

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590513

研究課題名(和文) NLRP3およびNLRC4のリガンドの探索、同定

研究課題名(英文) Searching the ligands of NLRP3 and NLRC4

研究代表者

小倉 裕範 (OGURA, Yasunori)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：60304557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP3およびNLRC4タンパク質に直接結合して活性化する分子を探索し、これらを同定することを目指した。研究遂行の過程で、複数の問題点が生じ、結果的に、研究期間内には、目的に近づくことすらできなかった。しかし、NLRP3の活性化機構をさまざまな視点から解析する過程で、いくつもの新しい知見を得られた。NLRP3経路活性化に伴ってセラミドが増加すること、塩素イオンの動態がNLRP3活性化に関与すること、成熟IL-1の細胞外輸送を阻害する化学物質が存在することなどを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：In this proposal, I have aimed to identify the ligands of NLRP3 and NLRC4 proteins, which are regulators of the inflammatory caspase, caspase-1. Although I could not accomplish the final goal within the period, on the process of analysing the mechanism of the NLRP3 activation, I have gotten important progress to approach the signaling pathway that NLRP3 mediates; namely, (1) the NLRP3 activation coincides with the increase of intracellular ceramide; (2) chloride ions play an important role in the NLRP3 activation; (3) the extract from *Zanthoxylum bungeanum* inhibits the extracellular transport of the mature IL-1beta peptide.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 細菌学(含真菌学)

キーワード：NLRP3 caspase-1 IL-1beta

1. 研究開始当初の背景

カスパーゼ1 (IL-1 β 変換酵素)を活性化する分子機構として、NLRタンパク質群 (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeat containing gene familyあるいはNOD (Nucleotide binding and oligomerization domain protein)-Like Receptorの略)に属する複数の細胞内タンパク質、NLRP1、Nlrp1b¹²⁹⁵¹、NLRP3、NLRP6、NLRP10、NLRP12、NLRC4、Naip5^{C57BL/6}の関与が明らかにされていた。研究代表者はこれらの中でも、NLRP3とNLRC4の機能の解析に携わっており、NLRP3はリステリア菌や黄色ブドウ球菌の細胞膜穿孔性毒素に、そしてNLRC4はサルモネラ菌やレジオネラ菌などのⅢ/Ⅳ型分泌機構に応答してカスパーゼ1を活性化することを明らかにしていた。なおNLRP3については、生細菌による感染ばかりでなく、細菌由来RNA、ムラミルジペプチド、ウイルス感染、高濃度のATP、尿酸結晶、ピロリン酸カルシウム結晶、アルミニウム塩結晶、活性酸素などにも反応すると報告されていた。

しかし、当時、NLRP3およびNLRC4に直接結合してこれらを活性化させる因子=リガンドの正体は不明であった。上記のようにNLRP3経路は様々な刺激で活性化されるが、これらの因子すべてが細胞質内で直接NLRP3分子に作用するとは考えにくく、おそらくこれらの刺激は共通のシグナル伝達経路に媒介されてNLRP3を活性化するものと予想されていた。申請者自身のそれまでの解析から、NLRP3の活性化には細胞内K⁺イオンの減少、Ca²⁺イオンの上昇、ホスホリパーゼA2の活性、リポキシゲナーゼの活性が必要であることがわかっており、NLRP3のリガンドは、細胞内のイオン動態と脂質代謝変化に共益して生成される分子であろうと予想していた。一方、NLRC4はマクロファージがサルモネラ菌やレジオネラ菌のような細菌にさらされた時にカスパーゼ1を活性化し、NLRC4を介したカスパーゼ1の活性化にはこれらの細菌がもつⅢ/Ⅳ型分泌機構が決定的な役割を果たすことがわかっていた。NLRC4の活性化機構について、Ⅲ/Ⅳ型

