

骨軟骨疾患と炎症の慢性化

大阪大学大学院歯学研究科生化学教室

村上 智彦

1. 目的および背景

慢性炎症は骨疾患、関節疾患、歯周疾患、肥満や糖尿病といった代謝性疾患など多くの疾患の発症に深く関与する。炎症組織ではマクロファージの浸潤と共に炎症性サイトカイン TNF や IL-1 が産生され、炎症性疾患の発症につながる。近年、慢性炎症関連疾患の発症にインフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体の関与が発見され、その重要性が明らかにされつつある (Strowig T et al, Nature 2012)。インフラマソームとは、感染や様々な生体ストレスに応答して、NOD-like receptors (NLRs), apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (Asc), Caspase-1 が複合体を構築することにより形成される。インフラマソームが形成されると、Caspase-1 が活性化され、引き続き炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-18) の分泌、そして細胞死 (pyroptosis) を誘導する。

インフラマソームは様々な生体内外のストレスによって活性化するが、NLRs などのパターン認識受容体がストレスを感知するセンサータンパク質として働く。主なインフラマソームのパターン認識受容体としては、NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)、absent in melanoma 2 (AIM2)、NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) などが知られている。それぞれのパターン認識受容体はそれぞれ異なる刺激因子を認識し、インフラマソームの形成を主導する。これらのインフラマソームは、主にマクロファージや樹状細胞などに発現することが知られており、それら細胞における炎症性サイトカインの分泌に必須であると考えられている。一方、ここ数年インフラマソームには細胞種あるいは組織特異的な機能や役割が存在する可能性を示唆する報告が注目をされている。例えば、膵臓 β 細胞では高グルコース刺激によるインフラマソームの活性化が報告されている (Oslowski CM et al, Cell Metab. 2012; Lerner AG et al, Cell Metab. 2012)。また、脂肪細胞ではインフラマソームの活性化が脂肪細胞分化に関与することが示されている (Stienstra R et al, Cell Metab. 2010)。興味深いことに、NLRP3 が構成するインフラマソームは、骨組織、関節、歯周組織、脂肪組織などの実質細胞においても発現し、各種疾患への関与が示唆されているが、その実態解明は進んでいない。NLRP3 インフラマソームは、細菌の感染、細胞外 ATP や尿酸塩などの結晶により活性化することが知られている。これらの刺激が細胞外へのカリウムの流出、ミトコンドリアダメージ、カルシウムの細胞内流動を引き起こし、NLRP3 インフラマソームの活性化に至ると考えられている (Murakami T et al, Proc Natl Acad Sci USA 2012; Yu J, Murakami T et al, Proc Natl Acad Sci USA 2014)。しかしながら、NLRP3 インフラマソームが、どの細胞にてどのようなメカニズムで活性化し、どのように病態形成に関与するかは未だに不明な点が多い。本研究では、骨代謝、関節疾患ならびに骨破壊性歯周疾患の発症過程に関与する細胞に着目し、それら細胞あるいは組織におけるインフラマソームの発現の探索を行い、インフラマソームの役割と活性化機構の解明を目指す。

2. 方法

インフラマソームの発現細胞の同定

マクロファージ以外の細胞におけるNLRP3インフラマソームの発現を探索するために、マウスの骨・軟骨組織を用いて、NLRP3インフラマソーム構成分子であるNLRP3, ASC, Caspase-1 のmRNAおよびタンパク質の発現レベルを詳細に調べた。アプローチとしては、各種組織から細胞を単離し、各種細胞 (骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、マクロファージなど) の初代培養を行った。細胞培養に各種刺激を付与した後、インフラマソーム関連遺伝子の発現をmRNAおよびタンパク質レベルにて検討した。遺伝子発現の解析には、taqmanあるいはSYBRを用いたqPCR法、タンパク質発現の解析にはウエスタンブロット法を用いた。必要に応じて、適宜インフラマソーム関連遺伝子 (NLRP3, ASC, Caspase-1) のノックアウトマウスあるいは細胞を活用した。

細胞種特異的なインフラマソームの活性化機構および機能解析

同定した細胞種の細胞培養系を用いて、細胞種特異的なインフラマソームの活性化機序とその役割を解析した。まず、マクロファージのインフラマソーム活性化機序との相同性と相違性を確かめた。方法としては、マクロファージにおいてNLRP3インフラマソームを活性化させることが知られている細胞外ATP、カリウムイオノフォアNigericin、結晶（尿酸塩など）、小胞体ストレスなどによる刺激が細胞種特異的なインフラマソームを活性化させるかを検討した。インフラマソームの活性化の指標としては、培養上清中の成熟型IL-1 β の分泌レベルと共に、細胞種によっては前駆型IL-1 β が発現していない可能性を考慮して、活性化型Caspase-1のタンパク質レベルも指標とした。さらに、NLRP3に結合するタンパク質がNLRP3の活性化に関与する可能性があるため、NLRP3結合タンパク質の探索を行った。

