

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04730

研究課題名(和文)インフラマゾーム活性化機構の新機軸

研究課題名(英文)New activation pathway for inflammasome

研究代表者

鈴木 敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10292848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフラマゾームは、様々な刺激因子(病原体、体内で生じた代謝産物等)を認識しNod様受容体を介してカスパーゼ-1を活性化する生体内複合体である。カスパーゼ-1が活性化することにより炎症性サイトカインIL-1 やIL-18が産生され、組織の炎症や再生修復を誘導するとされている。NLRの中でもNLRP3は特に糖尿病、痛風といった生活習慣病における慢性炎症を誘導し、病態の増悪因子として注目されている。しかし、未だに活性化の分子機構が解明されていない。本研究では、ライソゾームの破綻 ガレクチン-3集積 NLRP3の新しい活性化経路を見出し、その分子メカニズムを解明を行った。

研究成果の概要(英文)：Inflammasome is macromolecule complexes in the host cells upon being activated by pathogen infection or metabolites in the body. Caspase-1 activation is finely regulated by inflammasome that forms with Nod-like receptors (NLRs), and then activated caspase-1 can cleave pro-IL-1 or IL-18, and convert their bioactive cytokines. Among NLRs, NLRP3 is involved in chronic inflammatory diseases such as type II Diabetes or gout, because NLRP3 inflammasome can be activated by several metabolites including saturated fatty acids, cholesterol or uric acids crystals. In this work, we found new signaling pathway for activating NLRP3 inflammasome. The lysosome integrity-galectin-3 accumulation-NLRP3 activation axis may provide important insights into NLRP3 inflammasome activation in host cells.

研究分野：細菌学、免疫学

キーワード：インフラマゾーム 慢性炎症 カスパーゼ-1

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ等の免疫系細胞が刺激を受けると、インフラマゾームによってカスパーゼ-1が活性化され、それが炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-18の前駆体を切断することにより、生物学的に活性のあるサイトカインへ転換する。また、カスパーゼ-1は細胞死を誘導することによって、活性化サイトカインや細胞内炎症性物質の細胞外放出を行っている。このカスパーゼ-1活性化を制御するのが Nod 様受容体であることが近年明らかになり、特に重要なのが NLRP3、NLRC4、AIM2 およびこれらと会合するアダプタータンパク ASC であり、これらがカスパーゼ-1と複合体 (インフラマゾーム) を形成する。特に NLRP3 による活性化は、病原体に対する感染免疫、あるいは肥満、痛風、II 型糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病における慢性炎症を引き起こし、病態を増悪させる因子として、基礎および臨床の様々な領域で大いに注目されている。

これまでに申請者は、細菌感染によるカスパーゼ-1活性化を介した自然免疫誘導およびその制御機構を明らかにしてきた。また、病原体による新しいインフラマゾーム活性化制御と免疫回避機構を報告した。さらにこれらのプロジェクトと平行して、NLR 活性化の分子メカニズム解明に向けて研究を行ってきた。NLR の活性化は、リガンドである刺激因子と NLR との会合から始まると考えられる。これまでに NLRC4 と AIM2 の活性化に関してはかなりわかってきた一方で、NLRP3 の活性化は未だ解明されていない。刺激因子が多岐に渡るとともに、いくつかの細胞内現象が関与することが報告されているからである。これまでの報告を総合すると、①細菌の細胞傷害毒素や ATP の作用による細胞内カリウムイオン低下、あるいは②尿酸やコレステロールなどの結晶物の取り込みによるライソゾームの破綻がトリガーとなり、一部の経路はミトコンドリア傷害を経由すると考えられている。しかし、研究グループ間で結論は一致していない。カスパーゼ-1活性化による炎症を理解する上で、NLR の活性化機構の解明は必要である。とりわけ NLRP3 は、感染症による炎症のみならず生活習慣病における慢性炎症に関わっているため、その活性化メカニズムの解明への期待が大きい。このような背景から、申請者らは shRNA ライブラリースクリーニングにより NLRP3 活性化に関与する分子の網羅的解析を開始した。

スクリーニングの結果、今まで報告されていない新規分子がピックアップされてきた。糖鎖と結合するレクチンの一種ガレクチン群である。最近、ライソゾームが外的刺激によって壊されると、細胞内のガレクチン-3がライソゾーム膜周辺へ集積することが報告

