

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590329

研究課題名（和文） 皮膚における ASC および PYNOD の機能の解明

研究課題名（英文） Analyses of function of ASC and PYNOD in skin

研究代表者

今村 龍（IMAMURA RYU）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10311680

研究成果の概要（和文）：PYNOD(NLRP10)は、我々が発見した新規の細胞内分子であるが、現在までのところ、個体レベルでの機能は全く不明である。我々は PYNOD の生理的機能に迫るため PYNOD 欠損マウスの樹立に成功した。PYNOD 欠損マウスから調整したケラチノサイトでは UVB 刺激による TNF α の産生が低下していた。さらに UVB 照射後の表皮における TNF α の産生についても PYNOD 欠損マウスで減弱していた。また UVB 照射後の血清中の IFN γ の値が PYNOD 欠損マウスで高値を示すことを発見した。以上の結果から、PYNOD は皮膚において UVB 刺激後におこる TNF α の産生に関して重要な分子であることが明らかとなり、局所でおこる炎症反応において重要な分子と考えられる。

研究成果の概要（英文）：PYNOD(Nlrp10) is one of the NLR family member we recently identified, however, the physiological function of PYNOD is still totally unclear. To investigate physiological/pathological function of PYNOD, we succeeded to establish PYNOD deficient mice. We found that keratinocytes from PYNOD deficient mice show lower potential to produce TNF α after UVB treatment than that of wild-type mice. We further found TNF α production in skin after UVB treatment also decreased in PYNOD deficient mice. Moreover, we discovered IFN γ production in serum after UVB treatment is higher in PYNOD deficient mice. These results suggest that PYNOD plays important roles to produce TNF α production after UVB treatment in skin and contributes local inflammatory responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：自然免疫、NLR ファミリー蛋白、皮膚、PYNOD

1. 研究開始当初の背景

(1) Toll-like receptor (TLR) は細胞

膜に存在し、病原微生物を監視する自然免疫システムであるが、最近、細胞内部にも

病原体の感染監視システムが存在することが明らかになった。細胞質蛋白質 ASC はカスパーゼ-1 活性化に必要なアダプター蛋白であり、マクロファージなどにおいて、この細胞内部の感染監視システムで重要な役割を果たすことが明らかになってきている (Nature, 430, 2004)。カスパーゼ-1 は別名インターロイキン変換酵素と呼ばれ、IL-1 β と IL-18 前駆体のプロセッシング酵素として免疫学上重要な位置を占めている。一方、PYNOD (Nlrp 10) は、我々がデータベース解析を用いて発見した新規の細胞内分子であり、構造上の類似性からこの感染監視システムで働くと考えられる分子である (Int. Immunol., 16, 2004)。

(2) さらに癌研究の方面から ASC 遺伝子が、がん特異的なメチル化のターゲットであることが報告された (Cancer Res., 60, 2000)。実際に多数の癌で ASC 遺伝子のメチル化がおこり、その発現抑制が認められるという情報が蓄積しつつある。ASC はアポトーシスを促進する機能を持つが、詳細なメカニズムについては現在でも不明である。つまり ASC は炎症とアポトーシスに関係する分子であり、ASC の発現低下は、がん細胞の増殖に対して有利に働くことが予想される。加えて ASC 遺伝子の発現が、がん抑制遺伝子の代表である p53 によって制御を受けているという報告がなされた (Nat. Cell. Biol., 6, 2004)。これらが事実とすれば ASC はがん抑制遺伝子としての機能を持つということになる。

(3) 我々はこれまでに ASC による転写因子活性化やアポトーシス誘導能の分子機構を解析してきた (Oncogene 26, 2007, J. Biol. Chem., 280, 2005)。また新規に同定した PYNOD が、ASC と相互作用し、ASC を介するカスパーゼ-1 や転写因子 NF- κ B の活性化およびアポトーシスの誘導を抑制することを明らかにしてきた (Int. Immunol., 16, 2004)。

PYNOD の個体レベルでの役割は現在のところ不明であるが、ASC の生体内インヒビターである可能性がある。さらに ASC や PYNOD のモノクローナル抗体を作製し、生体内での発現を調べたところ、興味深いことに、ASC や PYNOD が表皮や正常ケラチノサイトで非常に強く発現していることが分かった。

