

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20912

研究課題名（和文）NLRP1変異による自己炎症の病態機序解明

研究課題名（英文）Investigation of mechanisms on autoinflammatory diseases caused by NLRP1 mutation

研究代表者

安東 泰希 (Taiki, Ando)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：10912644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：肝硬変を伴う希少疾患患者から同定されたNLRP1点変異が病態を引き起こすメカニズムの解明を試みた。患者由来の肝細胞株は恒常的にNLRP1インフラマソームを活性化させることを明らかにしたが、肝臓線維化に至る機序を解明することはできなかった。また、この点変異が肝細胞特異的に発現するマウスを作製して解析した。しかし、このマウスにおいて肝細胞のインフラマソーム活性化や肝臓の異常（肝臓線維化など）は認められなかった。従って、本患者では、何らかの感染や薬剤投与などが加わり（NLRP1点変異による）肝細胞のインフラマソーム活性化が誘導された可能性が考えられた。病態機序の解明にはさらなる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が同定した新規のNLRP1変異に関する本研究成果はNLRP1変異による自己炎症性疾患という概念の確立に寄与した。このように、本研究成果は学術的意義が高いと考えられる。また、インフラマソームを活性化させる機序の解明は特定の自己炎症性疾患の治療薬開発につながる可能性があり、本研究成果の社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We attempted to elucidate the mechanisms by which the NLRP1 point mutation, identified in a rare disease patient, caused liver cirrhosis. We demonstrated that NLRP1 inflammasome is constitutively activated in liver cell lines derived from this patient; however, we were not able to clarify the causal relationship between the NLRP1 inflammasome activation in hepatocytes and liver cirrhosis. We then generated the mice expressing this NLRP1 mutation specifically in hepatocytes. However, these mice neither exhibited NLRP1 inflammasome activation in hepatocytes nor liver abnormalities such as liver fibrosis. Accordingly, it was possible to speculate that in this patient, any infection and/or drug administration had triggered NLRP1 inflammasome activation, induced by this mutation, in hepatocytes. Further examination will be required to understand the relevant mechanisms.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：インフラマソーム 肝臓線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

NLRP1 は ASC 及び pro-caspase-1 とインフラマソームを形成して自然免疫応答に関与する。NLRP1 インフラマソームにより活性化した caspase-1 は pro-IL-1 $\beta$  (あるいは pro-IL-18) を切断して成熟型の IL-1 $\beta$  (あるいは IL-18) を産生・放出させて炎症を引き起こすとともにパイロトーシスと呼ばれるプログラム細胞死を誘導する。ヒト NLRP1 は N 末から PYD・NACHT・LRR・FIIND・CARD と呼ばれるドメインを有する。しかし、最近まで、NLRP1 インフラマソームの活性化機序や NLRP1 変異による疾患は十分に解明されていなかった。申請者の研究グループは、肝硬変とともに掌蹠角化症、歯周病、SLE 様徴候など多彩な病変を有する希少疾患患者から NLRP1 の FIIND に点変異 (NLRP1-P1214L) を見出し、この点変異が NLRP1 インフラマソームを異常活性化させることを示した。さらに、肝細胞における NLRP1 インフラマソームの活性化が IL-18 (IL-1 $\beta$ ) 産生による炎症とパイロトーシスを誘導して、肝硬変を引き起こす可能性を示した (Yasudo\*, Ando\*, Maehara\*, Hepatology, 2021) (\*共筆頭著者)。他方、(PYD や LRR における) NLRP1 変異がインフラマソームの活性化により稀な角化異常疾患を引き起こすと報告された (Zhong, Cell, 2016)。従って、現在、NLRP1 変異による自己炎症性疾患の概念が確立されつつある。しかし、NLRP1 変異が多彩な病態を示す機序は十分に解明されていない。そこで、研究代表者は「NLRP1 変異は臓器の自己炎症をどのように誘導するか？」を研究課題の核心をなす学術的「問い」として掲げ、さらに、肝細胞から放出される NLRP1 インフラマソームの粒子が肝臓線維化を誘導する可能性を示した論文 (Gaul, J Hepatol, 2021) に着目し、本研究計画を考案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト NLRP1 変異 (hNLRP1-P1214L) による肝細胞のインフラマソーム活性化亢進が肝硬変を引き起こす病態機序を解明することである。最終的な目標は、NLRP1 変異による自己炎症性疾患の治療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) hNLRP1-P1214L により肝細胞が放出するインフラマソーム粒子が膠細胞に及ぼす作用の解析

