

令和元年6月27日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19685

研究課題名(和文) 難病から『インフラマソーム病』を独立させ、分子標的に基いた診断の再編成を加速する

研究課題名(英文) Acceleration of the definition of "inflammasome disease" based on molecular mechanism of diseases

研究代表者

増本 純也(MASUMOTO, Junya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20334914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、正確な分子機序に基づいた分子標的治療に直結した新規の診断カテゴリーの創設へと再編成することである。

無細胞タンパク質再構成系により無細胞インフラマソームの作製とアルツハイマー病のアミロイド や2型糖尿病のアミリンなどのアミロイドとの複合体を作製した。また、アルツハイマー病で脳内に沈着するアミロイドオリゴマーが直接NLRP3インフラマソーム形成の第一段階であるNLRP3とASCの結合を誘導することを証明した。

これらの疾患がいずれもインフラマソーム病であること証明するため、無細胞インフラマソーム複合体と複合体に対する抗体作製を行うことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、臨床症状や病理形態に基づいた現在の難病診断を、正確な分子機序に基づいた分子標的治療に直結した新規の診断カテゴリーの創設へと再編成することである。これまで難治性炎症疾患などは、症状を点数化した臨床診断や、形態学的な病理診断に基づいて行われており、診断と治療効果が直結しないことや、確定診断に至らず治療に難渋することも少なくない。そこで、正確な分子機序に基づいた診断と疾患の再編成が必要である。上述の研究成果で『インフラマソーム病』を定義することにより、分子標的に基づいた疾患の再編成が進むものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is that the definition of new diagnostic categories based on molecular mechanism of the diseases. We constructed inflammasomes in a cell-free system using a wheat germ cell-free protein synthesis system. We also prepared amyloid which characterized by Alzheimer's disease and amylin which characterized by type 2 diabetes. We demonstrated that amyloid oligomers deposited in the brain in Alzheimer's disease directly induce the binding of NLRP3 to ASC, which is the first step in NLRP3 inflammasome formation. In order to prove that all these diseases are inflammasome diseases, we constructed antibodies against cell-free inflammasome complexes.

研究分野：人体病理学

キーワード：インフラマソーム病 コンパニオン診断

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、症状や病理形態に基づいた、治療標的と直結しない難病診断を、正確な分子機序に基づいた分子標的治療に直結した新規の診断カテゴリーへと再編成するために、まず『インフラマソーム病』を定義することである。

応募者は、1999年に細胞内の病原体や代謝産物を認識して周囲に炎症を起こすインフラマソームを発見した。以来、インフラマソームの関わる難病の病態の分子メカニズムの解明と、病理医として難治性炎症疾患や神経変性疾患の病理診断を行ってきた。そして、診断が治療効果に直接結びつくことが望ましいと考えてきた。

しかしながら、難治性炎症疾患や神経変性疾患の実際の診断は、症状を点数化した臨床診断や、形態学的な病理診断に基づいて行われており、診断と治療効果が直結しないことや、確定診断に至らず治療に難渋することも少なくない。そこで、正確な分子機序に基づいた診断と疾患の再編成が必要と考えるに至った。

2. 研究の目的

インフラマソームの活性化が疾患の本態であることがわかれば、活性化したインフラマソームを標的とした治療が可能になるので、多くの難病のなかから『インフラマソーム病』を独立させ、難病全体の疾患カテゴリーの再編成に発展させたい。そこで、以下の研究計画で、上記の目的を達成する。