されている。そこで、ライソゾーム破綻によって NLRP3 を活性化するとされている各種刺激を与えた後に、ガレクチン-3の時空間的な挙動を調べた結果、刺激直後にライソゾーム周辺にガレクチン-3の集積がみられた。さらに興味深いことに、このガレクチン-3集積部位に NLRP3 およびアダプタータンパク ASC が一時的に集まっていることを発見した (いずれも未発表データ)。ガレクチン-3と NLRP3、ASC のこれほど明瞭な集積はこれまでに報告がない。これらの新たな知見は、破綻したライソゾーム膜周辺に NLRP3 インフラマゾーム活性化に必要な細胞内因子群が集積し、そこでライソゾーム上でのガレクチン-3の集積を誘導し、そこで NLRP3 の活性化を引き起こすのではないか、という新たな仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

細胞レベルでライソゾーム膜周辺でのガレクチン-3集積から始まる NLRP3 活性化仮説を検証するとともにその分子機構を明らかにしていく。さらに遺伝子欠損マウスを用いた感染あるいは糖尿病の病態モデルによって個体レベルにおいても検証し、感染免疫や生活習慣病の病態進行における当該分子群の役割を明らかにしていくとともに、NLRP3 活性化を阻害し炎症を抑制するための治療標的となる分子を探し出すことを目的とした。

3. 研究の方法

- ① ライソゾーム破綻に伴うガレクチン-3、NLRP3、ASC およびカスパーゼ-1局在化の解析
- ② NLRP3 局在化とインフラマゾーム活性化機構の解析
- ③ マウスを用いた各種感染、炎症モデルにおける NLRP3 活性化機構の検証

4. 研究成果

本研究では、新たに見出したライソゾームの破綻→ガレクチン-3集積→NLRP3 活性化の経路を解明することによって、新たな NLRP3 活性化の分子メカニズムを解明しようと試みた。

ライソゾーム膜の障害を誘導する各種刺激 (ATP, Nigericin, 尿酸結晶、シリカ、パルミチン酸) あるいはリステリアや赤痢菌の細菌の感染を行い、ガレクチン-3、インフラマゾーム活性化に必要なアダプタータンパク ASC および NLRP3 の集積を解析した。その結果、刺激の程度によって各タンパクの集積の度合いが異なることが認められた。そのうち最も集積が強い刺激を用いて、これらのタンパクに結合する宿主因子のスクリーニングを行い、複数の候補を見出した。現在、さらに解析を進めている。

また、各種口腔細菌の感染によるインフラマゾーム活性を新たに見出し、その分子機構

を明らかにした。

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 11 件)

- ① Nakasone N, Ogura Y, Higa N, Toma C, Koizumi Y, Takaesu G, Suzuki T, Yamashiro T. Extract from the Psidium guajava leaf inhibits the type III secretion system of Gram-negative enteropathogenic bacteria. **Microbiol Immunol** 印刷中. 2018, doi: 10.1111/1348-0421.12604. 査読有
- ② Saeki A, Sugiyama M, Hasebe A, Suzuki T, Shibata K. Activation of NLRP3 inflammasome in macrophages by mycoplasmal lipoproteins and lipopeptides. **Mol Oral Microbiol** 印刷中. 2018, doi: 10.1111/omi.12225. 査読有
- ③ Maruzuru Y, Ichinohe T, Sato R, Miyake K, Okano T, Suzuki T, Koshihara T, Koyanagi N, Tsuda S, Watanabe M, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y. Herpes simplex virus VP22 inhibits AIM2-dependent inflammasome activation to enable efficient viral replication. **Cell Host Microbe** 23: 254-265, 2018, doi: 10.1016/j.chom.2017.12.014. 査読有
- ④ Suzuki S, Suzuki T, Mimuro H, Mizushima T, Sasakawa C. *Shigella* hijacks the glomulin-clAPs-inflammasome axis to promote inflammation. **EMBO Rep** 9: 89-101, 2018, doi: 10.15252/embr.201643841. 査読有
- ⑤ Nakasone N, Higa N, Toma C, Ogura Y, Suzuki T, Yamashiro T. Epigallocatechin gallate inhibits the type III secretion system of gram negative enteropathogenic bacteria under model condition. **FEMS Microbiol Lett** 364: . 2017, doi: 10.1093/femsle/fnx111. 査読有
- ⑥ Nakasone N, Ogura Y, Higa N, Toma C, Koizumi Y, Suzuki T, Yamashiro T. Hot-PBS extract of *Vibrio vulnificus* induces NF- κ B activation. **Electr J Biol** 13: 131-134. 2017 査読有
- ⑦ Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Suzuki T, Ando T. Regulation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. **Inflammation Res** 66: 59-65. 2017, doi: 10.1007/s00011-016-0992-4. 査読有
- ⑧ Saeki A, Suzuki T, Hasebe A, Kamezaki R, Fujita M, Nakazawa F, Shibata K. Activation of nucleotide-binding domain-like receptor containing protein 3 inflammasome in dendritic cells and macrophages by *Streptococcus sanguinis*. **Cell Microbiol** 19: e12663. 2017, doi: 10.1111/cmi.12663. 査読有
- ⑨ Satou K, Shimoji M, Tamotsu H, Juan A, Ashimine N, Shinzato M, Toma C, Nohara T, Shiroma A, Nakano K, Teruya K, Terabayashi Y, Ohki S, Koizumi N, Okano S, Suzuki T, Hirano T. Complete Genome Sequences of Low-Passage Virulent and High-Passage Avirulent Variants of Pathogenic *Leptospira interrogans* Serovar Manilae strain UP-MMC-NIID, originally Isolated from a patient with severe Leptospirosis, determined using PacBio Single Molecule, Real-Time Technology. **Genome Announc** 3: e00882-15. 2015, doi: 10.1128/genomeA.00882-15. 査読有
- ⑩ Sugiyama M, Saeki A, Hasebe A, Kamesaki R, Yoshida Y, Kitagawa Y, Suzuki T, Shibata K. Activation of inflammasomes in dendritic cells and macrophages by *Mycoplasma salivarium*. **Mol Oral Microbiol** 31: 259-269. 2015, doi: 10.1111/omi.12117. 査読有
- ⑪ Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Suzuki T, Ando T. Regulation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. **FEMS Pathog Dis** 73: ftv011. 2015, doi: 10.1093/femspd/ftv011. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① Ayumu Saeki, Akira Hasebe, Toshihiko Suzuki, Ken-ichiro Shibata. Translocation of mycoplasmal lipopeptide FSL-1 into cytosol for the NLRP3 inflammasome activation. 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年 3 月 28 日, 福岡
- ② Hiroshi Ashida, Toshihiko Suzuki. Analysis of novel *Shigella* effector mechanism that regulate host cell death. 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年 3 月 27 日, 福岡

