

令和元年5月31日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08934

研究課題名(和文) インフラマソーム機能変調疾患における汎用新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) The development of a novel general-purpose biomarker for autoinflammatory syndromes

研究代表者

駒井 浩一郎 (KOMAI, Koichiro)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：40304117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではインフラマソーム構成タンパク質PYCARD/ASCのエクソン2欠損型バリエーションを解析し、新たな自己炎症症候群の汎用バイオマーカーとすることを目的とした。その結果、尿酸塩刺激によるIL-1産生量がエクソン2欠損型で野生型に比して有意に高いこと、フラジェリン刺激によって有意に低下することを見出した。さらにエクソン2欠損型ASCは刺激下で野生型と比較してNLRP3結合性が増大し、NLRC4結合性が低下していることを見出した。またエクソン2が欠損するスプライスエラーを惹起する原因としてrs8056505変異の関与を認めたと、本変異以外のスプライシング干渉要因の存在も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では炎症シグナル伝達に働くタンパク質複合体「インフラマソーム」の構成分子であるexon2欠損型ASCスプライスバリエーションが機能変化をきたしていることを明らかにした。ASCは感染体やアミロイド、コレステロールなど様々な危険因子を受容するNLRP3などによって構成される様々なインフラマソーム共通のアダプター分子として機能し、感染症、認知症や生活習慣病など幅広い疾患を含む「自己炎症症候群」の発症に関与していると考えられることから、本分子が新たな疾患診断のための汎用バイオマーカーとして有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed functional analysis of PYCARD/ASC variant form lacking exon 2 (delta ASC), which is one of the proteins that make up the inflammasome in order to use it as a general-purpose biomarker for autoinflammatory syndromes. As the results, while it was found that the amount of active IL-1 was significantly elevated in the case with delta ASC as compared with wild type by stimulation with monosodium urate, it was decreased in the case with delta ASC as compared with wild type by stimulation with flagellin. Furthermore, as the results of immunoprecipitation experiments, while it was found that the binding capacity of delta ASC for NLRP3 was increased as compared with wild type upon monosodium urate stimulation, the binding capacity of delta ASC for NLRC4 was decreased as compared with wild type upon flagellin stimulation. We also found that rs8056505 SNP affects the splicing of PYCARD/ASC, but it was also suggested that other factors affect the splicing.

研究分野：分子生物学、免疫学

キーワード：インフラマソーム ASC/PYCARD 自然免疫 スプライシング IL-1 自己炎症症候群 認知症 生活習慣病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症や各種の生活習慣病、また痛風などの炎症性疾患において種々の危険シグナルを細胞内に伝達するためのインフラマソームタンパク質複合体の機能変調が知られつつある。そこで申請者は2012年からインフラマソーム関連遺伝子解析を開始し、2014年にインフラマソームの構成分子の一つである PYCARD (ASC)のエクソン 2 欠失型スプライスバリエント mRNA を日本人集団中に独自に見出した。PYCARD (ASC) (PYD and CARD domain containing; Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) は種々の危険因子を認識する NLRP3 などの受容分子と、IL-1 や IL-18 など活性化する Caspase-1 間のアダプター分子であり、申請者は炎症性疾患の一つである回帰性リウマチ患者でこのスプライスバリエント mRNA が優位に発現していることも明らかにしていた。

また、このバリエントについては当初以下の3点を明らかにしていた。

- ・ DNA 配列上では保持されているエクソン 2 がスプライシング時に脱落した mRNA にコードされていること
- ・ 特定の配列の脱落によってフレームシフトは生じず、本来の終始コドンまでタンパク質に翻訳され得る配列であること
- ・ 脱落部分配列の位置から推定して、イレギュラーな mRNA を分解する品質保証機構である RNA decay も作用せず、インフラマソーム機能に影響を及ぼすことが予測されること

### 2. 研究の目的

多くの危険シグナルは基本的に共通のインフラマソームを活性化することから、この特定配列欠失型バリエント PYCARD (ASC) は回帰性リウマチのみならず、認知症や生活習慣病を含む幅広いインフラマソーム関連疾患(自己炎症症候群)の病態形成機構解明や最適治療のための重要基礎知見と考えられたため、本研究ではバリエント PYCARD (ASC)の機能解析とバリエント産生機序の解明を行い、インフラマソーム関連疾患の病態形成機構基盤を明らかにし、本分子を汎用性の高い新規バイオマーカーとして確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では PYCARD (ASC) 発現異常に伴うインフラマソーム関連疾患病態形成機構の基盤を解明するために、平成 28-30 年度の3年間で以下の課題に取り組んだ。

課題 1: PYCARD (ASC) スプライスバリエントの機能解析

課題 2: PYCARD (ASC) スプライシング異常機構の解明

課題 1: PYCARD (ASC) スプライスバリエントの機能解析

課題 1 の目的: *in vitro* および *in vivo* で PYCARD (ASC) スプライスバリエントの機能解明

既に独自に単離している PYCARD (ASC) スプライスバリエント全長 cDNA を、内在的にインフラマソームを構成的に発現している THP-1 細胞に強制発現させ、以下の項目を検討した。

- ・ PMA および尿酸塩やフラジェリンなど種々の危険因子刺激によるインフラマソーム活性化によって培養上清中に産生される IL-18 の ELISA 法による定量
- ・ NLRP3, NLRC4 などの危険シグナル受容分子や Caspase-1 などの PYCARD (ASC) と相互作用が報告されているインフラマソーム構成分子との免疫沈降法による相互作用解析
- ・ PYCARD (ASC) 正常型/バリエント発現ヒト末梢血由来単核球に種々の刺激を与え、インフラマソーム活性化によって培養上清中に産生される IL-18 の ELISA 法による定量

