

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008 年度
 課題番号：19591303
 研究課題名（和文）細胞内微生物認識受容体クライオピリンの活性化によって誘導される細胞死の解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of cell death induced by the activation of intracellular pattern recognition receptor, cryopyrin
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：神戸 直智（KAMBE, Naotomo）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：5033525

研究成果の概要：

NLRP3 の活性化によってネクローシス様の細胞死が起こる機序を明らかにするため、NLRP3 の PYD ドメイン、下流分子である ASC の全長およびその CARD あるいは PYD ドメインを、GFP と FKBP とのキメラ蛋白質としてウイルスベクターにクローニングした。CAPS において肥満細胞が IL-1 β を産生することを同定した上で、肥満細胞株 MC/9 に導入し、FKBP を介して特徴的な細胞死を誘導できる系を樹立した。この結果、細胞死が誘導された際にどのような分子が関わっているのかを検討することが可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚感染症，免疫学

1. 研究開始当初の背景

クライオピリン（cryopyrin）は、家族性寒冷蕁麻疹として知られる familial cold autoinflammatory syndrome（FCAS, MIM #120100）および寒冷刺激によって誘発される蕁麻疹，アミロイドーシス，感音性難聴を 3 主徴とする Muckle-Wells 症候群（MWS, MIM #191900）の家系解析から，その原因遺伝子として同定され（Hoffman HM, et al. Nat Genet 2001），今日ではその分子構造から NLRP3 の名称での

統一が提唱される。その後，生後数日以内に発症する蕁麻疹、中枢神経病変、関節症状を 3 主徴として多彩な炎症症状を呈する CINCA 症候群（chronic infantile neurological cutaneous articular syndrome, MIM #607115）の原因遺伝子でもあることが明らかにされている（Feldmann J, et al. Am J Hum Genet 2002）。

我々はブドウ膜炎、関節炎、発疹を 3 主徴とする若年発症サルコイドーシス（MIM #609464）の本邦報告例の集積と世界に先駆

けてのその原因遺伝子の同定(Kanazawa N, et al. Blood 2005), および NLRP3 の変異をモザイクとして持つ CINCA 症候群の世界第 1 例目の報告(Saito M, et al. Arthritis Rheum 2005) などを通じて, これら疾患群が属する自己炎症性疾患(autoinflammatory diseases) に興味を持ち, 疾患の解析とメカニズムの解明に取り組んでいる。自己炎症性疾患は, 自己免疫疾患が自己抗体の存在や自己反応性 T 細胞の関与から獲得免疫系の異常として捉えられるのに対して, 今日「免疫」というシステム全体に占めるその重要性が再認識されつつある自然免疫系の異常に基づく疾患群と考えられ(McDermott MF, et al. Cell 1999), 国内外での注目を集めつつある(Saito M, et al. Arthritis Rheum 2006)。臨床症状としては乳児期発症周期熱症候群として捉えられるものの発症頻度はいずれも多くなく, このため罹患患者の集積を含め本症の研究に携わる研究機関は, 現時点では, 我々の施設を含めて世界中にまだ多くはない。

NLRP3 は, 920 アミノ酸からなる 105.7kD の蛋白であり, N 末端に家族性地中海熱の原因遺伝子 pyrin と同様の構造を有し蛋白-蛋白相互作用に関与する pyrin ドメイン(PYD) をもつ。C 末端に位置する leucine-rich repeats (LRRs) は, 自然免疫に関わる Toll 様受容体(TLR) にも認められ, 微生物特有の分子パターン認識に関与すると考えられている。中央部には NTPase の NACHT ファミリーに属する nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) が含まれ, 自己重合に関与する。これらは, 植物においては耐病遺伝子(resistance gene) として知られる細胞内パターン認識受容体に共通のものであり, 今日まで CATERPILLAR, NOD, NALP などの様々な命名と分類が提唱されてきたが(Inohara N, Nunez G. Nat Rev Immunol 2003), 細胞外でのパターン認識受容体である TLR にちなんで, NLR (NOD-LRRs containing) という名前での再整理が試みられつつある。

