

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05178

研究課題名(和文)インフラマソーム形成におけるNLRP3リン酸化修飾の生理的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of physiological roles of NLRP3 phosphorylation in the NLRP3 inflammasome formation

研究代表者

森田 林平(Morita, Rimpei)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：00362541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性サイトカインIL-1bの細胞外産生には分子複合体インフラマソームの形成によりcaspase-1の活性化が必須である。申請者らは非受容型チロシンキナーゼBTKがNLRP3インフラマソームの活性化に必須の分子であることを見出した。本申請ではBTKによるNLRP3のリン酸化修飾部位を同定し、その生理的意義を明らかにすることが当初の目的であった。しかし技術的困難と競合グループより同様の成果が報告されたため、NLRP3の結合因子の同定を目指した。その結果、アクチン調整因子gelsolinがNLRP3インフラマソームとapoptosisをミトコンドリア上で共制御することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりgelsolinは細胞骨格アクチンを調整するのみならず、炎症性マクロファージのプログラム細胞死(pyroptosisとapoptosis)を抑制し生存を維持するユニークな因子であることが明らかになりつつある。これはいまだ不明である炎症環境下におけるマクロファージの生存維持が炎症反応の経過と組織修復に与える意義の解明につながる。感染症のみならずがんや生活習慣病にも炎症反応は必ず伴いその病態を修飾することから、本成果は多くの疾患の病態解明につながると期待される。

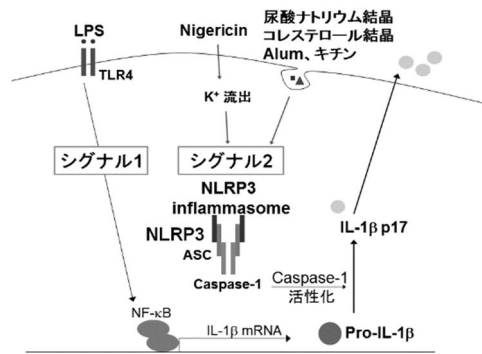
研究成果の概要(英文)：A pro-inflammatory cytokine IL-1b requires caspase-1 activation through NLRP3 inflammasome formation to be secreted extracellularly. We have previously reported that a non-receptor tyrosine kinase BTK is essential for NLRP3 inflammasome activation. At the beginning, in this study we had tried to determine amino acid residues of NLRP3 phosphorylated by BTK and to clarify its physiological significance. However, we met technical difficulties to purify a sufficient amount of phosphorylated NLRP3 for LC/LC-MS analysis and another research group reported the significance of phosphorylated NLRP3. Thus, we made an alternative of identifying a partner of NLRP3 in macrophages. As a result, we have found that an actin-modulating factor gelsolin negatively regulates NLRP3 inflammasome activation as well as apoptosis on the mitochondria.

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 マクロファージ インフラマソーム プログラム細胞死 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景



(図1) NLRP3 インフラマソームと IL-1β 産生

(1) マクロファ - ジや樹状細胞から産生される IL-1β は IL-6 や TNF-α と共に炎症反応の中心的な役割を担うサイトカインである。しかし IL-1β の産生機序は他の炎症性サイトカインと大きく異なり、TLR/NF-κB シグナル(シグナル1)は前駆型 pro-IL-1β を細胞内に産生するのみである。Pro-IL-1β を活性化型 IL-1β p17 に転換するには、シグナル2によりインフラマソームが形成され caspase-1 を活性化することが必須である。

インフラマソームは ASC と pro-caspase-1 そして Nod 様受容体(NLR)或いは AIM2 から成る分子複合体である。現在同定されている4種類のインフラマソーム(NLRP3, AIM2, NLRC4, NLRP1)の中でも NLRP3 inflammasome は様々な炎症性疾患における

IL-1β の産生を制御している。NLRP3 インフラマソームの形成を促すシグナル2の誘導物質として、リステリア毒素やワクチンアジュバンドの alum そして内因性因子の尿酸ナトリウム結晶やコレステロール結晶が知られている(Man *et al.* Immunol. Rev. 2015)。申請者らはダニの外骨格成分のキチンにより NLRP3 インフラマソームが活性化し、アレルギー性喘息が誘発されることを見出した(Kim *et al.* PNAS. 2015)。この様に NLRP3 インフラマソームは感染症のみならず生活習慣病やアレルギー等の広範な疾患の病態形成に関与している(図1)。

(2) 細胞内で NLRP3 インフラマソームの形成がどのように制御されているかは依然不明な点が多かった。申請者らは低分子阻害剤スクリーニングにより NLRP3 インフラマソーム形成に関わる細胞内制御分子の同定を試みた。その結果 TEC ファミリー - 非受容体型チロシンキナーゼである Bruton's チロシンキナーゼ(BTK)が NLRP3 インフラマソームの形成と caspase-1 の活性化に必須の分子であることを見出した(Ito *et al.* Nat. Commun. 2015)。具体的には下記の事柄を見出した。