課題 2: PYCARD (ASC) スプライシング異常機構の解明

課題 2 の目的: PYCARD (ASC) スプライスバリエント産生機序の解明

PYCARD (ASC) バリエント cDNA 配列分析の結果、DNA 配列上では保持されているエクソン 2 がスプライシング時に脱落した mRNA にコードされていることを明らかにしていたため、まずバリエント発現が認められたヒト PYCARD (ASC) DNA 配列を詳細に解析し、スプライシング異常原因となる患者特異的な DNA 変異の有無を明らかにすることを試みた。また変異部分を含むゲノム DNA 断片を単離し、pSPL3 などの発現ベクターを利用したミニ遺伝子を構築し HEK293 細胞へトランスフェクションすることでスプライシング再現実験(エクソントラップ法)を行い、RT-PCR 法によってスプライシング産物を解析、該当変異がスプライシングへ影響をおよぼす可能性の検証を試みた。

### 4. 研究成果

課題 1: PYCARD (ASC) スプライスバリエントの機能解析

PMA および尿酸塩刺激によって IL-18 産生量が PYCARD (ASC) スプライスバリエントでは野生型に比して有意に高いことを見出した。一方 PMA およびフラジェリン刺激によって IL-18

産生量はバリエントでは野生型に比して有意に低かった。さらに免疫沈降実験の結果、バリエントは尿酸塩刺激で NLRP3 との結合性が增大している一方で、フラジェリン刺激によって NLRP4 との結合性が低下していた。いずれの場合でも Caspase-1 との結合性には変化は見出されなかった。さらに、PYCARD (ASC) 正常型/バリエント発現ヒト末梢血由来単核球に PMA および尿酸塩刺激を与え、培養上清中に産生される IL-1 $\beta$  を定量した結果、PYCARD (ASC) スプライスバリエントをヘテロ発現している単核球では正常型ホモ発現と比較して IL-1 $\beta$  産生量が高い傾向が見出された。

#### 課題 2 : PYCARD (ASC) スプライシング異常機構の解明

PYCARD (ASC) スプライスバリエントをホモ発現するヒト DNA を解析した結果、PYCARD 遺伝子上 rs8056505 変異を認めた。本変異は日本人集団ではレアアリルであること、また exon1 上流プロモーター領域に位置するため、転写と共役的に生じるスプライシングにも影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで該当位置が正常配列または変異配列のゲノム DNA 断片を pSPL3 発現ベクターに組み込んだミニ遺伝子を構築し HEK293 細胞へトランスフェクションすることでスプライシング再現実験 (エクソントラップ法) を行った。その結果、正常型配列に比較して変異型配列では PYCARD (ASC) exon 2 欠失型スプライスバリエントの発現亢進が認められたが、エクソン 2 の完全な脱落は認められず、他のスプライシング干渉要因も存在する可能性が考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Expression of a *PYCARD/ASC* variant lacking exon 2 in Japanese patients with palindromic rheumatism increases interleukin-1 $\beta$  secretion  
Yumi Suganuma, Hayate Tanaka, Aya Kawase, Aoi Kishida, Moeko Yamaguchi, Atsuko Yabuuchi, Koji Inoue, Shunichi Shiozawa and Koichiro Komai  
Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology (2019, revise)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Identification and functional analysis of a splice variant of inflammasome adaptor *PYCARD/ASC* in Japanese patients with palindromic rheumatism.

Aoi Kishida, Yumi Suganuma, Aya Kawase, Hayate Tanaka, Atsuko Yabuuchi, Koji Inoue, Shunichi Shiozawa, Koichiro Komai  
The 7th East Asian Group of Rheumatology Meeting (2017)

(2) Exon2 欠損型 *PYCARD/ASC* バリエントの NLRP4 インフラマソーム機能への関与

岸田あおい、河瀬絢、菅沼佑美、田中颯、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

第 61 回日本リウマチ学会学術集会 (2017)

(3) Exon2 欠損型 *PYCARD/ASC* バリエント発現に伴う NLRP3 インフラマソーム機能の解析

菅沼佑美、河瀬絢、岸田あおい、田中颯、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

第 61 回日本リウマチ学会学術集会 (2017)

(4) *PYCARD/ASC* スプライスバリエントのインフラマソームに与える機能変調およびバリエント産生機序の解明

菅沼佑美、岸田あおい、藪内温子、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)

(5) NLRP4 インフラマソームにおける exon2 欠損型 *PYCARD/ASC* の機能解析

岸田あおい、菅沼佑美、藪内温子、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

第 62 回日本リウマチ学会学術集会 (2018)

(6) exon2 欠損型 *PYCARD/ASC* は NLRP3 インフラマソーム機能を亢進する

菅沼佑美、岸田あおい、藪内温子、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

第 62 回日本リウマチ学会学術集会 (2018)

(7) 日本人回帰性リウマチ患者における *PYCARD / ASC* スプライスバリエント産生機序の解明

藪内温子、岸田あおい、菅沼佑美、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

第 62 回日本リウマチ学会学術集会 (2018)

(8) 日本人回帰性リウマチ患者において見出した exon2 欠損型 *PYCARD/ASC* バリエントは IL-1 $\beta$  産生を増加させる

菅沼佑美、藪内温子、大谷英未、井上康二、塩沢俊一、駒井浩一郎

第 63 回日本リウマチ学会学術集会 (2019)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：回帰性リウマチ検査用バイオマーカー及び検査方法

発明者：駒井浩一郎、井上康二

権利者：神戸大学

番号：特許公開 2016-101092

出願年：2014

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院保健学研究科 駒井研究室

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-komai/>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。