

表 題 インフラマソーム依存的細胞死の分子機序の解明

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 相澤 恵美

担当指導教員氏名 森 良之 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻
消化器疾患学
歯科口腔外科学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

略語一覧

1. はじめに
2. 実験材料と方法
 - 2-1. 使用薬剤
 - 2-2. 使用動物
 - 2-3. 細胞培養
 - 2-4. マウス腹腔マクロファージの回収
 - 2-5. プラスミド作製
 - 2-6. レンチウイルス作製
 - 2-7. 遺伝子改変 THP-1 細胞の作製
 - 2-8. NLRP3D303N-THP-1 細胞の作製
 - 2-9. HeLa 細胞への一過性遺伝子導入
 - 2-10. IL-1 α/β の測定
 - 2-11. LDH の測定
 - 2-12. 死細胞の評価
 - 2-13. 細胞死のイメージング
 - 2-14. Crosslinking assay
 - 2-15. Western blot 法
 - 2-16. フローサイトメトリー
 - 2-17. 統計学的解析
3. 結果
 - 3-1. NLRP3 インフラマソームの活性化により惹起される細胞死の評価
 - 3-2. NLRP3D303N-THP-1 細胞を用いた細胞死の解析
 - 3-3. 阻害剤を用いた細胞死の評価
 - 3-4. Caspase1/11 非依存的細胞死に関与する因子の解析
 - 3-5. IL-1 β 分泌の解析
 - 3-6. Caspase-8 による GSDME 活性化の解析
 - 3-7. パイロトーシスと GSDME 活性化の解析
 - 3-8. インフラマソーム阻害剤によるパイロトーシスの解析

4. 考察
5. おわりに
6. 謝辞
7. 参考文献

略語一覧

略語	名称
AIM2	absent in melanoma 2
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain
ATP	adenosine triphosphate
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl) suberate disodium salt
DAMP	damage/danger-associated molecular pattern
DKO	double-KO
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dox	Doxycycline
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GSDMD	gasdermin D
GSDME	gasdermin E
HMGB1	high mobility group box 1
HRP	horseradish peroxidase
IL-1 α	interleukin-1 α
IL-1 β	interleukin-1 β
KO1	Kusabira-Orange
LDH	lactate dehydrogenase
NLRC4	nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and caspase recruitment domain containing 4

NLRP3	nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain containing 3
NT	amino-terminal domain
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	pattern recognition receptor
RCD	regulated cell death
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RIPK3	receptor-interacting serine-threonine kinase 3
SYTOXG	SYTOX green
WT	wild-type

1. はじめに

自然免疫系において、侵入してきた病原体やその病原体の分子構造は、パターン認識受容体 (PRRs [pattern recognition receptors]) を介して認識される。PRRs には様々な種類があり、代表的なものとしては NLRP3 (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain containing 3)、NLRC4 (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and caspase recruitment domain containing 4)、AIM2 (absent in melanoma 2) などが報告されており、これらはインフラマソームと呼ばれる細胞内タンパク複合体を形成することで Caspase-1 の活性化を介して炎症を惹起することが知られている (1, 2)。なかでも NLRP3 インフラマソームは、マクロファージなどの免疫細胞に主に発現しており、アダプター分子の ASC、プロテアーゼである Caspase-1 からなり (1, 2)、病原体から放出される PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) や死細胞から放出される danger signal (damage/danger-associated molecular patterns: DAMPs) を感知した NLRP3 インフラマソームは Caspase-1 の活性化を誘導する。インターロイキン-1 β (interleukin: IL-1 β) 変換酵素である Caspase-1 は (3)、NLRP3 インフラマソームにより活性化されることで、IL-1 β 前駆体 (pro-IL-1 β) を強力な炎症性サイトカインである成熟型 IL-1 β へとプロセシングする役割を持つ。IL-1 β と同じ IL-1 ファミリーに属する IL-1 α も同様に、NLRP3 インフラマソーム活性化時に分泌されることが知られているが、Caspase-1 は IL-1 α のプロセシングには寄与しないと報告されている (4)。さらに Caspase-1 の活性化により、パイロトーシスと呼ばれる炎症性細胞死を惹起することも報告されている (1, 2)。

近年、細胞自身が制御された細胞死 (regulated cell death: RCD) を惹起することが明らかとなっている (5, 6)。RCD のなかでもアポトーシスは、1972 年にはじめて報告され最もよく研究されている細胞死である。アポトーシスは組織恒常性を維持するための制御された細胞死であり、炎症を周囲に惹起しない抗炎症性の細胞死であると考えられている (7)。一方、心血管疾患や急性腎障害、アルツハイマー病、2 型糖尿病の病態の進展や創傷治癒などには、RCD のなかでもネクローシス様細胞死が関与することがわかっている (8, 9)。ネクローシスやパイロトーシスを含むネクローシス様細胞死では、死細胞からの ATP (adenosine triphosphate)、dsDNA、ssRNA、HMGB1 (high mobility group box 1) などの danger signal (DAMPs) が周囲に放出されるため、炎症性の細胞死と認識されており (7)、組織障害後の創傷治癒や炎症をコントロールするためには、ネクローシス様細胞死の制御が重要であると考えられる。また、ネクローシス様細胞死により細胞外に放出された DAMPs は、免疫細胞に発現する PRRs を介してさらに炎症を惹起する (7, 10)。

NLRP3 インフラマソームにより惹起されるパイロトーシスは、炎症性カスパーゼにより惹起される細胞死であり、アポトーシスとネクローシスの両方の特徴を併せ持つことが報告されている (11)。パイロトーシス細胞には DNA の断片化やクロマチンの凝集、小胞形成などのアポトーシスの特徴が観察される。さらに、細胞膜透過性の亢進や細胞の膨潤、LDH などの細胞成分の流出などネクローシス様細胞死の特徴も認められる。ヒト細胞では、炎症性カスパーゼである Caspase-1/-4/-5 が炎症性サイトカインのシグナル伝達やパイロトーシスを惹起することが知られているが、マウス細胞においては Caspase-4/-5 の相同体である Caspase-11 がパイロトーシスを惹起する。最近、パイロトーシスの実行分子として GSDMD (gasdermin D) が同定された (12, 13)。

GSDMD は、よく似た構造を持つ GSDMA、B、C、D、E、DFNB59 を含むガスダーミンファミリーに属する (14) 。GSDMD の N 末端領域 (NT) が、細胞膜への孔形成に寄与しており、C 末端領域がその役割を抑制している。カスパーゼにより活性化された GSDMD の NT は、細胞膜上のホスファチジルイノシトールと結合、多量体を形成することで細胞膜に 10-14 nm の孔を形成する (14, 15) 。GSDMD が形成した細胞膜孔を通じて、LDH や IL-1 α/β を含む細胞質成分が細胞外へと流出する。NLRP3 インフラマソーム活性化が誘導するパイロトーシスでは、GSDMD が形成した細胞膜孔を通じて、活性化した Caspase-1 によりプロセシングされた IL-1 β が、細胞外へ流出する。細胞外へ流出した炎症性サイトカインである IL-1 β が強力な炎症を惹起するため、パイロトーシスを制御することは炎症性疾患の治療につながると考えられる。

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予備的結果を得ている。NLRP3 インフラマソームは Caspase-1 だけでなく、ASC の pyrin-domain を介して Caspase-8 の活性化も誘導することが報告されている (16, 17) 。さらに Caspase-1 欠損下では NLRP3 インフラマソームが Caspase-8 の活性化を誘導し、IL-1 β のプロセシングと Caspase-3 を介した、周囲への炎症波及の少ないアポトーシスを惹起するとの報告もある (16-18) 。一方で、NLRP3 インフラマソームが Caspase-1 欠損下においてネクローシス様細胞死を惹起するとの報告もあり (19-21) 、NLRP3 インフラマソームが Caspase-1 非依存的に誘導する細胞死の正確なメカニズムは不明な点が多い。さらに近年、GSDMD と同じ Gasdermin family に属する GSDME (gasdermin E) 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 (22, 23) 。そこで、Caspase-1 欠損下におけるインフラマソームの活性化が誘導するパイロトーシスは、ASC/Caspase-8/-3 の活性化

を介した GSDME により惹起されるのではないかと仮説に至った。本研究では、NLRP3 インフラマソームが Caspase-1 非依存的に誘導する細胞死の制御機構の解明を目的として行った。

2. 実験材料と方法

2-1. 使用試薬

MCC950 (#AG-CR1-3615-M005) は Adipo Gen (Farmingdale, NY, USA) より購入、Nigericin (#tlrl-nig)、Pam3CSK4 (#tlrl-pms) は Invivo Gen (San Diego, CA, USA) より購入した。Z-DEVD-FMK (#4800-510)、Z-IETD-FMK (#4805-510)、Z-VAD-FMK (#4800-510) は株式会社医学生物学研究所 (名古屋) より、PEI MAX (#24765-1) は Polysciences (Warrington, PA, USA) より購入した。VX765 (#S2228)、GSK'872 (#S8465) は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) より、ピューロマイシン (#P8833) は Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) より、Lipofectamine 2000 (#11668019)、SYTOX Green (#S7020) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した。プラストサイジン S 塩酸塩 (#029-18701)、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, #162-23591)、ドキシサイクリン (Dox, #049-31121) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。

2-2. 使用動物

本研究におけるすべての動物実験は、自治医科大学動物実験規定 (平成 22 年規定第51号) に従い施行した。

実験動物として C57BL/6J (野生型:wild-type【WT】) マウスは日本 SLC より購入した。NLRP3 欠損 (NLRP3^{-/-}) マウスは Dr. Vishva M. Dixit (Genentech, CA, USA)、ASC 欠損 (ASC^{-/-}) マウスは谷口俊一郎先生 (信州大学)、Caspase-1/11 欠損

(Casp1/11^{-/-})マウスは筒井ひろ子先生(兵庫医科大学)の好意により提供され、実験に使用した。ASC/Caspase-1/11 二重欠損(ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-})マウスは ASC^{-/-}マウスと Casp1/11^{-/-}マウスを交配し、作製、実験に使用した。実験に使用したすべてのマウスは 12 世代以上の戻し交配を行い、C57BL/6J 系バックグラウンドとして実験に用いた。