3. 研究の方法

平成 29 年度：

1. 『インフラマソーム病』を定義するためのプローブを作成する。

1) 無細胞タンパク質再構成系による無細胞インフラマソームの作成とアルツハイマー病のアミロイドβや2型糖尿病のアミリンなどのアミロイドとの複合体作成

2) 無細胞インフラマソームを使ったモノクローナル抗体(プローブ)の作成

3) モノクローナル抗体生成ハイブリドーマからの抗体結合部位(Fab)遺伝子の単離

4) バイオパンニングによるインフラマソーム結合ペプチドの同定

5) 臨床検体(血清、滑液、腹水、尿、病理組織など)に対するコンパニオン診断への展開

平成 30 年度：

2. 『インフラマソーム病』に対する分子標的薬を開発する。

1) 無細胞インフラマソーム再構成系によるハイスループットスクリーニング

2) 1)によるリード化合物の同定

3) 難病モデル生物に対する治療実験と毒性試験

4) 特許申請と医師主導型治験への展開

4. 研究成果

無細胞タンパク質再構成系による無細胞インフラマソームの作製とアルツハイマー病のアミロイドβや2型糖尿病のアミリンなどのアミロイドとの複合体を作製した。

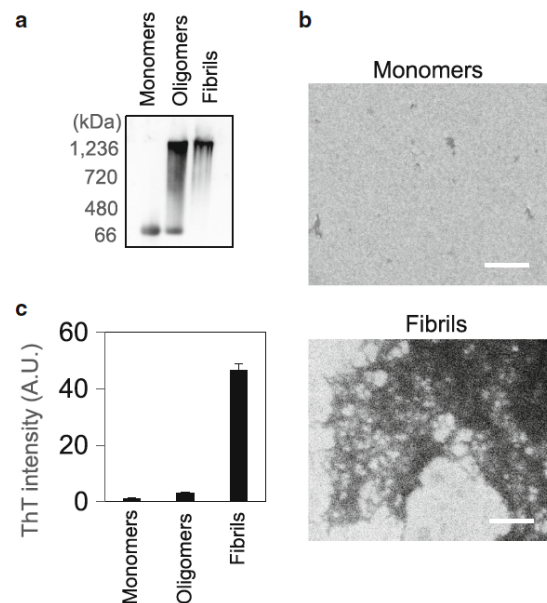


図 1. アミロイドβのオリゴマー化

具体的には AIM2、NLRP3、Pyrin、NLRP1、NLRC4、Nod2 を含む複合体を作製した。アルツハイマー病の原因となっているアミロイドβ (Aβ) や2型糖尿病の原因となっているアミリンとインフラマソームとの複合体については、モノマー、フィブリル、ポリマーに分類し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて無細胞インフラマソーム複合体の再構成

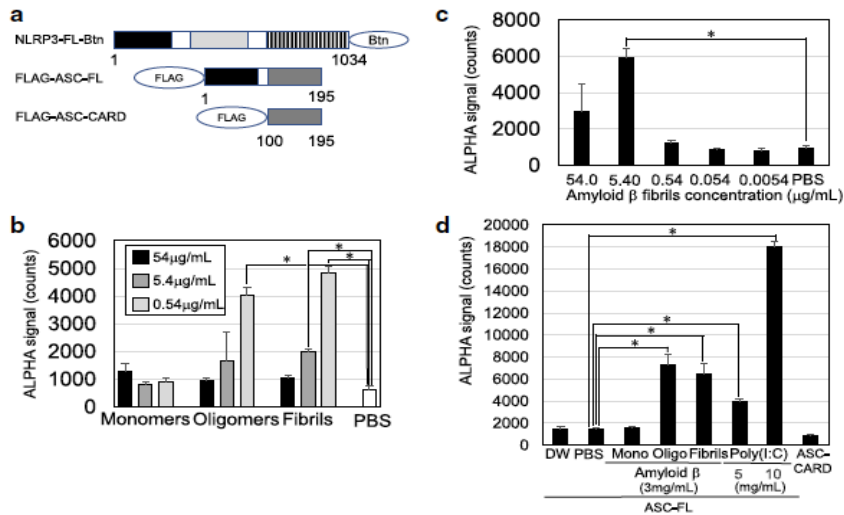


図 2. アミロイドβ のオリゴマー化による NLRP3-ASC-Aβ 複合体の形成

を行った(図 2, 3)。これらの成果について、国内学会で発表を行った(主な学会発表参照)。

次に、無細胞インフラマソーム系と HEK293T 細胞への強制発現系と末梢血単核球のノックダウン系を使い、膵ランゲルハンス島に沈着するアミロイドであるアミリンが直接 NLRP3 の LRR ドメインに結合し、NLRP3 と ASC の結合を誘導することを証明した。また、アルツハイマー病で脳内に沈着するアミロイドβオリゴマーが直接 NLRP3 インフラマソーム形成の第一段階である NLRP3 と ASC の結合を誘導することを証明した(図 3)。

