytokines. However, innate immune system also senses host-derived stimulatory factors and nutrient components, and often causes development of inflammatory diseases. We have examined a molecular mechanism underlying regulation of innate immune system and have revealed an essential role of microtubules in induction of inflammatory responses.

研究分野：生物系薬学

キーワード：自然免疫 炎症 サイトカイン 微小管 オルガネラ

### 1. 研究開始当初の背景

生活スタイルの変化に伴い、痛風、動脈硬化や2型糖尿病などの生活習慣病が社会問題となっている。近年の研究から、本来は病原体を認識するはずの自然免疫機構が、過剰な栄養摂取により体内に蓄積する代謝物を異物として認識するために炎症を惹起し、生活習慣病の発症要因となることが明らかになっている。とりわけ、尿酸塩結晶、コレステロール結晶や遊離脂肪酸などの代謝物により活性化される自然免疫機構 NLRP3 インフラマソームは、生活習慣病の治療・創薬標的として注目されている(図1, 齊藤達哉, 最新医学, 印刷中から抜粋)。主にマクロファージなどの貪食細胞において活性化される NLRP3 インフラマソームは、異物センサーであるパターン認識受容体 NLRP3、情報伝達因子 ASC とプロテアーゼ Caspase-1 からなるタンパク質複合体であり、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ ・IL-18 の産生を誘導する。IL-1 $\beta$ ・IL-18 は、他のサイトカインやケモカインのさらなる産生を誘導し、T 細胞や好中球などの炎症のエフェクター細胞の活性化および遊走を促進するため、過度の炎症に起因する生活習慣病の発症要因となる。代表者は、インフラマソームの活性化を細胞内クリアランス機構であるオートファジーが制御することの発見をきっかけに、インフラマソームの研究に携わってきた。

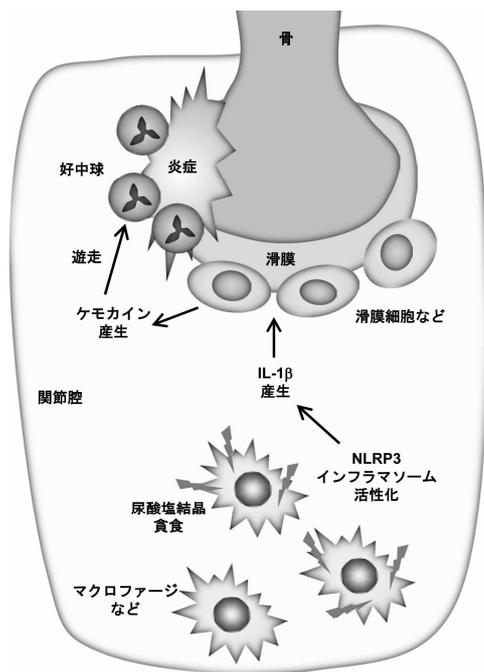


図1 . NLRP3 インフラマソームを介した痛風性関節炎の発症

### 2. 研究の目的

NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害する化合物を同定し、その作用メカニズムを解明する。本研究により、生活習慣病の治療法

を理解し、より優れた手法を開発することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### 材料

本研究には、C57BL/6 マウスおよび同マウスの骨髄から分化させたマクロファージを用いた。また、マウスマクロファージ細胞株 J774 を用いた。

#### 実験内容

・NLRP3 インフラマソームに対する阻害活性を有する化合物の同定

Nigericin で刺激した J774 細胞における NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 $\beta$  の産生を、ELISA により測定した。また、尿酸塩結晶で刺激したマウス骨髄由来のマクロファージにおける NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 $\beta$  の産生を、ELISA により測定した。当該実験系を用いて、NLRP3 インフラマソームを阻害する化合物を同定した。

・NLRP3 インフラマソーム制御因子の細胞内局在の同定

免疫蛍光染色法や Proximity ligation assay を用いて、NLRP3 インフラマソームの構成因子と微小管の細胞内局在を解明した。

・アセチル化された微小管の役割の解明

微小管の翻訳後修飾の状態をウエスタンブロットング法により解析した。アセチル化された微小管が刺激に応じて増加することが明らかになったので、微小管のアセチル化を制御する酵素である MEC17 や SIRT2 に着目した解析を行った。MEC17 に対する shRNA や SIRT2 に対する阻害剤が、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 $\beta$  の産生に与える影響を、ELISA により測定した。

・コルヒチンおよびレスベラトロールの作用機序の解明

NLRP3 インフラマソームは、以下の段階を経て活性化する：(1)尿酸塩結晶によるリソソーム損傷 (2)ミトコンドリア損傷 (3)微小管を介した NLRP3 インフラマソームの会合 (4)活性酸素種による NLRP3 の活性化 (5)Caspase-1 の活性化。そこで、以下の解析を行い、これらの段階の中から作用標的を同定した。

