

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461481

研究課題名(和文) IL-1を分子標的とする低分子化合物を用いた炎症性疾患の治療法の開発

研究課題名(英文) Interleukin-1 targeting therapy using low molecular weight compounds in inflammatory disorder

研究代表者

右田 清志 (Migita, Kiyoshi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60264214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性期蛋白である血清アミロイドA蛋白は、好中球に作用し、IL-1 の遺伝子発現を誘導するだけでなく、NLRP3インフラマソームを活性化し、単独で活性型IL-1 の産生を誘導することを明らかにした。SAAによるNLRP3インフラマソームの活性化によるSpleen tyrosine kinase(Sykキナーゼ)の活性化が関与しており、Sykキナーゼの阻害剤であるR406にブロックされる。生理的条件化においてアミロイド蛋白を介したインフラマソームの活性化がヒト自然免疫系で生じていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the proinflammatory effects of SAA in vitro in relation to the NLRP3 inflammasome in neutrophils. SAA stimulation induced pro-IL-1 mRNA expression in neutrophils. Furthermore, SAA engaged the caspase-1-activating inflammasome, resulting in the production of active IL-1. SAA-induced pro-IL-1 expression was marginally suppressed by the Syk specific inhibitor, R406, and SAA-induced pro-IL-1 processing in neutrophils was prevented by R406. Furthermore, SAA-induced NLRP3 mRNA expression was completely blocked by R406. Analysis of intracellular signaling revealed that SAA stimulation activated the tyrosine kinase Syk and mitogen-activated protein kinase (MAPK). These results demonstrate that the innate neutrophil immune response against SAA involves a two-step activation process: an initial signal promoting expression of pro-IL-1 and a second signal involving Syk-dependent activation of the NLRP3 inflammasome, allowing processing of pro-IL-1.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：IL-1 インフラマソーム 好中球 TNF- カスパーゼ1 NOD様受容体 サイトカインネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 自己炎症疾患は、自己免疫疾患と異なり、自己抗体の関与を認めない慢性炎症性疾患で、周期性発熱症候群から、小児特発性関節炎、ベーチェット病、通風、成人発症スチル病などのリウマチ性疾患がふくまれる。本疾患の特徴は、外因性(菌体成分)、内因性(尿酸、コレステロール結晶)の危険シグナルに自然免疫系の細胞が、過剰に反応した場合に発症すると考えられている。この過剰な免疫応答は、危険シグナル(danger signal)の細胞内センサーである NOD 様受容体(NLR)が、アダプター蛋白である ASC、Caspase-1 と重合し、最終的に Caspase-1 の活性化、活性型の IL-1 $\beta$  が産生され生じる炎症(自己炎症)で特徴づけられる。(図 2) 従って、関節リウマチなどの自己免疫疾患と異なり、治療標的となるサイトカインは、TNF、IL-6 ではなく IL-1 である。また自己炎症は、自己免疫とは全く異なる現象ではなく、自己炎症の過程で産生される IL-1、IL-18 は Th17、Th1 細胞の誘導に関わっており、自己免疫疾患の発症のトリガーとなり自己免疫疾患の病態に関与している。さらに自己炎症は、common disease である痛風に加え、コレステロール結晶に起因して生じる動脈硬化の病態形成にも重要な役割を果たしている。

(2) 本研究では、自己炎症疾患の病態の中心であるインフラマソームを介した IL-1 の産生の過程を、低分子化合物を用い制御することで、新たな治療法の開発を目指す。具体的には、低分子化合物を用いインフラマソーム活性化に必要な、NOD 様受容体の下流の炎症シグナル、Spleen tyrosine kinase の産生を阻害する。インフラマソーム活性化以降の経路において、低分子化合物を用いた IL-1 産生阻害を自己炎症疾患(病態)の治療に応用することを最終的な目標とする。

