

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15078

研究課題名(和文) ビタミンB6の新しい抗炎症作用の解明とその応用に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Novel mechanism of anti-inflammatory activity of vitamin B6.

## 研究代表者

須田 貴司 (Suda, Takashi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：70250090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンB6類のうち、ピリドキサル(PL)とピリドキサルリン酸(PLP)がマクロファージなどのIL-1産生を抑制することを見出した。また、その分子機構としてPLやPLPが トル様受容体シグナルによるTak1の活性化を阻害し、前駆体型IL-1の発現を抑制すること、NLRP3依存性のカスパーゼ1活性化を抑制し、IL-1の前駆体型から成熟型への転換を抑制することを示した。さらに、マウスにPLやPLPを投与することで、リポポリサッカライド投与によるエンドトキシンショックが緩和されることを示した。以上より、ビタミンB6はIL-1の産生を抑制し、炎症性疾患の予防に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that among B6 vitamers, pyridoxal (PL) and pyridoxal phosphate (PLP) inhibits IL-1 secretion from macrophages. Analyses of molecular mechanisms indicated that PL and PLP inhibits both Tak1 phosphorylation mediated by Toll-like receptors and following proIL-1 expression, and NLRP3-dependent caspase-1 activation and following proIL-1 processing into its mature form. Furthermore, administration of PL or PLP ameliorated lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. These results suggested that vitamin B6 is useful to prevent inflammatory diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：ビタミンB6 IL-1 NLRP3 endotoxin shock

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B6 はピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシンおよびそれらのリン酸化体からなる水溶性ビタミンで、ピリドキサルリン酸 (活性型ビタミン B6) はアミノ酸代謝に関わる補酵素として作用する。一般に欠乏することは少ないとされているが、近年、我国を含む先進国で不足傾向が指摘されている。さらに、ピリドキサルリン酸は炎症を伴う様々な疾患で血中濃度が低下する。また、ビタミン B6 は抗炎症作用もつと考えられ、そのメカニズムとして、抗酸化作用、T 細胞の IL-2 産生抑制作用などが報告されていた。

最近、研究分担者の加藤らは、ピリドキサルリン酸が免疫・炎症応答で重要な役割を果たす転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することを見出した。しかし、マクロファージなどのサイトカイン産生に対するビタミン B6 の効果は報告が無かった。興味深いことに、我々は最近、ビタミン B6 がマクロファージのインターロイキン(IL)-1 の産生を著しく抑制することを発見した。

IL-1 は最も重要な炎症性サイトカインの一つで、自然免疫を活性化し感染防御に働く一方、様々な炎症性疾患の発症に寄与している。最近の研究から、痛風、動脈硬化、糖尿病のような生活習慣病にも炎症が深く関わり、IL-1 が寄与していることが明らかになりつつある。このような観点から、IL-1 産生の制御法の研究は重要な研究テーマになっていた。

