

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06255

研究課題名(和文) マウス蝸牛組織における自然免疫応答の検討

研究課題名(英文) Evaluation of autoinflammatory responses in mouse cochlea

研究代表者

中西 啓 (Nakanishi, Hiroshi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20444359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP3はマクロファージなどの自然免疫担当細胞に発現している蛋白質である。NLRP3の機能獲得型変異は、NLRP3インフラマソームを活性化しInterleukin-1 β の分泌を促すために、全身性自己炎症性疾患を引き起こす。我々は、NLRP3の機能獲得型変異が非症候群性難聴も引き起こすことを明らかにし、その病態として、蝸牛局所でNLRP3インフラマソームが活性化されるためと仮定した。この仮説を証明するために野生型マウスを用いて実験を行い、マクロファージが蝸牛局所に存在すること、マクロファージにNLRP3インフラマソームを構成する蛋白質のmRNAが存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：NLRP3 protein is expressed in innate immune cells including macrophages. Gain of function mutations of NLRP3 induce the activation of NLRP3 inflammasome, resulting in the secretion of proinflammatory cytokine, interleukin-1 beta, to cause systemic inflammatory diseases, cryopyrin associated periodic syndromes. We found that a gain of function mutation of NLRP3 also caused non-syndromic hearing loss. We hypothesized that the hearing loss was caused by the activation of NLRP3 inflammasome mainly in the cochleae. We revealed that tissue-resident macrophage-like cells existed and mRNAs consisting NLRP3 inflammasome were expressed in the wild type mouse cochleae.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：蝸牛 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は最も頻度が高い先天性疾患の1つであり、その約50%は遺伝的要因による遺伝性難聴によるものと考えられている。遺伝性難聴は、難聴以外の症状の合併の有無により、症候群性遺伝性難聴と非症候群性遺伝性難聴に分類される。非症候群性遺伝性難聴は遺伝性難聴の約70%を占め、その大部分はメンデルの遺伝法則に従う単一遺伝子疾患であるため、難聴家系の連鎖解析により現在までに多くの原因遺伝子が同定されてきた。

非症候群性遺伝性難聴はその遺伝形式により、DFNA (常染色体優性遺伝)、DFNB (常染色体劣性遺伝)、DFNX (X連鎖性遺伝) に分類されている。現在までに原因遺伝子として、DFNA: 33種、DFNB: 66種、DFNX: 5種の遺伝子が同定されている(文献1)。これらの遺伝子がコードしている蛋白質は、正常な聴覚機能を獲得・維持するために大変重要な機能を担っている。これらの蛋白質を同定するという意味において、難聴原因遺伝子を同定することは大変意義深い。

我々は、非症候群性常染色体優性遺伝性難聴家系の連鎖解析を行い、本家系の難聴が *NLRP3* 遺伝子変異により生じていることを明らかにした。*NLRP3* は *NLRP3* (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 or Cryopyrin) 蛋白質をコードする遺伝子で、この蛋白質は単球、マクロファージ、樹状細胞などの自然免疫担当細胞に発現し、感染に対する防御応答を担う *NLRP3* インフラマソームを構成する蛋白質の1つである。

NLRP3 は、細菌やウイルスなどの病原体により活性化され、アダプター蛋白質 ASC (apoptosis associated speck like protein containing caspase recruitment domain) およびエフェクター蛋白質 Pro-caspase-1 と介合して、*NLRP3* インフラマソームと呼ばれる蛋白質複合体を形成する(図1、文献2)。*NLRP3* インフラマソームが形成されると活性化型 Caspase-1 が産生され、Interleukin-1 β

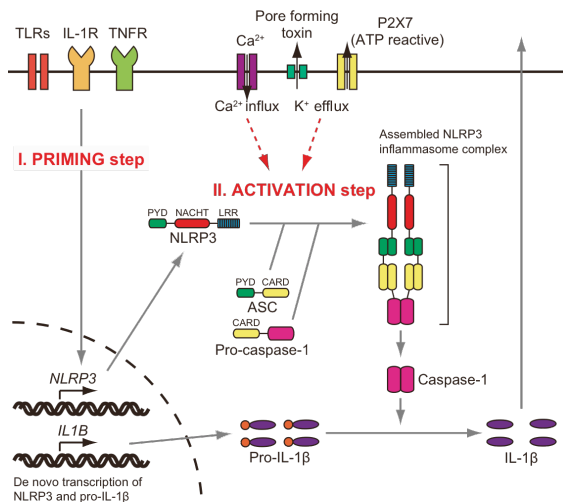


図1 NLRP3 インフラマソーム

(IL-1 β) などの炎症性サイトカインの分泌が誘導されることで炎症が惹起される。このように、*NLRP3* インフラマソームは、細菌やウイルスなどの病原体に対する細胞内センサーとして機能しており、自然免疫担当細胞における炎症応答の中心的役割を果たしている。

