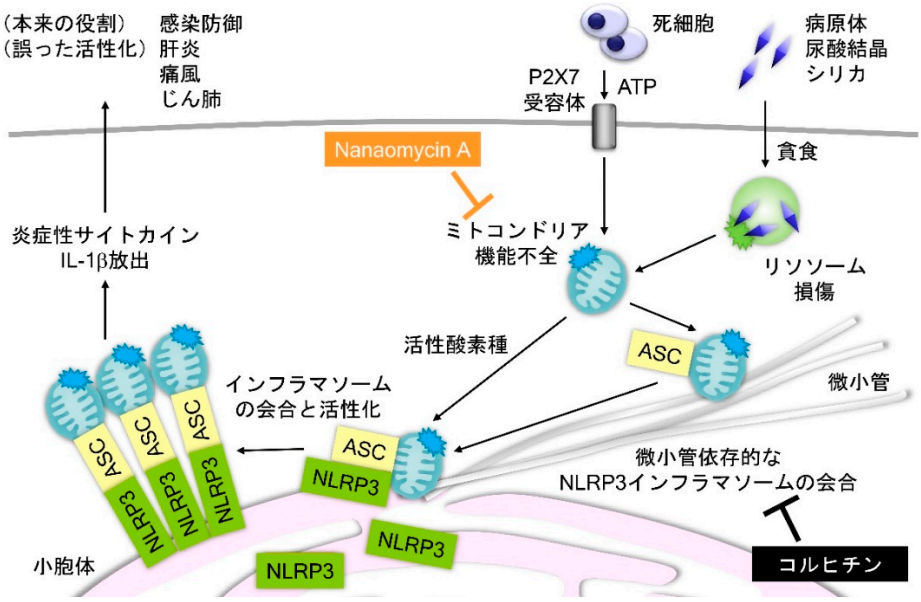
42　活性酸素種を介した自然免疫活性化の機序と意義の解明	齊藤　達哉

【目的】病原体成分をパターン認識受容体により感知した自然免疫機構は、適切なレベルのサイトカインやインターフェロンを産生することにより、生体を防御する。一方で、病原体が制御できる範囲を超えて増殖した際に、過剰な病原体成分に晒された自然免疫機構は、サイトカインストームなどの過度の炎症を惹起して組織障害を引き起こす。さらに、過度に摂取した栄養成分の代謝物や死細胞から放出された刺激性成分などに反応した自然免疫機構は、生活習慣病や急性組織障害などの発症要因となる。NLRP3 インフラマソームは、このような正負の両面性を有する代表的な自然免疫機構であり、様々な疾患の発症に深く関わっている。本研究では、NLRP3 インフラマソームの活性化を促進することが知られている活性酸素種に着目し、制御機序の解明と制御化合物の同定に取り組んだ。

【方法】本研究には、生後 6〜9 週齢の C57BL/6 マウスを用いた。骨髄由来マクロファージは、C57BL/6 マウスの後肢から造血幹細胞を単離した後、Macrophage colony stimulating factor を加えた RPMI 培地で培養を行うことにより分化誘導した。腹腔マクロファージは、チオグリコレートを投与した C57BL/6 マウスから単離した。Interleukin (IL)-1β は、ELISA により測定した。好中球の数は、フローサイトメーターにより CD11b(+)Ly6g(+)細胞を検出して測定した。ミトコンドリア由来の活性酸素種のレベルは、フローサイトメーターにより MitoSOX を検出して測定した。アセトアミノフェン誘導性肝炎や尿酸結晶／シリカ粒子誘導性腹膜炎などのマウス実験は、過去の論文を参考に行った。

【結果】NLRP3 インフラマソームをより特異的に、より強力に抑制する化合物を求めて、スクリーニングを行った。最終的に、グラム陽性細菌であるストレプトマイセス属が産生する抗生物質として知られている Nanaomycin A およびその類似体を、NLRP3 インフラマソームを阻害する化合物として同定した。そこで、Nanaomycin A の作用機序解明と有用性検証を行い、以下 1〜3 の成果を得た。1. Nanaomycin A は、ATP や尿酸結晶で刺激したマクロファージにおいて、活性酸素種の産生を抑制し、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出を阻害する。2. Nanaomycin A は、ATP による NLRP3 インフラマソームの活性化が引き起こすアセトアミノフェン誘導性肝炎マウスモデルにおいて保護的に働く。3. Nanaomycin A は、尿酸結晶などの腹腔内投与が引き起こす痛風マウスモデルにおいて、治療効果を示さない。