(4) 皮膚は粘膜とともに直接外界と接し、多彩な免疫機構によって生体を防御している免疫臓器であると考えられる。これまでに明らかにされてきた ASC の機能を考えると ASC が、皮膚において病原微生物を監視する自然免疫システム的一端を担っていたとしても決して不思議ではない。そこで我々は、さらに ASC の持つがん抑制遺伝子としての機能を考えあわせ、ASC やその阻害因子 PYNOD の皮膚における機能を解析することで、アレルギーや癌などの皮膚疾患の新たな一面を明らかにできるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

ASC や PYNOD はマクロファージなどの免疫担当細胞で感染監視・防御システムにおいて働いているとされる細胞質蛋白である。我々は、両蛋白が直接外界と接している臓器である皮膚にも高発現していることを見出した。本研究では、皮膚における ASC や PYNOD の生理機能を解明するために、細胞レベル (ケラチノサイト) あるいは個体レベル (マウス) での解析を試みる。

(1) ASC や PYNOD をノックダウンあるいはノックアウトしたケラチノサイトを樹立し、感染、UV 照射、アレルギー物質添加などの実験を行う。刺激後の細胞レベルでの応答を炎症性サイトカインの産生、転写因子の活性化、アポトーシスの程度などの点から比較検討することにより、ASC や PYNOD

がこれらの応答に関与しているかどうか明らかにする。さらに RNAi や阻害剤を用いて、これらの応答に関与するシグナル伝達分子の候補の検索を行う。

(2) ASC 欠損マウス、PYNOD トランスジェニックマウスおよび野生型マウスに対して、打ち抜き損傷、UV 照射、薬剤塗布などの刺激を加え、炎症や発がん過程における個体レベルでの皮膚反応を、治癒経過や組織学的変化を中心に比較検討し、ASC や PYNOD と皮膚疾患との関連の有無を明らかにする。

(3) 今回の実験で用いる様々な刺激に対して ASC および PYNOD の発現変化を検討する。

3. 研究の方法

1) ケラチノサイトを用いた細胞レベルでの解析 (ASC や PYNOD が関与する応答の検索)

ヒト正常ケラチノサイトやケラチノサイト細胞株 (HaCaT cell) を用いて ASC および PYNOD 遺伝子のノックダウンを行う。siRNA や microRNA を用いた一過性のノックダウン実験を試みるとともに、レンチウイルスベクターによる microRNA の恒常発現株の作製を行い、ヒトのケラチノサイト細胞において ASC や PYNOD の発現抑制を確立する。

我々は全身性に PYNOD を高発現するトランスジェニックマウスを系統樹立しており、このマウスのマクロファージでは ASC 欠損マウス同様、IL-1 β の産生が阻害されている結果を得ている。このマウスでは皮膚においても PYNOD が ASC 阻害因子として働く可能性が高い。また我々は ASC 欠損マウスを保持しており、野生型、PYNOD-Tg、ASC 欠損マウスからそれぞれケラチノサイトを直接分離培養する。

これらのヒトあるいはマウスのケラチノサイト細胞を用いて様々な刺激に対する応答を比較検討する。具体的には、自然

免疫に関わる刺激 [病原体に特殊な分子構造を含む各種の PAMPs 刺激、またはサルモネラ菌 (*S. typhimurium*) および黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の感染]、UV 照射刺激、あるいはトリニトロクロロベンゼンといった薬剤による刺激などを加え、刺激後の応答における ASC や PYNOD の関与を以下の点から検討する。括弧内は実験方法を示す。

A. IL-1 β , TNF α , IL-6 などの炎症性サイトカイン産生 (ELISA 法、RT-PCR 法)

B. IL-1 β 前駆体の成熟型への変換 (培養上清を用いた免疫沈降法)

C. 細胞死の程度 (LDH 放出やアネキシン V 染色による解析)

D. カスパーゼ 1 の活性化 (活性化断片を認識するウエスタンブロット法)

E. MAP キナーゼの活性化 (リン酸化型を認識するウエスタンブロット法)

(2) 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの解析 (ASC や PYNOD と疾患との関連) 野生型、PYNOD-Tg および ASC 欠損マウスの皮膚に対して、打ち抜き損傷、UV 照射、トリニトロクロロベンゼン塗布といった刺激を与え、その後の反応 (治癒経過、組織学的変化、炎症細胞の浸潤の程度など) を経過観察する。これらは実際の損傷治癒や日焼けあるいは過敏性皮膚炎などの実験モデルであり ASC や PYNOD と皮膚疾患の関係を検証できる。