NLRP3 の機能獲得型変異は、全身性自己炎症性疾患であるクリオピリン関連周期熱症候群 (Cryopyrine associated periodic syndrome: CAPS) を引き起こすことが知られている(文献3)。CAPS は、*NLRP3* の機能獲得型変異により *NLRP3* インフラマソームが恒常的に活性化されることにより、自然免疫担当細胞から IL-1 β 分泌が亢進して全身性炎症を生じると考えられている。本疾患では、周期性発熱、蕁麻疹様の発疹、関節痛・関節炎、感音難聴などが特徴的な症状である。これらの患者では造影 FLAIR-MRI にて蝸牛に造影効果が認められることより、蝸牛の炎症により難聴が生じていると考えられている(文献4)。我々が *NLRP3* に遺伝子変異を同定した家系の患者においても、FLAIR-MRI にて蝸牛に造影効果が認められており、難聴の原因は蝸牛の炎症であると考えている。

ではいったいどのような機序で、CAPS 患者や非症候群性常染色体優性遺伝性難聴家系の患者において蝸牛に炎症が起こるのであるか。その機序についてはよく分かっていないが、我々は少なくとも下記の2つの機序が関与していると考えている。

- ①全身に分布している単球などの細胞で *NLRP3* インフラマソームが活性化され IL-1 β が分泌されて全身性炎症が惹起される。その一部症状として蝸牛にも炎症が生じている。
- ②蝸牛内に組織マクロファージが存在しており、それらの細胞で *NLRP3* インフラマソームが活性化され IL-1 β が分泌される。その結果として蝸牛局所に炎症が惹起される。

蝸牛は全身の免疫応答から隔絶されていると考えられてきたため、CAPS においては主に①の機序により蝸牛の炎症が惹起されると想定されてきた。しかし、非症候群性常染色体優性遺伝性難聴家系の患者においては難聴以外の症状は認められないので、①の機序により蝸牛の炎症が惹起されているとは考えにくく、②の機序の関与が想定される。

2. 研究の目的

本研究では「1. 研究開始当初の背景」の②の機序の可能性を評価するため、マウスを用いて下記のことを明らかにすることを目的とする。

- A、マウス蝸牛に組織マクロファージが存在しているか評価する。
- B、組織マクロファージにおいて *NLRP3* インフラマソームを構成している蛋白質 (*NLRP3*、ASC、Pro-caspase-1、IL-1 β) が発現しているか評価する。

3. 研究の方法

A、マウス蝸牛内に組織マクロファージが存在するか評価する。

野生型マウス蝸牛の凍結切片を作製し、マクロファージに特異的な抗体である Anti-mouse CD68 抗体で染色することにより、マウス蝸牛内にマクロファージが存在するか評価する。生後 0、4、8、14、28 日齢のマウス蝸牛の凍結切片を作成し、組織マクロファージがいつ頃より存在するのかについても検討する。

B、組織マクロファージに NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質 (NLRP3、ASC、Pro-caspase-1、IL-1 β) が発現しているか評価する。

NLRP3 インフラマソームは自然免疫担当細胞に存在しているが、全ての組織マクロファージに存在しているわけではない。代表的な組織マクロファージである皮膚 Langerhans cell には NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質は同定されなかった (文献 5)。そこで、野生型マウス蝸牛の組織マクロファージに NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質 (NLRP3、ASC、Pro-caspase-1、IL-1 β) が発現しているか評価する。マウス蝸牛から抽出できる蛋白質量は極めて少量であるため、それぞれの蛋白質の mRNA が発現しているか RT-PCR で検討する。

まず、野生型マウス蝸牛から RNA を抽出し、*Nlrp3*、*Pycard* (ASC をコード)、*Casp1* (Caspase-1 をコード)、*I11b* の mRNA が発現しているか RT-PCR で検討する。次に、野生型マウス蝸牛におけるそれぞれの mRNA 発現量を、NLRP3 インフラマソームが発現していることが報告 (文献 4) されている他の組織における mRNA 発現量と Q-PCR で検討する。また、野生型マウス蝸牛におけるそれぞれの mRNA 発現量の経時的变化を、生後 0、4、8、14、28 日齢のマウスにおいて Q-PCR で検討する。