分泌機構により細胞質内に注入された繊維タンパク質 (flagellin)、あるいはflagellin類似タンパク質 (サルモネラ菌のPrgJおよびその相同タンパク質)がNLRC4を活性化するというモデルが他の研究グループから提出されていた。しかし、研究代表者自身の解析では、flagellinを欠損するサルモネラ菌およびレジオネラ菌でも、flagellinを有する対照菌株と同程度にカスパーゼ1を活性化することが確認され、またレジオネラ菌はPrgJに相同するタンパク質を保有していないことがわかっていて (研究代表者によるデータベース検索の結果)。このように、NLRP3およびNLRC4の活性化機構については、いくつもの矛盾点を指摘できた。

2. 研究の目的

NLRP3およびNLRC4の活性化機構についての矛盾点の背景を明らかにし、またNLRP3およびNLRC4のリガンドを同定することを目指した。

3. 研究の方法

本研究の当初の計画では、in vitroでNLRP3あるいはNLRC4のシグナル伝達経路を再構成する系をそれぞれ確立し、それらを応用してNLRP3およびNLRC4のリガンドを探索、同定することを目指した。in vitroでのシグナル伝達経路再構成系としては、(1)細胞破碎液中での再構成系、(2)セミインタクト細胞を用いたリガンド導入系、(3)リボソームを用いたリガンド導入系、の3通りの方法を検討した。リガンドのソースとしては、マウス骨髄由来マクロファージあるいはマクロファージ系細胞株を考えた。これらの細胞をNLRP3活性化刺激 (LPSとATPによる順次刺激)で刺激してNLRP3経路を活性化させることで、あるいはNLRC4活性化刺激 (サルモネラ菌への曝露)によりNLRC4経路を活性化させることで、細胞内にそれぞれのリガンドが生成するはずであると考えた。そこで、シグナル伝達再構成系の活性化を指標として、リガンドを単離し、最終的に化学的に同定することを目指した。

ただし、後述のように、研究の途上で方針を変更し、また新たな研究の方向性の模索を行った。

4. 研究成果

研究代表者が平成23年4月に所属施設を替わったため、研究施設の条件に応じて研究計画を変更した点があった。特に、サルモネラ菌の培養のためにはP2実験室が必要であるが、本研究期間中にP2実験室を整備することはできなかつたため、NLRC4機能の解析を進めることができず、NLRP3機能の解析にのみ集中した。

新規の環境では、マウス骨髄細胞よりも細胞株の使用が望ましい状況であったので、目的の実験に使用できる細胞株を改めて作製した。マウスマクロファージ由来細胞株RAW264.7細胞はそのままではASCタンパク質を発現せず、LPS+ATP刺激に反応しないが、これにASCタンパク質を強制発現させることで、LPS+ATP刺激に反応してカスパーゼ1を活性化できるようになる。そこで、ASCタンパク質、あるいはASCタンパク質とGFPタンパク質との融合タンパク質(ASC-GFPタンパク質)を恒常的に発現するRAW264.7細胞(RAW-ASC細胞、RAW-ASC-GFP細胞)を作製した。

この細胞を用いて、上記の3つの当初計画、(1)細胞破碎液中での再構成系、(2)セミインタクト細胞を用いたリガンド導入系、(3)リポソームを用いたリガンド導入系、を試みた。

計画(1)および(2)では、*in vitro*でNLRP3経路を活性化させることを目指した。研究代表者のこれまでの解析によれば、予めLPS+ATPで刺激したマウス骨髄由来マクロファージの破碎液を30℃下で反応させることで、細胞破碎液中のカスパーゼ1を活性化することができ、そこではASC→カスパーゼ1のシグナル伝達が再構成されていると考えられた。ただしNLRP3の活性化が細胞破碎液中で生じている証拠は未だ得られていなかった。そこで、RAW-ASC細胞を用いて、細胞可溶化液中あるいはセミインタクト細胞(低濃度の界面活性剤(Tween20など)で処理した細胞)中で、これを確認できる条件を求める実験を設計することを目指した。しかし、計画期間中、RAW-ASC細胞可溶化液中でのカスパーゼ1の活性化を検出することができず、いまだ、NLRP3活性化を検証するのに適切な実験条件を検討するに至っていない。