(3) ASC および PYNOD の発現変化の検討 ASC に対して PYNOD の発現制御に関してこれまで全く情報がなかったが、最近になって角膜の上皮細胞で UVB 照射によって PYNOD の発現が上昇することが報告された (Molecular Vision, 14, 2008)。さらに PYNOD の発現が皮膚において p53 の関連遺伝子である p63 によって制御を受ける可能性が示唆された (NCBI データベース)。これらのことから皮膚において PYNOD の発現が刺激依存的に変化する可能性がある。そこで前述の実験計画で用いた刺激に関して、ケラチノサイトやマ

ウスの皮膚における ASC および PYNOD の発現変化をウエスタンブロットイングや免疫組織染色によって検討する。

4. 研究成果

皮膚は粘膜とともに直接外界と接し、多彩な免疫機構によって生体を防御している免疫臓器であると考えられる。我々は皮膚における自然免疫のシステムに着目し解析を始めた。この領域における研究の世界的な動向としては、ノーベル医学・生理学賞の対象となった Toll-like receptor (TLR) のみに焦点が当てられて進められてきた。TLR は細胞膜に存在し、病原微生物を監視する自然免疫システムであるが、最近、細胞内部にも病原体の感染監視システムが存在することが明らかになった。そこで我々は、皮膚における自然免疫系システム、特に細胞内分子による監視システムを実験的に検証するために、ヒトケラチノサイト、マウスケラチノサイトおよびマウス個体を実験材料とし解析を進めた。

(1) ヒトケラチノサイトを用いた研究成果

①ヒト正常ケラチノサイトを用いて、様々な刺激を検討したところ、感染刺激や PAMPs 刺激の中でも、合成核酸である polyIC 刺激によって TNF α 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生や細胞死が強力に誘導されることを見出した。

②細胞質蛋白質 ASC はカスパーゼー 1 活性化に必要なアダプター蛋白であり、マクロファージなどにおいて細胞内の感染監視システムで重要な役割を果たすことが明らかになっている。我々はヒトケラチノサイトにおいても ASC が強く発現していることを発見した。そこで polyIC 刺激後の反応における ASC の役割を検討するために siRNA の一過性導

入による ASC 遺伝子のノックダウン法を確立した。

③このノックダウンにより前述の炎症性サイトカイン産生について、ASC の関与を検討したところ、TNF α および IL-8 の産生は ASC 依存的であるが IL-6 の産生は ASC 非依存的であることを発見した。またこれらのサイトカイン産生は MAP キナーゼ、p38 の阻害剤で強く抑制された。

④これらの炎症性サイトカイン産生は、転写因子 NF- κ B で制御されているが、刺激後 ASC 依存的および非依存的な NF- κ B の活性化がおこっていると考えられ大変興味深い。ASC の下流でどのような制御がおこなわれているのか、今後のさらなる解析が必要である。また ASC の機能を制御することにより炎症反応をコントロールできる可能性も示唆された。

(2) マウスケラチノサイトおよびマウス個体レベルでの研究成果

① 遺伝子改変マウスを用いた実験を行うために、マウス胎児よりプライマリーケラチノサイトを直接分離培養する方法を確立した。野生型マウス由来のケラチノサイトにおいても ASC や PYNOD (NLRP10) が蛋白レベルで非常に強く発現していることを発見した。

②PYNOD は、我々がデータベース解析を用いて発見した新規の細胞内分子であるが、PYNOD の個体レベルでの機能は現在のところ全く不明である。そこで皮膚および全身における PYNOD の生理的機能を検討する目的でノックアウトマウスの作製を行い、その樹立に成功した。

③PYNOD ノックアウトマウスおよび野生型マ

ウスの胎児から調製したプライマリーケラチノサイトについて解析を試みた。マウスケラチノサイトはヒトと異なり感染刺激などで IL-1 β や IL-6 の産生が認められなかった。しかし TNF α については、サルモネラ菌や緑膿菌の感染刺激や UVB 刺激によって産生増強が認められ、この産生増強は転写レベルでおこなっていることを明らかにした。興味深いことに PYNOD 欠損マウスから調整したケラチノサイトでは感染刺激による TNF α の産生は正常であったが、UVB 刺激による TNF α の産生が有為に低下していた。しかし UVB 刺激による JNK や p38 の活性化は PYNOD ノックアウトマウスのケラチノサイトにおいても正常であった。