・(1)と(2)に関しては、電子顕微鏡観察によりオルガネラ損傷を検出。

・(3)に関しては、Proximity ligation assay により NLRP3 とその下流の情報伝達因子 ASC の近接を検出。

・(4)に関しては、ミトコンドリア由来の活性酸素種を蛍光検出試薬 MitoSOX により検出。

・(5)に関しては、ウエスタンブロットにより、Caspase-1 活性化に伴う切断型 Caspase-1 の出現を検出。

・マウス痛風モデルを用いた化合物の抗炎症効果についての評価

尿酸塩結晶を腹腔内に投与して腹膜炎を惹起するマウス痛風モデルを用いて、化合物の抗炎症効果を評価した。ELISA により尿酸塩結晶投与後の腹腔内における IL-1 $\beta$ 量を測定した。さらに、炎症部位への好中球の遊走を解析するため、腹腔内の好中球数を FACS により測定した。

#### 4. 研究成果

自然免疫関連受容体である NLRP3 は、リソソムの損傷に応じて情報伝達因子 ASC およびプロテアーゼ Caspase-1 と共に NLRP3 インフラマソームを形成し、サイトカイン IL-1 $\beta$ や IL-18 の産生を介して炎症を惹起する。尿酸塩結晶やシリカナノ粒子などの刺激物による NLRP3 インフラマソームの過度の活性化は痛風や塵肺などの炎症性疾患の発症要因となるため、NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害する化合物の同定は重要な研究課題である。我々は、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、痛風治療薬であるコルヒチンが NLRP3 インフラマソームの活性化を抑制することを見出した。

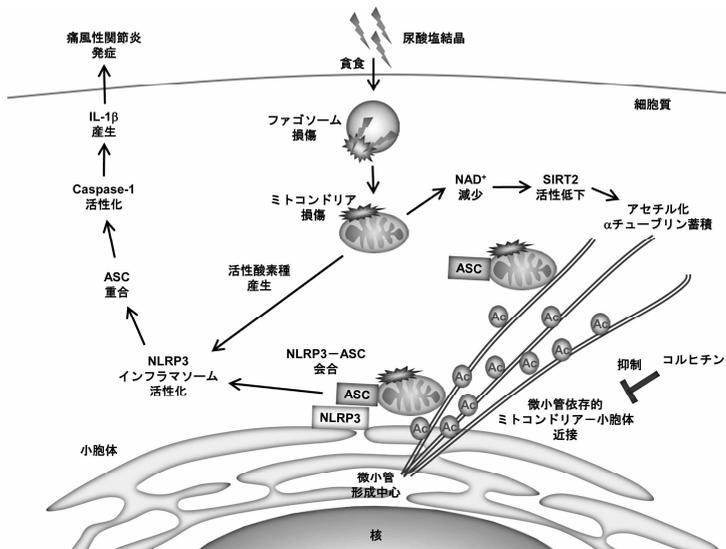


図2 . NLRP3 インフラマソーム活性化機序

微小管は尿酸塩結晶などの刺激に応じて小胞体とミトコンドリアの近接を促進することにより、小胞体上の NLRP3 とミトコンドリア上の ASC の会合を誘導する。尿酸塩結晶などの刺激は、ミトコンドリアの損傷を惹起するため、細胞内 NAD が減少して NAD 依存性のアルファチューブリン脱アセチル化酵素である SIRT2 の活性が低下する。SIRT2 の活性低下はアセチル化微小管を蓄積させる。アセチル化微小管は小胞体とミトコンドリアの近接頻度を高めるため、NLRP3 インフラマソームの会合が促進される。コルヒチンなどのチューブリン重合阻害剤は、微

小管依存的な NLRP3 インフラマソームの会合を抑制する。また、フィトケミカルであるレスベラトロールは、詳細なメカニズムは现阶段では不明であるが、アセチル化微小管の増加を抑制することにより、NLRP3 インフラマソームの会合を抑制する。これらの解析結果は、微小管が NLRP3 インフラマソームの阻害剤を開発する上での有力な創薬標的であることを示している (図2, 齊藤達哉, 最新医学, 印刷中から抜粋)。

#### 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14件)

1. \*Misawa T, \*Saitoh T, Kozaki T, Park S, Lee H, Takahama M, Akira S (\*Co-first authors).

Resveratrol inhibits the acetylated  $\alpha$ -tubulin-mediated assembly of NLRP3-inflammasome.

