

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07339

研究課題名(和文) インフラマソームアダプターASC解析による自己炎症性疾患の共通病態形成機構の解明

研究課題名(英文) Common Pathogenesis Mechanisms of Autoinflammatory Diseases by Inflammasome Adaptor ASC Analysis

研究代表者

駒井 浩一郎 (Komai, Koichiro)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：40304117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： SARS-CoV-2由来ORF3a共存下でASC機能亢進型エクソン2欠損スプライスバリエント(exon2)は野生型に比して有意に高いIL-1 β を産生することを認めた。またインフラマソーム結合新規因子として抗菌ペプチドDermcidinを同定した。ASCはrs8056505A>G SNPによって exon2優位になりIL-1 β によって野生型優位になる。そこでIL-1 β 刺激THP-1細胞のRNAseqを行いIMASCRNAなどスプライシング調節因子の発現を認めた。以上よりSNPによる exon2発現に伴うIL-1 β がスプライシング干渉しASCバリエントが周期発現する「周期発現モデル」を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ASCの機能亢進型スプライスバリエントを生じる選択的スプライシングがSNPとASC依存的に産生されるIL-1 β によって制御されることが明らかになった。このことより申請者はバリエントと正常型がASCが自己形成するネガティブフィードバックループによって周期的に交互発現する「周期発現モデル」を提唱するに至った。これは自己炎症性疾患に多く認められる周期的炎症のメカニズムを説明しうる初めてのモデルであり、今後本モデルの検証を行うことで、生活習慣病や認知症の一部、新型コロナウイルス感染症の増悪など多くの疾患を包含する自己炎症性疾患の効果的な診断法や治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We found that THP-1 cells expressed ASC exon 2-deficient splice variant (exon2) in the presence of SARS-CoV-2-derived ORF3a, produced significantly higher IL-1 β than the case with wild type ASC. We identified the antimicrobial peptide dermcidin as a novel inflammasome-binding factor. We have found that rs8056505A>G SNP in ASC confers exon2 dominance, while IL-1 β confers wild type dominance. RNAseq of IL-1 β -stimulated THP-1 cells revealed the expression of splicing regulators such as MASCRNA. Based on the above, we proposed a "cyclic expression model" in which IL-1 β interferes with the splicing of ASC variants in response to the expression of exon2 induced by SNP.

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：自己炎症性疾患 インフラマソーム ASC スプライスバリエント

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病などの認知症、感染症、痛風、脂肪肝や動脈硬化など各種の生活習慣病などは、各疾患の原因物質である危険シグナルを細胞内に伝達する様々なインフラマソームタンパク質複合体の機能変調による「自己炎症性疾患」として認識されつつある。申請者はこれまでに各インフラマソームの共通構成分子である ASC:PYCARD (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD: PYD and CARD domain containing) のエクソン 2 脱落型スプライスバリエントを日本人集団中に独自に見出した。またインフラマソーム機能異常が疑われる回帰性リウマチ患者ではこのバリエントが優位に発現していることを見出し、バリエント ASC は正常型と比較して IL-18 産生量を増大させ、シグナル受容分子 NLRP3 との結合性が増大していることを報告した (科研費基盤 C 2016-8、Suganuma et al., Asian Pacific J Allergy Immunol. PMID: 31421660, 2019、国内特許 特開 2016-101092)。

2. 研究の目的

インフラマソーム構成タンパク質のうち、危険因子の受容分子は NLRP1, NLRP3, AIM2 など複数が見出されているが、イフェクターである Caspase-1 に活性化シグナルを伝えるアダプターは ASC しか見出されていない。つまり ASC の機能異常は幅広い自己炎症性疾患の病態形成機構へ関与すると考えられるため、本研究ではバリエント ASC のさらに詳細な機能解析とバリエント産生機序の解明を行い、様々な自己炎症性疾患に共通する病態形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では ASC エクソン 2 脱落型スプライスバリエント発現に伴うインフラマソーム機能の変調を明らかにし、自己炎症性疾患の共通病態形成機構を解明するために、2020-22 年度の 3 年間で以下の課題に取り組んだ。

課題 1: ASC スプライスバリエントの機能の解明

課題 2: ASC スプライスバリエントの産生機序の解明

課題 1: PYCARD (ASC) スプライスバリエントの機能解析

課題 1 の目的: ASC スプライスバリエントの、正常型と比較した機能変化の解明

ASC 正常型およびスプライスバリエントのヒト単球系 THP-1 細胞内強制発現系を構築し、PMA と尿酸結晶による刺激実験から ASC 正常型/バリエント間で IL-18 産生量に有意な差異が存在することを明らかにしていた (Suganuma et al., Asian Pacific J Allergy Immunol. PMID: 31421660, 2019)。これを踏まえ、本研究では構築済み THP-1 細胞内 ASC 正常型/バリエント強制発現系を用いて、以下の項目を検討した。

- ・新型コロナウイルスの ORF3a 遺伝子産物 viroporin が ASC のユビキチン化を介してサイトカイン過剰産生を誘導することが報告されていることから、PMA (または LPS) および MSU 刺激によるインフラマソーム活性化によって培養上清中に産生される IL-1β や IL-18 の ELISA 法による定量を行い、ASC スプライスバリエントと正常型の差異を調べた。
- ・インフラマソーム構成因子に結合し、機能調節する新規因子は NEK7 などが知られているが、その全貌は明らかではなかった。そこで最もよく研究されている NLRP3 インフラマソームに結合する新規機能調節因子の探索を抗 NLRP3 抗体および抗 caspase-1 抗体を用いた免疫沈降実験と質量分析によって行なった。

課題 2: ASC スプライスバリエントの産生機序の解明

課題 2 の目的: ASC 遺伝子スプライシング時においてエクソン 2 が脱落する機構の解明

これまでに ASC バリエントの遺伝子発現については、以下を明らかにしていた。

- ・DNA 配列上では保持されているエクソン 2 がスプライシング時に脱落した mRNA にコードされている
 - ・エクソン 2 の脱落によってフレームシフトは生じず、本来の終始コドンまでタンパク質に翻訳されている
 - ・脱落部分配列の位置から、イレギュラーな mRNA を分解する品質保証機構である RNA decay も作用しないと予想される
 - ・ASC バリエント発現検体のゲノム DNA において、一般の日本人集団では稀な dbSNP データベースにも記載のある rs8056505(A G) SNP が存在する (図 3)
 - ・上記の SNP 含有ゲノム遺伝子を pSPL3 ベクターに導入したミニ遺伝子を HEK293 細胞に導入し、スプライシング再現の予備実験 (エクソントラップ法) を行った結果、バリエント RNA の発現が亢進した
- これらを踏まえ、構築済みのミニ遺伝子を THP-1 細胞へ導入するスプライシング再現実験を

行い、RT-PCR 法によってスプライシング産物を解析し、当 SNP のスプライシングへ影響をおよぼす可能性を検証した。また産生した ASC バリエーションによって IL-1 β 産生が亢進することを明らかにしている一方、IL-1 β によってスプライシングが変動することが報告されていることから、スプライシング再現実験は IL-1 β 刺激条件を変えて実施した。さらに、IL-1 β 刺激によって THP-1 細胞に生じる網羅的遺伝子変動を明らかにするために、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

課題 1: ASC スプライスバリエーションの機能の解明

exon2 では野生型と比較して ORF3a 共存下で有意に高い IL-1 β 産生を認めた。またインフラマソームに結合する THP-1 細胞中因子を免疫沈降法と質量分析によって探索した結果、抗 NLRP3 抗体および抗 caspase-1 抗体共に結合する因子として抗菌ペプチド Dermcidin を同定した。抗 Dermcidin 抗体による免疫沈降実験から NLRP3, ASC および Caspase-1 の結合を確認し、さらに siRNA による THP-1 細胞中の Dermcidin 発現抑制下で分泌 IL-1 β を測定した結果、IL-1 β 産生が有意に亢進した。これらより抗菌ペプチド Dermcidin の新たな機能として、NLRP3 インフラマソーム構成因子に結合することでその機能を抑制することが明らかになった (投稿中)。

課題 2: ASC スプライスバリエーションの産生機序の解明

スプライシング再現実験の結果、ASC は rs8056505 G アレルによって exon2 が優位になる一方、IL-1 β やその下流スプライシング制御因子である C6-ceramide によって野生型が優位になることを認めた。そこで IL-1 β 刺激 THP-1 細胞のトランスクリプトーム解析を RNAseq によって実施した結果、スプライシング調節因子 MASCRNA や U1 small RNA variant (RNVU) などが有意に発現上昇することを認めた。MASCRNA については qPCR による検証を行い、発現上昇を確認した。当研究室から報告済みの通り、exon2 は野生型に比して高い IL-1 β 産生に関与する。これらより、SNP による exon2 発現によって IL-1 β が亢進し、これが MASCRNA などスプライシング制御因子を誘導することで exon2 から野生型にスプライシングが修正され IL-1 β およびスプライシング制御因子発現が低下するに伴って、再び SNP による exon2 発現が優位になるフィードバックループが生じることで IL-1 β など炎症性サイトカインの周期的発現が惹起されると考える「ASC 周期発現モデル」を提唱し、論文発表を行った (Hattori M et al., Asian Pac J Allergy Immunol. 2022, epub ahead of print)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masaya Hattori, Atsuko Yabuuchi, Hayate Tanaka, Taketo Kawara, Hongyan Wang, Koji Inoue, Shunichi Shiozawa, and Koichiro Komai	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of ASC splice variant found in Japanese patients with palindromic rheumatism is regulated by rs8056505 single nucleotide polymorphism and interleukin-1 beta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	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） 10.12932/AP-010322-1339	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 Yumi Suganuma, Hayate Tanaka, Aya Kawase, Aoi Kishida, Moeko Yamaguchi, Atsuko Yabuuchi, Koji Inoue, Shunichi Shiozawa, and Koichiro Komai	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 Expression of a PYCARD/ASC variant lacking exon 2 in Japanese patients with palindromic rheumatism increases interleukin-1 secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 81-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12932/AP-040319-0509	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有吉薫香、川良毅人、駒井浩一郎
2. 発表標題 インフラマソーム構成因子ASCの選択的スプライシングを制御するIL-1 下流因子の解明
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片岡直紀、駒井浩一郎
2. 発表標題 抗菌ペプチドdermcidinはNLRP3 インフラマソームに結合し、IL-1 産生を抑制する
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹松蒔絵、駒井浩一郎
2. 発表標題 SARS-CoV由来ORF3aはexon2欠損型ASCスプライスバリエントと共役的にNLRP3インフラマソーム機能を活性化する
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹松蒔絵、片岡直紀、駒井浩一郎
2. 発表標題 SARS-CoV由来ORF3aがASCバリエント依存性インフラマソーム機能に与える影響
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林奈々子、片岡直紀、王紅彦、服部将也、駒井浩一郎
2. 発表標題 インフラマソーム結合性新規タンパク質の同定
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有吉薫香、川良毅人、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎
2. 発表標題 回帰性リウマチ患者におけるCaspase-1遺伝子解析
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部将也、王紅彦、藪内温子、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎
2. 発表標題 日本人回帰性リウマチ患者に見出したASCバリエーションのスパライシング変動機構
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学大学院保健学研究科駒井研究室 http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-komai/

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------