

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293235

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける自然炎症の関与の解明

研究課題名(英文) Innate immunity in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

研究代表者

河野 肇 (Hajime, Kono)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：60585074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチや無菌性炎症のメカニズムとして、IL-1が重要であることは知られている。IL-1活性化は他分子複合体であるインフラマソーム活性化による。我々はインフラマソーム活性化を可視化する細胞アッセイを開発した。ゲノムワイド遺伝子ライブラリーを用いて網羅的な検討を行い、インフラマソーム活性化、もしくは抑制に関与する分子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：IL-1 plays important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis or other sterile inflammation. IL-1 activation is mediated by inflammasome activation. We have developed a cell based assay to visualize inflammasome activation. By utilizing a genome-wide expression library, we identified several genes that activate or suppress inflammasome activation.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

感染に対する生体防御の第一線において、自然免疫による炎症反応は重要な役割を果たしている。一方自然免疫による急性炎症反応の対象は病原体に限局されるものではないため、感染局所に遊走した白血球の活性酸素やプロテアーゼなどの分解酵素などが漏れだして自らの組織傷害をも引き起こす。生体内における通常以上の細胞死、特にネクローシスは急性炎症反応を引き起こす。虚血などの感染を伴わない細胞死においては、急性炎症は組織傷害のみ引き起こし、様々な炎症性疾患の原因となると考えられている(1-3)。関節リウマチにおいては、関節への外傷が発症に関与すること、もしくは全身的な関節所見の悪化につながるものが経験されており、細胞死に対する炎症反応が関節リウマチにつながる事が想定される(4)。炎症原性のない正常生細胞が細胞死に伴い炎症を惹起する性質を帯びる機序については、細胞形質膜の統合性破綻にともない通常細胞内に隠されている分子が放出されることによると考えられる。このような通常細胞内に隠されており、細胞傷害時に放出される分子は **Danger Signal** と呼ばれている(5)。NLRP3はIL-1過剰産生による発熱、皮疹、関節炎などをきたす狭義の自然免疫疾患であるクリオピリン関連周期熱症候群の原因遺伝子として同定された。アダプター分子ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) とともに多分子複合体であるインフラマソームを形成し、カスパー1からIL-1の活性化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。このような自然免疫機構の活性化による疾病は自然炎症疾患と定義されている。尿酸結晶などの生体内で形成される無菌的微粒子に対する急性炎症反応(痛風)のみならず、動脈硬化や糖尿病などもNLRP3インフラマソームおよびIL-1依存性であることが判明するなどさまざまな疾患群において自然炎症の重要性が明らかになりつつある(9)。関節リウマチにおいてはその病態が部分的にIL-1依存性であることが判明しているが、その自己炎症性疾患としての側面は判明していない。

2. 研究の目的

死細胞によるインフラマソーム活性化については不明の点が多く研究は端緒に終わったばかりであるが、インフラマソーム形成の分子メカニズムの解明が喫緊の課題としてあげられる。本申請においては、NLRP3インフラマソーム形成の分子メカニズム、特にその促進的分子および抑制的分子の発見を第一の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞死による炎症反応の分子機構、特にインフラマソーム形成の分子機構の解明。

細胞死、特にネクローシスはインフラマソーム活性化をもたらす。インフラマソーム活性化、もしくは抑制機構を発見するために、今回2種類の方法でライブラリースクリーニングを行うこととし、アッセイに必用な系は構築済みである。a) レトロウイルスライブラリー法 安定的にASC-Cerulean発現するマクロファージセルラインRAW264.7細胞を樹立した。この細胞は、LPS+ATPなどの刺激によりインフラマソーム活性化をきたし、細胞質に一樣に存在していた分子が一ヶ所に集まりspeckleを形成する(図1)。さらに、ecotropic retrovirus receptorを遺伝子導

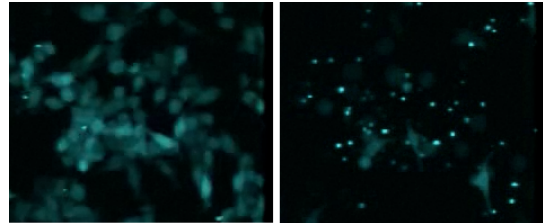


図1 RAW264.7細胞におけるインフラマソームの形成(左 untreated、右 LPS+ATP 投

入してあり、通常難しいレトロウイルスによるマクロファージへの遺伝子導入がほぼ100%容易にできる。マクロファージより採取したmRNAを用いてレトロウイルスライブラリーを作成し、ASC-Cerulean発現RAW264.7細胞に感染させた後、インフラマソーム活性化刺激を行う。インフラマソーム活性化はパイロトシスという細胞死を導くため、刺激後に生存し、増殖してくる細胞を分離して、そこに発現しているレトロウイルスライブラリー由来の分子を同定することにより、インフラマソーム抑制性分子が同定される。またその逆に、リアルタイムでインフラマソーム活性化を観察できる利点を生かして、インフラマソーム活性化因子の同定を行う。b) 上皮細胞HEK293T細胞におけるインフラマソーム再構成法 リポフェクションによる遺伝子導入が容易であるHEK293T細胞に適量のASC-Cerulean発現する安定株を作成した。この細胞株にさらにNLRP3を遺伝子導入すると、その用量依存性にspeckleを形成することが観察された。また、微量(3ng/5000cells)のNLRP3遺伝子導入を行った細胞においては、インフラマソーム活性化剤であるNigericin(細胞膜障害毒)の投与にてspeckleの形成がなされた(図2)。

すなわち、リポフェクションによる再構成によりNigericin依存性/非依存性の2方法でのspeckle形成が達成されている。さらに、抑制性遺伝子NLRP10の共発現により、speckle形成の抑制が観察された。96wellプレートの1プレートあたり約4分で画像を取得できるハイスループットのアッセイ系とな

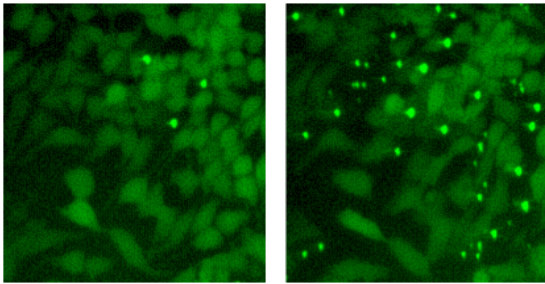


図2 再構成系(HEK293T細胞)におけるインフラマソームの形成(左 untreated、右 Nigericin 投与)

っている。ゲノムネットワークプロジェクト (GNP) で収集され、哺乳類発現ベクターにクローニングされたヒト完全長 cDNA クローン (約 16000 クローン) を遺伝子導入することによりゲノムワイドのスクリーニングを行う。これらにより得られた候補分子は、そのインフラマソーム形成に及ぼす機能が *in vitro* にて IL-1 活性化に関与するかどうか、さらには腹腔アッセイや皮膚アッセイなどを用い、*in vivo* での自然炎症への関連を検討する。

4. 研究成果

1) インフラマソーム活性化のゲノムワイドスクリーニング

ゲノムネットワークプロジェクト (GNP) で収集され、哺乳類発現ベクターにクローニングされたヒト完全長 cDNA クローン (約 16000 クローン) を遺伝子導入することによりゲノムワイドのスクリーニングを行った。

入手した、96 well ベースの大腸菌にトランスフォームされ凍結された状態から遺伝子精製を行い、そのまま高効率に HEK293T 細胞にトランスフェクションする一連のハイスループット工程を開発した。

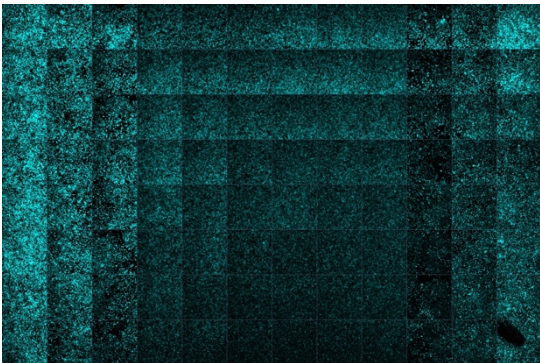


図3 インフラマソームの形成を 96well においてリアルタイムに取得するシステム画像

このアッセイにより、インフラマソーム活性化もしくは抑制をきたす遺伝子を複数同定した。最終的な機能同定までは至っておらず、現時点では既知のインフラマソーム抑制性遺

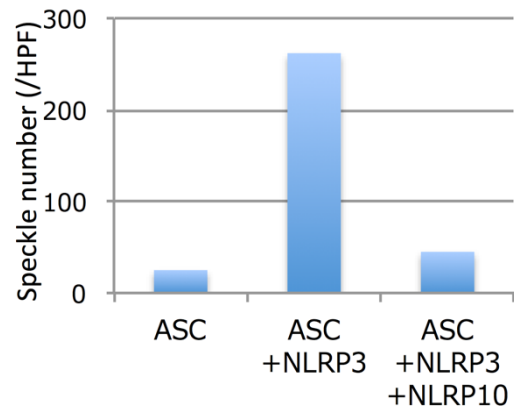


図4 HEK293細胞における遺伝子導入によるインフラマソームの形成

伝子 (NLRP10) による抑制を示す (図 4)。

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)

1: Onda A, Kono H, Jiao Q, Akimoto T, Miyamoto T, Sawada Y, Suzuki K, Kusakari Y, Minamisawa S, Fukubayashi T. New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization.

Muscle Nerve. 2016 Oct;54(4):788-91.

(査読有)

2: Hachiya Y, Kawasaki A, Oka S, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Suda A, Setoguchi K, Nagai T, Shimada K, Sugii S, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Ohno S, Katayama M, Kono H, Hirohata S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Nagaoka S, Tohma S, Furukawa H, Tsuchiya N. Association of HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population: A Case-Control Association Study. PLoS One. 2016 Jun 22;11(6):e0158065.

(査読有)

3: Furukawa H, Oka S, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Matsushita T, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kobayashi K, Osada A, Ihata A, Kondo Y, Nagai T, Setoguchi K, Okamoto A, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Kono H, Katayama M, Hirohata S, Sumida T, Migita K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S, Nagaoka S, Takehara K, Tohma S, Tsuchiya N.

Human Leukocyte Antigen and Systemic Sclerosis in Japanese: The Sign of the Four Independent Protective Alleles, DRB1*13:02, DRB1*14:06, DQB1*03:01, and DPB1*02:01.

PLoS One. 2016 Apr 26;11(4):e0154255.

(査読有)

4: Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T. Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis in Apoe^{-/-} mice.

J Immunol. 2015 Jan 15;194(2):773-80.

(査読有)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 肇 (Kono, Hajime)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：60585074

(2) 研究分担者

南木敏広 (Nanki, Toshihiro)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：00282749

関根 知世子 (Sekine, Chiyoko)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：40392005