

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390092

研究課題名(和文)炎症抑制型NLR蛋白PYNODの生理的・病理的役割の解明

研究課題名(英文)Physiological and pathological roles of PYNOD, an anti-inflammatory NLR protein

研究代表者

須田 貴司(SUDA, Takashi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：70250090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：PYNOD (NLRファミリーに属する細胞質蛋白)の欠損マウスを作成し、主に免疫系におけるPYNODの役割を検討した。PYNOD欠損マウスの自然免疫応答に明確な異常は認められず、獲得免疫応答である遅延型過敏症応答に異常が認められた。しかし、皮膚経路で免疫したマウスの所属リンパ節は正常な抗原特異的インターフェロン産生能を示し、末梢組織に投与した抗原が所属リンパ節に到達し、エフェクターT細胞が生成されるプロセスは正常であることが示唆された。したがって、PYNOD欠損マウスの獲得免疫応答異常の原因は所属リンパ節のエフェクターT細胞が末梢組織へ移動する段階以降に存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated the physiological role of PYNOD (a cytoplasmic protein belonging to the NLR family), especially its role in the immune system using PYNOD-deficient mice. PYNOD-deficient mice exhibited a clear defect in the delayed type hypersensitivity that is a type of acquired immune responses, whereas we could find no apparent defect in innate immune responses in these mice. However, draining lymph node cells isolated from PYNOD-deficient mice that had been immunized through skin routes exhibited normal antigen-specific IFN-gamma production, suggesting that peripheral antigen was successfully delivered to draining lymph nodes and effector T cells were normally generated in these mice. Thus, it is likely that the cause of the defect in the acquired immune system of PYNOD-deficient mice exist in a process of or after the migration of effector T cells from draining lymph nodes to peripheral tissues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：PYNOD 自然免疫応答 獲得免疫応答 樹状細胞 エフェクターT細胞 炎症性発がんモデル

### 1. 研究開始当初の背景

NLR ファミリーは免疫・炎症応答やプログラム細胞死を制御する細胞質蛋白群である。中でも、NLRP1/3, NLRC4 はアダプター蛋白 ASC と共にカスペーゼ 1 の活性化に働く複合体 (インフラマゾーム) を形成し、IL-1 などの炎症性サイトカインの成熟に重要な役割を果たす。また、NLRP3 の機能の亢進や不全は、周期熱症候群、糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病など様々な疾患の原因、素因となることが明らかになりつつある。我々は NLR ファミリーに属する PYNOD を発見し、この蛋白分子が ASC やカスペーゼ 1 に対する阻害因子として働くことにより、IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を抑制していることを示してきた。しかし、免疫炎症促進型 NLR 蛋白に比べ、免疫炎症抑制型 NLR 蛋白の生理的な意義は確立されておらず、遺伝子欠損マウスなどを用いて、個体レベルでその役割を解明することが、この研究領域で重要な課題になっている。

### 2. 研究の目的

PYNOD トランスジェニックマウスなどを用いたこれまでの解析から、PYNOD の発現が亢進すると、病原体刺激などによるマクロファージからの IL-1 などの産生が減少し、マウスはエンドトキシンショックに抵抗性を示すことが判明している。しかし、定常レベルの PYNOD の役割については不明である。そこで本研究では、新規に樹立した PYNOD 欠損マウスの解析を中心に、PYNOD の生理的役割、特に免疫系における役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) SPF 環境下でマウスを長期間飼育し、寿命、妊孕性、体重、血液学的パラメーター、胸腺、リンパ節、脾臓等の細胞数と細胞組成などを解析した。
- (2) 腹腔マクロファージおよび骨髄由来マクロファージを細菌・ウイルス感染や病原体関連物質で刺激し、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6 等の産生量を ELISA 法で定量した。また、カスペーゼ 1 や IL-1 のプロセッシングはウエスタンブロット法で解析した。
- (3) マウス腹腔に致死量のリポポリサッカライド (LPS) を投与し、24 時間および 48 時間後の生存率を調べた。また、血清中の IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  を ELISA 法で定量した。
- (4) ネズミチフス菌をマウス腹腔に接種し、48 時間後の肝臓および脾臓のホモジェネートを寒天培地に塗布し、コロニー数を計測した。
- (5) azoxymethane (AOM) と dextran sulfate (DSS) 投与による大腸がん誘発モデルおよび炎症誘導性胃粘膜過形成モデルマウス (C2mE マウス) において発がんや粘膜過形成に対する PYNOD 欠損の影響を検討した。
- (6) T 細胞依存性遅延型過敏症を、以下の 2

