

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19438

研究課題名（和文）液液相分離異常による病理学的疾患概念の確立と責任標的分子の同定

研究課題名（英文）Establish of aberrant liquid-liquid phase separation disease and identification of causative target molecules

研究代表者

増本 純也（Masumoto, Junya）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20334914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、液液層分離の形態を示すASC-speckにどのような分子群が関与するのかを明らかにするため、ヒト20kタンパク質アレイを用いて、ASC-speckに凝集するタンパク質を網羅的に明らかにした。そのうち、ASC-speckに凝集し、NLRP3と相互作用するタンパク質をCANEと命名した。CANEは天然変性領域をもち、液液相分離と関連する。その制御異常が液液相分離異常をもたらし、疾患と関連する可能性が示唆された。CANEはヒトにしか存在しないが、CANEを発現させたマウスには全身性炎症が観察された。以上の結果は液液相分離に関わるCANEの制御異常が炎症疾患と関わる可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドやDNA/RNAなどの核酸や天然変性領域をもつタンパク質などは、細胞質内液滴を形成する。神経変性疾患やウイルス感染細胞では液滴状の小体が観察されるがその病態形成メカニズムについては不詳の部分が多い、今回液滴状に集積して小体を形成するASC-speckに濃縮し、液液層分離と強く関連する天然変性領域をもつタンパク質CANEを発見し、その発現により全身の炎症を誘導することが示されたことは、細胞内の小体を形成する疾患メカニズムの解明の端緒になるだけでなく、新たな疾患概念の創出につながるという学術的意義があり、難病の診断や治療に貢献するという社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, to elucidate which proteins are involved in the formation of the "ASC-speck", which exhibits liquid-liquid phase separation, we utilized a human 20k-protein array (20k-HUPA) to comprehensively identify proteins that aggregate into the "ASC-speck" and proteins that collaborate with ASC and other proteins. Among them, we have named a protein collaborate with NLRP3 and aggregates in the "ASC-speck" as CANE. CANE possesses a disordered region associated with liquid-liquid phase separation. Dysregulation of CANE suggests a potential link to inflammatory diseases related to aberrant phase separation.

研究分野：病理学

キーワード：ASC-speck インタラクトーム 液液層分離

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、細胞内の液液相分離異常による疾患という概念は確立されていない。本研究の目的は、細胞内の液液相分離による細胞膜で分画されていない細胞質内ドロレット(液滴)が介在する疾患という新たな病理学的な疾患概念を確立することである。

アミロイドや DNA/RNA などの核酸や、天然変性領域をもつタンパク質などは、細胞質内液滴を形成する。神経変性疾患やウイルス感染細胞では液滴状の小体が観察される。液滴状の小体は、炎症性サイトカインである IL-1 β の活性化に必須の細胞内自然免疫複合体であるインフラマソームの形成の際にも認められる。この小体はインフラマソームの構成成分である ASC を含むことから ASC-speck と呼ばれている。

物質の濃度を生理的条件より高く設定できる試験管内無細胞実験系での予備的な検討では、アミロイドや RNA が ASC を含むタンパク質と相互作用し、非生理的と批判を受けるような非常に高い濃度で ASC-speck に凝集する様子が観察された。また、生化学的に ASC を含む分画での抗体作製では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の一つで、液液相分離に深く関わる天然変性ドメインをもつ FUS や、シェグレン症候群の自己抗体の標的である SSB/La や、核酸結合タンパク質に対するモノクローナル抗体が抗 ASC 抗体と同時に単離されていた(増本ら *J Biol Chem*, 1999) (鮎川, 増本ら *J Biol Chem* 2000)。以上の結果は、ASC-speck と液液相分離との関係を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、細胞内の液液相分離による細胞膜で分画されていない細胞質内液滴が介在する疾患の存在を ASC-speck を拠り所にして証明し、ASC-speck の関わる液液相分離にどのような分子群が関与して、病態が形成されていくのかを明らかにし、この新しい機序の鍵となる責任標的分子を同定する。そして、将来、変性疾患や炎症疾患に対する新規の分子機序に基づいた病理診断と分子標的治療法を確立したい。