2-3. 細胞培養

THP-1 細胞は 10%ウシ胎仔血清(fetal calf serum: FCS)含有 RPMI1640(Sigma-Aldrich)で培養した。THP-1 細胞は 24 時間もしくは 48 時間、200 nM PMA(富士フィルム和光純薬株式会社)存在下で培養することによりマクロファージ様に分化させた。HeLa 細胞は 10%FCS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, glucose 4500 mg/L, 富士フィルム和光純薬株式会社)で培養した。LentiX293T 細胞はタカラバイオ株式会社(滋賀)より購入した。10%FCS、1 mM ピルビン酸ナトリウム含有 DMEM (glucose 4500 mg/L, 富士フィルム和光純薬株式会社)で培養した。

2-4. マウス腹腔マクロファージの回収

マウスに 4%チオグリコレート(211716, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 1 mL を腹腔内投与し、投与 3 日後に腹腔内の細胞を回収した。回収した細胞は 10%FCS 含有 RPMI1640 培地で培養した。3 時間後、浮遊細胞を Phosphate-buffered saline (PBS)で除去し、接着細胞のみをマウス腹腔マクロファージとして実験に使用した。

2-5. プラスミド作製

発現ベクターは Kusabira-Orange1 (KO1)、ヒト ASC、CASP1、GSDMD、GSDME、NLRP3 の cDNA 配列を polymerase chain reaction (PCR) により増幅し、pCDNA3.1 ベクター (Thermo Fisher Scientific) に組み込み作製した。NLRP3D303N および IL-1 β D27A 変異体は Prime STAR Mutagenesis Basal kit (タカラバイオ株式会社) を用いて作製した。

2-6. レンチウイルス作製

LentiX293T 細胞に、LentiCRISPRv2、pLP1、pLP2、pVSVG を PEI MAX を用いてトランスフェクションし、レンチウイルスベクターを作製した。トランスフェクション 3 日後に培養上清を回収後、0.45 μ m フィルターにより濾過し、SW55 Ti ローター (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)、4°C、21,000 rpm、2 時間にて超遠心を行った。さらにペレットを 5% FCS 含有 PBS で懸濁した。レンチウイルスの力価は Lentivirus qPCR Titer kit (Applied Biological Materials, Richmond BC, Canada) を用いて測定した。

2-7. 遺伝子改変 THP-1 細胞の作製

THP-1 細胞に対して、ヒト ASC、CASP1、CASP3、CASP8、GSDMD、GSDME 遺伝子の変異を CRISPR/Cas9 を用いて導入した。各々の遺伝子を標的としたガイド RNA (sgRNA) を THP-1 細胞に導入した。各々の sgRNA は CRISPR direct で設計した。設計した sgRNA はピューロマイシン耐性遺伝子を持つ LentiCRISPRv2、もしくはブラストサイジン耐性遺伝子を持つプラスミドに導入した。LentiCRISPRv2 プラスミドは Addgene (Watertown, MA) より提供された。

作製したレンチウイルスベクターと THP-1 細胞を 8 $\mu\text{g/mL}$ ポリブレン (Sigma-Aldrich) 含有 RPMI 培地で 16 時間培養した。2 $\mu\text{g/mL}$ ピューロマイシンで 3 日間培養することで、プラスミド導入細胞の選択を行った。二重欠損細胞を作製する場合、さらに 10 $\mu\text{g/mL}$ ブラストサイジン S 塩酸塩による導入細胞の選択を 3 日間行った。

2-8. NLRP3D303N-THP-1 細胞の作製

THP-1 細胞に、CSIV TRE NLRP3D303N CMVKT レンチウイルスベクターを MOI 300 にて形質導入を行った。さらに限界希釈法により、遺伝子導入細胞を樹立した。

CASP1 KO もしくは ASC KO NLRP3D303N-THP-1 細胞は、各々の sgRNA を導入した LentiCRISPRv2 ベクターを NLRP3D303N-THP-1 細胞に導入して作製した。2 $\mu\text{g/mL}$ ピューロマイシンで 3 日間培養することで導入細胞の選択を行った。

2-9. HeLa 細胞への一過性遺伝子導入

HeLa 細胞を 1×10^5 細胞/mL で播種し、24 時間培養を行った。さらに Lipofectamine 2000 含有培地で HeLa 細胞と、NLRP3D303N、ASC、Caspase-1、GSDMD、GSDME それぞれのプラスミドを培養することによりトランスフェクションした。トランスフェクション 6 時間後に Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に培地交換を行った。

2-10. IL-1 α / β の測定

培養上清中の IL-1 α 、IL-1 β は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。

2-11. LDH の測定

培養上清中の lactate dehydrogenase (LDH) 酵素活性は、Cytotoxicity Detection kit (Roche, Mannheim, Germany)を用いて測定した。最大 LDH 酵素活性は、2% TritonX-100 によるものとし、ウサギ筋肉 L-Lactate Dehydrogenase (Roche) をスタンダードとして用いた。

2-12. 死細胞の評価

死細胞の核酸のみを染色する SYTOX Green 試薬 (SYTOXG; Thermo Fisher Scientific) を用いて評価した。細胞数の評価は、核染色用試薬である Hoechst33342 (株式会社同仁化学研究所、熊本)を使用した。まず、1 μ g/mL Hoechst 33342 を細胞培養液に添加し、20 分培養した。さらに 100 nM SYTOXG を添加した培地に交換した。SYTOXG 含有培地に交換 30 分後に細胞刺激を行い、マルチ検出モードマイクロプレートリーダー (Spark; TECAN, Switzerland)を用いて 37°C、5%CO₂ の条件下で継続的に蛍光強度を測定した。

2-13. 細胞死のイメージング

細胞死のイメージングは 8-well カバーガラスチャンバー (IWAKI, 静岡)を用いて行った。マウス腹腔由来マクロファージについては 2.5×10^5 細胞、カバーガラスチャ

ンバーに播種し Pam3CSK4 で 18 時間のプライミングを行った。1 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 添加後 20 分培養後、100 nM SYTOXG を添加した培地に交換した。細胞刺激を行った時間を 0 時間として共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, 東京) で観察を行った。

NLRP3 D303N-THP-1 細胞を 1×10^5 細胞、ガラスチャンバーに播種、200 nM PMA で 48 時間処理し、マクロファージ様に分化させた。1 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 添加後 20 分培養後、100 nM SYTOXG を添加した培地に交換、ドキシサイクリン (Dox) による刺激を行った時間を 0 時間として共焦点顕微鏡で観察を行った。

HeLa 細胞は 2.5×10^4 細胞、カバーガラスチャンバーに播種し 24 時間培養を行った。NLRP3D303N、ASC、Caspase-1、GSDMD、GSDME それぞれのプラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、6 時間培養した。Opti-MEM に培地交換し 24 時間培養後、共焦点顕微鏡で観察を行った。観察の前に 1 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst33342、100 nM SYTIXG で HeLa 細胞を標識した。

2-14. Crosslinking assay

細胞を Cross-linking Buffer (20 mM リン酸緩衝液、pH8.0、150 mM NaCl、1%NP40) により溶解し、遠心分離後の上清を反応に用いた。細胞抽出液は氷上にて 2 mM Bis(sulfosuccinimidyl) suberate disodium salt (BS3) 存在下で架橋され、架橋反応は終濃度 10 mM の Glycine を添加することにより停止した。

2-15. Western blot 法

細胞からの蛋白抽出は RIPA Buffer を用いて行った。抽出した蛋白質は 1×Laemmli Sample Buffer を加えて 95℃、5 分間処理し、SDS-PAGE で分離、PDVF 膜へ転写した。転写後の PDVF 膜を Blocking ONE（ナカライテスク株式会社、京都）で室温、1 時間ブロッキングし、4℃、over night で各 1 次抗体をインキュベートした。

続いて各 1 次抗体に対する Horseradish peroxidase（HRP）付き 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、Western BLoT Quant HRP Substrate もしくは Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate（タカラバイオ株式会社）を用いて化学発光させ、Amersham680（GE healthcare Life Sciences, NJ, USA）でバンドの検出を行った。β-actin の発現量を内在性コントロールとして使用した。

使用抗体

	抗体	製造元	製品番号
1 次抗体	Rabbit monoclonal anti-caspase-1 (D7F10)	Cell Signaling	#3866
	Rabbit monoclonal anti-caspase-3(8G10)	Cell Signaling	#9665
	Rabbit monoclonal anti-cleaved caspase-8	Cell Signaling	#9496
	Rabbit monoclonal anti-cleaved caspase-8	Cell Signaling	#8592
	Mouse monoclonal anti-Caspase-8	Cell Signaling	#9746
	Rat monoclonal anti-Caspase-11 (17D9)	Cell Signaling	#14340
	Rabbit polyclonal anti-GSDMD	Cell Signaling	#50928
	Rabbit polyclonal anti-GSDMD	Sigma-Aldrich	G7422

	Rabbit monoclonal anti-GSDMD	Abcam	ab209845
	Rabbit monoclonal anti-GSDME	Abcam	ab215191
	Mouse monoclonal anti-NLRP3	Adipogen	AG-20B-0014
	Rabbit polyclonal anti-ASC	Adipogen	AG-25B-0006
	Mouse monoclonal anti-Caspase-1 (p20)	Adipogen	AG-20B-0042-C100
	Rabbit polyclonal anti-IL-1 β	Santa Cruz	sc-7884
	Goat polyclonal anti-IL-1 β	R&D	AF-401-NA
	Goat polyclonal anti-IL-1 α	R&D	AF-400-SP
	anti- β -actin	Sigma-Aldrich	A5441
2 次抗体	HRP-goat anti-Mouse Superclonal IgG	Thermo Fisher Science	A28177
	HRP-goat anti-rabbit IgG	Cell Signaling	#7074

< 試薬組成 >

RIPA Buffer

20 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X, 10% glycerol, 1% deoxycholic acid,
0.1% SDS, 50 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇·10H₂O

2-16. フローサイトメトリー

NLRP3D303N-THP-1 細胞に Dox 添加により惹起される細胞死を、フローサイトメトリーを用いて評価した。Dox 添加 8 時間後に細胞を PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Jose, CA) により染色し、Flow Jo software version10 (Tree Star, CA, USA) を用いて解析した。