Int Immunol. 2015, in press (査読有)

2. Kozaki T, Takahama M, Misawa T, Matsuura Y, Akira S, \*Saitoh T (\*Corresponding author).

Role of zinc-finger antiviral protein in host defense against Sindbis virus.

Int Immunol. 2015, in press (査読有)

3. Isaka Y, Takabatake Y, Takahashi A, Saitoh T, Yoshimori T.

Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases.

Nephrol Dial Transplant. 2015, in press (査読有)

4. Maruyama K, Fukasaka M, Uematsu S, Takeuchi O, Kondo T, Saitoh T, Martino M, Akira S.

5-azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine-tuning osteoclast survival.

J Biol Chem. 2015, 290, 9377-9386. (査読有) doi: 10.1074/jbc.M114.631374.

5. Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, Fujita N, Saitoh T, Akira S, Yoshimori T, Sibley LD, Hwang S, Virgin HW.

The parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii* is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy.

Immunity. 2014, 40, 1-12. (査読有) doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.006

6. Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Ma JS, Kamiyama N, Matsuura Y, Suh PG, Hayashi M, Ebisu S, Brummelkamp TR, Takeda K, Akira S, Yamamoto M.

Role of the mouse and human autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -induced

- cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*.  
*J Immunol.* 2014, 192, 3328-3335. (査読有) doi: 10.4049/jimmunol.1302822.
7. Deretic V, Saitoh T, Akira S.  
 Autophagy in infection, inflammation and immunity.  
*Nat Rev Immunol.* 2013, 13, 722-737. (査読有) doi:10.1038/nri3532.
8. Akira S, Misawa T, Satoh T, Saitoh T.  
 Macrophages control innate inflammation.  
*Diabetes Obes Metab.* 2013, 15, 10-18. (査読有) doi: 10.1111/dom.12151.
9. Ono C, Ninomiya A, Yamamoto S, Abe T, Wen X, Fukuhara T, Sasai M, Yamamoto M, Saitoh T, Satoh T, Kawai T, Ishii KJ, Akira S, Okamoto T, Matsuura Y.  
 Innate immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in mammalian cells.  
*J Virol.* 2013, 88, 2157-2167. (査読有) doi: 10.1128/JVI.03055-13.
10. Patel KK, Miyoshi H, Beatty WL, Head RD, Malvin NP, Cadwell K, Guan JL, Saitoh T, Akira S, Seglen PO, Dinauer MC, Virgin HW, Stappenbeck TS.  
 Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production.  
*EMBO J.* 2013, 32, 3130-3144. (査読有) doi: 10.1038/emboj.2013.233.
11. Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, Nakatogawa H, Kobayashi S, Haraguchi T, Guan JL, Saito K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T.  
 Recruitment of the autophagic machinery upstream of LC3 is mediated by ubiquitin on host endosomal membranes during infection-induced autophagy.  
*J Cell Biol.* 2013, 203, 115-128. (査読有) doi: 10.1083/jcb.201304188.
12. Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T.  
 Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury.  
*EMBO J.* 2013, 32, 2336-2347. (査読有) doi: 10.1038/emboj.2013.171.
13. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, \*Saitoh T, \*Akira S (\*Co-corresponding authors).  
 Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110, 12379-12384. (査読有) doi: 10.1073/pnas.1310604110.
14. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, \*Saitoh T, \*Akira S (\*Co-corresponding authors).  
 Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome.  
*Nat Immunol.* 2013, 14, 454-460. (査読有) doi: 10.1038/ni.2550.
- [学会発表](計 23 件)
1. 齊藤達哉  
 ミトコンドリアの損傷はウイルス RNA を分解に導く自然免疫応答を惹起する  
 日本薬学会第 135 年会, シンポジウム招待講演, 神戸, 2015 年 3 月 27 日
  2. 齊藤達哉, 三澤拓馬, 審良静男  
 NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する化合物の同定  
 第 88 回日本薬理学会年会, 一般口頭発表, 名古屋, 2015 年 3 月 20 日
  3. Tatsuya Saitoh  
 Regulation of innate immune response by post-translational modifications.  
 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, Invited speaker, Tokyo, Japan, Jan 23, 2014
  4. Tatsuya Saitoh  
 Regulation of innate immune response by autophagy.  
 The 16th Northeastern Asian Symposium "Autophagy: From Basic to Medicine", Poster presentation, Pusan, Korea, Dec. 20, 2014
  5. Tatsuya Saitoh, Takuma Misawa, Tatsuya Kozaki, Shizuo Akira  
 Role of organelle in regulation of innate immune response  
 第 43 回日本免疫学会総会, ポスター発表, 京都, 2014 年 12 月 12 日
  6. 齊藤達哉  
 オートファジー関連因子による自然免疫応答の制御  
 第 8 回オートファジー研究会, 招待講演, 札幌, 2014 年 11 月 11 日
  7. Tatsuya Saitoh  
 Regulation of innate immune response by autophagy.  
 The 2014 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists, Invited speaker, Seoul, Korea, Nov. 7, 2014
  8. 齊藤達哉  
 NLRP3 インフラマソームを介した炎症応

