

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15527

研究課題名(和文) 蛍光・発光蛋白質会合センサーを用いたNLRP3インフラマソーム活性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of NLRP3 inflammasome activation using fluorescence and light emission protein-interaction sensors

研究代表者

平家 俊男(Heike, Toshio)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：90190173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP3インフラマソームの活性化機構を解明する目的で、構成分子であるNLRP3/ASC/CASP1の3つのタンパク質のそれぞれのN末端、C末端に発光物質を融合したコンストラクトと、それぞれの分子にHaloTagを融合したコンストラクトを作成し、分子会合を時間的・空間的に評価する系の構築を目指した。まず、これらのスプリット型発光タンパク質と融合タンパク質の組み合わせの内、最終的な蛋白会合の検出に最適であるものの選定を可能とする試験管内無細胞転写翻訳系を利用したスクリーニング系の構築に成功した。現在、このシステムを用いて最適の発光を生じる組み合わせを選定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まだ研究の途中ではあるが、本研究により個々の細胞レベルでインフラマソーム構成分子の会合の視覚的な評価が可能となり、細胞による反応の強さや進行速度の違い、細胞内での複合体形成の位置や拡がり、細胞毎の刺激に対する反応閾値の違いなど、多角的な視点からの評価が可能となる。又、インフラマソーム複合体の形成と、最終的なcaspase 1の活性化を個別に捉える事が可能とあり、それぞれの律速段階や制御機構の解明へと繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of evaluating the mechanism of NLRP3 inflammasome assembly and activation, we prepared constructs in which the luminescent substance is fused to the N- and C-terminus of each of the three component proteins of the NLRP3 inflammasome (NLRP3/ASC/CASP1). Constructs fused with HaloTag were also prepared. We then developed a screening system using an in vitro cell-free transcription/translation system that enables selection of combinations of these proteins that are optimal for detection of final protein association. Currently, this system is being used to select the combination that produces the optimal light emission.

研究分野：免疫疾患

キーワード：インフラマソーム 自己炎症性疾患 蛋白質会合蛍光センサー

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

1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患は、遺伝子変異に基づいたインフラマソームの活性化を背景とする炎症性疾患である。インフラマソームは病原体成分や生体のストレス反応により産生された物質を検出するセンサー分子と、ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) などのアダプター蛋白、エフェクター分子である caspase から構成され、感染やストレス反応により形成される蛋白複合体である。

センサー分子の先天的な異常によりインフラマソームが過剰に活性化され、炎症性サイトカインが過剰産生されることが自己炎症性疾患病態の本質であるが、代表疾患である CAPS (cryopyrin-associated periodic syndrome) では、責任分子である NLRP3 の機能獲得型変異により NLRP3 インフラマソームが形成され、caspase 1 の活性化から IL-1 が過剰産生されて炎症が惹起される。変異細胞が 5%程度の体細胞モザイクでも発症し、ヘテロ接合患者と臨床症状に大差が無い事が知られており、一部の細胞による炎症の誘発が周囲の正常細胞に波及する可能性が示唆されている。抗 IL-1 療法の普及により炎症のコントロールが可能となりつつあるが、中枢神経病などへの効果は限定的であり、病態の根本的治療法の確立が望まれている。この為にはインフラマソーム活性化機構の詳細な解明が必要であるが、分子レベルでの解析は始まったばかりであり、特に NLRP3 変異細胞に於けるインフラマソーム複合体形成機構の解明は手付かずの状態である。そこで、新しい視点から NLRP3 インフラマソームの活性化機構を解析し、過剰な活性化を直接制御するような治療法の開発へと応用することを旨とする過程で本研究への着想に至った。

近年、蛍光発光共鳴エネルギー移動 (FRET/BRET) に基づいた低分子蛍光センサーを用いた蛋白質会合解析が可能となり、連携研究者の小原らは、この技術を応用して単一細胞レベルで caspase 1 の活性化を時間的・空間的に解析するシステムの開発に成功している (Cell Reports 8:974, 2014)。また、インフラマソーム活性化の最終的なエフェクター分子である IL-1 放出現象を単一細胞レベルで実時間に観察するシステムも実現化されている (Sci Rep. 4:4736, 2014)。加えて、CAPS 患者由来疾患特異的 iPS 細胞から分化させた単球による *in vitro* での病態も再現されている (Blood 120:1299, 2012) ため、これらのシステムを有機的に組み合わせることにより、NLRP3 インフラマソームの活性化機構を解明する下地が固まりつつあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、疾患特異的 iPS 細胞より分化した細胞を用い、単一細胞レベルでのインフラマソームの分子会合・複合体形成過程を時間的・空間的に解析する系を構築し、炎症性サイトカイン産生過程の解明を行うとともに、過剰なインフラマソームの活性化そのものを抑制する治療法の開発へと寄与することである。これまでのインフラマソーム活性化機構の研究は、一定数の細胞集団を一塊として刺激し、産生されるサイトカインの総量や抽出した蛋白の会合を調べるものが中心であり、個々の細胞レベルでの反応の差や、時間的な反応の進行を横断的に捉える事は不可能であった。本研究の成功により、個々の細胞レベルでインフラマソーム構成分子の会合の視覚的な評価が可能となり、細胞による反応の強さや進行速度の違い、細胞内での複合体形成の位置や拡がり、細胞毎の刺激に対する反応閾値の違いなど、多角的な視点からの評価が可能となる。又、インフラマソーム複合体の形成と、最終的な caspase 1 の活性化を個別に捉える事も可能であり、それぞれの反応の律速段階や制御機構の解明へと繋がる可能性を秘めている。この研究の進展は、NLRP3 以外のインフラマソーム活性化機構の解明に繋がるものであり、インフラマソーム複合体形成を調整・阻害する新規治療薬の探索にも応用が可能である。