2-17. 統計学的解析

数値データは平均値±標準誤差（standard error of the mean: SEM）で表示した。多群間比較には ANOVA と Tukey's post hoc test を、反復測定による多群間比較には repeated one-way ANOVA もしくは repeated two-way ANOVA を用いた。統計解析は Prism（Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA）を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. NLRP3 インフラマソームの活性化により惹起される細胞死の評価

最初に、WT マウス、NLRP3^{-/-}マウス、Casp1/11^{-/-}マウスおよび ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マウスの腹腔マクロファージを用いて、NLRP3 インフラマソームの活性化により惹起される細胞死の確認を行った。WT マクロファージで認められる Nigericin 刺激 1 時間での LDH 放出が、NLRP3^{-/-}および Casp1/11^{-/-}マクロファージでは有意に抑制されていた(図 1A、B)。刺激 6 時間後でも、NLRP3^{-/-}からの LDH 放出は抑制されている一方で、Casp1/11^{-/-}マクロファージからは LDH 放出が認められることから、NLRP3 インフラマソーム活性化は Caspase-1/11 非依存的なネクロシス様細胞死を誘導しうることが示唆された。

ASC は NLRP3 インフラマソームにおける中心的な役割を担っていることが知られている (2)。そこで NLRP3 インフラマソーム活性化時に惹起される Caspase-1/11 非依存的なネクロシス様細胞死における ASC の機能を評価するため、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージを使用して細胞死を評価した。Nigericin 刺激 1 時間後での LDH 放出は、WT マクロファージに比較し、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}および Casp1/11^{-/-}マクロファージでは有意に抑制されていた。Nigericin 刺激 6 時間後における ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージからの LDH 放出は、刺激 1 時間後と同様に WT マクロファージに比較し有意に抑制されていた。しかしながら、Casp1/11^{-/-}マクロファージにおける刺激 6 時間後の LDH 放出は、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージに比較して有意に増加しており、さらに刺激後経時的に増加傾向を示した(図 2A)。また上清中の IL-1 β 濃度に関しては、刺激 1 時間から 6 時間後においても ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}

および Casp1/11^{-/-}マクロファージともに WT マクロファージに比較して有意に抑制されていた(図 2B)。一方で、WT マクロファージに比較して ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージからの IL-1 α 分泌は、IL-1 β と同様に有意に抑制されているのに対して、Casp1/11^{-/-}マクロファージからの IL-1 α 放出抑制は認められなかった(図 2C)。つまり、Casp1/11^{-/-}マクロファージでは、WT マクロファージに比較して遅れたタイミングで IL-1 α 分泌を伴ったネクローシス様細胞死が誘導されてくることが明らかとなった。

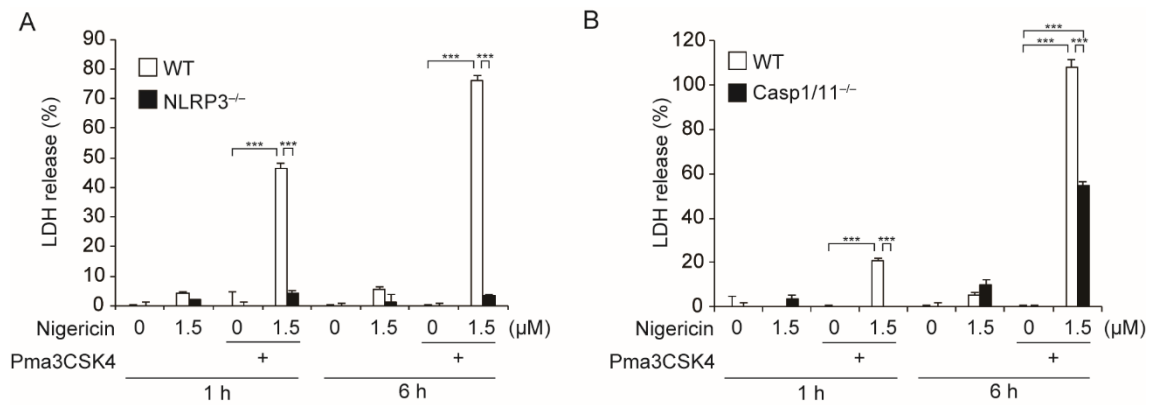


図1. WT、NLRP3^{-/-}、Casp1/11^{-/-}マクロファージからの LDH 放出

WT、NLRP3^{-/-}、Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間のプライミング刺激のち、Nigericin 刺激 1 時間後、6 時間後の培養上清中を回収、解析した。

A. WT マクロファージと NLRP3^{-/-}マクロファージからの LDH を測定した(各 n = 3)。

B. WT マクロファージと Casp1/11^{-/-}マクロファージからの LDH を測定した(各 n = 3)。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

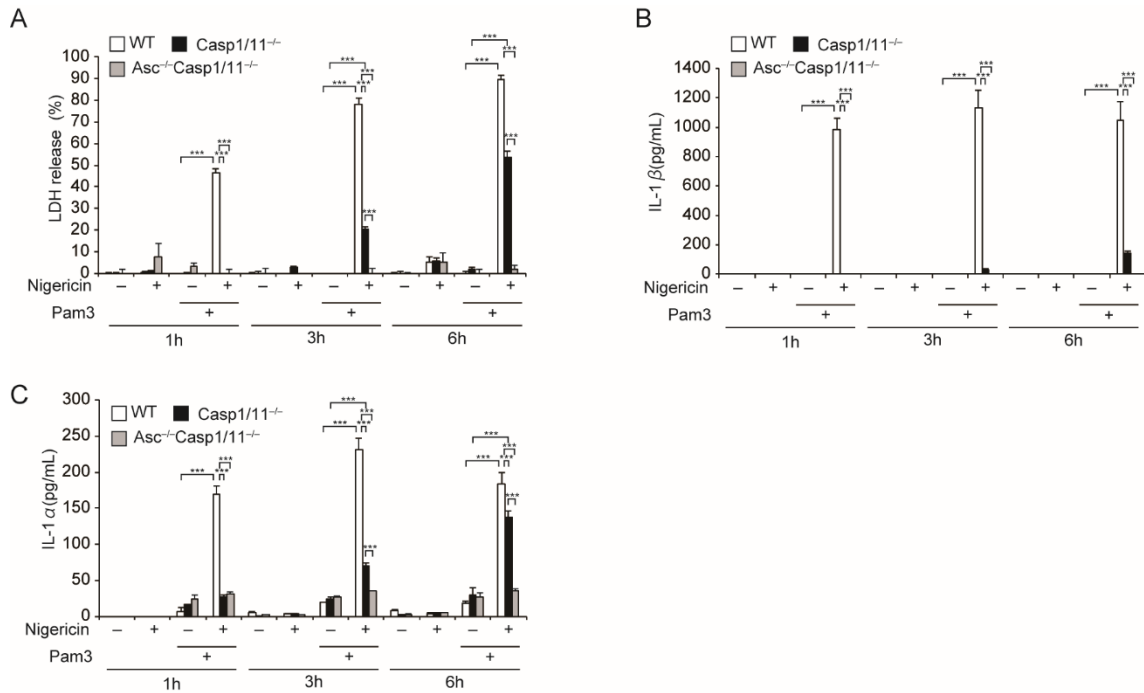


図 2. WT、Casp1/11^{-/-}、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージからの LDH、IL-1α、IL-1β 産生

WT、Casp1/11^{-/-}、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激 1、3、6 時間後の培養上清を回収、解析した。

A. 培養上清中の LDH を測定した (各 n=3)。

B. ELISA 法により培養上清中の IL-1β を測定した (各 n=3)。

C. ELISA 法により培養上清中の IL-1α を測定した (各 n=3)。

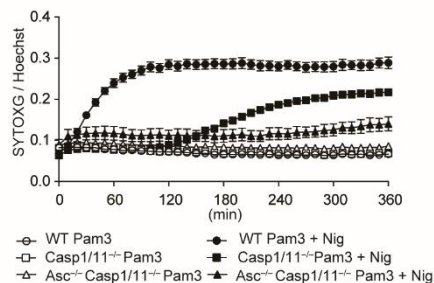
データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

次に、Casp1/11^{-/-}マクロファージで惹起される細胞死の経時的変化を、SYTOXG を用いて評価した。WT マクロファージでは刺激後約 30 分で細胞死が惹起されるのに対し、Casp1/11^{-/-}マクロファージは刺激後 150 分程度で細胞死が惹起されており、Casp1/11^{-/-}マクロファージでは遅れて細胞死が惹起されてくることが明らかとなった (図 3A)。さらにこの Casp1/11^{-/-}マクロファージにおける細胞死惹起時間の遅延は、共焦点顕微鏡によっても確認した (図 3B)。さらに共焦点顕微鏡強拡大像ではパイロトーシスの特徴である膨潤した細胞が WT および Casp1/11^{-/-}マクロファージともに確

認できたが、核の凝集は WT マクロファージよりも Casp1/11^{-/-}マクロファージでより顕著に観察された(図 4A、B)。

マウスマクロファージで確認された、NLRP3 インフラマソーム活性化により惹起される Caspase-1 非依存的な細胞死がヒト細胞でも観察されるか確認するため、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞を使用した。200 nM PMA 含有培地で 48 時間培養することによりマクロファージ様に分化させ、Nigericin によるインフラマソーム刺激を行った。マウスマクロファージと同様に、培養上清中への LDH 放出は ASC KO 細胞では有意に抑制される一方、Caspase-1 KO (CASP1 KO) 細胞ではコントロール細胞との間に有意な差を認めなかった(図 5A)。さらに SYTOXG による細胞死の経時的変化の評価でも、マウスマクロファージ同様に CASP1 KO 細胞における細胞死惹起時間の遅延が認められた(図 5B-D)。