- 答の理解とその制御  
日本リウマチ学会 第1回アニュアルベ  
シクコースレクチャー,招待講演,東京,  
2014年10月25日
9. 齊藤達哉  
自然免疫応答における細胞内微細構造体  
の役割  
第87回日本生化学会大会,シンポジウム  
招待講演,京都,2014年10月17日
10. 齊藤達哉  
痛風発作の分子機構  
日本痛風・核酸代謝学会 第25回痛風研  
修会,招待講演,東京,2014年9月7日
11. 齊藤達哉  
自然免疫応答の制御におけるオートファ  
ジーの役割  
日本病態プロテアーゼ学会,ワークショッ  
プ招待講演,豊中,2014年8月8日
12. 齊藤達哉  
NLRP3 インフラマソームを介した炎症応  
答の理解とその制御  
第23回日本 Cell Death 学会学術集会,シ  
ンポジウム招待講演,東京,2014年7月  
19日
13. 齊藤達哉  
NLRP3 インフラマソームと炎症性疾患  
第58回日本リウマチ学会総会・学術集会,  
シンポジウム招待講演,東京,2014年4  
月25日
14. Tatsuya Saitoh  
Understanding and manipulation of  
NLRP3-inflammasome.  
The 22nd International Symposium on  
Molecular Cell Biology of Macrophages,  
Invited speaker, Kobe, Japan, Jun. 2,  
2014
15. 齊藤達哉  
自然免疫応答の制御における細胞内分解  
系の役割  
日本薬学会第134年会,奨励賞受賞講演,  
熊本,2014年3月28日
16. Tatsuya Saitoh  
Regulation of innate immune response  
by autophagy.  
17th Biennial Meeting of Society for Free  
Radical Research International, Invited  
speaker, Kyoto, Japan, Mar. 26, 2014
17. 齊藤達哉  
NLRP3 インフラマソームの活性化に起因  
する痛風の発症  
第47回日本痛風・核酸代謝学会総会,シ  
ンポジウム招待講演,神戸,2014年2月  
21日
18. 齊藤達哉  
自然免疫を介した炎症応答の制御におけ  
るオートファジーの役割  
第7回オートファジー研究会,一般口頭発  
表,掛川,2013年12月21日
19. Tatsuya Saitoh  
Visualization of innate immune response

- occurring in cellular  
microcompartments.  
第42回日本免疫学会総会,シンポジウム  
招待講演,幕張,2013年12月11日
20. 齊藤達哉, Lee Hanna, 児崎達哉, 三澤  
拓馬, 高濱充寛, 佐藤荘, 竹内理, 齊藤愛  
記, 山岡昇司, 山本直樹, 松浦善治, 駒野  
淳, 審良静男  
RNA ウイルスに対する感染防御応答にお  
ける Zinc-finger antiviral protein の役割  
第36回日本分子生物学会年会,ポスター  
発表,神戸,2013年12月4日
21. 齊藤達哉, 審良静男  
オートファジー関連因子による自然免疫  
の制御  
第86回日本生化学会大会,シンポジウム  
招待講演,横浜,2013年9月11日
22. 齊藤達哉, 三澤拓馬, 審良静男  
微小管を介したミトコンドリアの局在変  
化は NLRP3 インフラマソームの活性化を  
促進する  
第22回日本 Cell Death 学会学術集会,シ  
ンポジウム招待講演,京都,2013年7月  
20日
23. 齊藤達哉, 三澤拓馬, 審良静男  
化合物ライブラリースクリーニングによ  
る NLRP3 インフラマソーム阻害剤の同定  
日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会,  
一般演題口頭発表,東京,2013年6月21  
日

〔図書〕(計1件)

Tatsuya Saitoh  
Regulation of intracellular dsDNA-induced  
innate immune responses by  
autophagy-related proteins.  
Biological DNA Sensor (1st Edition),  
Academic Press (Elsevier), 2013, Chapter 4,  
83-100. (英文)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 達哉 (Saitoh, Tatsuya)  
大阪大学微生物病研究所・准教授  
研究者番号：60456936

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：