これらの疾患がいずれもインフラマソーム病であることを定義した(図 3)(主な発表論文等⑨)。上記の複合体をマウスに免疫し、それぞれのインフラマソーム複合体を認識する数種類のモノクローナル抗体の作製に成功した。研究計画にはないインフラマソームについても無細胞インフラマソーム複合体と複合体に対する抗体作製を行うことができた。

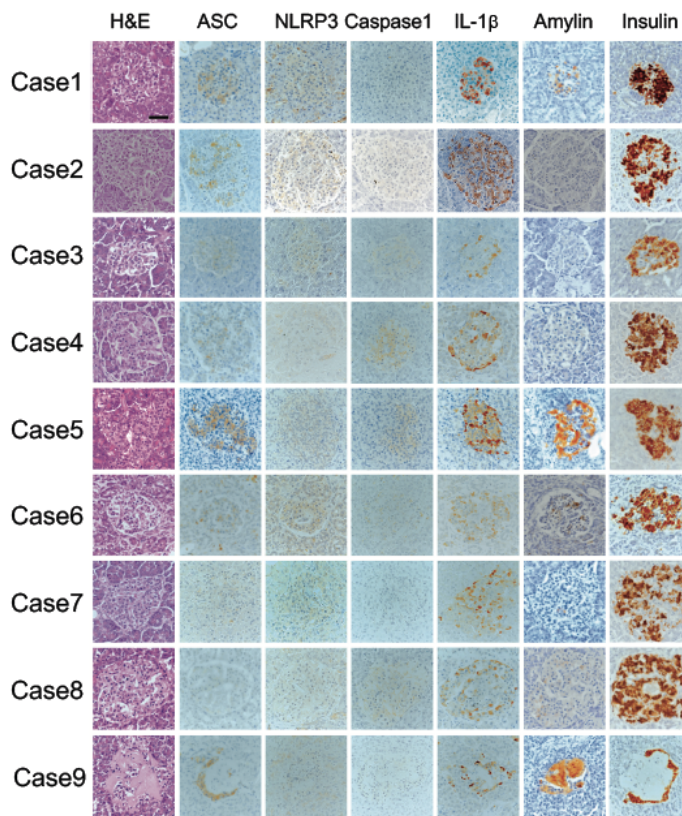


図 3. 2 型糖尿病での膵ランゲルハンス島におけるインフラマソーム構成タンパク質の発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① Takeuchi Y, Shigemura T, Kobayashi N, Nagumo H, Furumoto M, Ogasawara K, Fujii H, Takizawa M, Soga T, Matoba H, Masumoto J, Fukushima K, Migita K, Ojima T, Umeda Y, Agematsu K. Clinical features and new diagnostic criteria for the syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis. *Int J Rheum Dis*. 2019 in press. doi: 10.1111/1756-185X.13610. (査読有)

② Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*. 2019;39:12. doi: 10.1186/s41232-019-0101-5. (査読有)

有)

③ Nakanishi A, Kaneko N, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Zhou W, Kurata M, Yamamoto T, Akbar SMF, Zako T, Masumoto J. Amyloid β directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system. *Inflamm Regen*. 2018;38:27. doi: 10.1186/s41232-018-0085-6. (査読有)

④ Endo Y, Koga T, Ishida M, Fujita Y, Tsuji S, Takatani A, Shimizu T, Sumiyoshi R, Igawa T, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Agematsu K, Yachie A, Masumoto J, Migita K, Kawakami A. Musculoskeletal manifestations occur predominantly in patients with later-onset familial Mediterranean fever: Data from a multicenter, prospective national cohort study in Japan. *Arthritis Res Ther*. 2018;20:257. doi: 10.1186/s13075-018-1738-1. (査読有)

⑤ Morikawa S, Kaneko N, Okumura C, Taguchi H, Kurata M, Yamamoto T, Osawa H, Nakanishi A, Zako T, Masumoto J. IAPP/amylin deposition, which is correlated with expressions of ASC and IL-1 β in β -cells of Langerhans' islets, directly initiates NLRP3 inflammasome activation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018;32:2058738418788749. doi: 10.1177/2058738418788749. (査読有)