3. 研究の方法

まず、DNA 改変技術を用いて caspase 1 の活性化センサーと NLRP3・ASC・caspase 1 の会合を検出する低分子蛍光センサーを導入した iPS 細胞株を作成する。作成した iPS 細胞株より単球を分化させ、個々の細胞レベルで NLRP3 インフラマソーム複合体の形成と caspase 1 の活性化過程をリアルタイムで評価する系を確立し、NLRP3 インフラマソームの活性化による炎症誘導の機構を解明する。更に、NLRP3 変異の体細胞モザイクを原因とする CAPS 患者より樹立した正常及び NLRP3 変異 iPS 細胞を用いる事で、NLRP3 変異によるインフラマソーム複合体の過剰形成と caspase 1 の活性化過程の解析を行うとともに、正常細胞と NLRP3 変異細胞が混在する状況でのそれぞれの細胞のインフラマソーム活性化を評価し、体細胞モザイクに於ける炎症にそれぞれの細胞が寄与する過程を解析する。加えて、変異 NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害・調節する薬剤の探索を行う。

(1)インフラマソーム複合体形成を効率的に評価可能とするシステムの構築

目的とする NLRP3 インフラマソーム構成分子の会合を評価するシステムとして、NanoBiT Protein:Protein Interaction System を用い、NLRP3/ASC/CASP1 の 3 つのタンパク質それぞれ発光タンパク質を融合したコンストラクトを作成する。更に、NLRP3/ASC/CASP1 それぞれの蛍光標識 HaloTag 融合タンパク質を作成し、スプリット型発光タンパク質と融合タンパク質の組み合わせの内、最終的な蛋白会合の検出に最適であるものを選定する。

(2)CAPS 疾患特異的 iPS 細胞株へのセンサー分子の導入と単球・マクロファージの分化
 NLRP3 変異の体細胞モザイクにて発症した CAPS 患者より、既に NLRP3 変異陽性及び変異陰性 iPS 細胞株は樹立されている。この細胞株を基に、TALEN や CRISPR/Cas などの DNA 改変技術を用い、計画(1)で選定された蛋白会合の検出に最も適したセンサーを導入した細胞株を作成する。更に、各センサーの導入が成功した iPS 細胞株より単球・マクロファージ系細胞への分化を誘導し、センサー未導入 iPS 細胞より分化誘導した細胞と機能的に差の無い事を確認する。

(3)正常及び変異 NLRP3 インフラマソーム活性化機構の評価と解明

各種センサーの導入された NLRP3 変異陽性及び変異陰性 iPS 細胞株より分化した単球・マクロファージを様々な条件下で培養して、NLRP3 インフラマソーム構成分子の会合と caspase 1 の活性化につき個々の細胞レベルで時間的・空間的に評価する。これを通じ、正常の NLRP3 インフラマソームの活性化機構を解明すると共に、変異 NLRP3 分子がインフラマソームを過剰に活性化させる機構を解明する。

(4)NLRP3 変異陽性・変異陰性細胞共培養系での炎症波及機構の解明

センサー分子を導入した NLRP3 変異陽性及び変異陰性 iPS 細胞株より分化誘導した単球・マクロファージ系細胞を判別可能な状態に標識し、様々な割合で共培養して *in vitro* 体細胞モザイクモデルを作成する。この系に於いて NLRP3 インフラマソーム構成分子の会合と caspase 1 の活性化について細胞レベルでの評価を行い、NLRP3 変異陽性インフラマソームの活性化により引き起こされた炎症が NLRP3 変異陰性細胞へと波及する機構を解明する。