- ③ Shiho Suzuki, Toshihiko Suzuki, Hitomi Mimuro, Chihiro Sasakawa. IAP family members are involved in inflammasome activation in response to bacterial infection. 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年 3 月 27 日, 福岡
- ④ Toshihiko Suzuki. Pathogen infection and host responses. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会. 2017 年 12 月 12 日, 仙台
- ⑤ Shiho Suzuki, Toshihiko Suzuki. The microbial-host interaction that drive the activation of the Nlr4 inflammasome in *Shigella*-infected macrophages. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会. 2017 年 12 月 12 日, 仙台
- ⑥ 芦田浩, 鈴木敏彦, 笹川千尋. ワクチンおよび抗生物質代替創薬開発の基盤となる腸管病原細菌感染マウスモデルの構築とその機能解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017 年 12 月 6 日. 神戸
- ⑦ 岡野徳壽, 鈴木敏彦. *Porphyromonas gingivalis* gingipains による炎症抑制機構の解明. 第 100 回日本細菌学会関東支部総会. 2017 年 9 月 28 日. 東京
- ⑧ 佐伯歩, 長谷部晃, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. インフラマソーム活性化物質としてのマイコプラズマ由来リポタンパク質. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. 2017 年 9 月 17 日. 塩尻
- ⑨ 岡野徳壽, 鈴木敏彦. *Porphyromonas gingivalis* による低酸素条件下でのインフラマソーム活性化. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会. 2017 年 9 月 17 日. 塩尻
- ⑩ 佐伯歩, 長谷部晃, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. マイコプラズマ由来リポタンパク質によるマウスマクロファージに対する IL-1 β 産生誘導活性. 第 84 回日本細菌学会北海道支部学術集会. 2017 年 8 月 26 日. 札幌
- ⑪ Shiho Suzuki, Toshihiko Suzuki. Characterization of macrophages cell death caused by *Shigella* infection. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 20 日, 仙台
- ⑫ Claudia Toma, Takayoshi Yamaguchi, Naomi Higa, Arina Matsumoto, Nobuhiko Okura, Noboru Nakasone, Toshihiko Suzuki, Tetsu Yamashiro. Interaction of virulent *Leptospira interrogans* with renal epithelial cells. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 20 日, 仙台
- ⑬ Ayumi Saeki, Akira Hasebe, Toshihiko Suzuki, Ken-ichiro Shibata. One of mycoplasmal active entities that induce IL-1 β production by macrophages is lipopeptide/lipoprotein. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 20 日, 仙台
- ⑭ Shiho Suzuki, Toshihiko Suzuki, Hitomi Mimuro, Chihiro Sasakawa. GLMN is functionally involved in inflammasome activation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会. 2016 年 12 月 7 日. 仙台
- ⑮ 亀崎良助, 佐伯歩, 長谷部晃, 北川義政, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DNA によるインフラマソームの活性化. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 2016 年 8 月 24 日. 新潟
- ⑯ 佐伯歩, 長谷部晃, 亀崎良助, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. *Streptococcus sanguinis* の IL-1 α 産生誘導活性におけるインフラマソームの関与. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 2016 年 8 月 24 日. 新潟
- ⑰ 佐伯歩, 長谷部晃, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. IL-1 α -inducing activity of *Streptococcus sanguinis* in murine dendritic cells and macrophages. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 25 日. 大阪
- ⑱ 鈴木志穂, 鈴木敏彦, 三室仁美, 笹川千尋. GLMN は細菌感染における inflammasome 活性化の negative regulator である. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23 日. 大阪
- ⑲ Giichi Takaesu, Noboru Nakasone, Claudia Toma, Naomi Higa, Toshihiko Suzuki. TAK1-binding protein 2 (TAB2) negatively regulates the processing of pro-interleukin-1 β . 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会. 2015 年 11 月 18 日. 宜野湾
- ⑳ 亀崎良助, 佐伯歩, 阿部亜美, 長谷部晃, 北川善政, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* によるインフラマソームの活性化. 第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2015 年 9 月 5 日. 札幌
- ㉑ 佐伯歩, 長谷部晃, 亀崎良助, 中澤太, 鈴木敏彦, 柴田健一郎. *Streptococcus sanguinis* によるマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおける IL-1 α 産生誘導活性. 第 82 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2015 年 9 月 5 日. 札幌

〔図書〕(計 6 件)

- ① 芦田浩, 鈴木志穂, 鈴木敏彦. 病原細菌によるインフラマソーム制御戦略. 細胞. ニューサイエンス社. 2017
- ② 芦田浩, 鈴木敏彦, 笹川千尋. 赤痢菌による自然免疫抑制戦略の解明. 化学療法の領域 33: 1281-1288, 2017
- ③ 鈴木志穂, 鈴木敏彦. 特集消化管感染症の発症メカニズム「赤痢菌の感染機構と宿主免疫からの回避の手口」. 化学療法の領域 32: 1635-1642, 2016
- ④ 鈴木敏彦, トーマ・クラウディア, 高江洲義一, 比嘉直美, 仲宗根昇. 病原細菌の感染と宿主応答の分子論 : 細菌感染によるインフラマソーム活性化機構およびレプトスピラの持続感染機構. 化学療法の領域 32 : 109-114, 2016
- ⑤ 鈴木敏彦. 特集感染性胃腸炎「赤痢菌の感染と宿主免疫応答」. 最新醫學 70 巻増刊号: 2395-2400, 2015
- ⑥ 鈴木敏彦. 細胞死とインフラマソーム. G. I. Research 23: 14-18, 2015

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/dept/dentistry/bac/index.html>

2017年12月1日にプレス発表(論文2)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10292848