
トピックス

リボフラビンはマクロファージのインフラマソーム依存的な カスパーゼ-1 活性を阻害することで生体の炎症誘導を抑制する **Riboflavin attenuates host inflammatory response by the inhibition of inflammasome-dependent caspase-1 activity**

はじめに

ビタミン B₂ は、細菌、酵母、高等植物で生合成される水溶性ビタミンである。ヒトを含む多くの動物では *de novo* 経路による生合成ができないため、リボフラビン、フラビンヌクレオチド (FMN) やフラビンアデニンヌクレオチド (FAD) として体外から摂取される¹⁾。ビタミン B₂ の基本骨格であるリボフラビンのヒトにおける供給源としては、食物や種々の薬剤のほか、大腸内の微生物叢により産生されたものが重要である¹⁾。生体内では、吸収されたリボフラビンから補酵素型の FMN や FAD が合成され、これらがミトコンドリアにおける電子伝達系、クエン酸回路、脂肪酸の異化反応などで補酵素として重要な働きを担っている¹⁾。主なリボフラビン欠乏症としては、口内炎や脂漏性皮膚炎などが認められる他、がん発症への関与が示唆されている²⁾³⁾。

一方、リボフラビンが生体の炎症応答を抑制する作用をもつ可能性が示唆されている。マウスの敗血症ショックモデルを用いた研究では、リボフラビンが過剰な炎症を抑制し、その死亡率を低下させることが示されている⁴⁾。しかし、リボフラビンによる抗炎症作用の詳細なメカニズムは不明であった。最近、リボフラビンの新しい抗炎症メカニズムとして、生体の炎症応答に重要なインフラマソーム依存的なカスパーゼ-1 活性の抑制機序が報告されたので⁵⁾、今回トピックスとして紹介したい。

1. 生体における炎症応答とインフラマソーム

生体における炎症応答の誘導には、主に病原体の感染などを感知したマクロファージや樹状細胞から産生される炎症性サイトカインが重要な役割を担っている。そのため、マクロファージなどの細胞膜やエンドソーム膜には、病原体の侵入を感知するために必要な受容体が存在する⁶⁾。この受容体は、病原体に特有の分子

パターン (病原体関連分子パターン, pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を認識するため、パターン認識受容体と呼ばれる。代表的なパターン認識受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR)-4 はグラム陰性細菌のリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) を、TLR-1, 2, 6 はグラム陽性菌の細胞壁に由来する分子などの認識に関与し、細胞内で転写因子 NF- κ B などの活性化を介して炎症性サイトカインの産生を誘導する⁶⁾ (図 1)。

このようなパターン認識受容体は、主に細胞外の微生物成分を認識する受容体としての役割を担っている。一方、近年の研究により、宿主細胞の細胞質内に侵入した微生物成分や、細胞自体の傷害を感知する細胞質内の受容体が発見された。このような受容体はヌクレオチド結合性多量体化ドメイン (Nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) を共通にもつため、NOD 様受容体 (NOD-like receptors, NLRs) と呼ばれる。NLRs が細胞質内への病原体の侵入や細胞傷害を感知すると、いくつかの NLRs は TLRs と同様、NF- κ B の活性化を介して炎症性サイトカインの産生を誘導するが、他の NLRs は異なるシグナル経路を活性化し、通常 TLRs を介して産生されることのない炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-18 を産生する⁷⁾ (図 1)。

NLR サブファミリーの 1 つである NLRP3 は、刺激を受けるとアダプター分子 ASC を介してプロテアーゼの一種であるカスパーゼ-1 (不活性状態) をリクルートし、インフラマソームと呼ばれる複合体を形成してカスパーゼ-1 を活性化する。さらに、活性化したカスパーゼ-1 は、不活性な状態として細胞質内に存在する IL-1 β (前駆体 IL-1 β) などを切断し、活性型として細胞外へ分泌することで生体の炎症応答を惹起する⁷⁾。インフラマソームに依存する炎症応答は、病原体に対する感染制御で重要な役割を担っている⁷⁾ とともに、その炎症応答が過剰に惹起された場合、痛風、アルツハ