3. 結果

マクロファージ以外の細胞におけるNLRP3インフラマソームの発現を探索するために、マウスの骨・軟骨組織を用いて、NLRP3インフラマソーム構成分子であるNLRP3、ASC、Caspase-1のmRNAおよびタンパク質の発現レベルを詳細に調べた。マウス骨軟骨組織から細胞を単離し、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞などの初代培養を行い、インフラマソーム関連遺伝子の発現をそれぞれmRNAおよびタンパク質レベルにて検討した。qPCR法およびウエスタンブロット法による解析の結果、骨芽細胞や軟骨細胞では、インフラマソームのコンポーネントの各遺伝子発現レベルは、検出できるものの微弱であった。一方、破骨細胞はインフラマソームのコンポーネントの各遺伝子発現レベルは骨芽細胞や軟骨細胞に比べ、非常強く、またLPS刺激により強力に発現誘導されることを見出した。詳細に破骨細胞培養におけるインフラマソーム発現細胞を解析したところ、TRAP陽性の細胞であり、少なくとも破骨細胞リネージの細胞であることがわかった。次に、破骨細胞にNLRP3インフラマソームを活性化させる刺激を負荷したところ、IL-1 β の分泌やCaspase-1の活性化が検出された。破骨細胞とマクロファージのインフラマソーム活性レベルをIL-1 β の分泌量にて比較したところ、破骨細胞でのIL-1 β の分泌量はマクロファージに比べ少なかった。そこで、IL-1 β の前駆体であるproIL-1 β の発現量を調べたところ、破骨細胞ではproIL-1 β の発現がマクロファージに比べ低かった。この結果より、破骨細胞におけるIL-1 β の分泌量の低さは、proIL-1 β の発現の低さに起因することが示唆された。破骨細胞においてもマクロファージと同様の刺激によってNLRP3インフラマソームが活性化したことから、破骨細胞におけるNLRP3インフラマソームの活性化機構はマクロファージと同様である可能性が高い。そこで、NLRP3インフラマソームのセンサータンパク質であるNLRP3に着目し、NLRP3に結合するタンパク質の探索を行った。抗NLRP3抗体により共沈降してくるタンパク質を質量分析により解析した。その結果、新規E3ユビキチンリガーゼがNLRP3に結合することを見出した。実際に、*in vitro*の系でこのユビキチンリガーゼがNLRP3と結合することから、このユビキチンリガーゼはNLRP3インフラマソームの活性化に関与するものと考えられた。

4. 考察およびまとめ

骨組織、軟骨組織に含まれる細胞（骨芽細胞・軟骨細胞・破骨細胞）において、破骨細胞が強くインフラマソームのコンポーネントを発現していた。実際に、インフラマソームを活性化させる刺激を負荷すると、インフラマソームが活性化することを見出した。以上の結果から、破骨細胞はマクロファージからの分化過程でインフラマソームのIL-1 β 分泌能は低下するものの、インフラマソームの機能を保持していると考えられる。また今回見出したNLRP3に結合するユビキチンリガーゼは破骨細胞においても発現しており、マクロファージと同様の制御を受けている可能性が高い。今後は、破骨細胞におけるインフラマソームの役割や活性化機構をより詳細に明らかにし、生体内におけるインフラマソームの統合的理解に貢献していきたいと考えている。

5. 参考文献

Osowski CM1, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M, Ishigaki S, Zhu LJ, Hayashi E, Hui ST, Greiner D, Kaufman RJ, Bortell R, Urano F. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab.* 2012 Aug 8;16(2):265-73

Lerner AG1, Upton JP, Praveen PV, Ghosh R, Nakagawa Y, Igarria A, Shen S, Nguyen V, Backes BJ, Heiman M, Heintz N, Greengard P, Hui S, Tang Q, Trusina A, Oakes SA, Papa FR. IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* 2012 Aug 8;16(2):250-64.

Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:11282-11287.

Stienstra R1, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, Rensen PC, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, Kersten S, Müller M, van den Berg WB, van Rooijen N, Wabitsch M, Kullberg BJ, van der Meer JW, Kanneganti T, Tack CJ, Netea MG. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2010 Dec 1;12(6):593-605.

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

Yu J, Nagasu H, Murakami T, Hoang H, Broderick L, Hoffman HM, Horng T. Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 15514-15519.