NLRP3 の機能として, 炎症性サイトカインである IL-1 β のプロセッシングに携わることが知られる。NLRP3 はリガンドを認識すると立体構造が変化し, NOD を介した自己重合が可能となる。さらに, 自らの PYD を介して, アダプター蛋白の ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) の PYD と会合し, ASC の CARD (caspase recruitment domain) を介してさらに procaspase-1 の CARD と会合することで, inflammasome と呼ばれる蛋白複合体が形成される(Martinon F, et al. Mol Cell 2002)。その結果, 近接化された procaspase-1 が互いにこれを切断し活性型の caspase-1 を切り出し, proIL-1 β を活性型 IL-1 β へと変換する。最近, inflammasome の会合を

惹起し IL-1 β 分泌を促進する分子として, 細菌由来の毒素や RNA, 尿酸結晶などが報告された(Kanneganti TD, et al. Nature 2006; Martinon F, et al. Nature 2006; Mariathasan S, et al. Nature 2006)。NLRP3 の機能はこれらを認識し, IL-1 β の分泌調整を介して炎症を制御することにあると考えられる(Lich JD, et al. Immunity 2006)。実際に MWS や CINCA 症候群では, 末梢血からの自発的な IL-1 β の産生が報告されるとともに, IL-1 β の阻害薬 anakinra が奏功する(Goldbach-Mansky R, et al. N Eng J Med 2006)。

さらに, 最近我々は, NLRP3 の疾患関連変異体をヒト単球細胞株である THP-1 へと遺伝子導入した際に, ネクローシス様の急速な細胞死が誘導されることを確認した(Fujisawa A, et al. Blood 2007)。その細胞死は cathepsin B の特異的阻害剤である CA-074-Me によって効果的に抑制されることから, NLRP3 の活性化が, 未だ明らかにされていない機序によって cathepsin B 依存性にネクローシス様の細胞死を誘導することで生体防御に関与していることを示唆している。

2. 研究の目的

NLRP3 の活性化によって誘導される細胞死の機序を明らかにするため, 下流分子である ASC に会合する蛋白をスクリーニングするとともに, 動員されるカスケードを明らかにする。

3. 研究の方法

NLRP3 の疾患関連変異体(Y570C) を遺伝子導入した際に, THP-1 細胞で確認されるネクローシス様の細胞死のカスケードを解明するため, NLRP3 変異体の PYD を削ったプラスミドを作成して検討を行ったところ, 細胞死は確認されなかった。一方, NLRP3 の PYD に GFP とともに FK-binding protein (FKBPx3) をつないだキメラ蛋白を作成し, 遺伝子導入後に AP20187 を用いて FKBP を強制重合すると, ネクローシス様の細胞死が誘導され, これは cathepsin B 阻害剤である CA-074-Me によって抑制された。さらに, 下流分子の ASC の PYD あるいは CARD にそれぞれ FKBPx3 をつないだプラスミドを作成し同様に検討すると, cathepsin B 依存性のネクローシス様の細胞死が誘導された。このことから, NLRP3 によって誘導される細胞死には, ASC 依存性のカスケードが示唆され, ASC に会合する蛋白質をスクリーニングするために, TAPtag (Tandem Affinity

Purification tag) 法を用いた。

すなわち, ASC の CARD あるいは PYD を TAPtag ベクターにクローニングした後, これを HEK293 細胞に遺伝子導入して発現させた細胞抽出液と THP-1 細胞からの細胞抽出液とを混合し、蛋白の複合体を形成させ、これを TAPtag に発現した protain A (Prot-A) と IgG との会合を利用して IgG agarose beads で免疫沈降する(Step #1)。続いて、TEV protease で処理することで TAPtag から Prot-A を取り除いて会合した蛋白を上清として回収し (Step #2) 続いて calmodulin binding protein (CBP) を利用してカルシウムの存在下で calmodulin beads で免疫沈降を行う (Step #3) この様に免疫沈降を 2 回連続して行うことによって、それぞれのドメインに会合する蛋白質を網羅的に抽出できる (Rigaut et al. Nature Biotech 1999) 抽出した蛋白質は、SDS-PAGE の後、得られたバンドを質量分析にて同定する。

4. 研究成果

ASC に会合する蛋白質を TAPtag 法にてスクリーニングした。すなわち, ASC を構成するドメインである CARD あるいは PYD を TAPtag ベクターにクローニングした後 HEK293 細胞に導入し、遺伝子を発現させた細胞抽出液と細胞死が誘導される THP-1 細胞からの細胞抽出液とを混合して蛋白の複合体を形成させ、これを TAPtag に発現した protain A と IgG との会合を利用して IgG agarose beads で免疫沈降した。続いて、TEV protease で処理することで Prot-A を取り除き、会合した蛋白を上清として回収、続いて calmodulin binding protein (CBP) を利用してカルシウムの存在下で calmodulin beads で免疫沈降を行った。しかしながら、残念ながら、この操作の後に蛋白質は抽出できなかった。