A



B

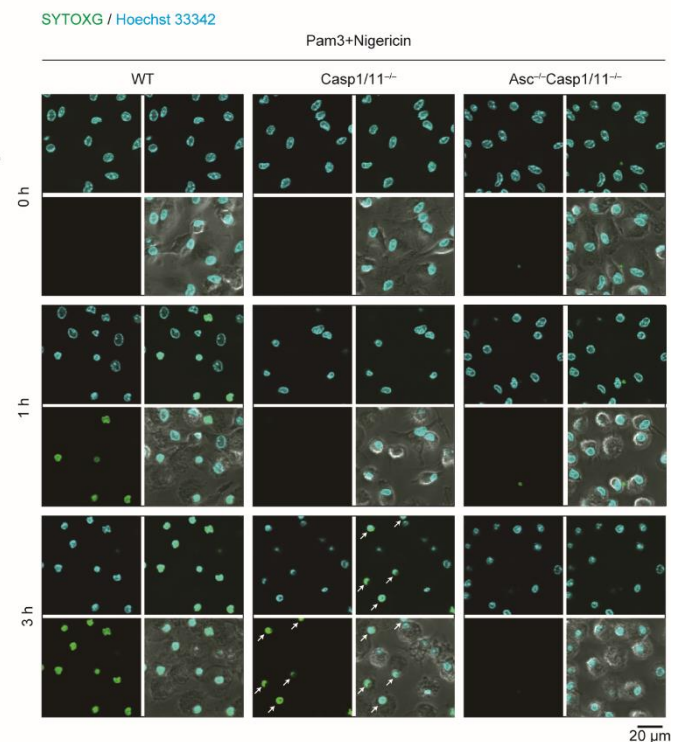


図 3. WT、Casp1/11^{-/-}、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージで惹起される細胞死の経時的変化

WT、Casp1/11^{-/-}、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激で惹起される細胞死の経時的変化を Hoechst33342 と SYTOXG を用いて解析した。

- A. SYTOXG 蛍光強度／Hoechst33342 蛍光強度を 10 分毎に評価した(各 n=6)。
- B. 共焦点顕微鏡で SYTOXG 陽性、Hoechst33342 陽性細胞を Nigericin 刺激 0、1、3 時間後で観察した。

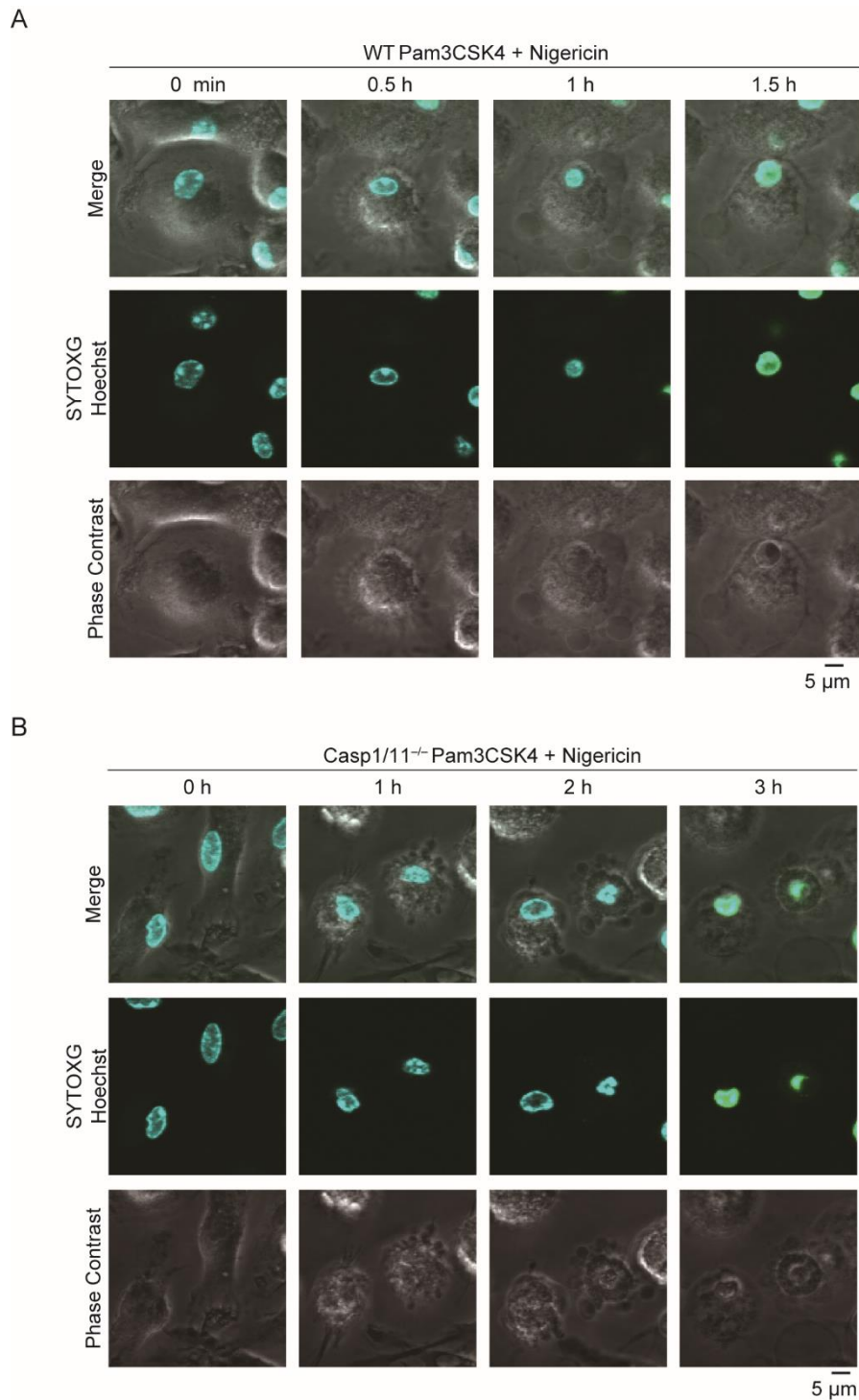


図 4. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージで惹起される細胞死の経時的変化

WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激で惹起される細胞死の経時的変化を Hoechst33342 と SYTOXG を用いて共焦点顕微鏡で観察した。

A. WT マクロファージを Nigericin 刺激 0、0.5、1、1.5 時間後に共焦点顕微鏡で観察した。

B. Casp1/11^{-/-}マクロファージを Nigericin 刺激 0、1、2、3 時間後に共焦点顕微鏡で観察した。

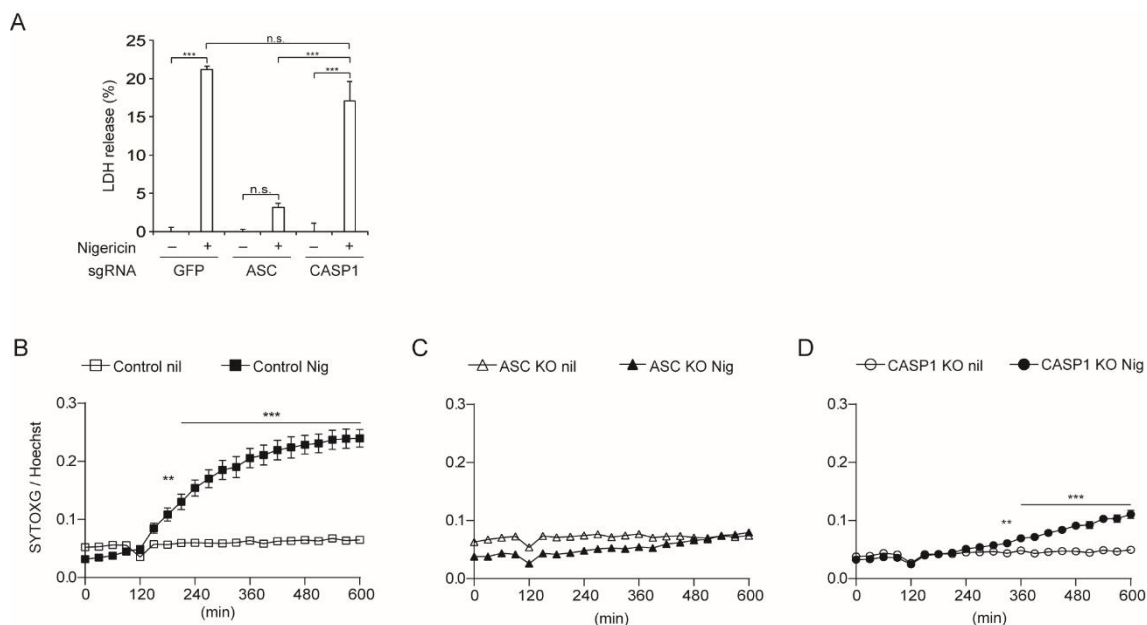


図 5. コントロール細胞、ASC KO、CASP1 KO THP-1 細胞からの LDH、SYTOXG の解析

コントロール、ASC KO、CASP1 KO THP-1 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Nigericin 5 μ M 刺激により惹起される細胞死を評価した。

A. コントロール、ASC KO、CASP1 KO THP-1 細胞の Nigericin 刺激 8 時間後の培養上清中の LDH 放出を測定した (n = 3)。

B-D. コントロール、ASC KO、CASP1 KO THP-1 細胞に Nigericin と同時に SYTOXG、Hoechst33342 を添加し、SYTOXG 蛍光強度/Hoechst33342 蛍光強度を 30 分毎に評価した (各 n = 3)。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

3-2. NLRP3D303N-THP-1 細胞を用いた細胞死の解析

Nigericin による非特異的な細胞死の可能性を排除するため、クリオピリン関連周期熱症候群の原因である NLRP3 活性型変異体 (NLRP3D303N) と TET-ON プロモーターを用い、Dox 誘導性に恒常活性化型 NLRP3 を発現する培養マクロファージ細胞株 (NLRP3D303N-THP-1 細胞) を樹立した (図 6A)。Western blot 法による解析で、作製した細胞では Dox 濃度依存的に NLRP3 の発現が誘導されることを確認した (図 6B)。また、Dox 濃度依存的に培養上清中への LDH、IL-1 β の放出が増加することも確認した (図 7A、B)。さらに Dox による NLRP3 活性化が細胞膜透過性の亢進を誘導し、パイロトーシスを惹起することをフローサイトメトリーで確認した (図 7C)。