つの実験系で検討した。i) トリニトロクロロベンゼン (TNCB) 感作マウスの耳介に TNCB を再塗布して、24 時間後の耳介の腫脹を計測した。ii) 卵白アルブミン免疫マウスの足蹠に卵白アルブミンを皮下注射し、24 時間後の足蹠の腫脹を計測した。

(7) 末梢組織で抗原を取り込んだ樹状細胞の所属リンパ節への移動を、以下の 2 つの実験系で検討した。i) 蛍光微粒子 (Fluoresbrite) をマウス鼻腔内投与し、16 時間後の縦隔リンパ節に出現する蛍光陽性 CD11c 陽性樹状細胞の数をフローサイトメトリーで計測した。

ii) FITC-デキストランをマウス足蹠に投与し、8 時間後の膝下リンパ節に出現する FITC 陽性 CD11c 陽性樹状細胞の数をフローサイトメトリーで計測した。

(8) 卵白アルブミンで皮下免疫したマウスより単離した所属リンパ節細胞を *in vitro* で抗原刺激し、IFN $\gamma$  産生量を ELISA 法で定量した。

### 4. 研究成果

(1) PYNOD 欠損マウスは、SPF 飼育環境では外見上際立った異常所見はなく、発育や妊孕性などにも異常は認められなかった。またヘマトクリット値、赤血球、血小板、白血球数は正常範囲内であり、リンパ節や脾臓における細胞数や組成なども野生型マウスと同様であった。

(2) PYNOD 欠損マウスの腹腔マクロファージおよび骨髄由来マクロファージは、ATP、ニゲリシン、尿酸結晶などの NLRP3 活性化物質による刺激や、サルモネラ菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、A 型溶連菌、インフルエンザウイルスなどの感染による IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生は正常であった。またサルモネラ菌感染によるカスペーゼ 1 の活性化も正常であった。

(3) LPS 腹腔投与による致死性エンドトキシンショックのマウスモデルにおいて、PYNOD 欠損マウスは野生型と比較して生存率や血清サイトカイン濃度 (IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ ) に明らかな差を認められなかった。

(4) ネズミチフス菌をマウス腹腔に接種し、48 時間後の肝臓および脾臓の生細菌数を定量したが、野生型マウスと PYNOD 欠損マウスの間で有意差は認められなかった。

(5) AOM-DSS 誘導大腸癌モデルおよび炎症誘導性胃粘膜過形成モデルマウスにおいて PYNOD 欠損の影響を検討したところ、野生型と比べ発がんや粘膜過形成の程度に差は認められなかった。

(6) PYNOD 欠損マウスは、トリニトロクロロベンゼンや卵白アルブミンに対する T 細胞依存性遅延型過敏症応答が著明に抑制されていた。

(7) 最近 PYNOD 欠損マウスでは抗原を取り込んだ局所樹状細胞の所属リンパ節への移動が抑制されていると報告されたが、我々の解析ではそのような異常は認められなかった。

(8) 卵白アルブミンで免疫した PYNOD 欠損マウスより単離した所属リンパ節細胞は *ex vivo* で正常な抗原 (卵白アルブミン) 特異的 IFN $\gamma$  産生能を示した。