3. 研究の方法

1. ASC-speck 形成を促進する協働タンパク質のスクリーニング

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成したヒト 2 万タンパク質アレイ (20k-human protein array: 20K-HUPA) を biotin 化 ASC をベイトにした網羅的スクリーニングで同定する。

2. ASC-speck の精製と TOF-MS による同定

ASC-speck を MACS で分離し、SDS-PAGE で展開したのち、含有タンパク質を TOF-MS で同定する。

3. 同定した分子の液滴形成能と ASC-speck 形成における役割の評価

2 で同定したタンパク質の液液相分離指向性について、蛍光顕微鏡で評価する。多様な条件での顕微鏡像を解析し、液滴形成の条件を探索する。天然変性領域の解析について筑波大学白木賢太郎教授の助言を得た。

4. 臨床検体での意義

同定したタンパク質の抗体を作製し、変性、炎症疾患では炎症細胞浸潤の組織像や強度を定量化する。

5. モデル動物で疾患を再現する。

同定したタンパク質のトランスジェニックマウスを作製し、行動試験や組織変性を病理組織学的な手法で解析する。

6. 液液相分離を阻害する分子標的薬を開発する。

創薬機構から、コア化合物ライブラリーの提供を受け、前年度までの実験で同定したタンパク質による液液相分離を阻害する分子のハイスループットスクリーニングを愛媛大学プロテオサイエンスセンターのシステムで行い、リード化合物の選定を行う。

4. 研究成果

本研究では、液液層分離の形態を示す ASC-speck にどのような分子群が関与して、病態が形成されていくのかを明らかにし、この新しい機序の鍵となる責任標的分子を同定するために、ヒト 20k タンパク質アレイを用いて、ASC と相互作用するタンパク質や ASC と協働するタンパク質群(インタラクトーム)のうち、液液層分離と強く相関する天然変性領域をもつタンパク質群を明らかにした。

NLRP3 を bait にしたスクリーニングで上位のシグナルを得られたタンパク質のうち、タンパク質内部に天然変性領域をもつ候補タンパク質を CANE と命名した (表 1)。

表1. The top 11 candidates with the highest ALPHA signals for further screening.

Ranking	symbol	FLJ clone number	ALPHA signal (24 h incubation)
1	LEKR1	FLJ16641	124,373
2	PCCA	FLJ96567	93,961
3	CANE	FLJ40383	36,977
4	undefined	FLJ32790	33,682
5	undefined	FLJ33056	31,703
6	undefined	FLJ26164	31,496
7	LINC00176	FLJ27267	24,517
8	undefined	FLJ44789	24,316
9	undefined	FLJ45691	23,531
10	undefined	FLJ23487	23,526
11	undefined	FLJ40883	22,895
*Positive control	ASC(PYD)		11,169
*Negative control	ASC(CARD)		1,909

CANE に対する抗体を作製して、骨髄性白血病細胞株である THP-1 をホルボールエステル (TPA) で分化誘導したマクロファージを、NLRP3 のリガンドである Nigericin で刺激したのち、NLRP3 の抗体との蛍光二重染色を行うと、細胞質の speck 状の凝集体に共局在する様子が観察された(図 1: 白矢頭)。このことから、CANE は NLRP3 と相互作用して”speck”に凝集する液液層分離関連タンパク質である可能性が示唆された。