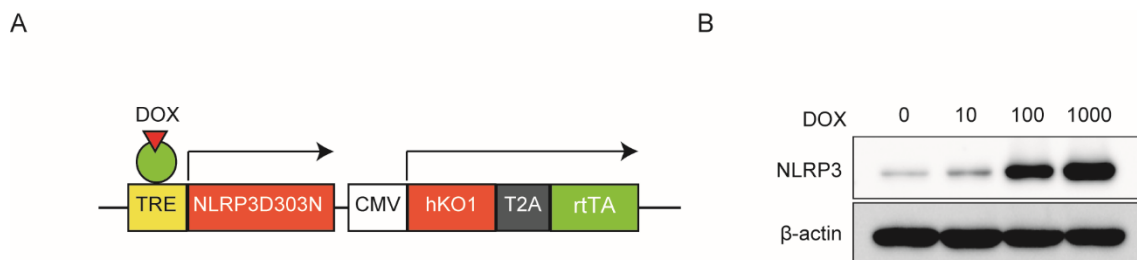


図 6. NLRP3D303N-THP-1 細胞の作製

- A. TET-ON プロモーターと NLRP3D303N を組み込んだレンチウイルスベクター。
- B. NLRP3D303N-THP-1 細胞を PMA で 24 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Dox 刺激 6 時間後に NLRP3 の発現を Western blot 法で解析した。

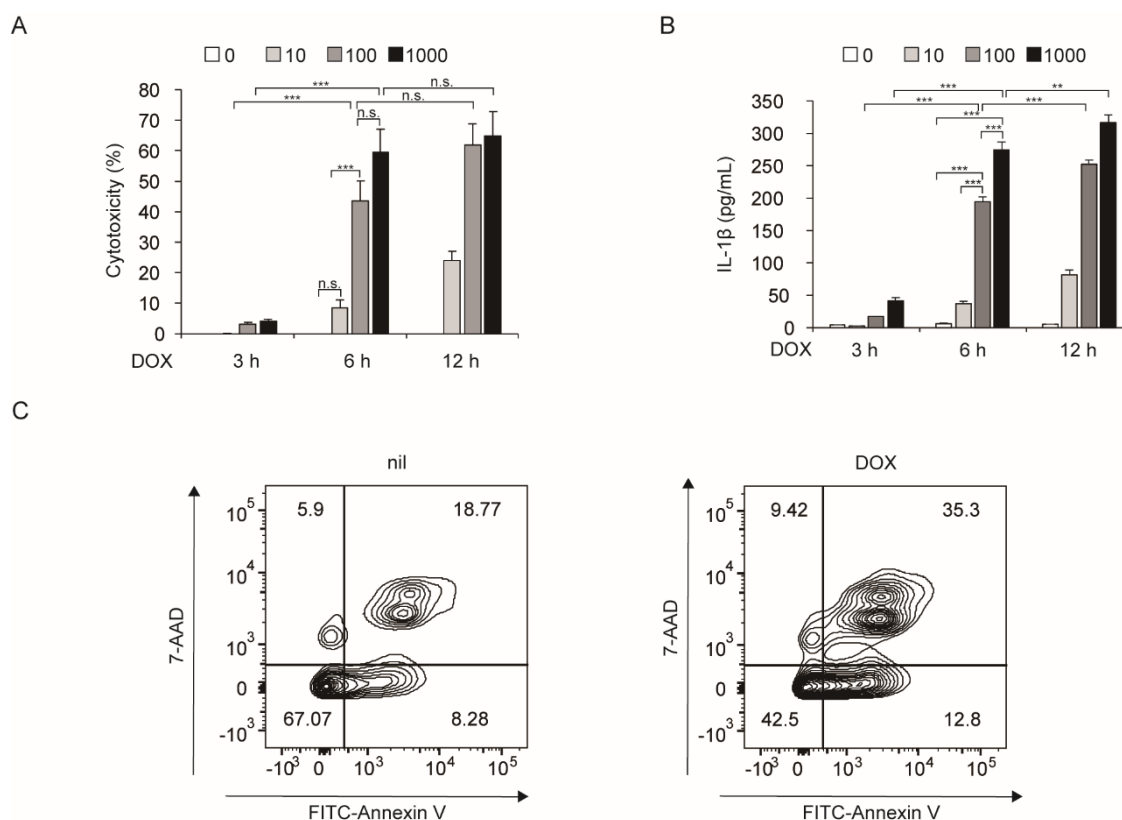


図 7. NLRP3D303N-THP-1 細胞を用いた解析

A-C. NLRP3D303N-THP-1 細胞を PMA で 24 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Dox 刺激による NLRP3 活性化で惹起される細胞死を評価した。

- A. Dox 刺激 3、6、12 時間後の培養上清中の LDH を測定した (n = 3)。
 B. Dox 刺激 3、6、12 時間後の培養上清中の IL-1 β を ELISA 法を用いて測定した (n = 3)。
 C. Dox 刺激 6 時間後の細胞死 (7-AAD 陽性、Annexin V 陽性:パイロトーシスした細胞を含む死細胞群、7-AAD 陰性、Annexin V 陽性:アポトーシス細胞群)をフローサイトメトリーで解析した

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

次に、ASC KO もしくは CASP1 KO NLRP3D303N-THP-1 細胞を作製し(図 8A)、Dox 誘導による LDH 放出を確認した。ASC KO NLRP3D303N-THP-1 (ASC KO D303N)細胞では LDH 放出が抑制されていたが、CASP1 KO NLRP3D303N-THP-1 (CASP1 KO D303N)細胞では Dox 刺激 18 時間後より LDH の放出が認められた

(図 8B)。NLRP3D303N-THP-1 細胞は、蛍光色素である Kusabira-Orange1 (KO1) が恒常的に発現しており(図 6A)、パイロトーシスによる細胞膜障害が起こると細胞質成分の漏出が惹起され KO1 の減弱が認められる。コントロール細胞では、Dox 刺激 6 時間後に KO1 の減弱と SYTOXG の増強が確認できた(図 9A、9B)。一方で、CASP1 KO D303N 細胞では、刺激 18 時間後で KO1 の減弱が認められた(図 9A)。さらにパイロトーシス惹起よりも早いタイミングでは、アポトーシス細胞の特徴である核の凝集が認められた(図 9C)。SYTOXG を用いた細胞死の経時的評価では、コントロール細胞では Dox 刺激 4 時間後から細胞死が惹起されているのに対して、CASP1 KO D303N 細胞では 16 時間後からに遅延していた(図 10A、C)。一方で ASC KO D303N 細胞では細胞死の惹起は認められなかった(図 10B)。

以上の結果より、NLRP3 インフラマソームの活性化は、ASC を介した Caspase-1 非依存的なネクローシス様細胞死を惹起することが示唆された。

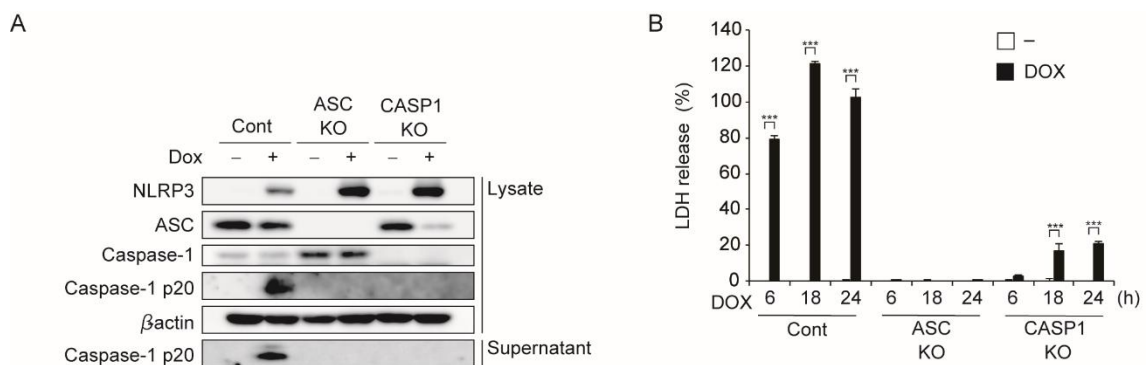


図 8. コントロール、ASC KO、CASP1 KO D303N 細胞を用いた解析

コントロール、ASC KO、CASP1 KO D303N 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Dox による NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導し解析した。

A. それぞれの細胞に、Dox 添加 6 時間後の蛋白の発現を Western blot 法で確認した。

B. それぞれの細胞に、Dox 添加 6、18、24 時間後の培養上清中の LDH を測定した (n = 3)。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

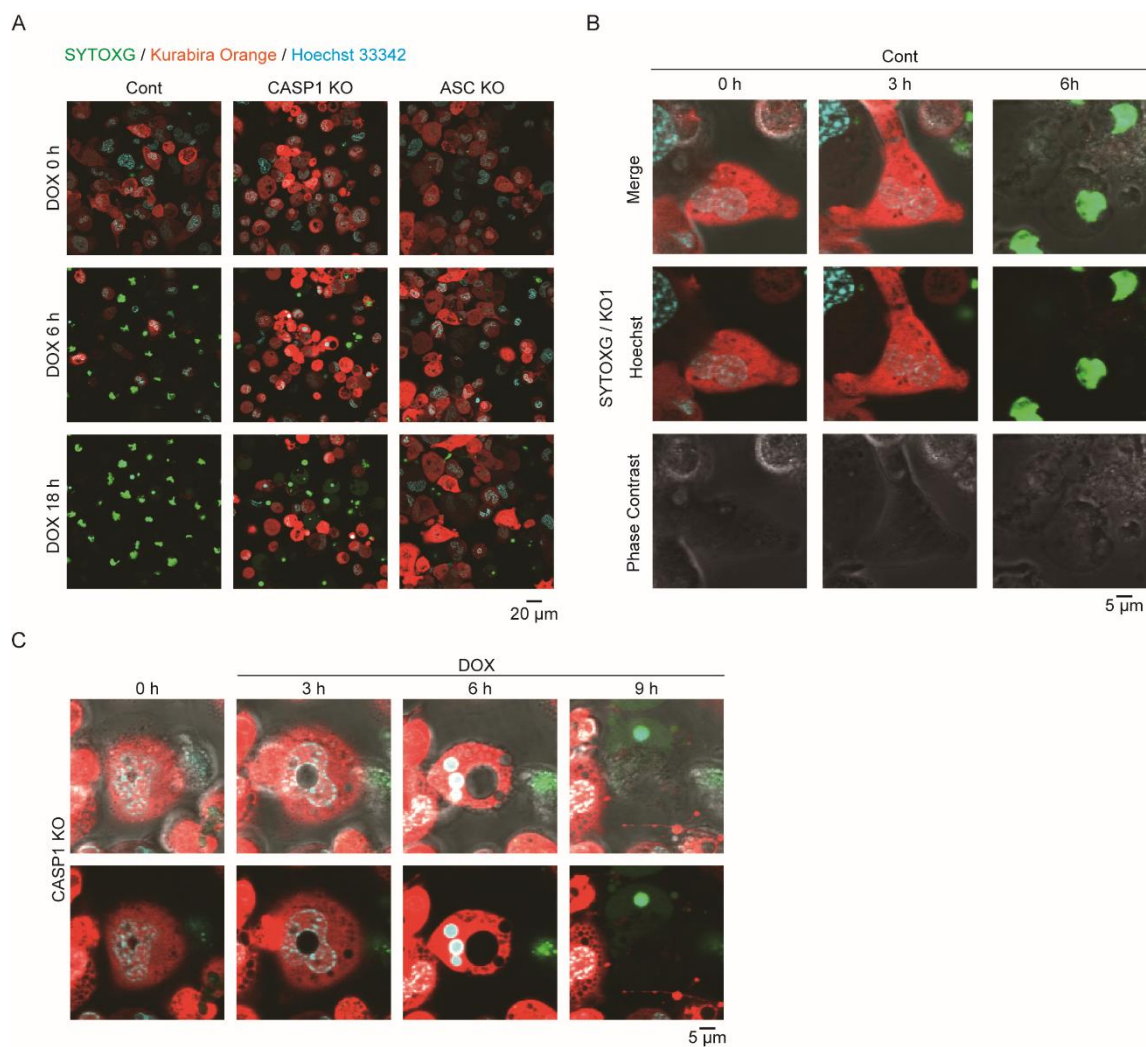


図 9. SYTOXG を用いた細胞死の観察

コントロール、ASC KO、CASP1 KO D303N 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Hoechst33342、SYTOXG、Dox を添加して解析した。

- A. それぞれの細胞への Dox 添加 0、6、18 時間後の変化を共焦点顕微鏡で観察した。
- B. コントロール細胞を Dox 添加 0、3、6 時間後に共焦点顕微鏡強拡大で観察した。
- C. CASP1 KO D303N 細胞に Dox 添加 0、3、6、9 時間後の変化を共焦点顕微鏡で観察した。

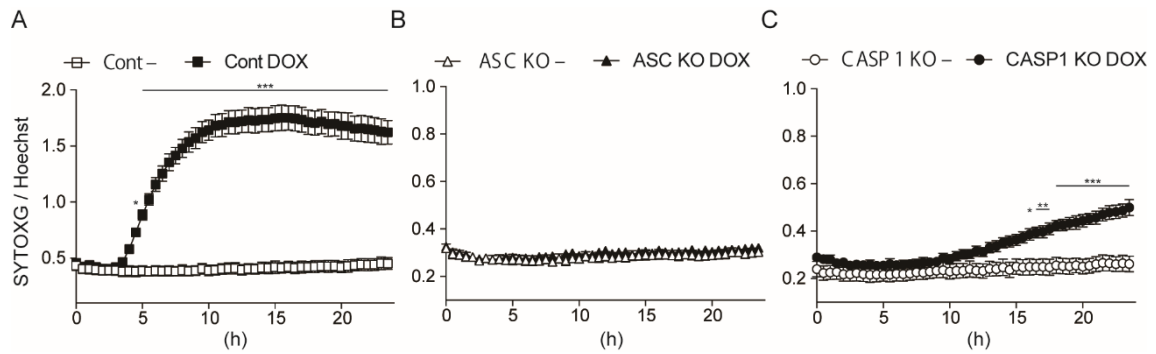


図 10. SYTOXG を用いた細胞死の経時的変化

A-C. コントロール、ASC KO、CASP1 KO D303N 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Hoechst33342、SYTOXG、Dox を添加。SYTOXG 蛍光強度／Hoechst33342 蛍光強度を 30 分毎に評価した(各 n=5)。

$P < 0.05$ であるものを*、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

3-3. 阻害剤を用いた細胞死の評価

これまでに、Caspase-8 は Caspase-1/11 非依存的細胞死におけるイニシエーターカスパーゼとして機能することが報告されている (16)。そこで、Caspase-1/11 非依存的細胞死はパンカスパーゼ阻害剤により抑制されるのではないかと考えた。予想通り、パンカスパーゼ阻害剤の Z-VAD により、Caspase1/11^{-/-}マクロファージからの LDH 放出は有意に抑制されていた (図 11A)。SYTOXG と共焦点顕微鏡での経時的評価では、細胞死惹起時間は遅延するものの、ネクロシス様細胞死は惹起されていることが確認された (図 11B、C)。また、CASP1 KO D303N 細胞でもマクロファージと同様に、Z-VAD により LDH の放出は抑制されており、経時的な評価では細胞死惹起時間の遅延が観察された (図 12A、B)。

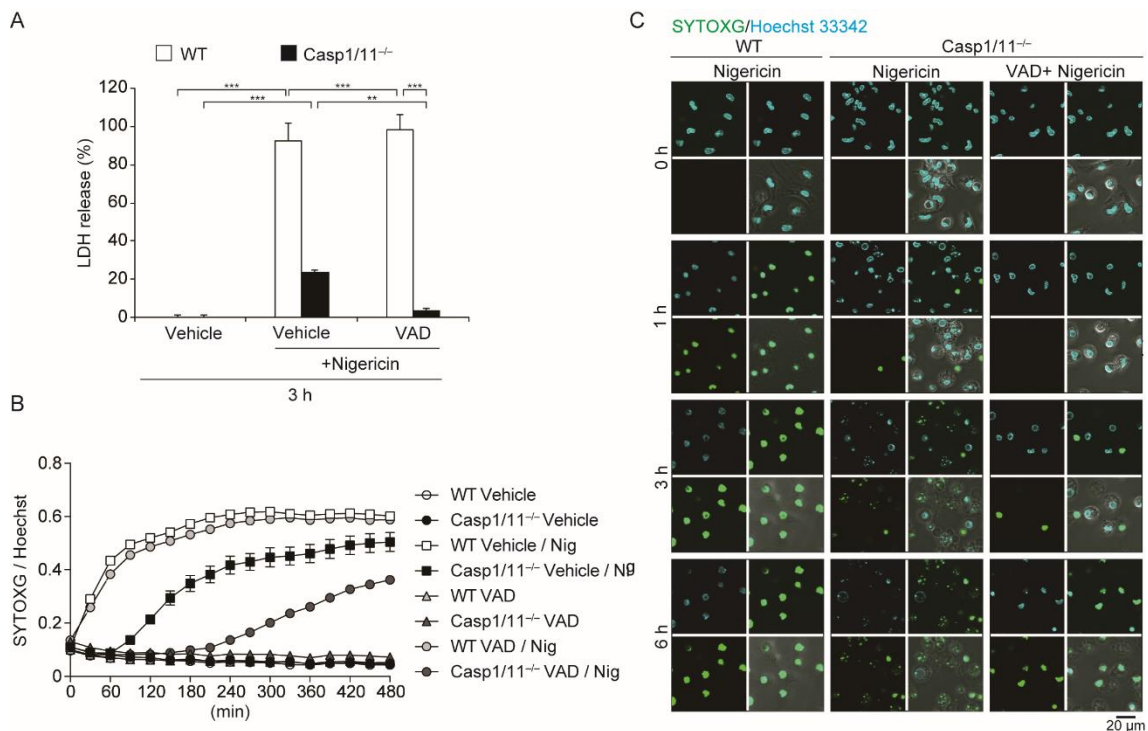


図 11. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージと Z-VAD を用いた細胞死の解析

WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージに Z-VAD を 30 分添加したのち、Nigericin 刺激を行い解析した。

A. Nigericin 刺激 3 時間後の培養上清中の LDH を測定した。(n = 3)

B-C. Nigericin と Hoechst33342、SYTOXG を同時に添加し、解析した。

B. SYTOXG 蛍光強度/Hoechst33342 蛍光強度を 30 分毎に評価した(各 n = 3)。

C. 共焦点顕微鏡での経時的な変化を観察した。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

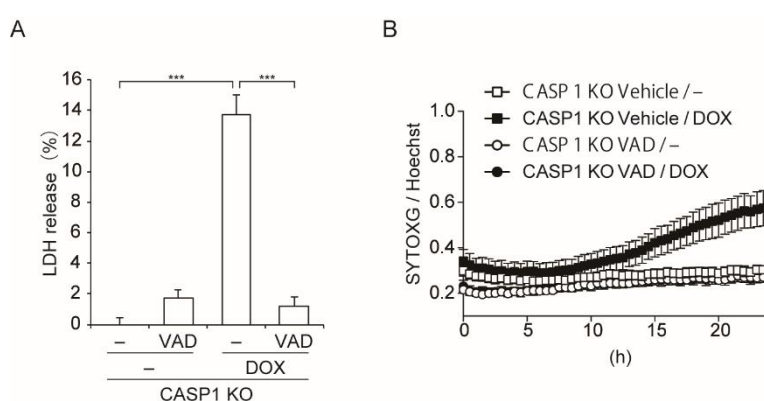


図 12. CASP1 KO D303N 細胞と Z-VAD を用いた細胞死の解析

コントロール、CASP1 KO D303N 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Z-VAD を 30 分間添加、Dox による NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導し解析した。

A. Dox 添加 3 時間後の培養上清中の LDH を測定した(n = 3)。

B. SYTOXG 蛍光強度/Hoechst33342 蛍光強度を 30 分毎に評価した(各 n = 5)。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

Caspase-8 は RIPK3 の活性化を阻害することにより、ネクロプトーシスを阻害していることが報告されている (6) 。Z-VAD 存在下で遅れて観察される細胞死は、

Caspase-8 の阻害によって引き起こされるネクロプトーシスではないかと考え、RIPK3 の阻害剤である GSK'872 と、Z-VAD を併用して評価を行った。Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおける LDH 放出は、Z-VAD 単独使用に比較して有意に抑制されており、細胞死惹起時間はさらに遅延していた(図 13A、B)。LDH 放出と同様、培養上清

中の IL-1 α は GSK'872 と Z-VAD の併用では Z-VAD 単独使用に比較して有意に抑制されていた (図 13C)。一方で、GSK'872、Z-VAD の使用の有無にかかわらず IL-1 β の分泌は認めなかった (図 13D)。

これらの結果より、NLRP3 活性化により惹起される Caspase-1/11 非依存的な細胞死には、カスパーゼを介したパイロトーシスと、RIPK3 を介したネクロプトーシスが含まれることが示唆された。

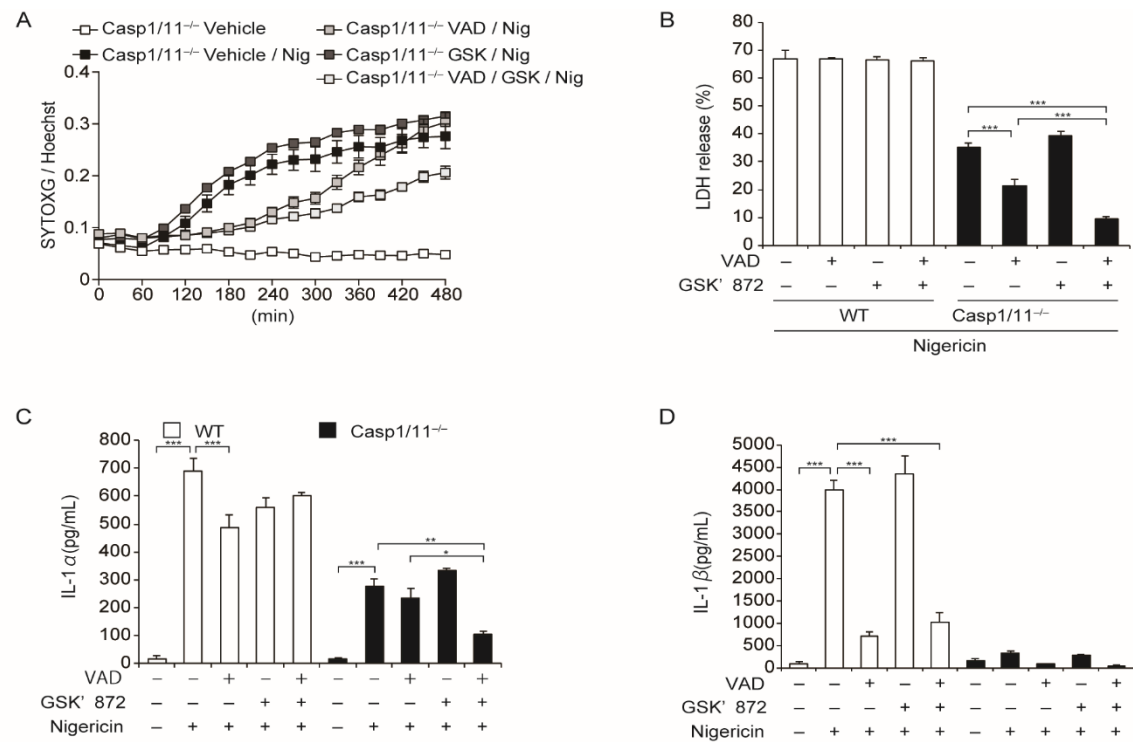


図 13. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージと Z-VAD、GSK'872 を用いた細胞死の解析

WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージに Z-VAD、GSK'872 を 30 分添加し、Nigericin 刺激を行い解析した。

- A. Nigericin と同時に Hoechst33342、SYTOXG を添加。SYTOXG 蛍光強度／Hoechst33342 蛍光強度を 30 分毎に評価した (各 n = 3)。
- B-D. Nigericin 刺激 3 時間後の培養上清を解析した。
- B. LDH を測定した。 (n = 3)
- C. IL-1 α を測定した。 (n = 3)
- D. IL-1 β を測定した。 (n = 3)

データは平均値＋標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ であるものを*、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

3-4. Caspase-1/11 非依存的細胞死に関与する因子の解析

NLRP3 活性化により、惹起される細胞死がパイロトーシスとネクロプトーシスであることが明らかになったことから、その細胞死を惹起する責任分子としてカスパーゼとガスダーミンの評価を行った。WT マクロファージでは、Nigericin 刺激により Caspase-1 の活性化と GSDMD の切断が認められたが、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージではそれらが完全に抑制されており、代わりに Caspase-3,8 の活性化が確認された(図 14A)。2017 年に Wang らにより、Caspase-3 が GSDME を切断することでパイロトーシスが誘導されることが報告された (23)。そこで、GSDMD、GSDME の切断について確認したところ、ASC^{-/-}Caspase-1/11^{-/-}マクロファージでは GSDMD、GSDME ともに活性化が認められなかったが、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージでは GSDME の切断のみが確認できた(図 14A)。さらに、CASP1 KO THP-1 細胞、CASP1 KO D303N 細胞においても、Nigericin、Dox それぞれの刺激により Caspase-3,8 の活性化と GSDME の切断を確認した(図 14B、C)。これまでの結果より、WT マクロファージに比較して、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおいては細胞死の惹起が遅延していることから、GSDME の活性化を経時的に評価した。細胞死惹起の遅延に一致するように、GSDME の活性化は刺激 1-3 時間にかけて強く誘導されていることが示された(図 15A)。過去の報告によると、ガスダーミンの N 末端領域はパイロトーシス中に、細胞膜中のホスファチジルイノシトールに結合することが知られている (14, 15)。そこで、TritonX - 114 を使用し膜タンパクを分離し、細胞膜分画中に含まれるガスダーミン N 末端領域(NT)を解析した。Nigericin 刺激によりパイロトーシスが誘導されている WT、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおける細胞膜分画中に、GSDMD、GSDME それぞれの N 末端領域が検出された(図 15B)。つまり、NLRP3 インフラマソーム活性

化時に誘導されるパイロトーシスの実行因子は、Caspase-1/11 存在下では GSDMD、Caspase-1/11 欠損下では GSDME であることが示唆された。

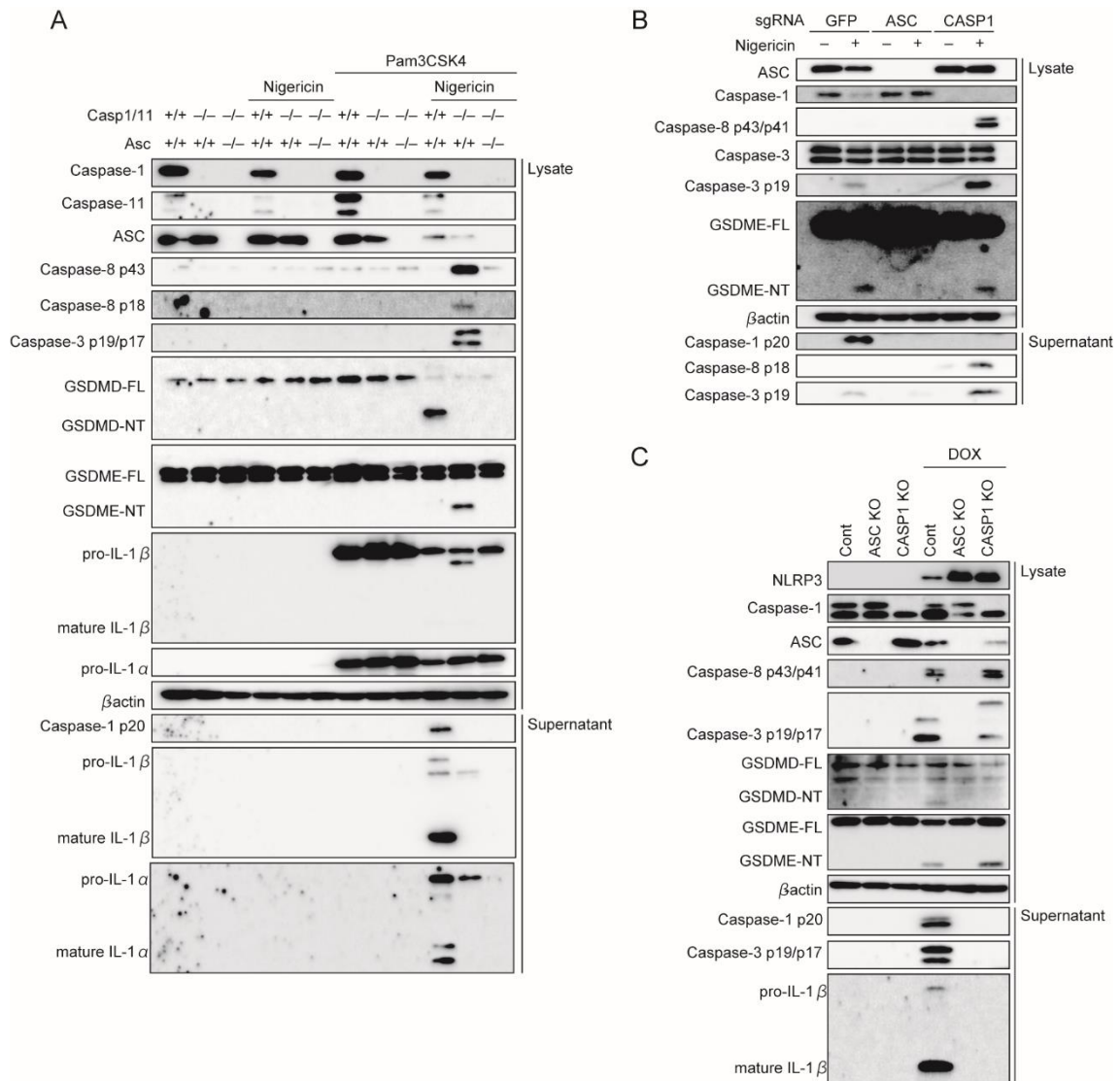


図 14. NLRP3 活性化が誘導する蛋白の発現および活性化

A. WT、Casp1/11^{-/-}、ASC^{-/-}Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激 3 時間後の蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