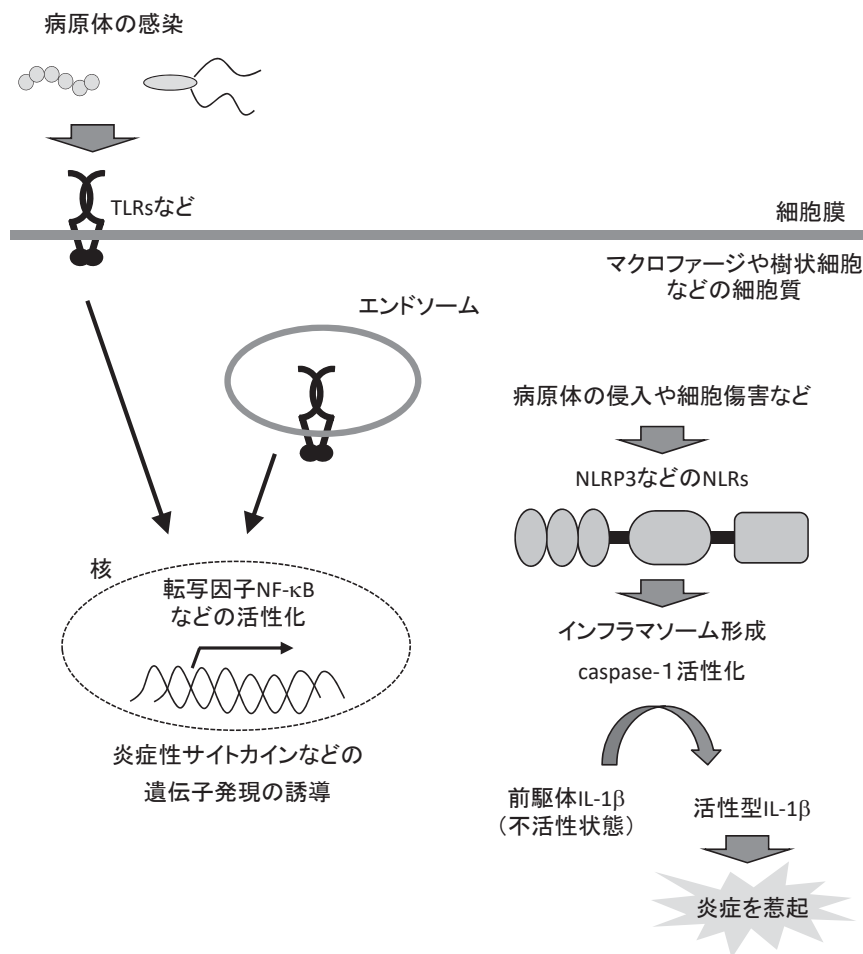


図1 生体における炎症応答のメカニズム

細胞膜やエンドソーム膜上に存在する TLRs などが、細胞外の病原体などを認識し、炎症性サイトカインを産生する。一方、細胞質内に侵入した病原体や細胞自体の傷害は、細胞質基質に存在するセンサーである NLRs によって認識される。刺激を受けた NLRs によってタンパク質複合体インフラマソームが形成され、カスパーゼ-1が活性化される。このカスパーゼ-1が前駆体 IL-1 β を切断することで活性型 IL-1 β が産生され炎症を惹起する。(詳細は本文参照)

イマー病、2型糖尿病、潰瘍性大腸炎・クローン病などの炎症性腸疾患の発症要因となることが知られている⁸⁾。例えば、過剰な炎症応答に起因する疾患の研究モデルとしてマウスを使用した敗血症モデルがあるが、この炎症応答にはインフラマソームが関与することが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。

2. リボフラビンはインフラマソーム依存的なカスパーゼ-1活性化を抑制する

リボフラビンは IL-1 β を含む炎症性サイトカインの産生を制御することが報告されている。マウスの敗血症ショックモデルを用いた研究では、リボフラビンが過剰な炎症を抑制し、その死亡率を低下させることが

示されている⁴⁾。これまで、その詳細な機序は不明であったが、リボフラビンがインフラマソーム依存的なカスパーゼ-1の活性化を阻害することで、炎症応答を抑制する可能性が示された⁵⁾。

Ahn と Lee は、まず NLRP3 インフラマソーム活性化における各種ビタミンの影響を検討した。マウス骨髄からマクロファージ(骨髄由来マクロファージ, BMDMs)を調製し、各種ビタミン(ビタミン B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ および C)の有無による NLRP3 インフラマソーム活性化を調べた。ここでは、あらかじめ LPS 刺激した BMDMs を NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導することが知られるニゲリシン(真菌由来の抗生物質の一種で細胞膜傷害作用がある)で刺激した。

インフラマソーム活性化の指標としては IL-1 β 産生量を ELISA 法で測定した。その結果、これまでにインフラマソーム活性化の抑制作用が報告されているビタミン C (アスコルビン酸) に加えて、ビタミン B₂ (リボフラビン) 存在下では、インフラマソーム活性化による IL-1 β 産生が抑制された。一方、その他のビタミンについては IL-1 β 産生に対する影響は確認されなかった。