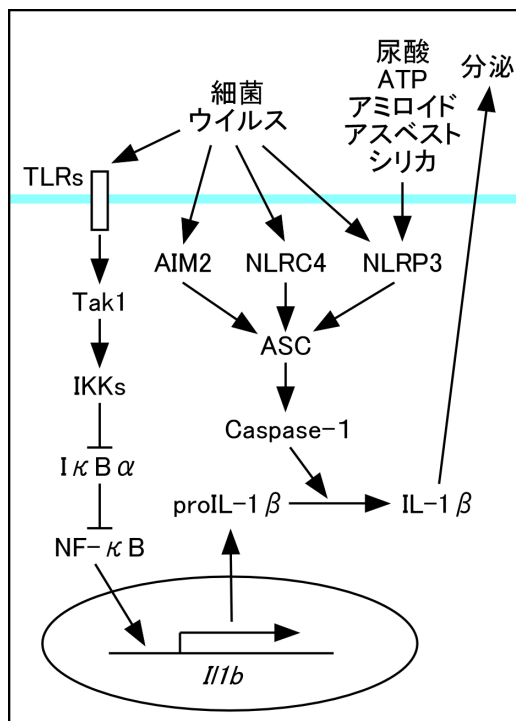


図 1 . IL-1 分泌機構

また、IL-1 の産生過程は NF- $\kappa$ B などの働きによる proIL-1 の発現とカスパーゼ 1 による proIL-1 の切断による成熟 IL-1 への転換の二段階に分けられる(図 1)。最近、カスパーゼ 1 の活性化は、微生物成分および環境中や生体内の炎症誘導物質の刺激で NLRP3、NLRP4、AIM2 などの細胞質蛋白が多量体化し、アダプター分子 ASC やカスパーゼ 1 とインフラマソームと呼ばれる複合体を形成することで誘導されることが明らかになり、IL-1 産生の分子機構の全容が明らかになりつつあった。

2. 研究の目的

- (1) 様々な刺激によるマクロファージなどからの IL-1 や他の炎症性サイトカインの産生に対するビタミン B6 の影響とその分子機構を検討した。
- (2) リポポリサッカライド (LPS) の投与によるエンドトキシンショックの動物モデルでビタミン B6 の効果を検討した。

3. 研究の方法

- (1) 細胞：マウス腹腔マクロファージは、C57BL/6J マウスの腹腔内に 1.5ml の 3%チオグリコレート投与し、4 日後に腹腔洗浄液中の細胞を回収し、培養プレートに付着した細胞をマクロファージとして使用した。また、THP-1 ヒト単球様細胞株を PMA で 3 時間処理し、マクロファージ様に分化させて使用した。
- (2) サイトカイン産生の誘導：上記細胞を主に LPS(トル様受容体 (TLR) 4 リガンド)で刺激することで NF- $\kappa$ B を活性化し、さらに ATP (5mM)、ニゲリシン (5 $\mu$ M)、尿酸ナトリウム結晶 (150 $\mu$ g/ml)などで NLRP3 を活性化することで IL-1 の産生を誘導した。また、場合によっては LPS の代わりに Pam3CSK4 (TLR2 リガンド)、poly(I:C) (TLR3 リガンド)、R837(TLR7 リガンド)、CpGODN(TLR9 リガンド)も用いた。一部の実験では、LPS で感作した腹腔マクロファージに黄色ブドウ球菌、対数増殖期のサルモネラ、リステリア菌を感染させた。
- (3) サイトカインの定量：培養上清中に分泌されたサイトカインは ELISA 法で定量した。
- (4) 細胞内蛋白の検出：細胞内のプロ IL-1、リン酸化 Tak1、リン酸化および総 IKK、I $\kappa$ B、リン酸化および総 JNK はウエスタンブロット法で検出した。
- (5) mRNA の定量：Il1b、Il6、Ptgs2、Ccl2、の mRNA の定量はリアルタイム PCR 法で行った。この際、Gapdh の mRNA 量を同時に定量し

て標準化に用いた。

(6) マウスエンドトキシシヨックモデル：C57BL/6 マウスの腹腔に 20 mg/ml の LPS を投与し、その後の腹腔洗浄液中および血清中の IL-1 を ELISA 法で定量した。また、50 mg/kg の LPS を腹腔投与し、その後のマウスの生存率を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス腹腔マクロファージを LPS で刺激する前にピリドキサルあるいはピリドキサルリン酸で細胞を処理すると、IL-1 の産生が著しく抑制された。ピリドキサミンやピリドキシニンにはそのような効果がなかった。ピリドキサルやピリドキサルリン酸は LPS や他のトル様受容体リガンド刺激による TNF や IL-6 の産生も抑制した。また、*Il1b*, *Il6*, *Ptgs2*, *Ccl2* など、転写因子 NF- $\kappa$ B により制御される遺伝子群の mRNA の発現も抑制した。実際、ピリドキサルとピリドキサルリン酸は LPS 刺激による Tak1 や IKK のリン酸化など、NF- $\kappa$ B 活性化経路を阻害した。これらの結果から、ピリドキサルおよびピリドキサルリン酸はトル様受容体刺激による Tak1 の活性化を阻害することで、NF- $\kappa$ B などの転写因子の活性化を阻害し、サイトカインを含む種々の炎症関連因子の発現を抑制するものと考えられる。