- 1) シグナル2により BTK は NLRP3 と直接結合する。
- 2) BTK のチロシンキナーゼドメインは NLRP3 の NACHT および Leucine-Rich Repeat ドメインと結合する。
- 3) BTK 阻害剤 LFM-A13 は BTK と NLRP3 の結合を阻害し、caspase-1 の活性化を低下させる。
- 4) BTK は AIM2 と結合しない。また LFM-A13 は AIM2 インフラマソームの活性には影響しない。
- 5) チロシンキナーゼ不活性の変異 BTK (BTK-E567K) は NLRP3 との結合能が低く、caspase-1 の活性化も低下している。
- 6) マウス脳梗塞モデルで BTK 阻害剤 ibrutinibu は脳虚血炎症を軽減し梗塞体積を減少させる。

これらの所見は「BTK は NLRP3 を直接かつ特異的にリン酸化することにより inflammasome 形成を制御する」という NLRP3 インフラマソームの形成には NLRP3 の翻訳後修飾が重要という新たな制御メカニズムの存在を示唆している。

現在まで SYK, JNK, PKR, IRAK が NLRP3 インフラマソームの形成に重要と報告されているが NLRP3 に対する直接の作用は不明である(Hara *et al.* Nat. Immunol. 2013, Lu *et al.* Nature 2012, Lin *et al.* PNAS 2014)。一方、PKCδによる NLRC4 のリン酸化が NLRC4 インフラマソームの形成に必須であることが報告されている(Qu *et al.* Nature 2012)。しかし NLRP3 インフラマソームはより広範囲な疾患の炎症を制御していることから、リン酸化 NLRP3 の存在・責任キナーゼ・リン酸化 NLRP3 の生理的意義を明らかにすることは、様々な炎症疾患の制御に結びつく重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では「BTKによる NLRP3 のリン酸化修飾は NLRP3 インフラマソームの形成に必須」という NLRP3 インフラマソームの新規活性化機序の確立を目指し、細胞から個体レベルまでの下記の3つの課題に取り組む。

- 1) BTK は NLRP3 を直接リン酸化するのか？
- 2) NLRP3 のリン酸化はインフラマソームの形成に必須か？
- 3) 生体内の炎症反応における NLRP3 のリン酸化の意義は？

申請者はヒト単球細胞株 THP-1 から BTK 欠損 THP-1 細胞株を作製し、Phos-tag®を用いてリン酸化 NLRP3 の検出を試みることににより、「BTK は NLRP3 のリン酸化を誘導する」という結果を既に得ている(未発表データ)(詳細は研究計画・方法欄)。

初年度ではこの結果を踏まえ、生化学実験および細胞イメージングにより課題1)と2)を明らかにし、質量分析により NLRP3 のリン酸化部位を同定する。

次年度以降は、先ず同定された NLRP3 のリン酸化部位を細胞レベルで検証する。更に NLRP3 リン酸化部位の変異ノックインマウスを作製し、*in vitro* 培養実験のみならず炎症性疾患マウスモデルを解析することにより課題 3) を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 を用いた BTK または *Gsn* 欠損細胞クローンの作製

ヒト単球細胞株 THP-1 細胞は PMA 処理 (シグナル 1) によりマクロファージ (THP-1 マクロファージ) に分化し、様々なシグナル 2 誘導物質によりインフラマソームを形成し IL-1 β を産生することが知られている。申請者らは CRISPR/Cas9 ベクター (lentiCRISPR v2) を用いて BTK 欠損 THP-1 細胞クローンを作製する。また、マウスマクロファージ株 J774-1 細胞より *Gsn* 欠損細胞クローンを作製する。コントロールとして yeast GAL4-UAS promoter を標的とするベクターを用いる。

(2) Phos-tag[®]によるリン酸化 NLRP3 の検出

Phos-tag[®]はリン酸化体を補足する機能分子であり、アクリルアミドと結合させることにより、SDS-PAGE にてリン酸化と非リン酸化タンパクを分離・検出することが可能になる (Kinoshita-Kikuta *et al.* Methods Mol. Biol. 2015)。マクロファージ溶解液を SDS-PAGE の後、抗 NLRP3 抗体と抗 BTK 抗体を用いてウェスタンブロットで標的分子を検出する。

(3) NLRP3 のリン酸化部位の同定

THP-1 マクロファージを nigericin で刺激し、抗 NLRP3 抗体で NLRP3 を免疫沈降し Phos-tag[®] SDS-PAGE および銀染色を行う。リン酸化および非リン酸化 NLRP3 のバンドを切り出し、ゲル内消化の後に LC-MS/MS 解析を行う (ゲル内消化以降の工程は外注)。リン酸化と非リン酸化ペプチドの MS/MS スペクトルのピークを比較し、リン酸化部位を同定する。

