

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06270

研究課題名（和文）炎症の慢性化に関するNLRP3インフラマソームの制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of NLRP3 inflammasome in chronic inflammation

研究代表者

村上 智彦（Murakami, Tomohiko）

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50510723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,500,000円

研究成果の概要（和文）：NLRP3インフラマソームは慢性炎症の発症に重要であることが判明しているが、NLRP3インフラマソームの制御機構は完全には理解されていない。本研究では、NLRP3と結合する新規タンパク質の探索を質量分析にて行い、Gタンパク質サブユニット beta 1（GNB1）を見出した。NLRP3インフラマソームにおけるGNB1の機能解析の結果、GNB1はNLRP3とASCの結合を抑制することでNLRP3インフラマソームを負に制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、NLRP3インフラマソームを負に制御する新規因子であるGNB1を見出した。Gタンパク質とNLRP3インフラマソームの関連を示したことは新規性が高く、学術的にも重要である。さらにNLRP3インフラマソームが慢性炎症の発症に重要であることが判明していることから、GNB1によるNLRP3インフラマソームの抑制効果を利用することで、慢性炎症性疾患に対する新規治療法あるいは新規予防法のに応用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：The NLRP3 inflammasome has been reported to be important for the development of chronic inflammation. However the regulatory mechanism of the NLRP3 inflammasome is not completely understood. In this study, we searched for new proteins that bind to NLRP3 by mass spectrometry and found G protein subunit beta 1 (GNB1). Functional analysis of GNB1 in NLRP3 inflammasome revealed that GNB1 negatively regulates NLRP3 inflammasome by suppressing the binding of NLRP3 to ASC.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：炎症 インフラマソーム NLRP3 GNB1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患、骨関節疾患、代謝性疾患などの疾患発症には慢性炎症が関係する。最近、慢性炎症の発症過程において、NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体が中心的役割を果たしていることが明らかにされてきた。NLRP3 インフラマソームは、感染や様々な生体内ストレスにตอบสนองして、センサータンパク質 NLRP3 がアダプタータンパク質 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 及び Caspase-1 と複合体を形成することにより構築される。その結果、Caspase-1 が活性化し、強力な炎症性サイトカインである Interleukin-1b (IL-1b) ならびに IL-18 が分泌され、最終的には、細胞死 (pyroptosis) が誘導される。

NLRP3 インフラマソームを活性化させる原因因子としては、歯周病菌などの病原性細菌の感染、脂質、結晶 (ハイドロキシアパタイト、尿酸塩 (MSU))、小胞体ストレスなどが知られている。これら様々なストレスは、カリウム (K) の細胞外流出、リソソームダメージなどを介し、活性酸素やミトコンドリアダメージを発生させ、NLRP3 インフラマソームを活性化させることが報告されてきた。しかしながら、活性酸素やミトコンドリアダメージは NLRP3 インフラマソーム活性化の一つの要因にしかすぎないことも報告されていることから、NLRP3 インフラマソーム活性化を決定づけるメカニズムは未だに不明である。

NLRP3 インフラマソーム活性化を決定づけるメカニズムは解明されていない一方で、カルシウムシグナルの阻害によって、NLRP3 インフラマソームの活性化が強く抑制できることが判明している。しかし、カルシウムイオノフォアである ionomycin によるカルシウム流入刺激だけでは NLRP3 インフラマソームは活性化しない。これらの結果は、NLRP3 インフラマソームを活性化させる未同定のメカニズムが存在することを強く示唆していた。そこで本研究では、NLRP3 インフラマソーム活性化に関連する未同定の分子機構を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

(1) NLRP3 インフラマソームの活性化に関わる新規因子の同定

IL-1b の成熟に重要である NLRP3 インフラマソームが慢性炎症の発症に重要であることが明らかとなってきた。NLRP3 インフラマソームの活性化を制御するメカニズムには未同定の因子が関与する可能性が示唆されている。したがって、NLRP3 インフラマソームの活性化機構が明らかになれば、慢性炎症の発症機構を解明できる可能性がある。そこで、NLRP3 インフラマソームの活性化に関与する新規因子を探索する。

(2) 同定した因子による NLRP3 インフラマソームの制御機構の解析

NLRP3 インフラマソーム活性化に必要な上流シグナルの解明は、慢性炎症の病態と発症機序の解明に大きく寄与すると期待される。そこで、NLRP3 インフラマソームの誘発刺激によって活性化される上流シグナルを解析し、同定した分子が司るシグナルとセンサータンパク質である NLRP3 との相互関係を分子および細胞レベルで分析する。これらの解析を通して、同定した因子による NLRP3 インフラマソームの制御機構を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) NLRP3 インフラマソームの活性化に関わる新規因子の同定

NLRP3 インフラマソームの活性化にはシグナル1とシグナル2と呼ばれる二つのステップが重要であることが知られている。シグナル1はLPSなどの刺激によるプライミングと呼ばれるステップで、NLRP3やIL-1bなどの転写を誘導する。続いて、シグナル2はトリガーと呼ばれるステップでNLRP3インフラマソームの構築を最終的に誘導し、Caspase-1が活性化する。特にシグナル2はATPなどのNLRP3インフラマソームを活性化させる刺激を負荷した直後から活性化することから、シグナル2には新規の遺伝子発現誘導や新規のタンパク質合成は関与しないと考えられている。実際、シクロヘキシミドにより新規のタンパク質合成を阻害してもNLRP3インフラマソームは活性化された。このことから、未同定のタンパク質が、センサータンパク質であるNLRP3と直接結合し、インフラマソームの活性化を制御している可能性が高いと考えられた。そこで、NLRP3に結合するタンパク質を探索するために、NLRP3と共免疫沈降するタンパク質あるいはNLRP3インフラマソーム凝集体を回収、精製し、プロテオミクス解析を行い、結合タンパク質の同定を目指す。使用する細胞としては、安定かつ強いインフラマソーム活性を誘導できるマクロファージ初代培養を用いた。質量分析解析は、大阪大学の共通機器である最新鋭の質量分析機器LC-ESI-MS/MSを用い、網羅的な分析が可能なショットガン分析を行う。さらに、通常の条件では、外来タンパク質の混入等により、質量分析解析の感度や再現性が低い場合が多く見受けられる。この点を鑑みて、安定同位体アミノ酸標識によりタンパク質の変化を鋭敏に検出することが可能なSILAC法を用いた質量分析解析を並行して実施する。

(2) 同定した因子による NLRP3 インフラマソームの制御機構の解析

同定した分子が、NLRP3 のストレス感知機構に関わるか否かを検討するために、当該分子と NLRP3 との相互関係を免疫共沈降法、結合実験ならびに免疫染色などの細胞染色により機能解析実験を行う。また当該分子の細胞での役割を明らかにするために、過剰発現実験、阻害剤が存在する場合は阻害剤の添加、shRNA によるノックダウン実験を実施し、NLRP3 インフラマソームの活性化に対する効果を検討する。また必要に応じて、同定したタンパク質の遺伝子欠損マウスを入手あるいは作製し、NLRP3 インフラマソームの制御に関連するかの検討を行う。インフラマソームの活性化は、培養上清中の IL-1 β 分泌量を指標に評価する。これに加え、本研究では NLRP3 インフラマソームの活性化機構をより詳細に調べるため、細胞内外の Caspase-1 および IL-1 β の活性化をウエスタンブロッティング法により検出し、インフラマソームの活性化の更なる指標とした。

4. 研究成果

インフラマソームの活性化にはセンサータンパク質が重要であることから、センサータンパク質である NLRP3 と直接結合し、インフラマソームの活性化に関与するタンパク質が存在する可能性が高いと考えられた。そこで、NLRP3 に結合するタンパク質を探索するために、NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導する ATP や Nigericin などの各種刺激に応じて NLRP3 と共免疫沈降するタンパク質を回収および精製し、質量分析を行い、結合タンパク質の探索および同定を試みた。その結果、複数の候補因子を見出したが、その中で NLRP3 やインフラマソームとの関連性が報告されていない新規タンパク質として、G タンパク質サブユニット beta 1 (GNB1) に着目した。GNB1 は G タンパク質の 3 つのサブユニットの一つであり、その変異は GNB1 症候群と呼ばれる難病の原因遺伝子と知られていたが、その詳細な機能やインフラマソームに関する報告はなされていなかった。

GNB1 と NLRP3 の結合は、GNB1 と NLRP3 の免疫沈降法による結合実験、さらにタンパク質の相互作用を細胞染色にて検出できる Proximity Ligation Assay を用いて確認した。また NLRP3 の各ドメインの欠損タンパク質を作製し、GNB1 との結合の有無を確認したところ、GNB1 は NLRP3 の PYD (pyrin domain) ドメインを介して結合していることが判明した。

続いて GNB1 が NLRP3 インフラマソームの活性化に実際に関与するかを検討するために、レトロウイルスによる shRNA を用いたノックダウン実験を行い、NLRP3 インフラマソームの活性化に対する効果を調べた。その結果、GNB1 ノックダウンマクロファージは NLRP3 インフラマソームの活性が亢進することが判明した。一方、GNB1 ノックダウンは AIM2 インフラマソームの活性には影響を示さなかった。これらの結果は、GNB1 が NLRP3 インフラマソームを特異的に負に制御していることを示していた。

さらに詳細に NLRP3 インフラマソームにおける GNB1 の機能を解析するために、GNB1 欠損マウスを入手し、解析を行った。GNB1 欠損マウスは神経系の発生異常のため、生後すぐに死亡する。そこで、GNB1 欠損マウス胎子の肝臓を採取し、胎子肝臓に含まれる造血幹細胞を MCSF (macrophage colony stimulating factor) にて分化誘導することで、GNB1 欠損マクロファージを培養することに成功した。GNB1 欠損マクロファージの NLRP3 インフラマソーム活性を測定したところ、野生型に比べ NLRP3 インフラマソーム活性が亢進していた。これらの結果は、GNB1 が NLRP3 インフラマソームを負に制御していることを強く示していた。

続いて、GNB1 欠損により NLRP3 インフラマソームの活性が亢進するメカニズムを解明するために、GNB1 の下流シグナルとして報告のある cAMP あるいは PLC-IP3-Ca²⁺経路が障害されているかを調べたところ、有意な差は認められなかった。加えて、GNB1 欠損あるいは GNB1 遺伝子変異で MAPK や AKT シグナルが障害を受けるといった報告があったことから、NLRP3 インフラマソーム活性化時の MAPK や AKT シグナルの変動を調べた。その結果、MAPK や AKT シグナルに関しても GNB1 欠損と野生型で有意な違いは認められなかった。

これまで報告されていた GNB1 関連経路で違いが観測されなかったことから、我々は GNB1 が NLRP3 の PYD ドメインと結合することに着目した。PYD は NLRP3 と ASC の結合に関与するドメインとして知られていたことより、GNB1 が PYD を介して NLRP3 と ASC の結合を阻害している可能性が考えられた。ASC は NLRP3 と結合すると速やかにオリゴマー化することが知られている。そこで、GNB1 が NLRP3 と ASC の結合を阻害するかを ASC のオリゴマー化を検出することで検証した。その結果、GNB1 の過剰発現により、NLRP3 による ASC のオリゴマー化が阻害されることが判明した。以上の結果から、GNB1 は NLRP3 と ASC の結合を抑制することで NLRP3 インフラマソームを負に制御していることが明らかとなった。NLRP3 インフラマソームは CaSR (calcium sensing receptor) などの GPCR (G protein coupled receptor) による制御を受けることが知られていることから、不要な NLRP3 インフラマソームの活性化を抑えるために GNB1 が機能している可能性が考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Murakami T, Ruengsinpinya L, Nakamura E, Takahata Y, Hata K, Okae H, Taniguchi S, Takahashi M, Nishimura R. G protein subunit beta 1 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation. Journal of immunology, 202(7):1942-1947. (2019) 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1801388.

村上智彦 小胞体ストレスセンサーOASIS による骨形成制御 THE BONE VOL.32 NO.2
43-47 (2018) 査読無

村上智彦 慢性炎症を基盤にした歯周疾患の病態の理解と治療戦略 CLINICAL CALCIUM Vol.26
No.5 P114(766)-120(772) (2016) 査読無
doi: CliCa1605766772.

〔学会発表〕(計 8 件)

村上智彦 関節破壊誘導因子の探索とその機能解析 骨代謝学会 Skeletal Science Retreat
岡山 (2017/11/25-26)

Murakami T, Novel aspect of inflammatory molecule in articular cartilage destruction
Bone Biology Forum, Chiba, Japan (2017/8/19)

村上智彦 炎症性サイトカイン IL-1b の産生機構の解析, 第 5 回大阪骨関節コロキウム
(2016/11/25)

村上智彦 骨代謝におけるストレス応答の役割 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 研究奨
励賞受賞講演 大阪 (2016/7/22)

村上智彦, 高畑佳史, 波多賢二, 西村理行 骨吸収を誘導する炎症性サイトカイン IL-1b の
産生に関わるインフラマソームの制御機構解析 第 2 回日本骨免疫学会 沖縄 (2016/7/6)

〔図書〕(計 3 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

https://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。