さらに、生体レベルでのリボフラビンの抗炎症作用を検討した。痛風の原因として知られる尿酸ナトリウム (monosodium urate, MSU) は、NLRP3 インフラマソーム活性化を誘導して生体内で IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生し、これが痛風の発症につながる可能性が示唆されている¹¹⁾。In vitro で LPS 処理した BMDMs に MSU 刺激を加えることでカスパーゼ-1 活性化、IL-1 β および IL-18 産生が認められ、リボフラビン存在下ではこれらが有意に抑制されたことから、MSU をマウス腹腔内に投与して誘導される腹膜炎モデルを用いて検討を行った。予めリボフラビンを経口投与したマウスに、さらにリボフラビンとともに MSU を腹腔内投与した後、腹腔内 IL-1 β および IL-18 濃度を測定した。その結果、MSU 投与によって産生される IL-1 β および IL-18 がリボフラビン投与によって有意に抑制された。これより、リボフラビンが生体でインフラマソーム活性化を抑制することで、過剰な炎症に伴う疾患の発症を抑える可能性が示された⁵⁾。

リボフラビンがインフラマソーム活性化を抑制する分子メカニズムは、どのようなものであろうか。前述のように、インフラマソームの活性化にはいくつかの過程が存在することが知られている。リボフラビンが NLRP3 インフラマソーム活性化のどの段階を抑制しているのか明らかにするため、インフラマソーム複合体によるカスパーゼ-1 活性化、ASC の複合体形成を示すダイマー・オリゴマー化、活性型 IL-1 β の分泌に必要な Gasdermin D (分泌の過程に必要な細胞膜孔の形成に関わる分子) 活性化に対する、リボフラビンの影響を検討した。その結果、LPS およびニゲリシンで誘導される活性型 IL-1 β 産生、カスパーゼ-1 活性化、ASC ダイマー・オリゴマー化および Gasdermin D 活性化の全ての過程が、リボフラビン存在下で抑制された。また、レコンビナントカスパーゼ-1 を用いた in vitro 実験系では、リボフラビンがカスパーゼ-1 活性化を阻害していることが示された。以上の結果より、リボフラビンは NLRP3 インフラマソーム活性化の主要な過程を阻害する可能性が示された⁵⁾。

病原体の感染や細胞の傷害という生体に対する危険は、マクロファージなどの細胞において、ミトコンド

リア障害に起因するミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) や活性酸素種 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) の細胞質内への遊離を誘発し、これがインフラマソーム活性化の重要な契機であることが知られている¹²⁾。一方、これまでの研究で、リボフラビンが抗酸化作用をもつことが明らかにされている¹³⁾。そこで、リボフラビンがミトコンドリア障害の抑制を介して、NLRP3 インフラマソーム活性化を制御する可能性を検討した。まず、ミトコンドリア呼吸鎖の障害を誘導し mtROS 産生を誘発するロテノンで BMDMs を処理し、インフラマソーム活性化に対するリボフラビンの影響を観察した。LPS 刺激した BMDMs をロテノンで処理することで活性型 IL-1 β 産生が誘導されるが、リボフラビン存在下ではそれが有意に抑制された。さらに、リボフラビン存在下では、ATP 処理による BMDMs のミトコンドリアから細胞質への mtDNA 遊離促進が有意に抑制された。以上の結果より、リボフラビンはミトコンドリア障害を抑制することでインフラマソーム活性化を制御することが示された⁵⁾。

インフラマソーム活性化を誘導する NLRs としては、NLRP3 以外にも重要なものが知られている。そこで、NLRP3 以外の NLRs によるインフラマソーム活性化へのリボフラビンの影響を検討した。細胞の核から細胞質内へ漏出した二本鎖 DNA (細胞傷害が発生したことを意味する)、細胞質内へ侵入したフラジェリタンパク質 (細菌の鞭毛成分) および LPS は、NLRP3 とは異なる AIM2 (absent in melanoma 2) インフラマソーム、NLRC4 インフラマソーム、またマウスカスパーゼ-11 (ヒトではカスパーゼ-4、-5) が関与する非典型インフラマソームなどの活性化を誘発することが知られている。これらの検討した全てのインフラマソームに起因する IL-1 β 産生がリボフラビンによって抑制された。さらに、実際の病原体感染においては、リステリア (*Listeria monocytogenes*)、サルモネラ菌 (*Salmonella Typhimurium*) や大腸菌 (*Escherichia coli*) の感染で AIM2、NLRC4、非典型インフラマソームが活性化することが知られている。これらの細菌感染によるインフラマソーム活性化に起因する IL-1 β 産生もリボフラビンは有意に抑制した。以上の結果より、リボフラビンは、NLRP3 インフラマソームのみならず、実際の細菌感染によって誘導される複数のインフラマソーム活性化を抑制し、宿主の炎症応答を制御することが示された⁵⁾。