実験計画(3)では、LPS+ATPで刺激したマクロファージから抽出した脂質をリポソーム化して、

予めLPSで刺激したマクロファージに与える方法を試みた。研究代表者の予備の実験では、LPSで刺激した骨髄由来マクロファージから調整したリポソームが少量ながらIL-1 β の分泌を誘導したことから、RAW-ASC細胞を用いて、これと同様のことを検証した。しかし、RAW-ASC細胞においてリポソームによるIL-1 β の分泌誘導は再現性に乏しく、あってもわずかであり、これを増強する試みも成功しなかつた。計画(3)も断念せざるを得なかつた。

本研究の当初計画は期待通りに運ばず、一方、本研究計画の期間中、他の研究グループからNLRP3およびNLRC4の活性化機構に関して、新規の知見が報告された。NLRP3のリガンドに関しては、細胞質中に放出された酸化ミトコンドリアDNAがNLRP3に直接結合して活性化することが示唆された⁽¹⁾。また、NLRC4の活性化にはヒトではNAIP、マウスではNaip5またはNaip2が直接の活性化因子として働くというモデルが提案された⁽²⁾。

これらの報告以降、本研究計画を見直し、リガンドの探索にこだわらず、NLRP3活性化機構に関して複数の視点から検証を行うこととした。

特に、LPS+ATP刺激によるNLRP3経路の活性化へのミトコンドリアの関与を検証するために、現在、(4)純化したNLRP3タンパク質とミトコンドリアDNAとの結合を表面プラズモン共鳴センサーを用いて検証する実験、そして(5)ミトコンドリアを欠落させたRAW-ASC細胞でのNLRP3経路活性化の有無を検証する実験、の2つの実験を準備している。

また、NLRP3活性化経路を解析する実験から、以下の(6)~(9)のような結果を得た(いずれも未発表)。

(6)NLRP3活性化経路はホスホリパーゼ阻害剤で阻害されることが知られているので、NLRP3活性化に伴って細胞内で遊離する脂肪酸を検出することを計画した。予備的に、ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸組成を網羅的に検討することを試みたが、LPS+ATP刺激前後で細胞内遊離脂肪酸組成に有意な変化を検出できなかつた。より精密な検証にはガスクロマトグラフィー

／質量分析法のような精度の高い方法を検討すべきであると考えられた。

(7) NLRP3の活性化に細胞中のセラミドが関与する可能性が他の研究室から報告された⁽³⁾のを受けて、LPS+ATPで刺激したRAW-ASC細胞中のセラミド量の変化を液体クロマトグラフィー質量分析法で検討した。その結果、LPS+ATP刺激により細胞内のセラミドが有意に増加することが確認され、加えて、セラミド種の組成の変化が観察された(C16とC24、C24:1脂肪酸を結合するセラミド種が特に増加)。そこで、セラミド合成系の阻害剤を用い、セラミドの増加とNLRP3の活性化の因果関係を検討してみた。しかし、de novo経路およびスフィンゴミエリンからの経路によるセラミド合成が、NLRP3活性化の原因となることを示す証拠は得られなかった。今後、スフィンゴシンからセラミドへの経路(サルベージ経路)あるいは複数の経路の同時阻害の影響を検討する予定である。

(8) NLRP3活性化機構に関与する細胞側の未知分子を見いだす目的で、各種香辛料の抽出物の中から、LPS+ATP刺激によるIL-1 β の分泌を阻害するものをスクリーニングした。その結果、ある香辛料がIL-1 β の分泌を阻害することを見いだした。しかし、これらのIL-1 β 分泌阻害因子は、予想に反して、カスパーゼ1の活性化およびプロIL-1 β の消化を抑制せず、成熟IL-1 β の細胞外輸送を阻害していると考えられた。そのような活性を有する化学物質の報告は未だなく、成熟IL-1 β の細胞外輸送機構は未だ明らかでないことから、このような化学物質の作用を明らかにすることで、成熟IL-1 β の細胞外輸送機構を解明する糸口になることを期待している。

