

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860699

研究課題名(和文) 脂質代謝経路への介入による新規の自然炎症制御方法の確立

研究課題名(英文) Regulation of NLRP3 inflammasome by modulation of lipid metabolisms

研究代表者

唐澤 直義 (Karasawa, Tadayoshi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60631893

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)：飽和脂肪酸はマクロファージにおいて危険シグナルの認識機構であるNLRP3インフラマソームを活性化し、IL-1betaの放出を引き起こす。しかしながら、その詳細な分子機序は明らかになっていなかった。本研究では、飽和脂肪酸によるNLRP3インフラマソームの活性化が不飽和脂肪酸により抑制されることを明らかにした。また、不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸により引き起こされるリソソーム傷害から保護することが明らかになった。これらの結果から飽和脂肪酸過多の脂肪酸組成はリソソーム傷害を介してNLRP3インフラマソームが活性化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Saturated fatty acids (SFAs) provoke NLRP3 inflammasome activation and subsequent IL-1beta release in macrophages. However, precise mechanisms by which SFAs activate NLRP3 inflammasome remain unclear. In this study, we clarified inflammasome activation provoked by SFAs was attenuated by treatment with unsaturated fatty acids (USFAs). Furthermore, SFA-induced lysosomal dysfunction was recovered by treatment with USFAs. These results suggest that lysosomal dysfunction induced by SFA overload provokes activation of NLRP3 inflammasome.

研究分野：代謝学

キーワード：飽和脂肪酸 炎症 サイトカイン マクロファージ インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患は日本人の死因の上位を占め、予防、治療法の確立は急務である。脂質異常症はその重要なリスク因子であるが、その量的な管理だけでは十分ではない。申請者は最近、脂肪酸合成系を支配する転写因子 SREBP-1 や、その標的遺伝子である脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の欠損マウスの解析から脂質の量的な改善とともに、脂肪酸の質的变化が、動脈硬化の進展に重要であることを明らかにした (Karasawa T. et al. *ATVB*, 2011 31 (8) : 1788-95; Saito R. et al. *ATVB*, 2011 31 (9) : 1973-1979)。一方、代謝病態に共通の病態として炎症が関与することが知られるようになってきたが、その惹起機序として自然免疫における危険シグナルの受容体であるパターン認識受容体の重要性が明らかになってきた。特に、NLRP3 インフラマソームはカスパーゼ-1 の活性化を介して炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を制御する分子複合体であるが、飽和脂肪酸やセラミドなどの脂質分子やコレステロール結晶を危険シグナルとして感知することから、脂質の蓄積からの炎症の惹起機序として着目されている。インフラマソーム活性を制御する方法を見出すことは代謝性疾患の治療戦略の上で非常に有用と考えられるが、インフラマソームは感染防御においても重要であり、その欠損は重篤な免疫不全をきたす可能性もある (*Nat Immunol* 13:325, 2012)。申請者自身もこれまでに、カスパーゼ-1 の活性調節を目的として、そのホモログ遺伝子群 COPs の機能の解明に取り組んできたが、カスパーゼ-1 活性化の下流に対する介入は広範な炎症応答に影響を与えてしまうことを観察している。従って、インフラマソーム応答を代謝性疾患の治療に応用するためには、標的疾患に対して特異的に活性化経路を制御する必要がある。以上より、申請

者は代謝性疾患特異的にインフラマソーム活性化を制御する方法として、代謝性の危険シグナルに対し、より上流の代謝経路から介入することが有効であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では代謝性の危険シグナルによるインフラマソーム活性化を防ぐことで、代謝性疾患に特異的なインフラマソーム制御経路の確立を目指す。特にインスリン抵抗性を中心とした代謝病態の発症に重要であると推測される飽和脂肪酸によって引き起こされるインフラマソームの活性化について脂質代謝への介入により制御することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の組成がインフラマソーム活性化に及ぼす影響の解析
LPS 前処理したマウス腹腔マクロファージに対し、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C16:0)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1) を負荷した際の培養上清中の IL-1 β について ELISA 法により評価した。また、インフラマソームの直接の活性の指標であるカスパーゼ-1 の活性について評価した。さらに、インフラマソームの活性化を間接的に評価する方法としてマウスマクロファージ培養細胞株 J774 にヒト IL1B 遺伝子を導入した細胞 (J774-hIL1B) 細胞を樹立し同様に脂肪酸負荷した際のヒト IL-1 β 産生を評価した。

(2) 脂肪酸の鎖長がインフラマソーム活性化に及ぼす影響の解析
LPS 前処理した野生型、及び Elovl6 欠損マウス由来腹腔マクロファージに対し、パルミチン酸、オレイン酸を負荷した際の培養上清中の IL-1 β について ELISA 法により評価した。

(3) 脂肪酸 Acyl-CoA 合成酵素の阻害がインフラマソーム活性化に及ぼす影響の解析

脂肪酸 Acyl-CoA 合成酵素 Triacsin C を前処理した J774-hIL1B 細胞に対し、パルミチン酸、オレイン酸を負荷した際の培養上清中のヒト IL-1 β について ELISA 法により評価した。また、Triacsin C 処理下における細胞内遊離脂肪酸量について定量した。

(4) 飽和脂肪酸がリソソーム傷害に及ぼす影響の解析

J774-hIL1B 細胞に対し、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸を負荷した際のリソソーム傷害について酸性 pH を標識する蛍光プローブである AcidiFluor ORANGE により評価した。