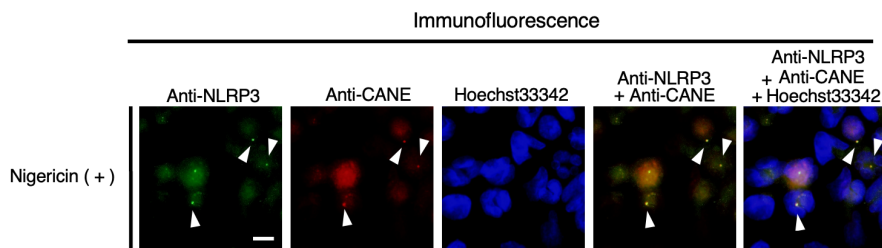


図 1. THP-1 細胞由来マクロファージの”speck”に凝集する新規タンパク質 CANE

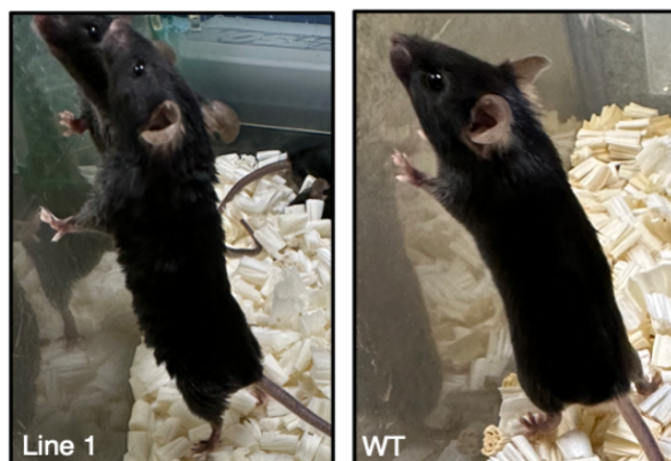


図2. CANE を恒常的に発現するトランスジェニックマウス(Line1)は毛羽だった外観を示す

CANE を恒常的に発現するマウスは、毛羽だった表現系を示した(図 2, Line1)。このマウスの皮下脂肪織には好中球が浸潤する(図 3: 赤矢印)炎症像がみられた。異常の結果は、CANE が液液相分離異常を誘導する責任タンパク質のひとつで、発現して speck に凝集することにより炎症の原因となる可能性が示された(図 2, 3)。

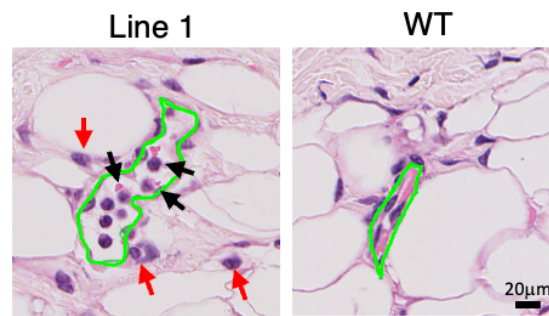


図3. CANE を恒常的に発現するトランスジェニックマウスは皮下脂肪織炎を示す
(赤矢印は浸潤する好中球、黒矢印は血管壁に接着する好中球)