4. 研究成果

A、マウス蝸牛内に組織マクロファージが存在することを明らかにした。

野生型マウス蝸牛の凍結切片を作製し、マクロファージに特異的な抗体である Anti-mouse CD68 抗体で染色した。Anti-mouse CD68 抗体で染色される細胞は、ラセン神経節、基底板、血管条、ラセン靭帯などに広範囲に分布していた (図 2)。

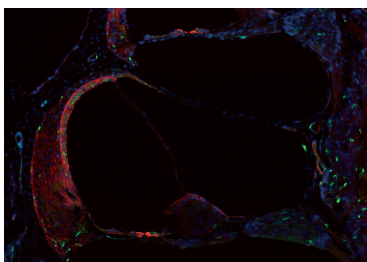


図 2 野生型マウス凍結切片
CD68/F-actin/DAPI

B-1、マウス蝸牛に NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質 (NLRP3、ASC、Pro-caspase-1、IL-1 β) の mRNA が発現していることを明らかにした。

野生型マウス蝸牛から total RNA を抽出し cDNA を作成した。cDNA を鋳型として、NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質の mRNA (*Nlrp3*、*Pycard*、*Casp1*、*I11b*) を増幅するように設計したプライマーを用いて PCR を行った。*Nlrp3*、*Pycard*、*Casp1*、*I11b* の全てにおいて電気泳動で PCR 産物を確認することができた (図 3)。

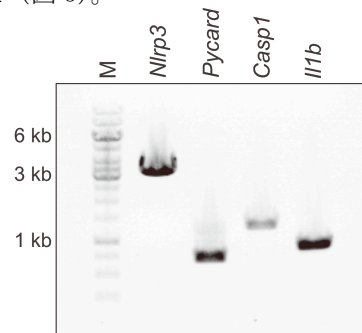


図 3 RT-PCR

B-2、マウス蝸牛に発現している NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質 (NLRP3、ASC、Pro-caspase-1、IL-1 β) の mRNA 発現量は、NLRP3 インフラマソームが発現していることが報告 (文献 4) されている他の組織とほぼ同等であることを明らかにした。

野生型マウス蝸牛から total RNA を抽出し cDNA を作成した。さらに、NLRP3 インフラマソームが発現していることが報告されている他の組織 (脳、肝臓、肺) から total RNA を抽出して cDNA を作成した。これらの cDNA を鋳型として *Nlrp3*、*Pycard*、*Casp1*、*I11b* の mRNA 発現量を Q-PCR で検討した。蝸牛における *Nlrp3*、*Pycard*、*Casp1*、*I11b* の発現量は、どの組織と比較しても 1/5 倍〜5 倍以内であった (図 4)。

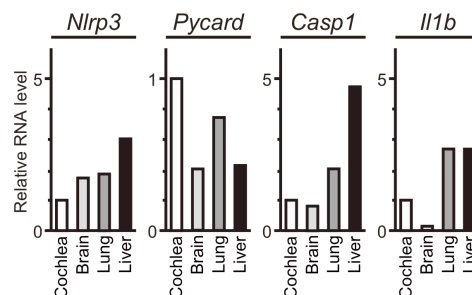


図 4 臓器別の RNA 発現量

B-3、マウス蝸牛に発現している NLRP3 インフラマソームを構成する蛋白質 (NLRP3、ASC、Pro-caspase-1、IL-1 β) の mRNA 発現量は、経時的に徐々に増加することを明らかにした。

生後 0、4、8、14、28 日齢の野生型マウス蝸牛から total RNA を抽出し cDNA を作成した。この cDNA を鋳型として *Nlrp3*、*Pycard*、

Casp1, *Il1b* の mRNA 発現量の経時的变化を Q-PCR で検討した。*Nlrp3*, *Pycard*, *Casp1*, *Il1b* ともに経過時的に mRNA 発現量は増加していた (図 4)。*Nlrp3*, *Pycard*, *Casp1* の mRNA 発現量は、生後 0 日齢に比べて、生後 4、8、28 日齢では、2~3 倍に増加していた。*Il1b* の mRNA 発現量は、生後 0 日齢に比べて、生後 8、28 日齢では、10~12 倍に増加していた。