HEK293T細胞に野生型hNLRP1 (hNLRP1-WT) あるいはhNLRP1-P1214LとASC-GFPやpro-caspase-1を一過性に発現させた後、細胞上清を回収した。次に、Percol密度勾配を用いる遠心分離法を利用して、その上清からインフラマソーム粒子を分離した。

患者由来肝細胞株の培養上清からと同様の手法でインフラマソーム粒子を含むと想定される層を分離した。

インフラマソーム粒子( )を正常コントロールの肝細胞株や膠細胞株に添加した。産生されるサイトカイン量をELISAで測定するなど、肝細胞株や膠細胞株が活性化されるか否かを調べた。

これらの実験から、hNLRP1-P1214Lにより肝細胞で形成されるインフラマソーム粒子が膠細胞の活性化を誘導し、肝臓線維化の原因となる可能性を検証した。

#### (2) hNLRP1-P1214L が肝細胞特異的に発現する遺伝子改変マウスの病態解析

hNLRP1-P1214Lのコンディショナルノックインマウスを作製し、このマウスと肝細胞特異的に Cre recombinase が発現するマウスを交配して、肝細胞特異的にhNLRP1が発現するマウスを作製した。この遺伝子改変マウスとコントロールマウスを長期観察した。経時的に血清IL-18・IL-1 $\beta$ 値や(肝酵素である)AST・ALT値などを測定した。また、肝臓組織を各種染色して炎症や線維化を評価した。

上記マウスに薬剤(リポポリサッカライドなど)を投与してと同様の実験を行った。

これらの実験から、肝細胞にhNLRP1-P1214Lが発現した場合に、マウスの肝臓に異常(線維化や肝硬変など)を引き起こされるか否かを検証した。

### 4. 研究成果

HEK293T細胞にhNLRP1-WT、ASC-GFP、pro-caspase-1を一過性に発現させた場合と比較して、hNLRP1-P1214L、ASC-GFP、pro-caspase-1を一過性に発現させた場合には細胞内にASCスペックがより多く形成されることを共焦点顕微鏡で確認した。このとき、pro-IL-18も同時に一過性に発現させると、hNLRP1-P1214Lの存在下では培養上清中に大量のIL-18が放出されることを確認した。他方、患者由来の肝細胞株はcaspase-1の活性化とともに大量のIL-18とIL-1 $\beta$ (特にIL-18)を恒常的に産生・放出することが確認された。従って、肝細胞内でhNLRP1-P1214Lはインフラマソームの活性化を強く誘導し、活性化したcaspase-1がpro-IL-18を切断して成熟型

の IL-18 を大量に放出させると考えられた。次に、Percoll 密度勾配を用いる遠心分離法で回収した培養上清からインフラマソーム粒子を含む層を分離した。その結果、hNLRP1-WT と比較して hNLRP1-P1214L を発現させた場合の培養上清には ASC-GFP を含むインフラマソーム粒子が多く含まれることを flow cytometry で確認した。また、同様の手法で患者由来肝細胞株の培養上清からインフラマソーム粒子を含むと想定される層を分離・回収した。次に、これらのインフラマソーム粒子を正常コントロールの肝細胞株や膠細胞株に添加した。hNLRP1-P1214L と ASC-GFP を含むインフラマソーム粒子は細胞内に取り込まれて細胞を活性化する可能性を示したが、細胞外に大量の IL-18 や IL-1 $\beta$  を放出させなかった。これらの結果は、hNLRP1-P1214L により形成されるインフラマソーム粒子は細胞外に放出され、その粒子は他の細胞に取り込まれることを示唆した。しかし、取り込まれたインフラマソーム粒子がその細胞内でインフラマソームを強く活性化させることを示唆する結果は得られなかった。他方、何らかの刺激とともに NLRP1 インフラマソーム粒子が膠細胞に作用すると、膠細胞は強く活性化して肝臓線維化に参与する可能性はあると考えられる。

肝細胞特異的に hNLRP1-P1214L が発現するマウスとコントロールマウスから肝臓を採取して、タンパクを抽出して前者のマウスの肝臓にだけ hNLRP1-P1214L が発現することをウエスタンブロッティングで確認した。肝細胞特異的に hNLRP1-P1214L が発現するマウスを長期観察したが、コントロールマウスと比較して発育や生存率に差は認められなかった。また、この遺伝子改変マウスの皮膚に異常（角化異常など）は認められなかった。さらに、定期的に採取した血清を解析したが、AST・ALT・LDH 値は正常範囲内であり、肝機能障害を示さなかった。血清 IL-1 $\beta$  や IL-18 値も正常範囲内であり、IL-6・TNF- $\alpha$  など炎症を示唆する他のサイトカインやケモカインの値も正常範囲内であった。肝臓組織を各種染色したが、コントロールマウスと比較して肝細胞特異的に hNLRP1-P1214L が発現するマウスの肝臓組織に、炎症細胞浸潤はなく、線維化を示唆する所見も認められなかった。抗 IL-1 $\beta$  抗体や抗 IL-18 抗体で染色しても、肝細胞特異的に hNLRP1-P1214L が発現するマウスの肝臓組織に IL-1 $\beta$  や IL-18 の高い発現は認められなかった。これらの結果は、肝細胞特異的に hNLRP1-P1214L が発現しても、それだけで肝細胞の NLRP1 インフラマソームは強く活性化しないことが明らかになった。他方、LPS などの肝障害を引き起こす薬剤の投与も試みたが、コントロールマウスと比較してこの遺伝子改変マウスで肝障害や肝臓線維化が強く誘導され結果は得られなかった。

これらの結果を総合すると、本患者さんでは、肝細胞における hNLRP1-P1214L 変異とともに何らかの感染や薬剤投与などが加わり、肝細胞のインフラマソームが活性化して肝臓線維化が引き起こされたと考えられる。現時点で、どのような感染や薬剤が関与したかは不明であるが、今後、このマウスの感染モデルや種々の薬剤投与モデルを解析して、肝細胞のインフラマソーム活性化から肝臓線維化に至るメカニズムを解明する必要がある。同時に、hNLRP1-P1214L が他の細胞（血球系細胞など）特異的に発現したマウスの解析も必要であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Abe Y, Minowa K, Kogami M, Ando T, Makiyama A, Yamaji K, Tamura N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Avacopan is possibly associated with the improvement of ANCA-associated vasculitis activity without decreasing ANCA titres: a four-case series	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	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) 10.1093/rheumatology/kead191.	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 Kogami M, Abe Y, Ando T, Makiyama A, Yamaji K, Tamura N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Performance of classification and diagnostic criteria for IgG4-related disease and comparison of patients with and without IgG4-related disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29645-2.	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 Kogami M, Abe Y, Ando T, Makiyama A, Yamaji K, Tamura N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Changes in anti-MDA5 antibody titres and serum cytokine levels before and after diagnosis of anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford).	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) 10.1093/rheumatology/keac627.	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 Watanabe R, Oshima M, Nishioka N, Sada KE, Nagasaka K, Akiyama M, Ando T, Higuchi T, Inoue Y, Kida T, Mutoh T, Nakabayashi A, Onishi A, Sakai R, Waki D, Yamada Y, Yajima N, Tamura N, Kaname S, Harigai M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Systematic review and meta-analysis for 2023 clinical practice guidelines of the Japan research committee of the ministry of health, labour, and welfare for intractable vasculitis for the management of ANCA-associated vasculitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	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) 10.1093/mr/roac114.	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 安東泰希、前原明絵、田村直人、北浦次郎	4. 巻 68
2. 論文標題 自己炎症性疾患における原因遺伝子解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 371-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yasudo H, Ando T, Maehara A, Ando T, Izawa K, Tanabe A, Kaitani A, Nomura S, Seki M, Yoshida K, Oda H, Okamoto Y, Wang H, Kamei A, Kojima M, Kimura M, Uchida K, Nakano N, Kaneko J, Ebihara N, Hasegawa K, Shimizu T, Takita J, Ogawa H, Okumura K, Ogawa S, Tamura N, Kitaura J.	4. 巻 74
2. 論文標題 A Possible Association Between a Nucleotide-Binding Domain LRR-Containing Protein Family PYD-Containing Protein 1 Mutation and an Autoinflammatory Disease Involving Liver Cirrhosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 2296 ~ 2299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31818	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安東泰希、前原明絵、安戸裕貴、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題 希少疾患患者から同定されたNLRP1点変異 (P1214L) は自己炎症性疾患を誘導する
3. 学会等名 第6回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安東泰希、前原明絵、安戸裕貴、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、山路健、奥村康、小川誠司、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題 肝臓繊維化を伴う希少疾患患者から同定されたNLRP1点変異はインフラマソームを強く活性化する
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	山本里彩、前原明絵、安東泰希、安戸裕貴、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、奥村康、小川誠司、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題	NLRP1-P1214L点変異はNLRP1とdipeptidyl peptidase 9 (DPP9) の結合を阻害することによりNLRP1インフラマソームの活性化を亢進させる
3. 学会等名	第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Yamamoto Risa, Maehara Akie, Ando Taiki, Yasudo Hiroki, Izawa Kumi, Ando Tomoaki, Kaitani Ayako, Kitaura Jiro
2. 発表標題	A point mutation of NLRP1 (NLRP1-P1214L), identified in a patient with a rare disease, causes an auto-inflammatory disease through hyper-activation of inflammasome: molecular analysis of the pathophysiology
3. 学会等名	第54回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	山本里彩、安東泰希、安戸裕貴、安藤智暁、山路健、奥村康、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題	ヒトNLRP1の点変異により誘導される自己炎症性疾患の病態解析
3. 学会等名	第32回日本リウマチ学会関東支部学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	北浦次郎、安東泰希、前原明絵、安戸裕貴、山本里彩、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、田村直人
2. 発表標題	NLRP1変異による自己炎症性疾患の病態
3. 学会等名	第6回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 安東泰希、前原明絵、安戸裕貴、安藤智暁、伊沢久未、田辺篤、貝谷綾子、亀井杏菜、王合興、金子順一、山路健、奥村康、小川誠司、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題 NLRP1点変異が肝臓線維化を主徴とする自己炎症性疾患を誘導した症例
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東泰希、前原明絵、安藤智暁、伊沢久未、北浦次郎、田村直人
2. 発表標題 肝臓線維化を主徴とする稀少疾患患者から同定されたNLRP1変異の機能解析
3. 学会等名 第118回日本内科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安東泰希、前原明絵、安戸裕貴、安藤智暁、伊沢久未、田辺篤、貝谷綾子、亀井杏菜、王合興、金子順一、山路健、奥村康、小川誠司、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題 肝臓線維化を主徴とする稀少疾患患者から同定されたNLRP1変異の機能解析
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akie Maehara, Taiki Ando, Kumi Izawa, Tomoaki Ando, Ayako Kaitani, Anna Kamei, Hexing Wang, Koji Tokushige, Nobuhiro Nakano, Naoto Tamura, Ko Okumura, Jiro Kitaura
2. 発表標題 A point mutation within the function-to-find domain (FIIND) of human NLRP1 causes an autoinflammatory disease involving liver fibrosis and dyskeratosis.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前原明絵、安東泰希、安戸裕貴、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題 ヒトNLRP1のFIINDにおける点変異 (P1214L) は自己炎症性疾患を誘導する
3. 学会等名 第5回日本免疫不全・自己炎症学会 総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前原明絵、安東泰希、安戸裕貴、伊沢久未、安藤智暁、貝谷綾子、奥村康、小川誠司、田村直人、北浦次郎
2. 発表標題 肝硬変を伴う希少疾患患者から同定されたNLRP1点変異の機能解明
3. 学会等名 第30回東京免疫フォーラム
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------