ヒト NLRP3 の疾患変異体でのアミノ酸置換部位はマウス Nlrp3 において保存されていることを確認した上で、マウス Nlrp3 をクローニングした。作成したマウス Nlrp3 疾患変異体は、ヒトでの疾患変異体同様に、NF- κ B の恒常的な転写亢進を誘導することを確認した。

また、蕁麻疹を表現形とする CAPS 患者において、活性化 IL-1 β を恒常的に発現する細胞が肥満細胞であることを免疫組織染色にて確認し、さらにマウス骨髄由来培養肥満細胞を用いて、肥満細胞が Nlrp3 の活性化を介して IL-1 β を産生することを確認した。

その上で、NLRP3 の PYD ドメイン、下流

分子である ASC の全長および ASC を構成する CARD あるいは PYD ドメインを、移入した遺伝子の発現を確認するための GFP, および発現した蛋白質を活性化するために薬剤共存下に強制重合化させるための FKBP とのキメラ蛋白質としてウイルスベクターにクローニングした。作成した遺伝子をマウス肥満細胞株である MC/9 細胞に導入した結果、FKBP を介して特徴的な細胞死を誘導することができる細胞株を樹立することができた。

このシステムを利用することで、特徴的な細胞死が誘導された際にどのような分子が関わっているのか、またこの経路が cathepsin B 依存性であるかについて詳細に検討することが可能となった。

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. Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, Nunez G, Matsue H. (2009) Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J Exp Med.* (in press). 査読あり
2. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T. (2009) Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis Rheum.* 60: 242-250. 査読あり
3. Saito M, Nishikomori R, Kambe N, Fujisawa A, Tanizaki H, Takeichi K, Imagawa T, Iehara T, Takada H, Matsubayashi T, Tanaka H, Kawashima H, Kawakami K, Kagami S, Okafuji I, Yoshioka T, Adachi S, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T. (2008) Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *Blood.* 111: 2132-41. 査読あり
4. Fujisawa A, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Tanizaki H, Kanazawa N, Adachi S, Heike T, Sagara J, Suda T, Nakahata T, Miyachi Y. (2007) Disease-associated mutations in CIAS1

induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. *Blood*. 109: 2903-11. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1. 神戸直智 (2009) NLRP3-inflammasome を介した IL-1 β 産生とヒスタミン非依存性蕁麻疹 (第18回東京免疫フォーラム 3月12日, 東京)
2. 中村悠美, 神戸直智, 松江弘之 (2008) 自己炎症性疾患において肥満細胞は NLRP3 inflammasome を介して好中球遊走と血管透過性を制御する (第38回日本免疫学会総会, 12月1-3日, 京都)
3. 佐藤貴史, 中村悠美, 神戸直智, 松江弘之 (2008) NLRP3 の活性化によって誘導される pyronecrosis の分子学的機序 (第15回分子皮膚科学フォーラム, 11月14-15日, 京都)
4. 中村悠美, 神戸直智, 松江弘之 (2008) 肥満細胞に発現する NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 β の産生は生体内で好中球主体の炎症と血管透過性の亢進を誘導する (第15回分子皮膚科学フォーラム, 11月14-15日, 京都)
5. Nakamura Y, Kambe N, Matsue H. (2008) Cryopyrin-associated IL-1 beta secretion in mast cells and a role played by mast cells in autoinflammatory disorders. (**International Investigative Dermatology 2008**, May 14-17, Kyoto, Japan)
6. Kambe N, Nakamura Y, Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Matsue H. (2008) A case of early-onset sarcoidosis who showed spontaneous regression of his clinical manifestations but inherited skin eruption to his baby: What should we call this systemic inflammatory granulomatosis associated with NOD2 mutation? (V **International Congress on Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases**, April 4-8, Rome, Italy)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸直智 (KAMBE Naotomo)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号 50335254

(2) 研究分担者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI Ryuta)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 70359800

(3) 連携研究者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI Ryuta)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 70359800