(9) ASCタンパク質を恒常的に発現するRAW264.7細胞を作製すると、作製当初はLPS+ATP刺激に強く反応するが、継代を経るにつれ、ASCタンパク質の発現が維持されているにもかかわらずLPS+ATP刺激に対して反応しにくくなることを複数回観察した。そこで、このようなRAW-ASC細胞が、LPS+ATP刺激に反応するようになる条件を検討したところ、培養液中の塩素イオンをグルコン酸イオンに置換すれば、LPS+

ATP刺激に反応することを見いだした。培養液中の塩素イオンをグルコン酸イオンに置換することで、LPS+ATP刺激によるカスパーゼ1の活性化が増強されることは既に他の研究グループから報告されており、塩素イオンはLPS+ATP刺激によるカスパーゼ1の活性化に抑制的に作用すると考えられている。ここで研究代表者は次のように推測した。(a)通常に増殖する細胞中でもASC-カスパーゼ1経路がわずかながら恒常的に活性化されており細胞増殖に対して抑制的に作用している(一定の確率で細胞死を誘導する)。そのため(b)一部の細胞にASC-カスパーゼ1経路の活性化が抑制されるような遺伝的変異あるいはエピジェネティック変化が起こると、そのような細胞は増殖(生存)に有利になり、いずれ細胞集団中の優位を占めるようになるであろう。RAW264.7細胞でASCタンパク質が発現されないのもそのような原因によるのではなかろうか。ASC遺伝子はヒト乳がん細胞のゲノムDNAにおいて異常なメチル化／発現抑制を受ける遺伝子として独立に見出された経緯があり、TMS1(Target of Methylation-associated silencing-1)という別名を有している。一方、(c)継代を経ることでRAW-ASC細胞のなかには塩素イオン動態に変化(透過性増加?)が生じたクローンが生じ、そのような細胞の中ではASCタンパク質の機能が無力化され、ASC遺伝子が不活化された場合と同様、増殖抑制を解除し、細胞の増殖速度を上げるのではないかと考える。塩素イオンチャネル／トランスポーター遺伝子の中にはがん抑制遺伝子として作用するものが知られており、ASC/TMS1遺伝子によるがん抑制作用と、塩素イオンチャネル／トランスポーター遺伝子によるがん抑制作用は、同一のシグナル伝達機構に関わる可能性が想像された。このような考察を踏まえ、現在、LPS+ATP刺激に対して反応しにくくなったRAW-ASC細胞における塩素イオン動態の検討を計画している。

当初の研究計画が計画通りに進まなかったことは誠に不本意であり、他の研究グループとの競争に相当の遅れをとったことには忸怩たる思いがある。しかし、NLRP3およびNLR4の活性化機構の全容は未だ明らかにされず、研究当初に指摘した矛盾点は未だに解決され

てはいない。今後もこの問題の解決に取り組んでいきたい。

(参考文献)

- (1)Shimada K et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012 36(3):401-14.
- (2)Kofoid EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NALPs determines inflammasome specificity. *Nature*. 2011 477(7366):592-5
- (3)Vandanmagsar B et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011 17(2):179-88.

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 3件)

1. Nakanishi A, Kitagishi Y, Ogura Y, Matsuda S. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review). *Int J Oncol*. 2014 44(6):1813-9.
2. Sukumaran B, Ogura Y, Pedra JH, Kobayashi KS, Flavell RA, Fikrig E. Receptor interacting protein-2 contributes to host defense against *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 66(2):211-9
3. Kim YG, Shaw MH, Warner N, Park JH, Chen F, Ogura Y, Núñez G. Crohn's disease-associated Nod2 mutation limits production of proinflammatory cytokines to protect the host from *Enterococcus faecalis*-induced lethality. *J Immunol*. 2011 187:2849-52

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[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://oguralab2011.web.fc2.com/narajo/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小倉 裕範(OGURA, Yasunori)

奈良女子大学研究院生活環境科学系・教授

研究者番号:60304557