

炎症性細胞死ピロトーシスのネクロティックコア形成における役割の解明

唐澤直義

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

【研究の背景】

NLRP3 インフラマソームは無菌性の危険シグナルを認識し、カスパーゼ-1 (Casp1) の活性化を介して炎症性サイトカインである IL-1 β の産生を制御する分子複合体である。我々は、動脈硬化における炎症の惹起機序として NLRP3 インフラマソームに着目し、その活性を担う Casp1 の欠損が動脈硬化における炎症惹起を抑制し、動脈硬化形成を抑制することを明らかにしてきた^{1, 2)}。動脈硬化に起因する心血管イベントの抑制にはプラークの安定性を保つことが重要である。死細胞や脂質コアにより形成されるネクロティックコアの増大はプラークの不安定化の主因となると考えられるが、その形成に関わる分子基盤は未解明な点が多く残されている。一方、NLRP3 インフラマソーム形成に続く Casp1 の活性化は IL-1 β の産生だけでなく、Gasdermin D をプロセッシングすることによって炎症性細胞死ピロトーシスを引き起こす²⁾。ピロトーシスは DNA の断片化などアポトーシスと部分的に類似した性質を示すプログラムされた細胞死であるが、細胞質成分の放出など、ネクローシスの特徴も示す。ピロトーシスはアポトーシスと異なり細胞質成分の自己消化を引き起こさないことから、ネクロティックコア形成への寄与が疑われる。

【目 的】

本研究では、ピロトーシス誘導における NLRP3 インフラマソームの役割を明らかにし、動脈硬化病変における Casp1 の制御がピロトーシスを抑制することでネクロティックコアを縮小できるかについて検討を行う。

【方 法】

- 1) NLRP3 インフラマソーム構成分子の欠損がマクロファージにおけるピロトーシスに及ぼす影響について評価を行うため、野生型マウス、NLRP3、ASC、及び Casp1 欠損マウスからチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを採取した。これら初代マクロファージに対し、コレステロール結晶、リン酸カルシウム結晶、Nigericin などの NLRP3 インフラマソーム活性化刺激を負荷し、LDH 放出及び SYTOXG 染色によりピロトーシスの評価を行った。
- 2) ネクロティックコア形成における Casp1 の役割を明らかにするため、ApoE 欠損マウスバックグラウンドにて Casp1^{flox/flox} マウスと ROSA26CreERT2 マウスを掛け合わせ、タモキシフェン誘導型 Casp1 欠損マウスを作製した。

【結 果】

- 1) NLRP3 インフラマソーム構成分子欠損マウス初代マクロファージに対し、Nigericin 刺激時の LDH 放出を評価したところ、刺激後の初期応答においては、野生型においては LDH 放出が認められるが、いずれの欠損マウス由来のマクロファージにおいても LDH 放出が完全に抑制された。しかしながら、刺激後後期の応答においては Casp1 欠損マウス由来のマクロファージでは野生型マクロファージから遅延して LDH 放出が認められた。細胞膜非透過性の DNA 結合プローブである SYTOXG の染色によって評価を行っても、ASC 欠損マクロファージでは陽性細胞が認められないのに対し、Casp1 欠損マクロファージにおいては野生型から遅延して SYTOXG 陽性細胞が認められた。Nigericin 刺激時の細胞死関連分子の発現についてそれぞれのマクロファージにおいて確認したところ、Casp1 欠損マクロファージにおいてはカスパーゼ-3 の活性化が検出された。さらに、Casp1 欠損マウスにおける Nigericin 刺激時の LDH 放出は

Pan-カスパーゼ阻害剤である Z-VAD により抑制された。

- 2) 作製した誘導型 Casp1 欠損マウスに対し、タモキシフェンを 5 日間、腹腔内投与し、4 週間後の Casp1 発現を確認したところ、骨髄、脾臓における Casp1 タンパク質の発現が抑制されていることが確認された。また、Apoe 欠損マウスに対し、SYTOXG を静脈内投与することにより、動脈硬化病変におけるネクロシス細胞を検出する手法を確立した。

【考 察】

本研究においては *In vitro* の検討にて NLRP3 インフラマソームの各構成分子の欠損がピロトーシスの誘導において果たす役割の検討を行った。NLRP3 や ASC を欠損したマクロファージにおいては Nigericin 刺激時の LDH 放出が完全に抑制され、これらの分子の欠損時にはピロトーシスが抑制されることが示唆された。しかしながら、Casp1 欠損マクロファージを Nigericin により刺激すると LDH 放出や SYTOXG 陽性などのピロトーシスの指標は初期応答については抑制されるが、後期の応答では野生型からは遅延してネクロシス様細胞死が引き起こされることが明らかになった。この結果から、NLRP3 インフラマソームの活性化は Casp1 非依存的なネクロシス様細胞死も誘導することが示唆される。このネクロシス様細胞死は、Pan カスパーゼ阻害剤である Z-VAD により阻害されることから、他のカスパーゼが関与することが疑われる。当初、Casp1 はピロトーシスの実行因子として同定されたことから、ピロトーシスを制御する上での標的分子となると考えられていたが、NLRP3 インフラマソームにより誘導されるネクロシス様細胞死の制御には、その上流の NLRP3-ASC の複合体形成を阻害する必要があることが示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

インフラマソームと心血管イベントの関連については、IL-1 β 阻害剤カナキヌマブが二次予防に有効であることが最近示された³⁾。インフラマソームはピロトーシスとともに IL-1 β の産生を制御する分子複合体であることから、心血管イベントの抑制に対する有効な標的分子になることが期待される。本研究では *In vitro* の解析によりインフラマソームを構成するそれぞれの分子がネクロシス様細胞死の誘導において果たす役割の違いを明らかにすることから、標的としての機能の差別化が期待できる。今後、*In vivo* での解析により、それぞれの因子の欠損がネクロティックコア形成とプラークの安定性に及ぼす影響を明らかにすることで、創薬の基礎となる知見を提供できると考えている。

【参考・引用文献】

1. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in western diet-fed apolipoprotein e-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 425:162-168
2. Karasawa T, Takahashi M. Role of nlrp3 inflammasomes in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24:443-451
3. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ, Group CT. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017; 377:1119-1131