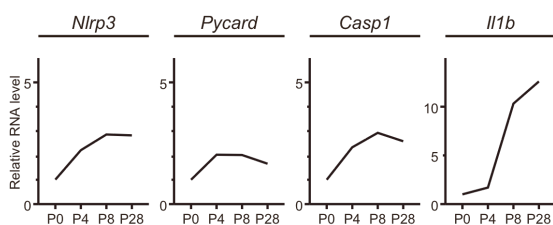


図 5 経時的な RNA 発現量

〔引用文献〕

- ① Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org> (accessed 2017-05-26)
- ② Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci*, 68, 765-783, 2011
- ③ Jesus AA, Goldbach-Mansky R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annu Rev Med*, 65, 223-244, 2014
- ④ Sibley CH, Plass N, Snow J, et al. Sustained response and prevention of damage progression in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease treated with anakinra: a cohort study to determine three- and five-year outcomes. *Arthritis Rheum*, 64, 2375-2386, 2012
- ⑤ Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 11, 723-237, 2011

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 7 件)

- ① 中西啓, 泉智沙子, 遠藤志織, 大和谷崇, 峯田周幸, 結核性中耳炎の 1 例, *JOHNS*, 査読無, Vol. 33, No. 3, 2017, 123-126
- ② 中西啓, 水田邦博, 遠藤志織, 細川久美子, 大和谷崇, 峯田周幸, 残存上皮が外表化して治癒した先天性鼓膜真珠腫例、耳鼻咽喉科臨床、査読有、Vol. 110, No. 2, 2016, 171-174
DOI:<http://doi.org/10.5631/jibirin.110.171>
- ③ 中西啓, 兼子恵美, 水田邦博, 診療所に

おける高齢者の栄養補給・補液、*ENTONI*、査読無、No. 190, 2016, 59-67

④ 中西啓, 水田邦博, 峯田周幸, 高齢者の耳管開放症例、*JOHNS*、査読無、Vol. 32, No. 3, 2016, 403-406

⑤ 中西啓, 水田邦博, 鼓膜炎、*JOHNS*、査読無、Vol. 32, No. 1, 2016, 123-126

⑥ Endo S, Mizuta K, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H. The effect of ventilation tube insertion or trans-tympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. *Acta Otolaryngologia*, 査読有, Vol. 136, No. 6, 2016, 551-555
DOI:10.3109/00016489.2016.1143118

⑦ Kurima K, Ebrahim S, Pan B, Sedlacek M, Sengupta P, Millis B, Cui R, Nakanishi H, Fujikawa T, Kawashima Y, Choi BY, Monahan K, Holt JR, Griffith AJ, Kachar B. TMC1 and TMC2 localize at the site of mechanotransduction in mammalian inner ear hair cell stereocilia. *Cell Reports*, 査読有, Vol. 12, No. 10, 2015, 1606-1617
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.058

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① Nakanishi H. *NLRP3* mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34. ARO 40th Annual MidWinter Meeting, 2017. 2. 11-15, USA
- ② 中西啓, 本邦アッシャー症候群タイプ 1 症例の検討、第 61 回日本聴覚医学会総会・学術講演会、2015. 10. 19-21、青森県・盛岡市
- ③ 中西啓, *COL4A5* に遺伝子変異を同定することができたアルポート症候群例における聴力像の検討、第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会、2016. 10. 5-8、長野県・長野市
- ④ 中西啓, 当院における ANCA 関連血管炎性中耳炎症例の検討、第 64 回耳鼻咽喉科学会中部地方部会連合会、2016. 7. 16, 三重県・津市
- ⑤ 中西啓, 先天性外耳道鼓膜真珠腫例、第 11 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2015. 7. 19、徳島県・徳島市
- ⑥ 中西啓, 高齢者の耳管開放症例、第 78 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会、2016. 6. 23-24、鹿児島県・鹿児島市
- ⑦ 中西啓, 本邦アッシャー症候群タイプ 2

患者における聴力像の検討、第 60 回日本聴覚医学会総会・学術講演会、2015. 10. 21-23、東京都・新宿区

⑧ 中西啓、蝸牛有毛細胞において *Tmc2* は *Tmc1* を補完するのか、第 25 回日本耳科学会総会・学術講演会、2015. 10. 7-10、長崎県・長崎市

⑨ 中西啓、De-novo 変異にて発症したアルポート症候群例、第 63 回耳鼻咽喉科学会中部地方部会連合会、2015. 7. 19、長野県・松本市

⑩ 中西啓、当院における遅発性内リンパ水腫症例の検討、第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会、2015. 6. 25-26、静岡県・浜松市

⑪ Nakanishi H. Progressive nonsyndromic hearing loss associated with mutation of the *NLRP3* gene and alteration of innate immunity. COSM 2015, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 啓 (NAKANISHI, Hiroshi)

浜松医科大学・耳鼻咽喉科頭頸部外科・助教

研究者番号：20444359