(4) インフラマソーム形成前の NLRP3 の結合因子の同定

LPS 刺激マウス骨髄マクロファージの溶解液を抗 NLRP3 抗体ビーズにより免疫沈降を行い、SDS-PAGE と Oriole 染色により特異的なバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析により分子を同定する。

(5) Gelsolin、NLRP3 とミトコンドリアの結合の観察

マウス骨髄マクロファージを LPS と nigericin で刺激した後に、MitoSpy Orange でミトコンドリアをラベルし、アセトン固定の後に抗 gelsolin 抗体で染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

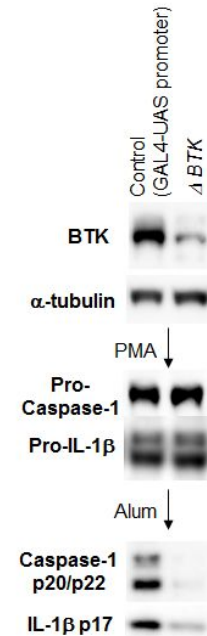
(1) BTK 欠損による NLRP3 インフラマソーム活性化の低下 (図 2)
BTK 欠損 THP-1 マクロファージでは alum 刺激に対する caspase-1 活性化と IL-1 β 産生能が低下したことから、BTK は NLRP3 インフラマソーム形成に必須の分子であることを再確認できた。

(2) Phos-tag[®]によるリン酸化 NLRP3 の検出 (図 3)

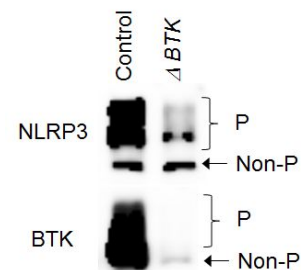
Nigericin 刺激により NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導し Phos-tag 入り SDS-polyacrylamide gel で電気泳動を行った。その後、抗 NLRP3 抗体と抗 BTK 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果 BTK の欠損によりリン酸化 NLRP3 が著減することを見出した。つまり BTK は NLRP3 のリン酸化に関与していることが明らかとなった。

(3) NLRP3 のリン酸化部位の同定

上記の方法により THP-1 マクロファージからリン酸化および非リン酸化 NLRP3 バンドを切り出し、外部受託業者により NLRP3 リン酸化部位の同定を試みた。しかし全長の NLRP3 を解析するには大量の NLRP3 バンドが必要であり、複数回の解析を行ったが結果としてリン酸化アミノ酸の同定はできなかった。また同時期に NLRP3 のリン酸化の重要性を報告する論文が発表され (Song *et al.* Mol. Cell. 2017. 68:185)、研究の方向性を再考することとなった。



(図 2) BTK 欠損 THP-1 マクロファージでは alum (シグナル 2) で誘導される NLRP3 インフラマソームの活性が著しく低下している

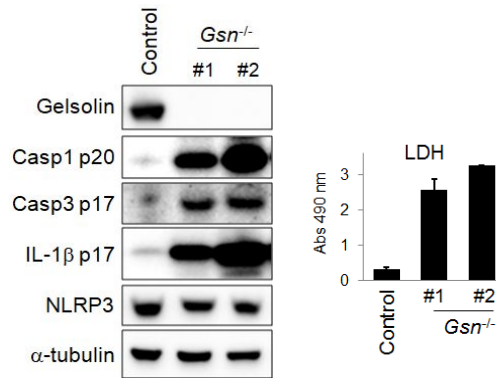


(図 3) BTK 欠損 THP-1 マクロファージでは nigericin 刺激時のリン酸化 NLRP3 が減少する

(4) インフラマソーム形成前の NLRP3 の結合因子の同定

そこで、より直接的に NLRP3 インフラマソームの形成制御因子を同定するために LPS 刺激マクロファージ溶解液を抗 NLRP3 抗体で免疫沈降し特異的な分子の同定を試みた。その結果アクチン調節因子 gelsolin を見出した。免疫沈降-ウェスタンブロットおよび proximity ligation assay で NLRP3 と gelsolin の結合を確認した。

(5) Gelsolin は NLRP3 インフラマソーム形成と apoptosis を負に制御する(図4) *Gsn* 欠損 J774-1 細胞クローンでは nigericin 刺激に対して IL-1 β の産生と caspase-1 の活性化が亢進していることが明らかとなった。興味深いことに、gelsolin 欠損により炎症性細胞死 pyroptosis と apoptosis の 2 種類のプログラム細胞死が亢進していることも判明した。



(図4) *Gsn* 欠損による NLRP3 インフラマソーム活性の亢進
左: *Gsn* 欠損による活性型 caspae-1 & -3 と IL-1 β の増加
右: LDH の増加

