

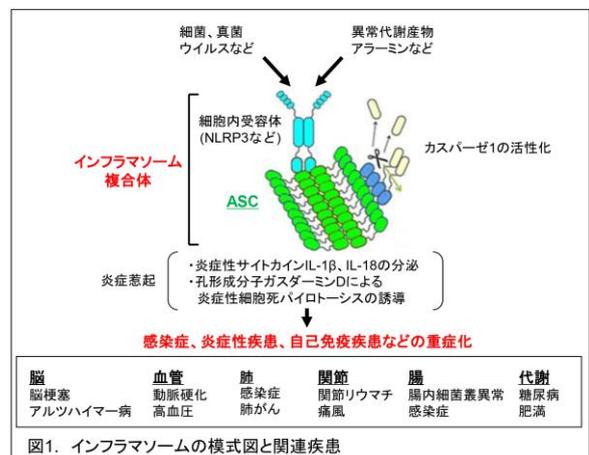
インフラマソーム炎症の共通制御機構の解明

慶應義塾大学医学部 微生物学免疫学

原 英樹

【背景】

インフラマソームは、外因性の微生物成分や微粒子、および内因性の異常代謝産物やアラミンなどを細胞内で認識して炎症応答を惹起する自然免疫機構である（図 1）。インフラマソーム応答が活性化するためには、まず細胞内受容体が異物を検知する必要がある。それにより構造変化が起こり、アダプター分子 ASC（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD）を介してタンパク分解酵素カスパーゼ 1 がリクルートされる。この細胞内受容体、ASC、カスパーゼ 1 が会合したタンパク複合体をインフラマソーム複合体とよぶ。カスパーゼ 1 は自己切断により活性型となり、基質である炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-18 の前駆体を切断し、生物活性を有するアクティブフォームへと変換させる。また、不活型の膜傷害タンパク質ガスダーミン D も活性型へと変換させることで炎症を伴うプログラム細胞死パイロトーシスを誘導する。異物が侵入もしくは発生した部位に応じて、インフラマソームは脳や血管、関節、肺、心臓、膵臓、腸といったあらゆる臓器で活性化しうするため、脳梗塞やアルツハイマー病、動脈硬化、心筋梗塞、関節リウマチ、糖尿病、肺がん、大腸がんなど様々な疾患の発症および重症化に関与することが多くの研究から明らかにされている。われわれもインフラマソーム応答が黄色ブドウ球菌やリステリアなどの感染症において重症化に関わることを世界に先駆けて突き止めた（参考論文 3）。



インフラマソームの細胞内受容体はこれまでに 7 種類同定されており、NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing protein 3) や NLRP6、AIM2 (absent in melanoma 2) などがそれぞれ異なるリガンドを認識することで多様な異物に対応している。一方で、その下流では、すべての受容体が効率よくカスパーゼ 1 を活性化するために ASC をアダプターとしてリクルートする。また、上述した多くの疾患では複数のインフラマソームが活性化することから、単一の細胞内受容体を標的とするよりも下流の共通シグナル経路を阻害することでより効果的に炎症を抑制できると考えられる。

【目的】

インフラマソーム応答は様々な炎症を伴う疾患を重篤化させる。そこで本研究では、インフラマソームを効率よく阻害するための標的分子を同定する目的で、インフラマソーム応答に共通する制御機構を検討した。具体的には、①タンパク質 A を介したインフラマソーム制御機構の解明、②ASC のリン酸化を誘導するシグナル伝達経路の特定、および③インフラマソーム関連疾患におけるインフラマソーム応答の影響について検討を行った。

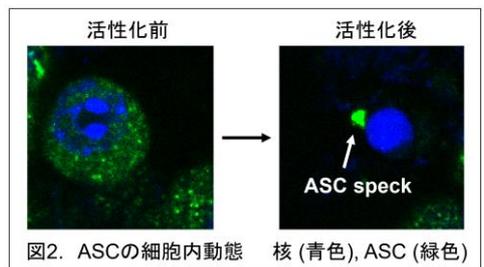


図2. ASCの細胞内動態 核(青色), ASC(緑色)

【方法】

研究計画①：タンパク質 A を介したインフラマソーム制御機構の解明
インフラマソーム応答を誘導する細胞内受容体は共通してアダプター分子 ASC を介してカスパーゼ 1 を活性化する経路を有する。通常、ASC は細胞質内に発現しているが、細胞内受容体と会合することで劇的な局在変化を起こし、核の近傍に凝集体 (ASC speck と呼ぶ) を形成する (図 2)。そこでインフラマソーム活性化時に ASC と会合する分子を調べたところ、いくつかのタンパクが候補として挙がってきた (未発表データ)。そこで LPS でプライミングしたマクロファージを候補分子特異的な阻害剤で 1 時間処理し、NLRP3 インフラマソーム刺激剤である nigericin や AIM2 インフラマソーム刺激剤である poly (dA:dT) で刺激することでインフラマソーム応答の指標となる IL-1 β や IL-18 などのカスパーゼ 1 依存的な炎症性サイトカインの産生を

ELISA で検出した。また、候補分子のインフラマソーム応答への関与を検討するために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術で各遺伝子を欠損したマクロファージ株を作製した。PFA で固定した細胞を ASC 抗体で処理することで ASC speck の蛍光染色を行った。

研究計画②：ASC のリン酸化を誘導するシグナル伝達経路の特定

ASC はすべてのインフラマソーム応答に関わる共通分子である。われわれが ASC の制御機構について検討を行ったところ、インフラマソーム活性化時に ASC がリン酸化修飾を受けていることが判明した(参考論文7)。そこで、ASC のリン酸化部位を特定するために、候補となるアミノ酸に点変異を加えた ASC を発現するマクロファージ株を作製し、各インフラマソームリガンドで刺激後、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。カスパーゼ1の活性化は、活性型である p10 サブユニットをウエスタンブロット法で検出した。また、インフラマソーム応答に関わるリン酸化酵素を特定するために、各酵素特異的な阻害剤でマクロファージを処理し、インフラマソーム応答に関わる分子を絞り込んだ。分子のリン酸化はウエスタンブロット法で検出した。

研究計画③：インフラマソーム関連疾患におけるインフラマソーム応答の重要性

インフラマソームが活性化すると *Listeria monocytogenes* (リステリア) 感染が重症化することをわれわれは突き止めている(参考論文3)。リステリアは AIM2、NLRP3、NLRP6などを介して複合的にインフラマソームを活性化することから、本研究のインフラマソーム関連疾患として同感染モデルを使用した。マウスに 10^5 もしくは 10^6 cfu のリステリアを静脈投与し、感染2日目もしくは4日目に肝臓を回収した。HE染色により病変を観察、もしくはホモジナイズして臓器内菌数を測定した。血中のサイトカイン濃度は ELISA で測定した。

【結果】

研究計画①：タンパク質 A を介したインフラマソーム制御機構の解明

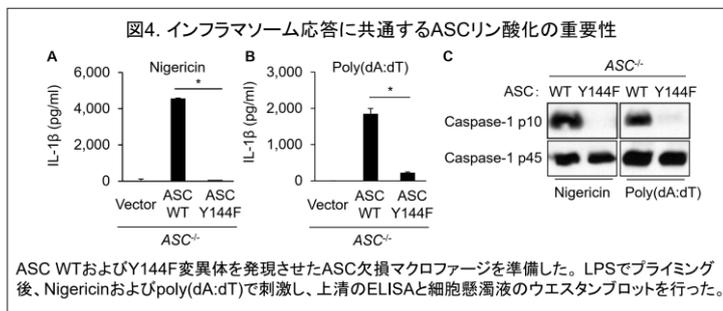
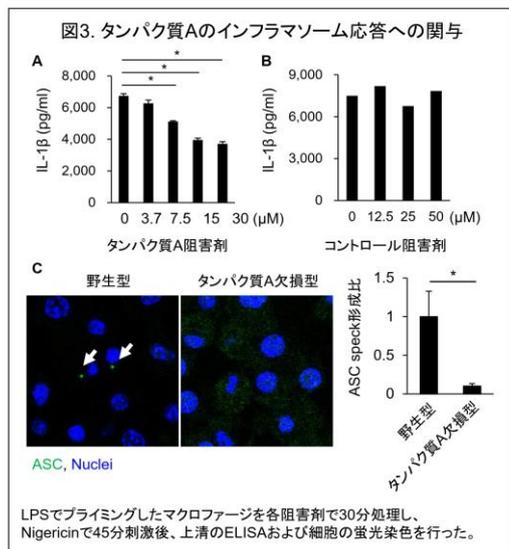
インフラマソームの共通アダプター分子である ASC と会合する候補分子として、タンパク質 A のインフラマソーム応答への関与を調べた。その結果、タンパク質 A 特異的な阻害剤でマクロファージを処理した場合には、NLRP3 インフラマソームの活性化が濃度依存的に抑制された(図3: 未発表データ)。一方で、コントロール阻害剤で処理した場合にはインフラマソーム依存的な IL-1 β 産生に影響はなかった。また、AIM2 のリガンドである poly(dA:dT) で刺激した場合にも、タンパク質 A 特異的な阻害剤処理により IL-1 β 産生が減少した(未発表データ)。そこで、タンパク質 A 欠損マクロファージを作製したところ、nigericin 刺激で誘導した ASC speck の形成が野生型マクロファージと比較して減少した(図3: 未発表データ)。以上の結果から、タンパク質 A が NLRP3 や AIM2 に共通するインフラマソーム活性化経路を制御していることが示された。

研究計画②：ASC のリン酸化を誘導するシグナル伝達経路の特定

HEK293T 細胞を用いた前実験から、ASC の 144 番目チロシンがリン酸化修飾を受けるアミノ酸候補として挙げられた。そこで、ASC 欠損マクロファージに 144 番目チロシンをフェニルアラニンに置換した ASC 変異体を発現するマクロファージを作製し、nigericin および poly(dA:dT) 刺激を行った。その結果、どちらの刺激においてもインフラマソーム依存的な IL-1 β 産生が野生型マクロファージと比較して低下した(図4: 未発表データ)。またインフラマソーム依存的なカスパーゼ1の活性化(p10サブユニットへの変換)も ASC Y144F 発現株では顕著に減少していた(図4: 未発表データ)。以上の結果から、NLRP3 や AIM2 インフラマソームの活性化には共通して ASC144 番目チロシンのリン酸化が必要であることが示された。そこで、各種キナーゼ阻害剤を用いてインフラマソーム応答に関わるリン酸化シグナルを選別したところ、Lyn と Syk を阻害したときにインフラマソーム応答が顕著に減弱した(未発表データ)。また、Lyn を阻害すると Syk のリン酸化も低下することから、Syk は Lyn の下流で活性化し、ASC のリン酸化に関与することが示唆された。

研究計画③：インフラマソーム関連疾患におけるインフラマソーム応答の重要性

感染マウスにおけるリステリアの臓器内菌数を調べたところ、AIM2 欠損マウスで菌数が減少し、ASC 欠損マウスではさらに低下した(図5: 未発表データ)。肝内菌数と相関して、肝臓における膿瘍形成も野生型マウスと比較して、これらの欠損マウスでは低下し、インフラマソーム依存的な IL-18 産生も減弱していた(図5: 未発表データ)。そこで、IL-18 と IL-1 β の二重欠損マウスにリステリアを感染させたところ、ASC 欠損

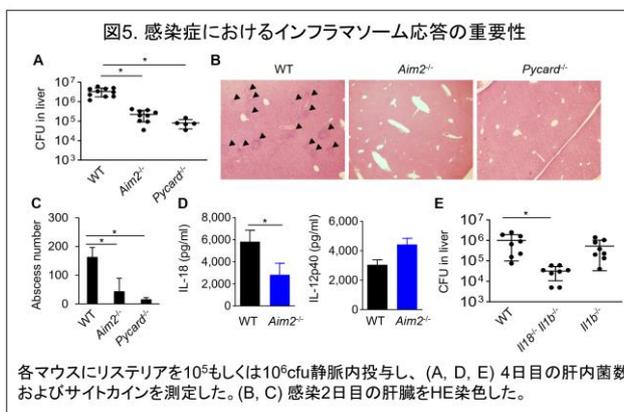


マウスと同様に肝内菌数が減少したのに対して、IL-1 β 単独欠損マウスでは野生型マウスと同程度の菌数が検出された (図 5: 未発表データ)。以上の結果から、インフラマソーム依存的に産生される IL-18 が感染個体におけるリステリアの増殖を増長させるいること、また、それにより病態が重症化していることが明らかとなった。

【考察】

インフラマソーム応答を誘導する細胞内受容体として、これまでに 7 種類の分子が同定されていた。これらのインフラマソームは各々異なるリガンドを認識することから、別々に制御されていると考えられてきた。今回の研究から、細胞内受容体によるリガンド認識とは別に、アダプター分子 ASC が細胞内受容体の種類に関わらず共通の制御を受けていることが明らかとなった。また、タンパク質 A とリン酸化酵素の異なるシグナル経路がそれぞれ ASC の機能や細胞内局在を制御することで、インフラマソームに共通する制御機構として機能していることが判明した。今後、さらに詳細なメカニズムを解明し、これらを標的とした阻害化合物を設計することで、インフラマソームを介した炎症応答を効率的に抑制することが可能になると考えられる。また、本研究で検討した感染症だけでなく、上述した炎症性疾患や自己免疫疾患など幅広い疾病の改善に応用できることが期待される。

以上のような研究の進展に大いなる援助をいただいたアステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。



【発表論文および参考文献】

1. Tsuchiya K, Hosojima S, Hara H, Kushiyama H, Mahib M. R., Kinoshita T, Suda T. Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 α downstream of inflammasomes. *Cell Rep.* 34: 108887, 2021.
2. Fang R, Uchiyama R, Sakai S, Hara H, Tsutsui H, Suda T, Mitsuyama M, Kawamura I and Tsuchiya K. ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. *Mucosal Immunol.* 12: 1092-1103, 2019.
3. *Hara H, Seregin SS, Yang D, Fukase K, Chamaillard M, Alnemri ES, Inohara N, Chen GY and Núñez G: The NLRP6 inflammasome recognizes lipoteichoic acid and regulates Gram-positive pathogen infection. *Cell* 175: 1651-1664, 2018. *Corresponding Author
本論文は F1000 Prime で推薦された (<https://f1000.com/prime/734357156>)。
4. Sakamoto K, Kim YG, Hara H, Kamada N, Caballero-Flores G, Tolosano E, Soares MP, Puente JL, Inohara N and Núñez G. IL-22 controls iron-dependent nutritional immunity against systemic bacterial infections. *Sci. Immunol.* 2: eaai8371, 2017.
5. Conos SA, Chen KW, De Nardo D, Hara H, Whitehead L, Núñez G, Masters SL, Murphy JM, Schroder K, Vaux DL, Lawlor KE, Lindqvist LM and Vince JE. Active MLKL triggers the NLRP3 inflammasome in a cell-intrinsic manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114: 961-969, 2017.
6. He Y, Hara H and Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* 41: 1012-1021, 2016.
7. Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V and Mitsuyama M. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat. Immunol.* 14: 1247-1255, 2013.