(2) 予め LPS で活性化したマクロファージをピリドキサルやピリドキサルリン酸で処理し、その後 NLRP3 活性化刺激を加えた場合にも IL-1 の産生が抑制された。また、この条件下では、ピリドキサルやピリドキサルリン酸はカスパーゼ 1 の成熟を阻害した。この実験系でもピリドキサミンやピリドキシニンは有意な抑制効果を示さなかった。一方、LPS 刺激のみで誘導される、proIL-1 や TNF、IL-6 の産生は、LPS 刺激後にピリドキサルやピリドキサルリン酸を加えても、抑制されなかった。これらの結果から、ピリドキサルおよびピリドキサルリン酸は NLRP3 依存性カスパーゼ 1 活性化を阻害し、カスパーゼ 1 によるプロ IL-1 から成熟 IL-1 への転換を阻害すると考えられる。

(3) 黄色ブドウ球菌、対数増殖期のサルモネラ菌、リステリア菌はそれぞれ NLRP3、NLRC4、AIM2 依存性にカスパーゼ 1 を活性化することが知られている。そこで、LPS 感作マクロファージをピリドキサルまたはピリドキサルリン酸で処理したのち、これらの細菌を感染させ、IL-1 の産生に対する影響を検討した。その結果、ピリドキサルやピリド

キサルリン酸は黄色ブドウ球菌感染による IL-1 産生のみ抑制し、サルモネラ菌やリステリア菌感染による IL-1 の産生は抑制しなかった。これらの結果から、ピリドキサルやピリドキサルリン酸は NLRP3 依存性のカスパーゼ 1 活性化経路を選択的に阻害するものと考えられる。

(4) マウス腹腔に 20mg/kg の LPS を投与すると、3 時間後に腹腔洗浄液中や血清中に IL-1 が検出される。この実験系で、LPS 投与の 2 時間前にピリドキサルまたはピリドキサルリン酸(20 mg/kg)をマウス腹腔に投与すると、IL-1 の産生が有意に抑制された。また、ピリドキサルまたはピリドキサルリン酸(20 mg/kg)をマウス腹腔に投与し、2 時間後に致死量の LPS を投与したところ、ピリドキサルやピリドキサルリン酸を投与しなかったマウスに比べ、生存率が有意に改善された。

以上の結果より、ピリドキサルとピリドキサルリン酸は NF- $\kappa$ B と NLRP インフラソームの活性化経路を共に抑制することが判明した。また、ピリドキサルやピリドキサルリン酸は炎症性疾患の予防に有効である可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Peipei Zhang, Takeshi Kinoshita, Hiroko Kushiyama, Sofya Suidasari, Norihisa Kato, Takashi Suda: Novel anti-inflammatory function of vitamin B6 by inhibition of the NLRP3 pathway. Japan Australia Meeting on Cell Death. Melbourne, Australia, October 23, 2015  
Peipei Zhang, Takeshi Kinoshita, Hiroko Kushiyama, Sofya Suidasari, Norihisa Kato, Takashi Suda: Vitamin B6 prevents IL-1 $\beta$  production through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. 1st Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology Joint Conference: Inflammation, Stress and Immune Homeostasis. Heifei, China, June 17-19, 2015

Peipei Zhang, Takeshi Kinoshita, Hiroko Kushiyama, Sofya Suidasari, Norihisa

Kato, Takashi Suda: Vitamin B6 prevents IL-1 $\beta$  production through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, May 16, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://dimb.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須田 貴司 (SUDA, Takashi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：70250090

### (2) 研究分担者

加藤 範久 (KATO, Norihisa)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：20144892