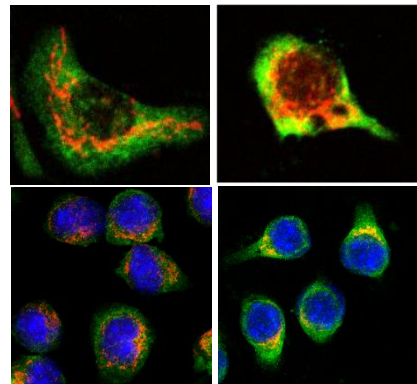
(6) Gelsolin はミトコンドリアと結合することにより NLRP3 インフラマソーム形成を制御する(図5)

Gelsolin が NLRP3 インフラマソーム形成

と共に apoptosis 起動の間でもあるミトコンドリアに結合するか否か、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、NLRP3 インフラマソームの形成の際、gelsolin はミトコンドリアに結合することを見出した(図5上段)。加えて、gelsolin の欠損により NLRP3 のミトコンドリアへの結合が促進されることより(図5下段)、炎症マクロファージにおいて gelsolin はミトコンドリアと結合することにより pyroptosis と apoptosis を共制御していると考えられる。

(7) まとめ

申請時は NLRP3 のリン酸化修飾の解析を目指したが、技術的に困難が伴い、海外の研究グループより同様の論文が発表されたことは痛恨であった。しかし視点を変えることにより NLRP3 インフラマソーム形成と apoptosis を共制御する因子 gelsolin を同定することができた。現在マクロファージ特異的 *Gsn* 欠損マウスを作製中であり、今後このマウスを用いて本研究で見出した現象の生理的意義を明らかにしてゆく。



(図5) Gelsolin は NLRP3 のミトコンドリアへの結合を抑制する
上: Gelsolin (緑)とミトコンドリア(赤)との結合
左: LPS 刺激、右: LPS と nigericin 刺激
下: NLRP3 (緑)とミトコンドリア(赤)との結合
左: Ctrl、右: *Gsn*^{-/-} J774-1 (LPS と nigericin 刺激)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, Ando M, Akanuma T, Iizuka M, Sakai R, Morita R, Yoshimura A	4. 巻 109
2. 論文標題 Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 2130-2140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo T, Morita R, Okuzono Y, Nakatsukasa H, Sekiya T, Chikuma S, Shichita T, Kanamori M, Kubo M, Koga K, Miyazaki T, Kassai Y, Yoshimura A	4. 巻 8
2. 論文標題 Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 15338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms15338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tasaki S, Suzuki K, Nishikawa A, Kassai Y, Takiguchi M, Kurisu R, Okuzono Y, Miyazaki T, Takeshita M, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Ikeura K, Tsunoda K, Morita R, Yoshimura A, Toyoshiba H, Takeuchi T	4. 巻 76
2. 論文標題 Multiomic disease signatures converge to cytotoxic CD8 T cells in primary Sjogren's syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1458-1466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2016-210788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A.	4. 巻 -
2. 論文標題 MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4312.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama M, Yasuoka H, Yamaoka K, Suzuki K, Kaneko Y, Kondo H, Kassai Y, Koga K, Miyazaki T, Morita R, Yoshimura A, Takeuchi T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Enhanced IgG4 production by follicular helper 2 T cells and the involvement of follicular helper 1 T cells in the pathogenesis of IgG4-related disease.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-016-1064-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa A, Suzuki K, Kassai Y, Gotou Y, Takiguchi M, Miyazaki T, Yoshimoto K, Yasuoka H, Yamaoka K, Morita R, Yoshimura A, Takeuchi T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of definitive serum biomarkers associated with disease activity in primary Sjogren's syndrome.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-016-1006-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murota A, Suzuki K, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Kondo Y, Takeshita M, Niki Y, Yoshimura A, Takeuchi T.	4. 巻 78
2. 論文標題 Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cytokine.	6. 最初と最後の頁 87-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2015.12.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi R, Chikuma S, Shichita T, Morita R, Sekiya T, Ouyang W, Ueda T, Seki H, Morisaki H, Yoshimura A.	4. 巻 28
2. 論文標題 Innate-like function of memory Th17 cells for enhancing endotoxin-induced acute lung inflammation through IL-22.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 233-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxv070.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama M, Suzuki K, Kassai Y, Miyazaki T, Morita R, Yoshimura A, Takeuchi T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Resolution of elevated circulating regulatory T cells by corticosteroids in patients with IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 430-432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.12725.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森田林平、吉村昭彦
2. 発表標題 Clathrin heavy chain is an NLRP3 partner for NLRP3 inflammasome activation
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤泰介、森田林平、吉村昭彦
2. 発表標題 Notch シグナルによる活性化 T 細胞からステムセルメモリー T 細胞への転換と免疫療法への応用
3. 学会等名 第21回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----