## 2. 研究の目的

自己炎症疾患は、自然免疫系の細胞が、外因性、内因性のストレス分子に対する過剰な免疫応答で、最終的に、産生された IL-1 $\beta$  に産生に起因する慢性炎症疾患である。自己免疫疾患と異なり、自己抗体、自己反応性 T 細胞の関与はないが、ストレス分子を認識する NOD 様受容体(NLRs)、その下流の細胞内シグナルによるインフラマソームの活性化とそれに伴う IL-1 $\beta$  の産生が、病態の中心である。海外ではすでに IL-1 に対する抗体医薬が自己炎症疾患の治療に用いられているが、本研究では、NOD 様受容体からインフラマソーム活性化に重要なシグナル分子を明らかにし、これら分子を標的とする新たな治療法を開発することを目標とする。つまり抗体医薬ではなく、低分子化合物による IL-1 の分子標的療法を確立し、自己炎症疾患の新しい治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 【好中球の培養】健常人末梢血(ヘパリン採血管 10ml)より、比重遠沈法にてヒト好中球を分離した。分離した好中球は、12well plate に  $5 \times 10^5$ /ml の細胞濃度で 10%FBS を添加した RPMI1640 培養液で培養を行った。これら好中球をリコンビナント血清アミロイド A (rSAA, ペプロテック社)で刺激した。

(2) 【サイトカインの測定】好中球を rSAA (1~10 $\mu$ g/ml)で刺激し、その培養上清を回収し、培養上清中の IL-1 $\beta$  ELISA キット(R&D 社)、cleaved caspase-1 を caspase-1 (p20) ELISA キット(R&D 社)で測定した。

(3) 【遺伝子発現】ヒト好中球を rSAA で刺激し、6 時間後に mRNA を抽出し、mRNA から cDNA を作製し、IL-1 $\beta$  の mRNA を real-time PCR (ロシュ社、light-cycler)で測定した。

(4) 【細胞内シグナル伝達】好中球を rSAA で刺激し(5~30min)、細胞を溶解し、cellular lysate を SDS-PAGE で電気泳動、メンブレンに転写後、抗リン酸化 spleen tyrosine kinase (抗リン酸化 Syk 抗体)でイムノブロットを行った。

## 4. 研究成果

### 【結果】

(1) 【サイトカイン産生】ヒト好中球を rSAA (1~10 $\mu$ g/ml)で刺激し、培養上清を回収し、ELISA 法で測定すると、用量依存性に IL-1 $\beta$  の産生が誘導された。また、同じ培養上清に SAA の用量依存性に、cleaved caspase-1 (p20) が検出された。さらに、培養上清を抗 IL-1 $\beta$  抗体を用いたイムノブロットで解析すると、pro-IL-1 $\beta$  が caspase-1 で切断され分泌される cleaved IL-1 $\beta$  (p17) が検出されることより、SAA は NLRP3 インフラマソームを活性化することで、好中球から活性型 IL-1 $\beta$  の分泌を誘導することがわかった。Syk 阻害剤である R406 で好中球を前処理し、rSAA 刺激すると、SAA で誘導される好中球の IL-1 $\beta$  産生はブロックされた。

(2) 【pro-IL-1 $\beta$  の mRNA の発現】ヒト好中球を rSAA で刺激すると、刺激後 6 時間後に pro-IL-1 $\beta$  の mRNA の発現が誘導された。Syk キナーゼの阻害剤である R406 は、SAA で誘導される pro-IL-1 $\beta$  の mRNA 発現を抑制するが、その抑制効果は部分的であった。

(3) 【細胞内シグナル伝達の解析】ヒト好中球を rSAA で刺激し、その cellular lysate を抗リン酸化 Syk 抗体でイムノブロットを行った結果、リン酸化 Syk のバンドが検出された。R406 は、この SAA 刺激で誘導される Syk のリン酸化をブロックすることがわかった。さらに、SAA で刺激した好中球の培養上清を、抗カスパーゼ 1 抗体でイムノブロットを行うと、活性型 Caspase-1 (p20) が検出されることより、SAA 刺激で好中球 NLRP3 インフラマソームの活性化が誘導されていることが示唆された。

