

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590566

研究課題名(和文) Inflammasome 形成に関わる ASC の多面的機能の解析

研究課題名(英文) Multiple functions of ASC that mainly regulates the formation of inflammasome

研究代表者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shunichiro)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60117166

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)：Inflammasome 形成制御因子 ASC は炎症・細胞死を促進する。炎症を伴う大腸癌易発生マウス(Ahr 欠損)に ASC を欠損させた所、発癌が遅延した。当マウスは IL-1 の産生が増強しており、その発現は ASC 欠損によって消失し、炎症抑制が発癌遅延の一原因と考えられた。一方 ASC 発現過剰によってがん細胞の細胞高密度状態で生存障害を与えた。また、逆に発現を減少させるとがん細胞の転移能が亢進した。

ASC と直接結合する分子として、inflammasome 関連分子以外に、ファスシン、IQGAP など細胞骨格・情報伝達関連分子が見出された。現在上記の分子相互作用の生物学的意義解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：ASC responsible for inflammasome formation is involved in both pro-inflammation and pro-apoptosis. We observed the occurrence of the colon cancer was clearly retarded by ASC deletion from Ahr<sup>-/-</sup> mouse, a prone to colon cancer. In Ahr<sup>-/-</sup> mice, it was observed that an oncogene beta-catenin was accumulated in nuclei of the intestinal epithelium associated with an increase in the expression of IL-1β and severe inflammation was suppressed. On one hand, we observed that the metastatic potential of cancer cells were enhanced by ASC knock-down, while Asc over-expression suppressed the survival of cancer cells specifically in the confluent state.

When we searched for the ASC binding proteins by immunoprecipitation and mass spectrometer, cytoskeletal and signal transduction-relating molecules, such as Fascin and IQGAP were, and their direct interaction with ASC was confirmed. The investigation of the biological significance of the interaction is underway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：ASC Inflammasome innate immunity cell death cancer fascin IL-1β IFNβ

## 1. 研究開始当初の背景

### ASC 発見を契機とする自然免疫研究の新たな展開：TLR から細胞質型受容体へ

アポトーシス促進蛋白質として見出した ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) (JBC, 1999, by Masumoto et al.) は CARD と家族性地中海熱原因遺伝子ピリン相同領域 (PYD と命名) を有し、炎症、アポトーシスのいずれにも関与する事を報告した。その後、PYD 含有遺伝子探索が行われ、その中に leucine-rich repeat を有するファミリー (NLRPs) が、膜型 TLR に対応する細胞質型病原体受容体として注目され始めた。そして、ピリン始め NLRP3 等 NLRPs と ASC との相互作用が報告され、ASC が炎症シグナル (IL-1 $\beta$  産生) に関与する事が示唆された。

### ASC 欠損マウスの作製と ASC が caspase1 活性化因子であることの証明

ASC が caspase 1 を活性化する *in vitro* 実験が報告され、急速に研究が進展した。私達は ASC 欠損マウスを用いて個体レベルで ASC が caspase 1 の活性化因子である事を証明し (Genes to Cells, 2004, by Yamamoto et al.)。米国グループからも同様の報告がなされた (Nature, 2004 by Mariathasan et al.)。

### ASC の PYD 構造決定と PYD-PYD 相互作用の責任アミノ酸決定

私達は PYD-PYD 相互作用を明らかにし (BBRC, 2001, by Masumoto et al.)、さらに PYD 部分の点突然変異体を多数構築し細胞内での相互作用の検討と PYD の NMR 解析を行い 3 次元構造と PYD-PYD 相互作用の責任アミノ酸を決めた (Biochemistry, 2005 by Moriya et al.)。

### 自然免疫シグナルにおける ASC 機能の国際的樹立

現在 ASC の自然免疫におけるアダプター蛋白質としての機能は国際的に認められ (Cell, review, 2010, by Schroder K et al.; Nat Immunol. 2007, by Mariathasan S. et al. 等), Nature Immunology Review のポスター (Innate immunity: sensing and signaling, 2008, by ELatz et al, <http://www.nature.com/nri/poster/innate>) に ASC の自然免疫における機能が紹介された。

## 2. 研究の目的

自然免疫は膜型受容体 Toll 様受容体 (TLR) を中心として研究が進展し、今日は PYD (ピリン相同領域) を持った細胞質型病原体受容体が注目を集めている。

私達が見出した PYD と CARD を有する ASC は細胞質型病原体受容体と共に形成される inflammasome の、責任構成分子である。代表

的細胞質型病原体受容体である NLRP3 (Cryopyrin) や AIM2 は病原体を認識すると PYD 領域を介して ASC と結合し、さらに ASC は CARD 領域を介して procaspase 1 をリクルートして inflammasome 形成する。そして分子近接化によって procaspase 1 は活性化され、活性化 caspase 1 は前駆体 proIL-1 $\beta$  や IL-18 を活性化型へ変換する。

この際、細胞死が生じる場合もある。

この inflammasome 構成分子群、形成機構はまだ解明すべき点が多く、また inflammasome (speck) 形成の場が細胞内で核近辺の一点であることの必然性は謎である。本研究の目的は、ASC と相互作用する分子群を検索・同定し、その結果を基に inflammasome 構成分子群と形成機序の理解を目的とする。ASC が細胞骨格分子と相互作用する予備的結果を得ているので、標的分子を細胞骨格に焦点を合わせて検討を行い inflammasome 制御異常が原因と考えられる種々病態解明の糸口とする。

## 3. 研究の方法

ASC と相互作用する標的蛋白質をプロテオミクス手法で予備的に検索・同定した候補分子群のデータを基に、炎症、細胞死などに関連する蛋白質に焦点を合わせ、ASC の inflammasome 形成制御機能の他、細胞計画死制御等の多面的機能と分子機序を解明する。リコンビナント蛋白質を用いての試験管内結合反応や、細胞内発現させた場合において免疫染色や免疫沈降にて相互作用を直接的に証明する。候補蛋白質の発現を siRNA や shRNA でノックダウンし、NLRP/ASC/caspase 1 や AIM2/ASC/caspase 1 などそれぞれの inflammasome 形成への影響、caspase 1 活性化、IL-1 $\beta$  産生への影響、また細胞計画死等への影響を明らかにする。

## 4. 研究成果

Inflammasome 形成に関わる ASC は炎症促進効果と細胞計画死促進という何れの機能も有することが示唆されている。炎症効果促進面での働きを示唆する結果として、大腸がん易発生マウス (Ahr 欠損マウス) から ASC を欠損させた所、大腸がんの発生が著名に遅延した。Ahr 欠損マウスは カテニンの核内蓄積が増している一方、IL-1 $\beta$  の産生が増強しており、炎症を伴う大腸がんを発生するが、ASC の欠損によって、IL-1 $\beta$  の発現が消失し、炎症が抑制されたことが一つの原因と考えられた。

一方 ASC をがん細胞において発現過剰やノックダウンすると、がん細胞の形質に影響を与えた。発現過剰にするとがん細胞の細胞密度の高い状態で生存に障害を与えた。また、逆に発現を減少させるとがん細胞のインベ

ードボディが増し、転移能を亢進した。

ASC と直接結合する分子を免疫沈降や質量分析を用いて検索した結果、inflammasome 関連分子以外に、ファスシン、IQGAP など細胞骨格蛋白質や情報伝達制御分子との相互作用が認められた。