今後、どのようなタンパク質群が刺激や液液層分離に関与し、どのような病態と関連しているのかを明らかにし、液液層分離の異常による疾患群を整理した上で、それらのタンパク質群を標的とした疾患特異的な創薬研究に発展させたい。最後に、本研究に対する科研費のご支援に感謝申しあげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kaneko Naoe, Kurata Mie, Yamamoto Toshihiro, Sakamoto Akimasa, Takada Yasutsugu, Kosako Hidetaka, Takeda Hiroyuki, Sawasaki Tatsuya, Masumoto Junya	4. 巻 213
2. 論文標題 CANE, a component of the NLRP3 inflammasome, promotes inflammasome activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2300175	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 Sakaue Tomohisa, Koyama Tadaaki, Nakamura Yoshitsugu, Okamoto Keitaro, Kawashima Takayuki, Umeno Tadashi, Nakayama Yasuhide, Miyamoto Shinji, Shikata Fumiaki, Hamaguchi Mika, Aono Jun, Kurata Mie, Namiguchi Kenji, Uchita Shunji, Masumoto Junya, Yamaguchi Osamu, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 8
2. 論文標題 Bioprosthetic Valve Deterioration: Accumulation of Circulating Proteins and Macrophages in the Valve Interstitium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 862 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2023.01.003	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 Ishitoku Michinori, Mokuda Sho, Araki Kei, Watanabe Hirofumi, Kohno Hiroki, Sugimoto Tomohiro, Yoshida Yusuke, Sakaguchi Takemasa, Masumoto Junya, Hirata Shintaro, Sugiyama Eiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Uprregulate NRP2 Expression and Promote SARS-CoV-2 Proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1498 ~ 1498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v15071498	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 Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Kaneko Naoe, Masumoto Junya	4. 巻 18
2. 論文標題 Intestinal edema induced by LPS-induced endotoxemia is associated with an inflammasome adaptor ASC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0281746	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 Watanabe Hirofumi, Mokuda Sho, Tokunaga Tadahiro, Kohno Hiroki, Ishitoku Michinori, Araki Kei, Sugimoto Tomohiro, Yoshida Yusuke, Yamamoto Toshihiro, Matsumoto Mayuko, Masumoto Junya, Hirata Shintaro, Sugiyama Eiji	4. 巻 43
2. 論文標題 Expression of factor XIII originating from synovial fibroblasts and macrophages induced by interleukin-6 signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00252-4	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 Yamada Yuichi, Kinoshita Izumi, Miyazaki Yoshiko, Masumoto Junya(23番目), Fukushima Mana, Motoshita Junichi, Mori Hiroki, Shiose Akira, Oda Yoshinao	4. 巻 480
2. 論文標題 Myxoid type and non-myxoid type of intimal sarcoma in large vessels and heart: review of histological and genetic profiles of 20 cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 919 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-022-03293-9	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 Namiguchi Kenji, Sakaue Tomohisa, Okazaki Mikio, Kanno Kaho, Komoda Yuhei, Shikata Fumiaki, Kurata Mie, Ota Noritaka, Kubota Yoshiaki, Kurobe Hirotsugu, Nishimura Takashi, Masumoto Junya, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 8
2. 論文標題 Unique Angiogenesis From Cardiac Arterioles During Pericardial Adhesion Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 61591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2021.761591	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 Kaneko Naoe, Mori Wakako, Kurata Mie, Yamamoto Toshihiro, Zako Tamotsu, Masumoto Junya	4. 巻 36
2. 論文標題 Inflammasome assembly is required for intracellular formation of 2-microglobulin amyloid fibrils, leading to IL-1 secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Immunopathology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3.94632E+13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03946320221104554	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増本純也
2. 発表標題 細胞傷害と炎症-Cell Injury and Inflammation-
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会-ワークショップ2 病理学総論再考-（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 増本純也ら
2. 発表標題 NLRP3インフラマソームの機能を調節する新規分子の同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増本純也
2. 発表標題 プロテオインタラクトームによる自己炎症疾患の病態解明
3. 学会等名 111回日本病理学会総会(神戸)2022/4/14-15.（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本敏弘、倉田美恵、金子直恵、増本純也
2. 発表標題 エンドトキシン誘発敗血症モデルにおけるインフラマソーム非依存性炎症の組織像
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会(千葉)2022/11/30-12/2
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子直恵、森若子、倉田美恵、山本敏弘、座古保、増本純也
2. 発表標題 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成にはインフラマソームの形成が必須である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会(千葉)2022/11/30-12/2
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 マックルウェルズ症候群の治療用医薬組成物	発明者 増本純也、金子直恵、澤崎達也、竹田浩之	権利者 愛媛大学
産業財産権の種類、番号 特許、7072260	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	座古 保 (Zako Tamotsu) (50399440)	愛媛大学・理工学研究科(理学系)・教授 (16301)	
研究分担者	白木 賢太郎 (Shiraki Kentaro) (90334797)	筑波大学・数理物質系・教授 (12102)	

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