以上の結果より、PYNOD 欠損マウスの自然免疫応答には明確な異常が認められず、むしろ獲得免疫応答に異常があることが判明した。さらに、皮下免疫した抗原刺激は正常に所属リンパ節まで到達していることから、PYNOD 欠損マウスにおける獲得免疫異常の原因は、所属リンパ節で生成されたエフェクター T 細胞が末梢組織へと移動するプロセス以降に存在することが示唆された。

#### 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 4 件)

Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiya, H., Nagata, S., and Suda, T. Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. *Int. Immunol.* 査読有, 2013, 25:363-372 doi: 10.1093/intimm/dxs161

Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., and Harada, M. Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 査読有, 2012, 61:667-676 doi: 10.1007/s00262-011-1132-1

Furuichi, K., Kokubo, S., Hara, A., Imamura, R., Wang, Q., Kitajima, S., Toyama, T., Okumura, T., Matsushima, K., Suda, T., Mukaida, N., Kaneko, S. and Wada, T. Fas Ligand Has a Greater impact than TNF- $\alpha$  on Apoptosis and Inflammation in Ischemic Acute Kidney Injury. *Nephron Extra* 査読有, 2012, 2:27-38

doi: 10.1159/000335533

Motani, K., Kushiya, H., Imamura, R., Kinoshita, T., Nishiuchi, T., and Suda, T. Caspase-1 protein induces apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)-mediated necrosis independently of its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 査読有, 2011, 286:33963-33972

doi: 10.1074/jbc.M111.286823

[学会発表](計 9 件)

須田貴司 パイロプトーシスとその被食機構 第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム, (横浜) 2013 年 9 月 11 日

Imamura, R. Functional Analyses of PYNOD (NLRP10) in Mice. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Carcinogenic Spiral and International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, (金沢) 2013 年 1 月 24-25 日

Kinoshita, T., Imamura, R., and Suda, T. The Role of NLRP3 in the Induction of Cytokine Gene Expression in Tumor Cells. 第 35 回日本分子生物学会年会, (福岡) 2012 年 12 月 11-14 日

Imamura, R., and Suda, T. Functional analyses of PYNOD (NLRP10) in mice 2012 年日本免疫学会学術集会 (神戸) 2012 年 12 月 5-7 日

Suda, T., NLRs: cytoplasmic stress sensors mediating inflammation and cell death. 第 34 回日本分子生物学会年会 シンポジウム, (横浜) 2011 年 12 月 13-16 日

Kinoshita, T., Imamura, R., and Suda, T. NLRP3 mediates NF- $\kappa$ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会, (横浜) 2011 年 12 月 13-16 日

Kushiya, H., Imamura, R., Suda, T. Trichostatin A induces macrophage IL-1 production by activating NLRP3 inflammasome. 2011 年日本免疫学会学術集会 ワークショップ, (幕張) 2011 年 11 月 27-29 日

Imamura, R., Kinoshita, T., Wang, Q., Kushiya, H., and Suda, T. Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 日本分子生物学会 第 11 回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム (金沢) 2011 年 5 月 25-26 日

Motani, K., Kushiya, H., Imamura, R., Kinoshita, T., and Suda, T. Caspase-1 induces ASC-mediated necrosis independently of its catalytic activity. 13<sup>th</sup> International TNF Conference, (Awaji) May 18, 2011

[図書](計 1 件)

須田貴司: 細菌感染による能動的細胞死とインフラマソーム. *実験医学* 30: 566-570, 2012

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://dimb.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 貴司 (SUDA, Takashi)  
金沢大学がん進展制御研究所・教授  
研究者番号：70250090

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

大島 正伸 (OSHIMA, Masanobu)  
金沢大学がん進展制御研究所・教授  
研究者番号：40324610

今村 龍 (IMAMURA, Ryu)  
金沢大学がん進展制御研究所・助教  
研究者番号：10311680