現在上記の分子相互作用面から、生物学的効果の機序解析を進め、新たながん分子標的の検索を目指している。

#### 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 9 件)

1. Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T  
Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation.  
Nat Commun. 10;5:3566. 2014  
doi: 10.1038/ncomms4566. 査読有
2. Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Dezaki, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Hiroko Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M.  
NLRP3 Regulates Neutrophil Functions and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Independently of Inflammasomes.  
J Immunol. 192(9):4342-4351, 2014  
doi: 10.4049/jimmunol.1302039. Epub 2014 Apr 2. 査読有
3. Komada T, Usui F, Shirasuna K, Kawashima A, Kimura H, Karasawa T, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Taniguchi S, Muto S, Nagata D, Kusano E, Takahashi M  
ASC in Renal Collecting Duct Epithelial Cells Contributes to Inflammation and Injury after Unilateral Ureteral Obstruction.  
Am J Pathol 184(5):1287-1298, 2014  
doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.014. Epub 2014 Mar 5. 査読有
4. Negishi H, Matsuki K, Endo N, Sarashina H, Miki S, Matsuda A, Fukazawa K, Taguchi-Atarashi N, Ikushima H, Yanai H, Nishio J, Honda K, Fujioka Y, Ohba Y, Noda T, Taniguchi S, Nishida E, Zhang Y, Chi H, Flavell RA, Taniguchi T.  
Beneficial innate signaling interference for antibacterial responses by a Toll-like receptor-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis.  
Proc Natl Acad Sci USA, 110(49):19884-19889, 2013  
doi: 10.1073/pnas.1320145110. Epub 2013 Nov 18. 査読有
5. Shimane T, Kobayashi H, Takeoka M, Kitazawa M, Matsumura T, Hida S, Tiepeng Xiao, Koike T, Taniguchi S, Kurita H.  
Clinical significance of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain in oral squamous cell carcinoma.  
Oral & Maxillofacial Pathology 115(6):799-809, 2013  
doi: 10.1016/j.oooo.2013.03.013. 査読有
6. Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, Nakayama J, Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U.  
Crucial Role of Hyaluronan in Neointimal Formation after Vascular Injury.  
PLOS ONE. 8(3) :e58760, 2013  
doi: 10.1371/journal.pone.0058760. Epub 2013 Mar 6. 査読有
7. Ikuta T, Kobayashi Y, Kitazawa M, Shiizaki K, Itano N, Noda T, Pettersson S, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y, Taniguchi S, Kawajiri K.  
ASC-associated inflammation promotes cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice.  
Carcinogenesis. 34(7):1620-1627, 2013  
doi: 10.1093/carcin/bgt083. Epub 2013 Mar 1. 査読有
8. Usui F, Shirasuna K, Kimura H, Tatsumi K, Kawashima A, Karasawa T, Hida S, Sagara J, Taniguchi S, Takahashi M.  
Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice.  
Biochem Biophys Res Commun. 425:162-168, 2012  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.058. Epub 2012 Jul 20. 査読有
9. Imamura T, Ishizuka O, Lei Z, Hida S, Sudha GS, Kato H, Nishizawa O.  
Bone marrow-derived cells implanted into radiation-injured urinary bladders reconstruct functional bladder tissues in rats.  
Tissue Eng Part A. 2012;18:1698-1709  
doi:10.1089/ten.TEA.2012.0061. Epub 2012 May 14. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Matsumura T, Fujii C, Hida S, Taniguchi S.  
Actin binding protein fascin1 regulates innate immune responses in tumor cells.  
第 42 回日本免疫学会学術集会 (千葉市)  
2013.12.11-13
2. 伊藤賢祐、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎  
細胞間相互作用を介した ASC 依存的な腫瘍抑制機能  
第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜市)  
2013.10.3-5
3. 藤井千文、松村富穂、伊藤賢祐、肥田重明、谷口俊一郎  
がん細胞での ASC の発現量低下は細胞運動能を亢進させる  
第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜市)  
2013.10.3-5
4. 松村富穂、肥田重明  
細胞骨格分子による自然免疫制御  
新学術領域研究「自然炎症 + 脂質マシナリー」合同若手ワークショップ (鳴門市)  
2013.7.2-4
5. 藤井千文、松村富穂、伊藤賢祐、北沢将人、肥田重明、谷口俊一郎  
がん細胞における ASC と細胞運動能の相関性の解析  
第 85 回日本生化学会 (福岡市)  
2012.12.13-16
6. Shimane T, Takeoka M, Kobayashi H, Aizawa H, Tiepeng Xiao, Matsumura T, Koike T, Hida S, Taniguchi S, Kurita H.  
Correlation between ASC (PYD-CARD) expression and cell differentiation in normal oral epithelium  
ACOMS 2012 15-18 November, 2012 (Bali-Indonesia)
7. 嶋根哲、相澤仁志、竹岡みち子、松村富穂、肥田重明、小池剛史、肖鉄朋、小林啓一、谷口俊一郎、栗田浩  
口腔扁平上皮癌における ASC (PYD-CARD) の発現とアポトーシスの関連  
第 50 回日本がん治療学会学術集会 (横浜)  
2012.10.25-27
8. 伊藤賢祐、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎  
A novel tumor-suppressor functions of ASC in malignant cells.  
第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌)  
2012.9.19-21

9. Fujii C, Hida S, Ito K, Kitazawa M, Taniguchi S.  
Potential involvement of ASC in cancer progression and metastasis.  
Metastasis 2012 3-5 Sep. (Brisbane)
10. 北沢将人、谷口俊一郎  
ヒト線維肉腫細胞 HT1080 における ASC による増殖抑制メカニズムの解析  
第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (北九州市) 2012.6.27-29
11. 北沢将人、肥田重明、岡田なぎさ、松村富穂、藤井千文、竹岡みち子、宮川眞一、谷口俊一郎  
A novel tumor-suppressor function of ASC in fibrosarcoma  
第 70 回 日本癌学会学術総会 (名古屋)  
2011 10.3-5
12. 岡田なぎさ、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎  
The role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in Antitumor effect of macrophage.  
第 70 回 日本癌学会学術総会 (名古屋)  
2011 10.3-5
13. 岡田なぎさ、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎  
マクロファージの抗腫瘍作用における ASC の役割  
第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会 (浜松) 2011 6.30 -7.1
14. 北沢将人、谷口俊一郎  
ASC によるヒト線維肉腫細胞 HT1080 の増殖抑制  
第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (東京) 2011 6.22-24

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shunichiro)  
信州大学・医学系研究科・教授  
研究者番号： 60117166

##### (2) 研究分担者

肥田 重明 (HIDA, Shigeaki)  
信州大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号： 10345762