3. まとめ

生体における炎症応答が適切な役割を果たすために

は、過剰な応答を抑えるよう制御することが重要である。今回、リボフラビンのインフラマソーム依存的なカスパーゼ-1活性化の抑制作用による抗炎症機能が示された。一方、病原体の感染における炎症応答は、感染から身を守る上で必須の免疫応答である。これまでの研究で、リボフラビンが哺乳動物の免疫システムを活性化する作用が示されている。例えば、生体が病原体の感染を受けた際、異物の排除に関わるマクロファージや好中球の活性化をリボフラビンが誘導することが知られている¹⁴⁾。また、リボフラビンのT細胞への影響も確認されている。主要なT細胞集団であるCD4⁺またはCD8⁺T細胞とは異なり、単一の抗原を認識するT細胞集団であるMAIT細胞(mucosal-associated invariant T cells)は、細菌などに由来するリボフラビン合成代謝中間体を認識し免疫応答を誘導することで、粘膜免疫に寄与することが示されている¹⁵⁾。炎症や自然免疫の制御という観点から、リボフラビンには免疫応答の活性化と抑制という相反する作用が存在する可能性が示唆されており、リボフラビンがどのような仕組みで生体に適切な炎症が誘導されるよう役割を果たしているのか、生体レベルでの検討が必要であると考えられる。今回の研究の結果、リボフラビンが多様なメカニズムでインフラマソーム活性化を抑制する可能性が示唆された。インフラマソーム活性化は特異性の高い分子間の相互作用によって成立することが知られており、これら全ての相互作用にリボフラビンが作用するとは考えにくい。リボフラビンにおけるインフラマソーム活性化の詳細な抑制作用には未だ不明な点が存在しており、今後の研究に期待したい。

Key words :Riboflavin, Vitamin B₂, inflammasome, inflammation, caspase-1

2nd Department of Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University
武庫川女子大学薬学部生化学Ⅱ講座
内山 良介, 野坂 和人

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.1.7 受付)

文 献

1) 大石誠子, 福井清, 邊見久, 櫻庭春彦, 大島敏久, 福井清,

- 成戸丈紘, 片根真澄, 本間浩, 浅野泰久(2021)ビタミンB₂. ビタミン・バイオフィクター総合事典(日本ビタミン学会編). pp.124-149, 朝倉書店, 東京
- 2) Saedisomeolia A, Ashoori M (2018) Riboflavin in human health: A review of current evidences. *Adv Food Nutr Res* **83**, 57-81
- 3) Peterson CT, Rodionov DA, Osterman AL, Peterson SN (2020) B vitamins and their role in immune regulation and cancer. *Nutrients* **12**, 3380
- 4) Toyosawa T, Suzuki M, Kodama K, Araki S (2004) Effects of intravenous infusion of highly purified vitamin B₂ on lipopolysaccharide-induced shock and bacterial infection in mice. *Eur J Pharmacol* **492**, 273-280
- 5) Ahn H, Lee GS (2020) Riboflavin, vitamin B₂, attenuates NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasomes by the inhibition of caspase-1 activity. *Sci Rep* **10**, 19091
- 6) Pandey S, Kawai T, Akira S (2014) Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a016246
- 7) Babamale AO, Chen ST (2021) Nod-like receptors: Critical intracellular sensors for host protection and cell death in microbial and parasitic infections. *Int J Mol Sci* **22**, 11398
- 8) Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**, 278-286
- 9) Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K, Uchiyama R, Yumikura-Futatsugi S, Mitani K, Hayashi S, Akira S, Taniguchi S, Van Rooijen N, Tschopp J, Yamamoto T, Fujimoto J, Nakanishi K (2009) Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta-mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. *J Hepatol* **51**, 333-341
- 10) Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, Forsberg LS, Carlson RW, Dixit VM (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* **341**, 1246-1249
- 11) Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237-241
- 12) Pandey A, Shen C, Feng S, Man SM (2021) Cell biology of inflammasome activation. *Trends Cell Biol* **31**, 924-939
- 13) Fujiwara C, Muramatsu Y, Nishii M, Tokunaka K, Tahara H, Ueno M, Yamori T, Sugimoto Y, Seimiya H (2018) Cell-based chemical fingerprinting identifies telomeres and lamin A as modifiers of DNA damage response in cancer cells. *Sci Rep* **8**, 14827
- 14) Peterson CT, Rodionov DA, Osterman AL, Peterson SN (2020) B Vitamins and their role in immune regulation and cancer. *Nutrients* **12**, 3380
- 15) Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J (2012) MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* **491**, 717-723