4. 研究成果

(1) 飽和脂肪酸により引き起こされるインフラマソーム活性化は不飽和脂肪酸により抑制される

LPS 前処理されたマウス腹腔マクロファージに対し、パルミチン酸、ステアリン酸の飽和脂肪酸を処理することにより、顕著な IL-1 β の産生が認められた。これに対し、オレイン酸を共処理することにより、IL-1 β の産生は抑制された。また、カスパーゼ-1 活性についてもパルミチン酸の負荷により増加が認められたが、オレイン酸の共処理により、抑制された。J774-hIL1B 細胞からのヒト IL-1 β 産生についても同様の結果が認められた。このことから、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の組成が飽和脂肪酸過多に傾くとインフラマソームの活性化が引き起こされることが示された。

(2) 内因性飽和脂肪酸の伸長反応の阻害はパルミチン酸によるインフラマソーム活性化を抑制しない

LPS 前処理した野生型、及び、Elov16 欠損マウス腹腔マクロファージに対し、パルミチン酸処理した際の IL-1 β 産生について評価を行ったが、両群間に差は認められなかった。

(3) 脂肪酸 Acyl-CoA 合成酵素の阻害は飽和脂肪酸によるインフラマソーム活性化を増強

する

脂肪酸 Acyl-CoA 合成酵素を阻害する Triacsin C を J774-hIL1B 細胞に処理した所、IL-1 β の産生が認められた。また、Triacsin C により J774-hIL1B 細胞を前処理した後、パルミチン酸による刺激を行うと、IL-1 β の産生は相加的に増加した。さらに、Triacsin C とパルミチン酸処理を行った細胞の遊離脂肪酸含量を測定すると増加が認められた。これらの結果から細胞内の遊離脂肪酸含量の増加によりインフラマソームの活性化が引き起こされることが示された。

(4) 飽和脂肪酸により引き起こされるリソソームの傷害は不飽和脂肪酸により抑制される

J774-hIL1B 細胞に対して、パルミチン酸を負荷すると AcidiFluor ORANGE 陽性にて示されるリソソームの減少が認められた。しかしながら、オレイン酸を共処理することにより、リソソームの減少は抑制された。これらの結果により、飽和脂肪酸負荷により増加した細胞内の遊離脂肪酸がリソソームの傷害を介して IL-1 β の産生を引き起こしていることが推測された。

本研究では飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが飽和脂肪酸過多に傾くとリソソーム傷害を介した NLRP3 インフラマソーム活性化が引き起こされることを明らかにした。このことは飽和脂肪酸による炎症惹起機序を明らかにするとともに、脂肪酸組成の飽和／不飽和比を適切に保つことが代謝病態における炎症を制御する上で有効である可能性を示している。

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 9 件)

1. Karasawa T, Kawashima A, Usui F, Kimura H, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushima Y, Sagara J,

Takahashi M. Oligomerized CARD16 promotes caspase-1 assembly and IL-1beta processing. *FEBS Open Bio* 5: 348-356, 2015.

2. Shirasuna K, Karasawa T (equal contribution), Usui F, Kobayashi M, Komada T, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Taniguchi S, Takahashi M. NLRP3 deficiency improves angiotensin II-induced hypertension but not fetal growth restriction during pregnancy. *Endocrinology* 156: 4281-4292, 2015.

3. Karasawa T, Takahashi M. RIP140 as a novel therapeutic target in the treatment of atherosclerosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* 81: 136-138, 2015.

4. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Yoshimura K, Aoki H, Tsutsui H, Noda T, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vascular Biology* 35: 127-136, 2015.

5. Kimura H, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Suzuki K, Iwasaki Y, Yada T, Caturegli P, Takahashi M. Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency improves obesity and metabolic disorders. *Sci Rep* 5: 15883, 2015.

6. Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Mizukami H, Ohkuchi A, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Ozawa K, Taniguchi S, Takahashi M. Nanosilica-induced placental inflammation and pregnancy complications:

Different roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC.

Nanotoxicology 9: 554-567, 2015.

7. Mizushina Y, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y, Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 290: 5065-5077, 2015.

8. Komada T, Usui F, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Inoue Y, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes for rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Sci Rep* 5: 10901, 2015.

9. Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Dezaki K, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol* 192: 4342-4351, 2014.

[学会発表] (計 3件)

- ① 唐澤 直義, 白井 文武, 川島 晃, 木村 博昭, 高橋 将文, 飽和脂肪酸によるインフラマソーム活性化機構の解析, 第48回日本動脈硬化学会 学術集会, 2016年7月15日, 京王プラザホテル (東京)
- ② 唐澤 直義, 白井 文武, 川島 晃, 木村 博昭, 高橋 将文, 脂肪酸結晶によるNLRP3 インフラマソームを介した炎症惹起機構の解析, 第37回日本炎症・再生

医学会，2016年6月16日，京都市勧業館みやこめッセ（京都）

- ③ 唐澤 直義，木村 博昭，臼井 文武，川島 晃，高橋 将文，脂質代謝異常におけるASCの役割，第36回日本炎症・再生医学会，2015年7月21日，虎ノ門ヒルズフォーラム（東京）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/inflammation/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐澤 直義 (KARASAWA, Tadayoshi)

自治医科大学 医学部 助教

研究者番号：60631893