⑥ Hachiya A, Kobayashi N, Matsuzaki S, Takeuchi Y, Akazawa Y, Shigemura T, Motoki N, Masumoto J, Agematsu K. Analysis of biomarker serum levels in IVIG and infliximab refractory Kawasaki disease patients. *Clin Rheumatol*. 2018;37(7):1937-1943. doi: 10.1007/s10067-017-3952-7. (査読有)

⑦ Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Fukui S, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Yoshiura KI, Eguchi K, Kawakami A. MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase γ pathway. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(4):718-726. doi: 10.1093/rheumatology/kex451. (査読有)

⑧ Kaneko N, Iwasaki T, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Nakano N, Kurata M, Masumoto J. Applications of reconstituted inflammasomes in a cell-free system to drug discovery and elucidation of the pathogenesis of autoinflammatory diseases. *Inflamm Regen*. 2017;37:9. doi: 10.1186/s41232-017-0040-y. (査読有)

⑨ Takeuchi Y, Shigemura T, Kobayashi N, Kaneko N, Iwasaki T, Minami K, Kobayashi K, Masumoto J, Agematsu K. Early diagnosis of early-onset sarcoidosis: a case report with functional analysis and review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2017;36(5):1189-1196. doi: 10.1007/s10067-017-3544-6. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① 金子直恵、中西文香、座古保、増本純也、アミロイド A β の重合化は試験管内無細胞インフラマソームの形成を促進する、第 39 回日本炎症・再生医学会、2018 年

② 中西文香、金子直恵、座古保、増本純也、A β のアミロイド凝集体による NLRP3 インフラマソームの活性化、第 41 回分子生物学会年会、2018 年

③ 和田有希子、金子直恵、増本純也、インフラマソーム活性化メカニズム解説のための擬人化(キャラクター化)を用いた漫画(マンガ)によるアウトリーチ活動の試み、第 41 回分子生物学会年会、2018 年。

④ Nakano N, Kaneko N, Kurata N, Yamamoto T, Urano T, Koga T, Kawakami A, Yachie A, Agematsu K, Migita K, Yoshiura K, Ishii E, Masumoto J. European Society for Immunodeficiencies 2018 (国際学会) 2018 年

⑤ 増本純也、金子直恵、伊藤有紀、山本敏弘、倉田美恵、中野直子、森川紳之祐、周薇、竹田浩之、澤崎達也、無細胞タンパク質複合体再構成系による自己炎症疾患の病態解明と特異的分子標的治療薬探索、第 1 回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会(招待講演) 2018 年。

⑥ 増本純也、金子直恵、伊藤有紀、森川紳之祐、山本敏弘、倉田美恵、無細胞系による NLRP3 イ

インフラソームと直接相互作用する物質の探索、第12回臨床ストレス応答学会大会、2017年。

⑦ 増本純也、金子直恵、伊藤有紀、無細胞系によるNLRP3と直接相互作用する内因性物質の同定、第38回日本炎症・再生医学会、2017年。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

名称：「無細胞PYRINインフラマソーム/NOD2ノドソーム再構成創薬技術」

発明者：増本純也、金子直恵、岩崎智之、澤崎達也、竹田浩之

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：特願2018-070098 特開2018-173409

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：「無細胞NLR C4インフラマソーム阻害剤探索システムと無細胞NLR C4インフラマソームを標的とする低分子化合物」

発明者：増本純也、金子直恵、澤崎達也、竹田浩之

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：特願2018-070098 特開2018-173410

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：「インフラマソームを標的とする低分子化合物」

発明者：増本純也、金子直恵、澤崎達也、竹田浩之

権利者：国立大学法人愛媛大学

種類：特許

番号：特願2017-185085 特開2018-172360

出願年：2017

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.pros.ehime-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：座古 保

ローマ字氏名：(Zako tamotsu)

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：理工学研究科(理学系)

職名：教授

研究者番号(8桁)：50399440

研究分担者氏名：大澤 春彦

ローマ字氏名：(Osawa haruhiko)

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：90294800

(2) 研究協力者：

研究協力者氏名：金子 直恵

ローマ字氏名：(Kaneke naoe)

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：医学系研究科