

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590327

研究課題名(和文)自然免疫ストレスセンサーNLRPの新機能とその分子機構解明

研究課題名(英文)Identification of a novel role for innate immune sensor NLRP

研究代表者

木下 健(KINOSHITA, TAKESHI)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：20311681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫系のストレスセンサー分子であるNLRP3は多様な細胞ストレスに応じて誘導される炎症性サイトカイン分泌に中心的な役割を担っている。本研究ではNLRP3が非感染性ストレスを感知したヒトマクロファージ細胞株の炎症誘導過程においてTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ のmRNA発現誘導に寄与している事を明らかにした。更にこのNLRP3による各種遺伝子発現誘導能が、がん細胞においてはがんの悪性を促す各種遺伝子の発現誘導にも関与している可能性を見いだした。これらの結果より、自然免疫ストレスセンサーNLRP3の遺伝子発現誘導能は多様な組織において様々な未知の役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLR) family member NLRP3 is a central regulator of innate immunity. We recently found that NLRP3 mediates NF-kappaB activation and cytokine transcription in human monocytic cell line THP-1 following microbial infection. In this study, we examined the effect of NLRP3 knockdown on cytokine induction following sterile stimulation to clarify the physiological relevance of this function. NLRP3 knockdown reduced cytokine induction in THP-1 and human monocytes following sterile stimulation. Next, we examined the role of NLRP3 in tumor cell lines. NLRP3 knockdown reduced the constitutive expression of IL-1beta in these tumor cell lines. Interestingly, the expression of TGF-beta, IL-6, and matrix metalloproteinase were reduced in knockdown cells. These data suggest that NLRP3 not only mediates cytokine transcription for innate immunity but also contributes tumor progression through the induction of tumor-related gene expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 医科学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

自然免疫系は病原体感染のみならず、がん、アレルギー、遺伝性炎症疾患など種々の疾患に伴う様々な“非感染性”細胞ストレスを感知して炎症反応を誘起している。nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR)は自然免疫系を構成している細胞質の病原体センサー分子群であるが、ファミリー分子NLRP3は細胞ストレス時にはストレスセンサーとして機能して活性化され、炎症性サイトカイン分泌を誘導する。これまでにアスベスト、痛風に由来する尿酸結晶、コレステロール、アミロイドβペプチド等による細胞ストレスを感知してIL-1β分泌を誘導することが報告されている。NLRP3は多様な細胞ストレスに応じて誘導される炎症性サイトカイン分泌に中心的な役割を担っているストレスセンサー分子である。

代表的な炎症性サイトカインであるIL-1βは2段階の発現制御下にあり、1、転写因子NF-κB活性化によるIL-1β前駆体の産生・蓄積、2、caspase-1による前駆体から活性型へのプロセッシング、を経て活性型IL-1βが細胞外に放出される。NLRP3はcaspase-1を活性化してIL-1β前駆体プロセッシングに寄与していることがノックアウトマウスの病原体感染モデルを用いた解析で明らかにされてきた。しかし、病原体感染の場合には細胞膜上に発現している病原体センサー分子群Toll-like receptor (TLR)ファミリーの活性化が1段階目のNF-κB活性化とIL-1β前駆体産生蓄積を担うのに対し、細胞ストレスに起因する炎症誘導の場合、TLR経路とは別のNF-κB活性化誘導

機構が必要となる。しかし、具体的な機構は未解明であった。

### 2. 研究の目的

我々は、バクテリア感染ヒトマクロファージ細胞株の解析により、NLRP3がTLR経路とは独立にNF-κB活性化を誘導していること、NF-κB活性化を介してIL-1β前駆体、TNF-α、IL-8産生を誘導していることを明らかにした。これらから、マクロファージNLRP3が細胞ストレスに起因する炎症誘導の場合にもNF-κB活性化、サイトカイン産生を誘導していることが強く示唆された。本研究では病原体感染を伴わない各種炎症誘導過程にNLRP3-NF-κB活性化経路が寄与していることを示すことで、その生理的な重要性を証明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 病原体感染を伴わない細胞ストレスに起因する炎症誘導系での検証

NLRP3-NF-κB経路が尿酸結晶、アジュバント刺激等で誘導されるIL-1β産生においてもIL-1β前駆体産生に寄与している事を示すため、ヒトマクロファージ様細胞株THP-1のNLRP3発現をsiRNAによる一過性のノックダウンおよびshRNA安定発現株の樹立によってノックダウンした。この細胞を尿酸結晶、アジュバント、バクテリアトキシンで刺激し、IL-1β前駆体産生・蓄積をmRNAレベル(RT-PCR, 定量PCR法)で調べた。同様の解析を末梢血から単離した単球細胞を用いても行った。

(2) 非免疫細胞におけるNLRP3の役割

NLRP3はがん細胞など多くの非免疫系組織でも発現している。このNLRP3が“非感染性”細胞ストレスに伴う炎症誘導過程においてもNF-κB活性化を誘導している事を明らかに出来ればNLRP3-NF-κB活性化経路の重要性を証明する強い証拠となる。そこでNLRP3, IL-1βを恒常的に発現しているがん細胞株およびIL-1β産生が報告されているがん細胞株にsiRNAを導入ないしshRNA安定発現株を樹立しNLRP3の発現をノックダウンした。この細胞株のIL-1β前駆体の産生をmRNAレベル(RT-PCR, 定量PCR法)で調べた。NLRP3-NF-κB経路が他のサイトカイン、ケモカイン(IL-6, IL-8)、増殖因子(VEGF, bFGF)、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP9, MMP2, MT1-MMP)産生に寄与する可能性についても各遺伝子のmRNAレベルで解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 病原体感染を伴わない細胞ストレスに起因する炎症誘導系での検証

NLRP3 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを作製し、ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 に導入することで NLRP3 発現ノックダウン THP-1 細胞を樹立した。尿酸結晶刺激で誘導される NLRP3 ノックダウン細胞の TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 発現量は、ネガティブコントロール shRNA 発現細胞で誘導される mRNA 量に比べて有意に低下していた。同様の結果は siRNA を用いた一過性の NLRP3 ノックダウンでも確認された。この尿酸結晶刺激により誘導され、NLRP3 ノックダウンで抑制される TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 発現は TLR/IL-1R シグナル経路のアダプター分子 MyD88 のノックダウンによっても、caspase-1 阻害剤 Ac-YVAD-CMK 処理によっても影響を受けなかったことから、産生された IL-1 $\beta$  の autocrine 機構による二次的な産生誘導が含まれる可能性は排除された。

アジュバント刺激に応じた IL-1 $\beta$  mRNA 発現誘導、バクテリアトキシン刺激に応じた TNF- $\alpha$  発現誘導でも同様の結果を得た。また、末梢血から単離した単球細胞に siRNA を導入して NLRP3 をノックダウンすると、アジュバント刺激に応じた IL-1 $\beta$  mRNA 発現誘導が抑制されること、この場合も Ac-YVAD-CMK 処理が IL-1 $\beta$  mRNA 発現誘導に影響を及ぼさないことも確認できた。

以上の結果より、病原体感染を伴わない各種炎症誘導過程においても NLRP3-NF- $\kappa$ B 活性化経路が寄与していることが示された。

(2) 非免疫細胞における NLRP3 の役割  
がん細胞で発現している NLRP3 が IL-1 $\beta$  遺伝子発現誘導に寄与している可能性を調べるため、siRNA, shRNA を用いて各種がん細胞の NLRP3 をノックダウンし IL-1 $\beta$  の発現レベルを調べた。線維肉腫 (HT1080)、胃がん (SH10-TC)、大腸がん (HT29, WiDr) の IL-1 $\beta$  mRNA 発現が NLRP3 ノックダウン細胞において減弱していた。興味深いことに、NLRP3 ノックダウンは HT1080 の TGF- $\beta$ , b-FGF、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) 発現も減少させた。MT1-MMP, TGF- $\beta$ , b-FGF, MMP はがんの悪性化と密接に関わる因子であることから、NLRP3 発現と、がんの悪性化の関連が示唆された。そこで Gen Expression Omnibus 検索によりがん細胞における NLRP3 発現を検索したところ、脳腫瘍において NLRP3 が高発現していることを見だし、グリオーマ細胞株 U87MG の NLRP3 ノックダウン細胞

を作製、各種遺伝子発現を解析した。NLRP3 ノックダウンにより U87MG の TGF- $\beta$ , MT1-MMP の発現が低下すること、MT1-MMP による MMP2 切断活性が減弱すること、*in vitro* マトリゲル浸潤アッセイにおける浸潤能が低下することなどが確認された。

これらの結果より、NLRP3 が、がん細胞においても各種遺伝子の発現誘導に重要な役割を担っていること明らかとなった。更に、NLRP3 が各種因子の発現制御を介してがんの悪性化の過程にも寄与していることが示唆された。

#### 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 1 件)

1. Motani K., Kushiyama H., Imamura R., Kinoshita, T., Nishiuchi T., and Suda T., 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: 33963-33972 (2011)

[学会発表](計 2 件)

1. 木下健, 今村龍, 須田貴司: The role of NLRP3 in the induction of cytokine gene expression in tumor cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡
2. 木下健, 今村龍, 須田貴司: NLRP3 mediates NF- $\kappa$ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 14 日 横浜

[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]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木下 健 ( KINOSHITA TAKESHI )  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号 : 20311681

(2)研究分担者

無し ( )

(3)連携研究者

無し ( )