(5)NLRP3 インフラマソーム阻害薬の検索系確立

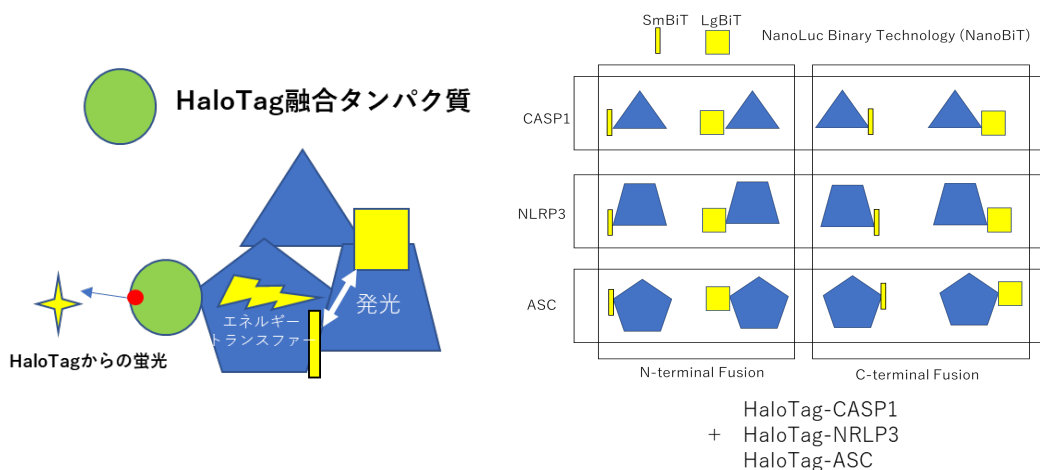
NLRP3 変異陽性及び変異陰性 iPS 細胞株より分化誘導した単球・マクロファージ系細胞を用い、特に変異陽性 NLRP3 インフラマソームの活性化を選択的に抑制する化合物の探索系を確立する。

4. 研究成果

実際には、NLRP3・ASC・caspase 1 の会合を検出する低分子蛍光センサーを導入した iPS 細胞株を作成する前段階で技術的な問題が生じ、センサーを導入した iPS 細胞株の完成には至らなかったが、それぞれの問題点に対する解決策を検討し、実現化の目処がついている。

(1)インフラマソーム複合体形成評価を最適化するシステムの構築

目的とする NLRP3 インフラマソーム会合を評価する目的で、構成分子である NLRP3/ASC/CASP1 の3つのタンパク質のそれぞれの N 末端、C 末端に発光物質を融合した 12 種類 (発光タンパク質の断片として SmBiT と LgBiT の 2 種類があり、それぞれを 3 つのタンパク質の N 末端、C 末端に融合) のコンストラクトを作成した。加えて、それぞれの分子に HaloTag を融合したコンストラクトも作成したが、これら 12 種類のスプリット型発光タンパク質と融合タンパク質の組み合わせの内、最終的な Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)の検出に最適であるものを選定する段階で技術的な問題が生じた。それぞれのコンストラクトを培養細胞に導入して行う実験は、組み合わせの数が膨大である上、BRET の定量化が困難であるため、そのままでは最適の組み合わせを選定できない事態となった。



(2)試験管内無細胞転写翻訳系を利用したスクリーニング系の構築

前述の問題を解決する手段として、それぞれのコンストラクト・融合蛋白の組み合わせの内、最も効率的な発光を生じるコンストラクトの組み合わせの選定を可能とする試験管内無細胞転写翻訳系を利用したスクリーニング系 (小麦胚芽に PCR 断片を加えて蛋白を合成させて発光強度を測定する系) の構築に成功した。現在、このシステムを用いて最適の発光を生じる組み合わせを選定中である。

(3)CAPS 疾患特異的 iPS 細胞株へのセンサー分子の導入

上記の実験と並行して、iPS 細胞への複数遺伝子の同時形質転換を確実にかつ効率的に進めるシステムの構築を行った。具体的には、それぞれの遺伝子コンストラクトを決まったコピー数だけ iPS 細胞に導入でき、かつ安定的に保持できる系の構築を模索した。その結果、人工染色体と組換え反応を用いた遺伝子発現系を利用する事が解決策となる目処が立った(Hasegawa Y, et al. 2018)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hasegawa Y, Ikeno M, Suzuki N, Nakayama M, and Ohara O. Improving the efficiency of gene insertion in a human artificial chromosome vector and its transfer in human-induced pluripotent stem cells. *Biology Methods and Protocols*, Volume 3, Issue 1, 2018, bpy013. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpy013>

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

研究室ホームページアドレス

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~pediatrics/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：八角 高裕

ローマ字氏名：(YASUMI, Takahiro)

所属研究機関名：京都大学・大学院医学研究科

部局名：発達小児科学

職名：講師

研究者番号(8 桁)：00511891

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小原 収

ローマ字氏名：(OHARA, Osamu)

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。