(4) 【NLRP3 の発現に対する Syk 阻害剤の影

響】SAA で誘導される NLRP3 インフラマソームに NLRP3 の遺伝子発現が影響しているか検討した。好中球を SAA5ug/ml で刺激すると、刺激 4 時間後から NLRP3 の mRNA の発現が誘導された。Syk 阻害剤である R406 は、SAA で誘導される NLRP3 の mRNA をブロックすることがわかった。

(5) 【SAA 刺激による Syk キナーゼの活性化】好中球を SAA で刺激し、その lysate を抗チロシンリン酸化抗体でイムノブロットを行うと、50~80KDa の分子量近傍にリン酸化蛋白のバンドが検出され、これらリン酸化蛋白のバンドは、Syk 阻害剤 R406 の前処置にて消失した。次に、好中球を SAA で刺激し、その lysate から Syk 免疫沈降し、抗リン酸化 Syk 抗体でイムノブロットを行った。SAA 刺激で Syk のリン酸化が誘導され、この Syk のリン酸化は R406 の前処置でブロックされることがわかった。

#### 【考察】

NLRP3 インフラマソームの活性化には、プライミックスステップによる pro-IL-1 $\beta$  の誘導と、活性化ステップによる NLRP3 の活性化による pro-IL-1 $\beta$  のカスパーゼによる二つのステップが必要と考えられていた。今回の検討により、血清アミロイド A 蛋白 (SAA) は単独で pro-IL-1 $\beta$  の遺伝子発現、NLRP3 の活性化を誘導し、活性型 IL-1 $\beta$  の産生を誘導することが明らかになった。同様の現象は、ヒト単球でも確認されていたが、好中球においても同様の現象が生じることを初めて明らかにした。SAA は鋭敏な急性期蛋白であり、炎症の際は、基準値の 1000 倍以上に上昇することが知られている。今回用いた SAA の濃度は、1~10 $\mu$ g/ml と非常に低濃度であり、生体においては動脈硬化等の subclinical inflammation でも十分到達する濃度である。今回の検討において、非常に低い生理的濃度の SAA 刺激によって好中球の NLRP3 インフラマソームが活性化され、活性型の IL-1 $\beta$  が誘導されることが明らかになった。以上の結果は、ヒトのさまざまな炎症病態において生体内で好中球のインフラマソームの活性化、IL-1 $\beta$  の産生で代表される自己炎症が容易に生じて炎症病態のさらなる永続化を誘導することを示唆している。これら SAA を介した自己炎症サイクルの制御法の一つとして、低分子化合物を用い、Syk キナーゼ活性化の阻害が有効であることが示された。

#### 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)

Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Fukui S, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Yoshiura KI, Eguchi K, Kawakami A.

MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  pathway. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(4):718-726. doi:10.1093/rheumatology/kex451.

Koga T, Kawashiri SY, Migita K, Sato S, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Nonaka F, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Eguchi K, Kawakami A.

Comparison of serum inflammatory cytokine concentrations in familial Mediterranean fever and rheumatoid arthritis patients.

*Scand J Rheumatol*. 2017 Sep 2:1-3.

doi:10.1080/03009742.2017.1363281.

[Epub ahead of print]

Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Nakamura M, Nakamura T, Agematsu K, Masumoto J, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K.

Serum amyloid A induces NLRP-3-mediated IL-1 $\beta$  secretion in neutrophils.

*PLoS One*. 2014 May 20;9(5):e96703.

doi: 10.1371/journal.pone.0096703.

eCollection 2014.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 清志 (MIGITA, Kiyoshi)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60264214

(2)研究分担者

増本 純也 (MASUMOTO, Junya)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授  
研究者番号：20334914

川上 純 (KAWAKAMI, Atsushi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90325639

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )