

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 25 年 12 月 20 日現在

機関番号： 12501  
研究種目：若手研究 (B)  
研究期間： 2012 ~ 2013  
課題番号： 24791136  
研究課題名 (和文) インフラマソーム活性化によるプログラム細胞死の分子メカニズムの  
解明  
研究課題名 (英文) Molecular mechanism of programmed necrosis induced by  
NLRP3-inflammasome  
研究代表者  
佐藤 貴史 ( Satoh Takashi )  
千葉大学・大学院医学研究院、助教  
研究者番号： 90568635  
交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

## 研究成果の概要 (和文)：

Tet-on システムで CAPS 関連の NLRP3 変異体を発現させると、ネクローシス様細胞死が誘導されることを確認した。この NLRP3 依存性のプログラム細胞死は、Cathepsin B 阻害剤である CA074-Me と pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-fmk で抑制されること、またその阻害部位が、それぞれ NLRP3 のアダプター分子である ASC の凝集の前後であることを明らかにした。NLRP3 のアダプター分子である ASC とその下流で切り出される Caspase-1 をノックダウンした結果、この NLRP3 依存性の細胞死は ASC を必要とするが Caspase-1 は必要としないことが分かった。一方、NLRP3 の PYD ドメインを FKBP 蛋白を用いて重合化させるモデルでもネクローシス様細胞死が誘導されたが、このモデルでは Tet-on システムでは認められない、Caspase-3 や PARP の切り出しが起こっていることから、NLRP3 依存性の細胞死モデルとして妥当ではないことが推察された。この NLRP3 依存性のプログラム細胞死による好中球の誘導能をマウスの air-pouch モデルで検証すると、IL-1 $\beta$  放出を伴わない細胞死単独でも、好中球の誘導能を有することが認められた。

## 研究成果の概要 (英文)：

Mutant-NLRP3 expression by Tet-on system induced necrotic cell death, while WT did not. We showed that CA074-Me (casepsin B inhibitor) and Z-VAD-fmk (pan-caspase inhibitor) blocked the mutant-NLRP3 dependent cell death before and after ASC oligomerization, respectively. Knocking down of ASC and caspase-1 by sh-RNA revealed that ASC was required in NLRP3-induced necrotic cell death, whereas caspase-1 was not. We judged the manner of cell death induced by NLRP3-PYD oligomerization as necrosis from several observations, but when NLRP3-PYD was oligomerized, we observed the activation of caspase-3 and PARP, which is observed in apoptosis and was not observed in mutant NLRP3 expression by tet-on system. This indicates that this NLRP3-PYD oligomerization model cannot be a good model of NLRP3 activation. We performed neutrophil infiltration assays using an air-pouch model. This assay showed that NLRP3-mediated necrotic cell death resulted in a neutrophilic inflammatory response without IL-1 $\beta$ .

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード： 細胞死、インフラマソーム、自然免疫、NLRP3、ネクローシス

## 1. 研究開始当初の背景

NLRP3 は細胞内パターン認識受容体 NLR family の1つで、*Candida Albicans* や *Listeria monocytogenes* などの微生物由来の分子パターン(PAMPs)や、細胞外 ATP・アミロイド  $\beta$ ・尿酸結晶・シリカ・アスベストなどの DAMPs を認識して活性化すると、アダプター分子である ASC・pro-caspase-1 と共に inflammasome と呼ばれるを蛋白複合体を形成し、活性型 IL-1 $\beta$  を分泌して炎症を惹起する(Tschopp J, et al. *Nat Rev Immunol* 2010)。

NLR family はヒト以外の哺乳類のみならず、植物の耐病遺伝子 NBS-LRR family と高い相同性を有し、3つのドメインのうち C 末端に LRR ドメイン・中央に NOD-NBS ドメインを持つという共通の構造を持つことから、その基本的な機能もまた類似していると考えられる。獲得免疫を持たない植物は、NBS-LRR を介して PAMPs や DAMPs を認識すると過敏感反応が起き速やかにプログラム細胞死を起すことから、ヒト NLR においても類似の反応によりプログラム細胞死が誘導される可能性がある。実際、NLR family 分子である Nlrc4 が *Salmonella spp.* や *Pseudomonas aeruginosa* を認識すると、それらを貪食した細胞がプログラム細胞死 pyroptosis を起すことが報告され、近年注目を集めている。

我々は以前より、NLRP3 の恒常活性変異により周期熱・じんま疹・関節炎等を来す CAPS(Cryopyrin associated periodic syndrome)の解析を行っており、NLRP3 の疾患関連変異体をヒト単球細胞株である THP-1 へと遺伝子導入すると、急速にネクロシス様の細胞死が誘導されることを既に報告している(Fujisawa, A. et al. *Blood* 2007)。この細胞死が、cathepsin B の特異的阻害剤である CA-074Me で効果的に抑制されることを明らかにし、その後他のグループからも NLRP3 活性化に伴うプログラム細胞死に関する報告がなされ、細胞死が CA-074Me で抑制されることと、Caspase-1 の存在が必要なことが明らかにされているが(Motani K, et al. *JBC* 2011)、その細胞死の

メカニズムは不明のままである。

THP-1 を用いた我々の in vitro の実験のみならず、in vivo においても CAPS 患者の末梢血単核球を LPS で刺激して変異 NLRP3 の発現を誘導すると単球が消失することが確認されている。これらより、CAPS 患者においては変異 NLRP3 の発現に伴って、未だ明らかにされていない機序によってプログラム細胞死が誘導され、IL-1 $\beta$  による炎症をさらに増悪させていると推定される。

## 2. 研究の目的

周期熱・じんま疹・関節炎を来す CAPS(Cryopyrin associated periodic syndrome)を引き起こす NLRP3 の恒常活性変異体を用いて、プログラムネクロシスの分子機序を明らかにする。また、NLRP3 誘導性のプログラム細胞死の生体内での役割を、マウスを用いて個体レベルで検証する。

## 3. 研究の方法

(1) NLRP3 の活性化により細胞死を誘導する2つのモデル **TetOn 誘導モデル**・**FKBP 重合モデル**が、NLRP3-inflammasome に伴う細胞死を再現するか、その妥当性を検討する。

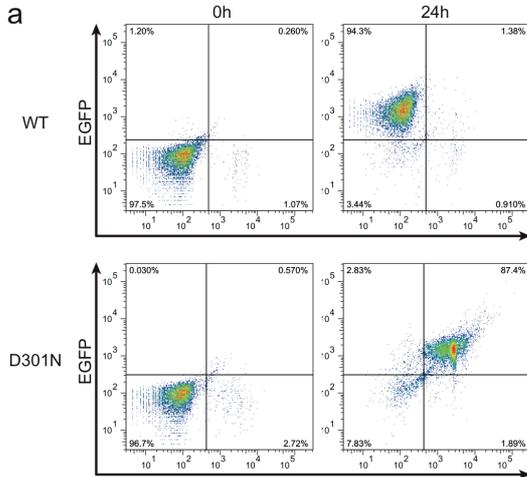
(2) Inflammasome の構成因子である ASC・Pro-caspase-1 をノックダウンすることで、そのプログラム細胞死の機序を明らかにする。

(3) NLRP3 の活性化に伴う細胞死を抑制することが既に知られる CA-074Me が、細胞死の実行部分のどのステップを抑制しているのかを、ウェスタンブロッティングや免疫沈降法を用いて明らかにする。スクリーニングにより細胞死を抑制する他の阻害剤についても同様に検討する。

(4) マウス Air-pouch モデルを用いて、NLRP3 誘導性のプログラム細胞死を Air-pouch 内で起こすことで、Pouch に遊走してくる細胞を解析し、細胞死単独の場合と IL-1 $\beta$  放出と細胞死が同時に起こる場合とを比較する。

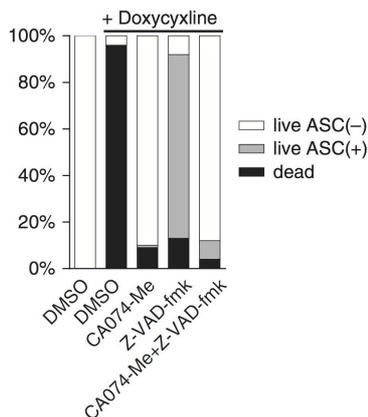
#### 4. 研究成果

(1) Tet-on システムで CAPS 関連の NLRP3 変異体を発現させると、WT-NLRP3 を発現させても細胞死は起こらないのに対し、変異体を発現させると、Doxycycline 添加 6 時間後～24 時間後にかけてネクローシス様細胞死が誘導されることを確認した。



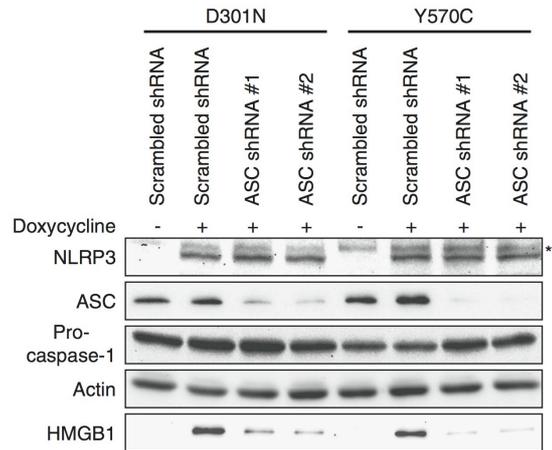
(縦軸：EGFP で蛍光標識された NLRP3 の発現量、横軸：ネクローシスにより蛍光色素の取り込みが起こる)

(2) この NLRP3 依存性のプログラム細胞死を抑制する阻害剤をスクリーニングした結果、Cathepsin B 阻害剤である CA074-Me と pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-fmk が細胞死を抑制することが明らかとなった。細胞死の阻害部位を明らかにするため、NLRP3 のアダプター分子である ASC を可視化する目的で ASC-mCherry を Stable で発現させる細胞株を作成した。この細胞株を用いて再び Tet-on システムで変異 NLRP3 を発現させると、これら阻害剤による細胞死の阻害が、それぞれ ASC の凝集の前後で生じていることを明らかにした。



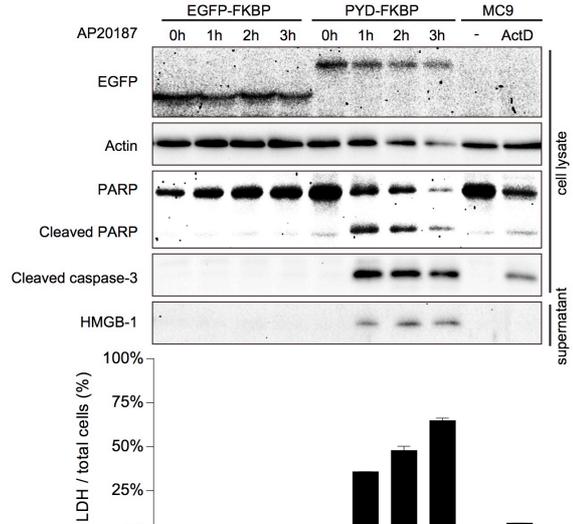
(live ASC(+): ASC 凝集を伴う生細胞  
live ASC(-): ASC 凝集を伴わない生細胞)

(3) NLRP3 のアダプター分子である ASC とその下流で切り出される Caspase-1 を sh-RNA を用いてノックダウンした結果、この NLRP3 依存性の細胞死は ASC を必要とするが Caspase-1 は必要としないことが分かった。



(HMGB1: ネクローシスに伴い細胞外に放出される核内蛋白質)

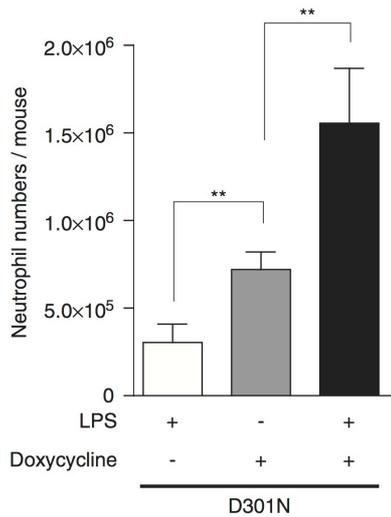
(4) 一方、NLRP3 の PYD ドメインを FKBP 蛋白を用いて重合化させるモデルでもネクローシス様細胞死が誘導されたが、このモデルでは Tet-on システムでは認められない、Caspase-3 や PARP の切り出しが起こっていることから、NLRP3 依存性の細胞死モデルとして妥当ではないことが推察された。



(NLRP3 の PYD ドメインにタグ付けされた FKBP 蛋白を、AP20187 を用いて強制重合化

すると、LDH 放出を伴う細胞死が誘導されたが、同時に PARP や Caspase-3 の活性化が認められた)

(5) この NLRP3 依存性のプログラム細胞死による好中球の誘導能をマウスの air-pouch モデルで検証すると、IL-1 $\beta$  放出を伴わない細胞死単独でも、好中球の誘導能を有することが認められた。



(最右列：Air-pouch 内で細胞死と IL-1 $\beta$  放出が起こった時に遊走してきた好中球の総数)

中央列：Air-pouch 内で細胞死のみ起こした場合の好中球の総数

最左列：Air-pouch 内で細胞死・IL-1 $\beta$  放出いづれも起こさない場合)

## 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 1 件)

**NLRP3 activation induces ASC-dependent programmed necrotic cell death, which leads to neutrophilic inflammation**

Satoh T, Kambe N, Matsue H.

Cell Death Dis. 2013 May 23;4:e644. doi: 10.1038/cddis.2013.169. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

① Programmed cell death induced by

CAPS-associated mutant NLRP3 features necrosis that leads to in vivo neutrophilic inflammation.

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013)

(International Investigative Dermatology 2013, May 8-11, Edinburgh, UK)

② Programmed necrosis by CAPS-associated NLRP3.

Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2013)

(7th International Congress of FMF and AIDS, May 22-26, Lausanne, Switzerland)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 貴史 (Satoh Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院、助教

研究者番号：90568635