NLRP3 インフラマソームの活性化と化合物による抑制



42. 活性酸素種を介した自然免疫活性化の機序と意義の解明

齊藤　達哉

*徳島大学 先端酵素学研究所 炎症生物学分野

Key words：炎症，オルガネラ，活性酸素種，自然免疫

緒　言

病原体成分をパターン認識受容体により感知した自然免疫機構は、適切なレベルのサイトカインやインターフェロンを産生することにより、生体を防御する［1，2］。一方で、病原体が制御できる範囲を超えて増殖した際に、過剰な病原体成分に晒された自然免疫機構は、サイトカインストームなどの過度の炎症を惹起して組織障害を引き起こす。さらに、過度に摂取した栄養成分の代謝物や死細胞から放出された刺激性成分などに反応した自然免疫機構は、生活習慣病や急性組織障害などの発症要因となる。NLRP3 インフラマソームは、このような正負の両面性を有する代表的な自然免疫機構であり、様々な疾患の発症に深く関わっている。NLRP3 インフラマソームは、自然免疫に関わるパターン認識受容体である NLRP3、下流のアダプター因子 ASC やプロテアーゼ Caspase-1 からなる複合体であり、炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-1β の放出を介して炎症を惹起する。NLRP3 インフラマソームの本来の役割は、A 群レンサ球菌、カンジダ、インフルエンザウイルスなどの病原体に応答し、炎症を介してその排除を行うことである。一方で、NLRP3 インフラマソームは、死細胞から放出される ATP や過栄養により体内に蓄積する尿酸などに反応して誤って活性化し、非感染性の炎症を通じて肝炎や痛風などの発症要因となることがある（図 1）。そこで我々は、特異的かつ低毒性な NLRP3 インフラマソーム阻害化合物を同定し、当該化合物を継続的に摂取することにより、生活習慣病を予防・治療する手法を開発することを目指して研究を行っている。

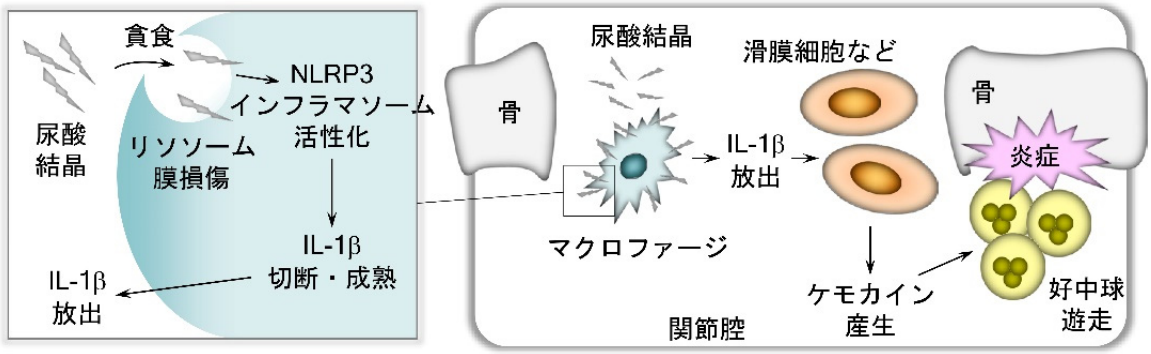


図 1. 尿酸結晶による痛風の発症

関節腔内に蓄積した尿酸結晶は、マクロファージなどの自然免疫担当細胞に貪食された際に、NLRP3 インフラマソームを介した炎症性サイトカイン IL-1β の産生を誘導する。IL-1β は周囲の細胞を刺激し、ケモカインの産生を誘導する。ケモカインは、関節腔内への好中球などのエフェクター細胞の遊走を誘導し、炎症による組織損傷を惹起する。