④さらにマウス個体背部に UVB を照射する実験を行い、表皮をサンプルとして TNF α の産生について RT-PCR および細胞抽出液の ELISA で検討した。In vitro でのケラチノサイトの実験と同様に、PYNOD ノックアウトマウスでは野性型マウスと比較して TNF α の産生増強が減弱していた。また UVB 照射後の血清中の IFN γ の値が PYNOD ノックアウトマウスでは高値を示すことを発見した。

⑤以上の結果から、PYNOD は皮膚において UVB 刺激後におこる TNF α の産生に関して重要な分子であることが明らかとなり、局所でおこる炎症反応において重要な分子と考えられる。また UVB 刺激後におこる全身性の反応にも寄与する可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., et. al. (6名 3番目) Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. C

ancer Immunol. Immunother. 査読有 in press 2012年
DOI: 10.1007/s00262-011-1132-1

2. Motani, K., Kushiyama, H., Imamura, R., et. al. (6名 3番目) Caspase-1 protein induces apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)-mediated necrosis independently of its catalytic activity. J. Biol. Chem. 査読有 286 2011年 3396 3-33972 DOI: 10.1074/jbc.M111.286823

3. Imamura, R. et. al. (9名 1番目) Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in human and mice. J. Immunol. 査読有 184 2010年 5874-5884
DOI: 10.4049/jimmunol.0900779

4. Motani, K., Kawase, K., Imamura, R., et. al. (6名 3番目) Activation of ASC induces apoptosis or necrosis depending on the cell type and causes tumor eradication. Cancer Science 査読有 101 2010年 1822-1827 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01610.x

5. Hasegawa, M., Imamura, R., et. al. (7名 2番目) Mechanism and repertoire of Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain-mediated gene expression. J. Immunol. 査読有 182 2009年 7655-7662
DOI: 10.4049/jimmunol.0800448

[学会発表] (計 11 件)

1. Kinoshita, K., Imamura, R., et. al. NLRP3 mediates NF- κ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. 第34回日本分子生物学会年回 2011年12月14日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

2. Kushiyama, H., Imamura, R., et. al. Trichostatin A induces macrophage IL-1 β production by activating NLRP3 inflammasome. 第40回日本免疫学会総会・学術総会 2011年11月29日 幕張メッセ (千葉)

3. Imamura, R., et. al. Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム 2011年5月26日 石川県立音楽堂 (金沢)

4. Motani, K., Kushiya, H., Imamura, R., et. al. Caspase-1 induces ASC-mediated necrosis independently of its catalytic activity. 13th International TNF Conference 2011年5月18日 Awaji Yumebutai International Conference Center (兵庫)

5. Motani, K., Imamura, R., et. al. Molecular switch for the ASC-mediated apoptosis and necrosis. 14th International Congress of Immunology 2010年8月26日神戸コンベンションセンターコンプレックス (兵庫)

6. Imamura, R., et. al. Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 14th International Congress of Immunology 2010年8月26日神戸コンベンションセンターコンプレックス (兵庫)

7. Harashima, N., Imamura, R., et. al. Toll-like receptor 3-ligand induced apoptotic and autophagic cell death and growth arrest in human prostate cancer cells. 14th International Congress of Immunology 2010年8月25日神戸コンベンションセンターコンプレックス (兵庫)

8. Motani, K., Kawase, K., Imamura, R., et. al. Activation of ASC induces apoptotic or necrotic cell death depending on the cell type and causes tumor rejection. 第5回研究所国際ネットワークシンポジウム2010年6月24日 KKRホテル金沢(石川)

9. 木下健、今村龍、須田貴司 The role for NLRP3 in the TNF- α production by macrophages第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日パシフィコ横浜 (神奈川)

10. 今村龍、他4名 ASC:細胞死と炎症シグナル伝達の接点 第82回日本生化学会大会 2009年10月21日神戸国際会議場 (兵庫)

11. Motani, K., Imamura, R., et al ASC mediates apoptosis or necrosis depending on the cell type. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Cell Death 2009年10月7日 Cold Spring Harbor N.Y. (米国)

[その他]

ホームページ等

当研究室ホームページアドレス

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~cdmtd/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 龍 (IMAMURA RYU)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10311680

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし