

氏名	相澤恵美
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 615 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	インフラマソーム依存的細胞死の分子機序の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 古川 雄 祐 (委員) 教授 岩本 禎 彦 講師 早川 盛 禎

論文内容の要旨

1 研究目的

NLRP3 インフラマソームは、NLRP3 とアダプター分子 ASC、プロテアーゼである Caspase-1 から構成される細胞内タンパク複合体であり、病原体非存在下に惹起される無菌性炎症に関与することが明らかになってきた。NLRP3 インフラマソームは Caspase-1 の活性化を介して IL-1 β の分泌を制御していることが知られているが、その活性化はパイロトーシス (Pyroptosis) と呼ばれるプログラムされた細胞死も引き起こすことが報告されている。パイロトーシスでは膜透過性が亢進し、細胞質成分の漏出が引き起こされる。この膜透過性の亢進は分泌シグナルを持たない IL-1 β の放出に重要であり、細胞死と炎症惹起を関連づける重要な現象とされる。最近、パイロトーシスの実行分子として Gasdermin D (GSDMD) が同定され、Caspase-1 により切断された GSDMD の N 末端が細胞膜上で孔形成し、細胞質成分を流出させることでパイロトーシスを引き起こすことが明らかとなった。さらに、同じ Gasdermin family に属する Gasdermin E (GSDME) も Caspase-3 により切断され、パイロトーシスを惹起することが報告された。しかし、インフラマソーム依存的細胞死の詳細な分子機構については、いまだ不明な点が多く残されている。

本研究では、GSDMD の切断に重要な Caspase-1 欠損下でもインフラマソームの活性化によりパイロトーシスが誘導されるとの結果を得た。一方、インフラマソームの活性化は Caspase-1 だけでなく、ASC を介して Caspase-8/Caspase-3 を活性化させることが知られていることから、この経路が GSDME を介して Caspase-1 欠損下でのパイロトーシスを惹起しているのではないかと仮説に至った。そこで、本研究は、インフラマソームの活性化により惹起されるパイロトーシスの制御機構の解明を目的として行った。インフラマソームの活性化機構については申請者のグループを含めて様々な研究が行われているが、これを介した細胞死の制御については不明な点が多い。本研究により、細胞死を介したインフラマソームの制御機構が解明されれば、これを利用した炎症制御や炎症関連疾患に対する新たな治療法の開発の手がかりにもつながると考えられる。

2 研究方法

WT、Caspase-1 欠損 (Casp1/11^{-/-})、ASC/Caspase-1 二重欠損 (ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}) マウスから腹腔マクロファージを回収、培養して実験に使用した。Pam3CSK4 でプライミング刺激を行い、NLRP3 インフラマソーム活性化を誘導する Nigericin で刺激を行い、培養上清とタンパク質を解析

に用いた。

ヒト細胞でもマウスマクロファージと同様の細胞死が惹起されるか確認するため、PMA 刺激によりマクロファージ様に分化誘導した THP-1 細胞に Nigericin 刺激を行い、培養上清とタンパク質を解析に用いた。遺伝子改変 THP-1 細胞はヒト ASC、CASP1、CASP3、CASP8、GSDMD、GSDME 遺伝子を標的としたガイド RNA を作製し、LentiCRISPRv2 ベクターに導入した。作成したプラスミドを LentiX293T 細胞にトランスフェクションした後、レンチウイルスを回収し、THP-1 細胞に感染させて作製した。

さらに、Caspase-1 を発現していない HeLa 細胞を用いて、NLRP3 インフラマソーム活性化時の細胞死を評価した。HeLa 細胞に恒常活性化型 NLRP3 (NLRP3D303N)、ASC、GSDMD、GSDME それぞれのプラスミドを Lipofectamine2000 を用いて一過性に強発現させた 24 時間後の培養上清とタンパク質を解析に用いた。

パイロトーシスは、LDH 産生と炎症性サイトカイン IL-1 α / β 産生により評価した。さらに Western Blot 法 (WB) により、インフラマソーム活性化によるパイロトーシス誘導が ASC による Caspase-8/-3、GSDME の活性化を介しているかを検討した。

3 研究成果

ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージでは Nigericin 刺激による LDH 放出が抑制される一方、Casp1/11^{-/-}マクロファージでは LDH が放出され、パイロトーシスが誘導された。THP-1 細胞でも Caspase-1 欠損細胞では、LDH が放出されパイロトーシスが誘導されており、Caspase-1 非依存的に ASC を介してパイロトーシスが惹起されることが明らかとなった。さらに Casp1/11^{-/-}マクロファージで誘導される細胞死では、培養上清中に IL-1 β の分泌は認められず、IL-1 α の分泌が認められた。

次に、Caspase-1 非依存的パイロトーシスの惹起経路を確認した。マウスマクロファージ、THP-1 細胞ともに、Caspase-1 欠損下において、Caspase-8/-3、GSDME の活性化が WB で確認できた。さらに Casp1/11^{-/-}マクロファージに Caspase-3 阻害剤 (DEVD)、Caspase-8 阻害剤 (IETD) を添加すると、DEVD に比較して IETD がより強力にパイロトーシスと GSDME の活性化を抑制していた。Caspase-1/Caspase-8 二重欠損 THP-1 細胞では、Caspase-1 欠損細胞に比較し LDH 産生、Caspase-3、GSDME の切断も有意に抑制されていることを WB で確認した。つまり Caspase-8 が GSDME の活性化を誘導することが示された。

また、NLRP3 インフラマソームの活性化が、Caspase-8 を介した Caspase-1 非依存的細胞死を惹起するかの評価のため、HeLa 細胞への一過性遺伝子導入を行った。ASC、GSDME および NLRP3D303N 導入細胞は、ASC および GSDME 導入細胞に比較して LDH の放出が誘導され、さらに Caspase-8/-3、GSDME の活性化も強く誘導された。さらに WT マクロファージへの Caspase-1 阻害剤 (VX765) 添加により薬理的に Caspase-1 を阻害したところ、IL-1 β の産生が抑制され、IL-1 α 産生を伴った Caspase-8/-3/GSDME を介したパイロトーシスが誘導されていた。

4 考察

本研究では、NLRP3 インフラマソームの活性化により、IL-1 α 分泌を伴う Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシス (incomplete pyroptosis) が惹起されることを明らかにした。IL-1 α は創傷治癒後の血小板新生な

どへの関与も指摘されており、IL-1 β 産生を抑制しつつ、IL-1 α 産生を誘導する incomplete pyroptosis が炎症疾患の病態や創傷治癒において重要な役割を担っているのではないかと考えられる。さらに薬剤による Caspase-1 の阻害でも incomplete pyroptosis が誘導され、IL-1 α が産生されることから、Caspase-1 阻害剤が NLRP3 インフラマソームが関与する疾患の新たな治療につながるかもしれない。

今後、incomplete pyroptosis の病態における生理学的な意義についてはさらなる解析が必要と考えるが、この細胞死のメカニズムの解明が炎症性疾患の有用な治療法の開発につながると期待できる。

5 結論

NLRP3 インフラマソームの活性化は、ASC/Caspase-8/GSDME を介した IL-1 α の産生を伴うパイロトーシスを惹起することが示され、NLRP3 インフラマソームによる新たな細胞死経路の存在を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

無菌性炎症の重要な mediator である NLRP3 inflammasome は danger signal を感知して Caspase-1 を活性化する。活性化した Caspase-1 は Gasdermin D を切断、切断された Gasdermin D の N 末端が細胞膜に孔をあけて IL-1 β を流出させる (complete pyroptosis)。一方、NLRP3 inflammasome が Caspase-1 非存在下でも細胞死を誘導するとの報告もあるが、その詳細は不明であった。

本研究において申請者らは、NLRP3 inflammasome が Caspase-1 欠損マクロファージにおいて Caspase-8 を活性化することを見いだした。活性化した Caspase-8 は Gasdermin E を介して pyroptosis を誘導し、その際に IL-1 β ではなく IL-1 α を細胞外に放出した。

本研究は NLRP3 inflammasome による新たな細胞死 (incomplete pyroptosis) の経路を明らかにしたもので、きわめて高い独創性を有する。生物学的には Caspase-1/Gasdermin D/IL-1 β 経路に不備が生じた場合に Caspase-8/Gasdermin E/IL-1 α 経路が代償的に働く可能性を示唆し、臨床的にも NLRP3 inflammasome が関与する疾患の病態の理解に役立つことが期待される。

英文論文はすでに査読付きの英文国際誌 iScience に投稿されており、revision 中である。学位論文も丁寧に作成されており、まとめの図の追加と細部の修正をもって合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおり発表を行った。発表は明快で、時間も厳守された。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員共通の質問として、今回発見した新しい細胞死の経路の生物学的意義が挙げられた。また Caspase-1/Gasdermin D/IL-1 β 経路と Caspase-8/Gasdermin E/IL-1 α 経路の使い分け、とくにマクロファージの subset や分化段階による違い、炎症反応における IL-1 β と IL-1 α の役割の違い、今回の実験条件において Caspase-8 が活性化されているにもかかわらず apoptosis が誘導されない理由、incomplete pyroptosis に伴って IL-1 α の processing が起こるかどうかとその機序などが質問された。申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、自身の研究テーマに関して包括的な知識を有していると共に、実験結果について深く考察していることがわかった。

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。