*現在の所属：大阪大学 大学院薬学研究科 生体応答制御学分野

方　法

本研究には、生後 6～9 週齢の C57BL/6 マウスを用いた。骨髄由来マクロファージは、C57BL/6 マウスの後肢から造血幹細胞を単離した後、Macrophage colony stimulating factor を加えた RPMI 培地で培養を行うことにより分化誘導した。腹腔マクロファージは、チオグリコレートを投与した C57BL/6 マウスから単離した。IL-1β は、ELISA により測定した。好中球の数は、フローサイトメーターにより CD11b(+)Ly6g(+)細胞を検出して測定した。ミトコンドリア由来の活性酸素種のレベルは、フローサイトメーターにより MitoSOX を検出して測定した。アセトアミノフェン誘導性肝炎や尿酸結晶／シリカ粒子誘導性腹膜炎などのマウス実験は、過去の論文を参考に行った［3，4］。

結　果

1. Nanaomycin A は活性酸素種を介した NLRP3 インフラマソームの活性化を抑制する

これまでの研究において、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ている［5，6］。しかしながら、コルヒチンは微小管の重合を破壊するため毒性が高く、長期間にわたり継続して摂取することは難しい。また、コルヒチンの NLRP3 インフラマソームに対する阻害効果は完全ではなく、限定的である。そこで、NLRP3 インフラマソームをより特異的に、より強力に抑制する化合物を求めて、スクリーニングを継続した。最終的に、Nanaomycin A およびその類似体を、NLRP3 インフラマソームを阻害する化合物として同定した。Nanaomycin A は、グラム陽性細菌であるストレプトマイセス属が産生する抗生物質として、大村智博士により同定された化合物である［7］。しかしながら、Nanaomycin A およびその類似体が炎症の誘導に与える影響はこれまでに解析されていない。

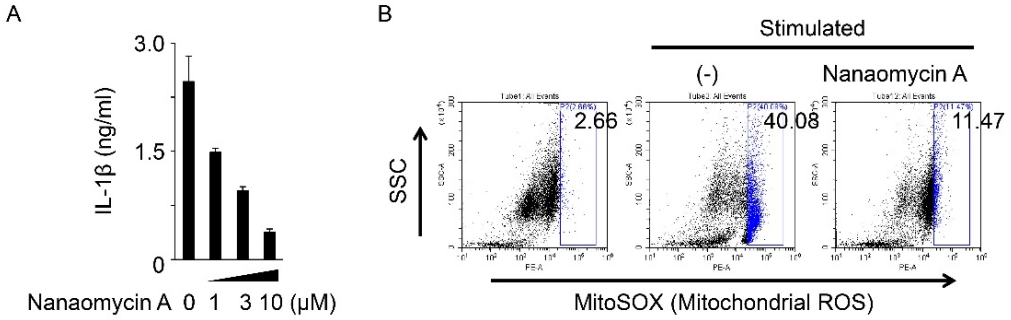


図 2. Nanaomycin A による活性酸素種産生および NLRP3 インフラマソーム活性化の抑制

(A) Nanaomycin A は、マウスマクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出を抑制する。IL-1β は ELISA により測定した。

(B) Nanaomycin A は、マウスマクロファージにおいて、ミトコンドリア由来の活性酸素種の産生を抑制する。ミトコンドリア由来の活性酸素種は MitoSOX により測定した。

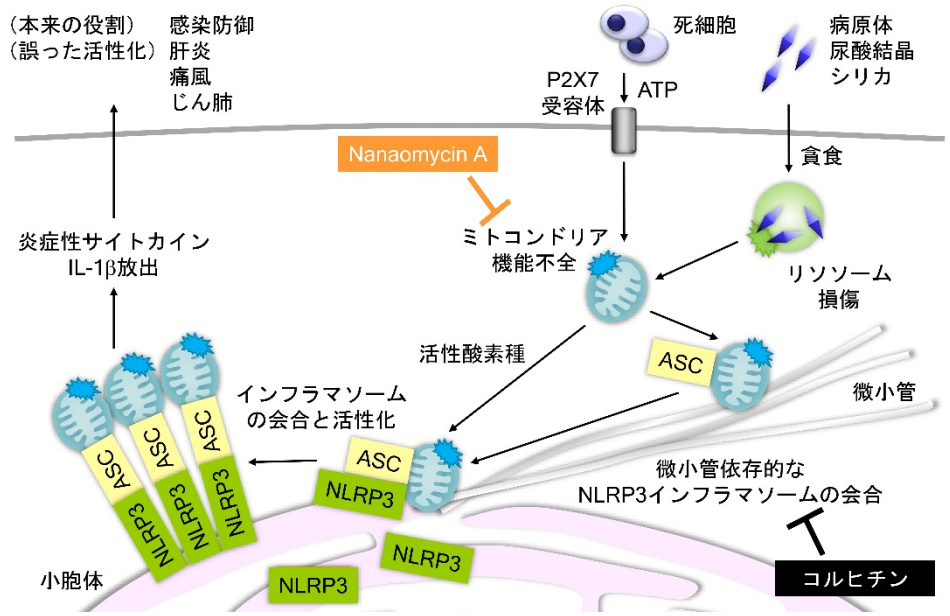


図 3. NLRP3 インフラマソームの活性化機序

尿酸結晶などの微粒子は、マクロファージなどの自然免疫担当細胞に貪食された際にリソソーム膜の損傷を引き起こす。続いて、リソソームから漏出した内容物が、ミトコンドリアの機能不全を引き起こす。また、死細胞から放出された ATP は P2X7 受容体を刺激し、ミトコンドリアの機能不全を引き起こす。機能不全に陥ったミトコンドリアは、活性酸素種の産生と NAD^+の低下を引き起こす。活性酸素種は NLRP3 インフラマソームの直接的な活性化を誘導し、NAD^+の低下は NLRP3 インフラマソームの会合を誘導する。Nanaomycin A は、ミトコンドリアの機能不全を阻害するため、強力に NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する。

以上を踏まえて研究を進め、以下の結果を得た。Nanaomycin A およびその類似体で処理したマウス腹腔マクロファージでは、ATP や尿酸結晶などに応じて誘導される NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出が阻害された（図 2）。同様に、Nanaomycin A およびその類似体で処理したマウス骨髄由来マクロファージでも、ATP や尿酸結晶などに応じて誘導される NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出が阻害された。

NLRP3 インフラマソームの活性化には、ミトコンドリアの機能不全とそれに伴う活性酸素種の産生が関わっている（図 3）。Nanaomycin A およびその類似体で処理したマウス骨髄由来マクロファージでは、ATP や尿酸結晶などに応じて誘導されるミトコンドリアの機能不全に伴う活性酸素種の産生が抑制された（図 2）。また、Nanaomycin A およびその類似体で処理したマウス骨髄由来マクロファージでは、ATP や尿酸結晶などに応じて誘導されるミトコンドリアの形態変化も抑制された。

2. Nanaomycin A は肝炎を抑制する

Nanaomycin A およびその類似体が NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出を阻害したことから、ATP による NLRP3 インフラマソームの活性化が誘発する疾患マウスモデルを用いて解析した。アセトアミノフェンを過剰投与したマウスにおいては、肝炎が誘発される。この肝炎は、ATP による P2X7 受容体刺激を介した NLRP3 インフラマソームの活性化により引き起こされることが明らかになっている［3～4］。そこで、Nanaomycin A を腹腔内投与したマウスと投与していないマウスにおいて、アセトアミノフェン過剰投与に対する感受性を検証した。解析の結果、Nanaomycin A の投与はアセトアミノフェンによる生存率の低下を防ぐことが明らかになった（図 4）。

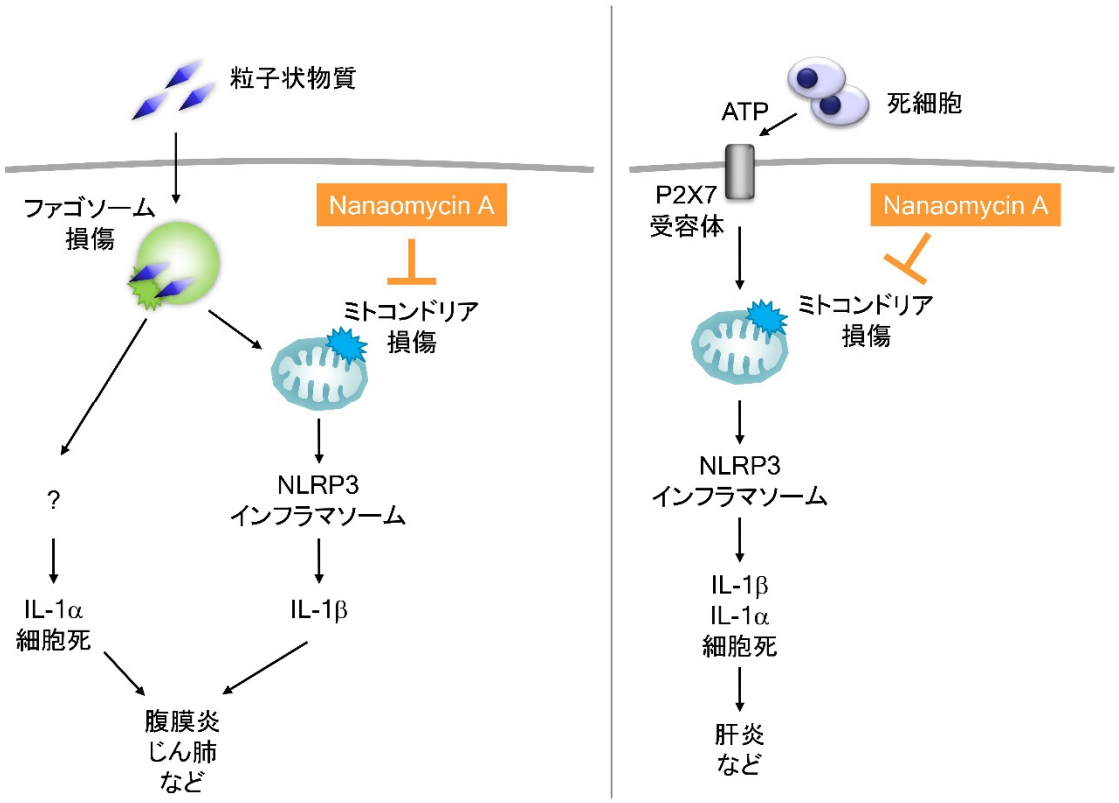


図 4. ATP による炎症と粒子状物質による炎症

ATP は、P2X7 受容体を刺激することにより NLRP3 インフラマソームを活性化する。NLRP3 インフラマソームは IL-1β 放出に加えて、細胞死や IL-1α放出を誘導する。尿酸結晶やシリカなどの粒子状物質は、NLRP3 インフラマソームを活性化して、IL-1β 放出を誘導する。一方で、尿酸結晶やシリカなどの粒子状物質は、NLRP3 インフラマソーム非依存的に、細胞死や IL-1α放出を誘導する。NLRP3 インフラマソームを阻害する Nanaomycin A は、ATP による炎症を抑制することが出来るが、粒子状物質による炎症を抑制するには不十分である。

3. Nanaomycin A は腹膜炎を抑制できない

Nanaomycin A およびその類似体が NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出を阻害したことから、尿酸結晶やシリカ粒子が誘発する腹膜炎に対する効果を検証した。この実験系は、痛風の疾患モデルとして用いられており、腹腔内への好中球の遊走は炎症の程度を判断するバロメーターをして用いられる。そこで、Nanaomycin A を投与したマウスと投与していないマウスにおいて、尿酸結晶やシリカ粒子の投与による腹膜炎の症状を検証した。解析の結果、Nanaomycin A を投与しても、尿酸結晶やシリカ粒子の投与による腹腔内への好中球の遊走を阻害することは出来ないことが明らかになった（図 4）。Nanaomycin A は腹腔内投与によりアセトアミノフェンによる肝炎を抑制することから、腹腔内で極端に安定性や効果が失われることなどは考えにくく、NLRP3 インフラマソームを特異的に阻害した場合には粒子状物質による炎症を抑えることが難しいと判断する方が妥当であろう。実際に、シリカ粒子による炎症の誘導には NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出よりも、当該機構を介さない IL-1α やプロスタグランジン E2 の放出の方が重要であることを示す論文も発表されている［8, 9］。Nanaomycin A は、粒子状物質による IL-1α の放出を抑制しないことも確認している。コルヒチンについては、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1β の放出に加えて、好中球などの炎症のエフェクター細胞の遊走も抑制することが出来るため、炎症を緩和する効果を発揮すると考えられる。

考　察

本研究では、ATP や尿酸などに応じた活性酸素種の産生を介した NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する化合物として、Nanaomycin A を同定した。一方で、Nanaomycin A がどのようにミトコンドリアの機能不全を防ぎ、NLRP3 インフラマソームを抑制するのか、その分子メカニズムは不明である。今後は、Nanaomycin A に結合する因子のスクリーニングや Nanaomycin A で処理したマクロファージのプロテオーム解析などを通じて、作用メカニズムの詳細を明らかにしていきたい。

また、Nanaomycin A は、ATP による P2X7 受容体刺激を介した NLRP3 インフラマソームの活性化が惹起する肝炎を防ぐことが明らかになった。Nanaomycin A は、ATP により惹起される炎症に起因する疾患の治療薬開発において、有望なリード化合物となると考えられる。今後は、細胞レベル、生体レベルのどちらにおいても、より高い特異性、より高い阻害活性を有する化合物を同定するため、有機化学の専門家と共に合成展開した Nanaomycin A 類似体の解析を進めていきたい。

意外なことに、Nanaomycin A は、尿酸結晶やシリカ粒子が誘発する腹膜炎を防ぐことが出来なかった。粒子状物質による炎症を抑えるためには、NLRP3 インフラマソームだけを抑制するだけでは不十分であり、炎症の誘導に関わる複数の反応を同時に抑制する必要があると考えられる。今後は、痛風だけでなく、動脈硬化などに対する治療薬開発に寄与することを目指して、粒子状物質による炎症を抑制する化合物のスクリーニングも進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素学研究所の髙濵充寛博士および北里大学北里生命科学研究所の野口吉彦博士、砂塚敏明博士である。

文　献

1) Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int Immunol. 2009 Apr;21(4):317-37. doi: 10.1093/intimm/dxp017.

2) Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. Nature. 2012 Jan 18;481(7381):278-86. doi: 10.1038/nature10759.

3) Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, Flavell RA, Mehal WZ. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. J Clin Invest. 2009 Feb;119(2):305-14. doi: 10.1172/JCI35958.

4) Cui BW, Bai T, Yang Y, Zhang Y, Jiang M, Yang HX, Wu M, Liu J, Qiao CY, Zhan ZY, Wu YL, Kang DZ, Lian LH, Nan JX. Thymoquinone Attenuates Acetaminophen Overdose-Induced Acute Liver Injury and Inflammation Via Regulation of JNK and AMPK Signaling Pathway. Am J Chin Med. 2019 Apr 11:1-18. doi: 10.1142/S0192415X19500307.

5) Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. Nat Immunol. 2013 May;14(5):454-60. doi: 10.1038/ni.2550.

6) Misawa T, Saitoh T, Kozaki T, Park S, Takahama M, Akira S. Resveratrol inhibits the acetylated α-tubulin-mediated assembly of the NLRP3-inflammasome. Int Immunol. 2015 Sep;27(9):425-34. doi: 10.1093/intimm/dxv018.

7) Omura S, Tanaka H, Koyama Y, Oiwa R, Katagiri M. Nanaomycins A and B, new antibiotics produced by a strain of Streptomyces. J Antibiot (Tokyo). 1974 May;27(5):363-5. doi: 10.7164/antibiotics.28.925

8) Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. Immunity. 2011 Apr 22;34(4):514-26. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.019.

9) Kuroda E, Ozasa K, Temizoz B, Ohata K, Koo CX, Kanuma T, Kusakabe T, Kobari S, Horie M, Morimoto Y, Nakajima S, Kabashima K, Ziegler SF, Iwakura Y, Ise W, Kurosaki T, Nagatake T, Kunisawa J, Takemura N, Uematsu S, Hayashi M, Aoshi T, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ. Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1α Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation. Immunity. 2016 Dec 20;45(6):1299-1310. doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.010.