- B. コントロール細胞、ASC KO THP-1 細胞、CASP1 KO THP-1 細胞を PMA で 48 時間処理し、マクロファージ様に分化させた。Nigericin 刺激 8 時間後の蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。
- C. コントロール細胞、ASC KO D303N 細胞、CASP1 KO D303N 細胞を PMA で 48 時間処理し、マクロファージ様に分化させた。Dox 添加 18 時間後の蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

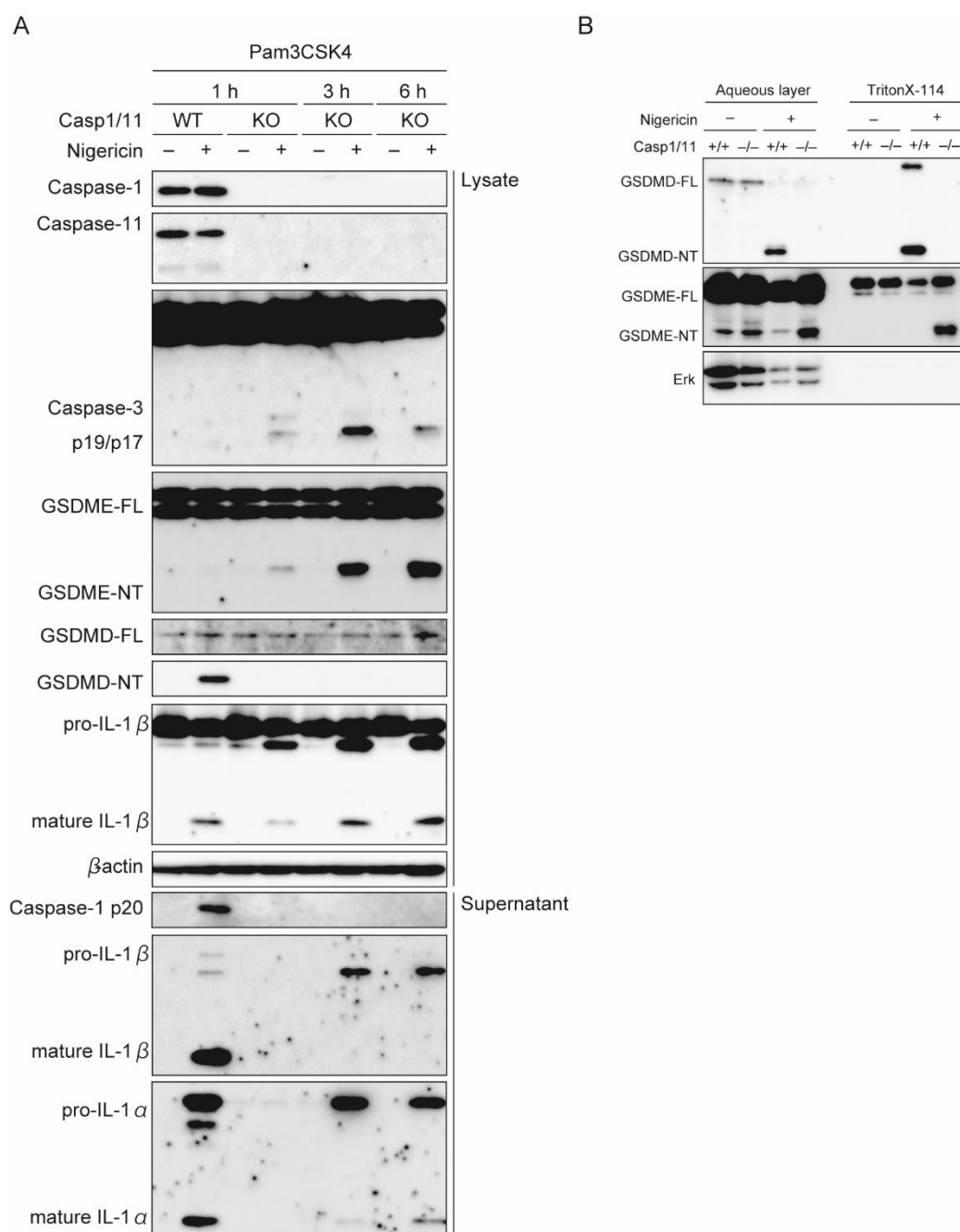


図 15. NLRP3 活性化が誘導する蛋白の発現および活性化の経時的変化と、細胞膜分画中の蛋白の解析

- A. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激 1、3、6 時間後の蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。
- B. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージを Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激 3 時間後に、Triton-X114 で細胞膜分画と可溶化分画に分離した。それぞれの蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

3-5. IL-1 β 分泌の解析

過去の報告では、Caspase-1 欠損下において、Caspase-8 は IL-1 β を切断するとの報告がある (16, 21)。しかし私のデータでは、Nigericin 刺激により Caspase-1/11^{-/-} マクロファージの細胞質中には、成熟型 IL-1 β がわずかし確認することができず、代わりに切断部位の異なった IL-1 β (28kDa) が、細胞質中に検出されていた (図 14A)。つまり、Caspase-8 が IL-1 β を切断する部位は通常切断される部位とは異なっており、Caspase-8 による切断では成熟型 IL-1 β (p17) は分泌されないことが示唆された。一方で WT マクロファージでは Nigericin 刺激により、培養上清中に少量の pro-IL-1 β が、さらに成熟型 IL-1 α/β は多量に検出することができた。そこで、私は pro-IL-1 β をパイロトーシス細胞内にとどめる、未知のメカニズムがあるのではないかと考えた。この細胞内にとどまった pro-IL-1 β を評価するため、Nigericin 刺激 3 時間後のパイロトーシスした WT マクロファージを TritonX - 100 で溶解、解析した。TritonX - 100 で処理することにより、成熟型 IL-1 β の量には変化がなかったが、pro-IL-1 β は著明に増加していた (図 16A)。次に pro-IL-1 β が、複合体を形成して細胞質基質に残存している可能性を考慮し、BS3 を用いたクロスリンクアッセイを行った。IL-1 β は高分子量のタンパク複合体として検出することができたが、ほとんどの IL-1 α は単量体として検出された (図 16B)。さらに、IL-1 β を細胞外へと分泌する際の、カスパーゼによるプロセシングの重要性を確認するために、IL-1 β の切断部位である Asp27 と Asp116 を置換し、切断されないヒト変異型 IL-1 β を作製し (図 17A)、これと変異型 IL-1 β と野生型 IL-1 β を NLRP3D303N-THP-1 細胞にレンチウイルスを用いて導入した。マウスマクロファージの結果と一致して、Dox により誘導されるパイロトーシスに伴って成熟型 IL-1 β の分泌が認められたが (図 17B、C)、変異型 IL-1 β (IL-1 β D116I、D27A/D226I) は Dox による NLRP3 インフラマソームの活性化でも切断されなかった (図 17B)。さら

に、パイロトーシス後の上清中には、パイロトーシスにより、野生型 IL-1 β は切断され培養上清中に検出されるが、変異型 pro-IL-1 β (IL-1 β D116I、D27A/D116I) はわずかにしか検出できなかった。さらに TritonX - 100 で細胞膜を可溶化したところ、上清中の変異型 pro-IL-1 β が増加していた (図 17D)。これらのことより、細胞外へ放出されなかった変異型 pro-IL-1 β は細胞内に残留していると考えられた。以上の結果より、pro-IL-1 β は細胞内複合体を形成し、さらにパイロトーシス細胞からの IL-1 β 分泌にはカスパーゼによるプロセッシングが必要であることが示唆された。

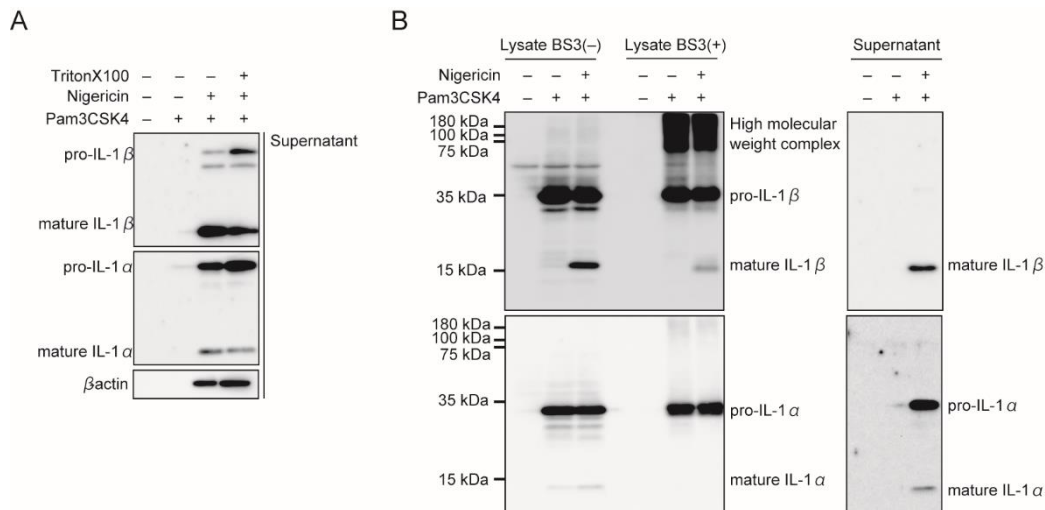


図 16. 細胞外へ分泌された IL-1 β の解析

WT マクロファージを、Pam3CSK4 で 18 時間の予備刺激ののち、Nigericin 刺激を行った。

- A. Nigericin 刺激 3 時間後に回収した培養上清を TritonX-100 による処理を行い、Western blot 法による解析を行った。
- B. Nigericin 刺激 30 分後に回収した Lysate を BS3 を用いてクロスリンクさせ、Western blot 法による解析を行った。

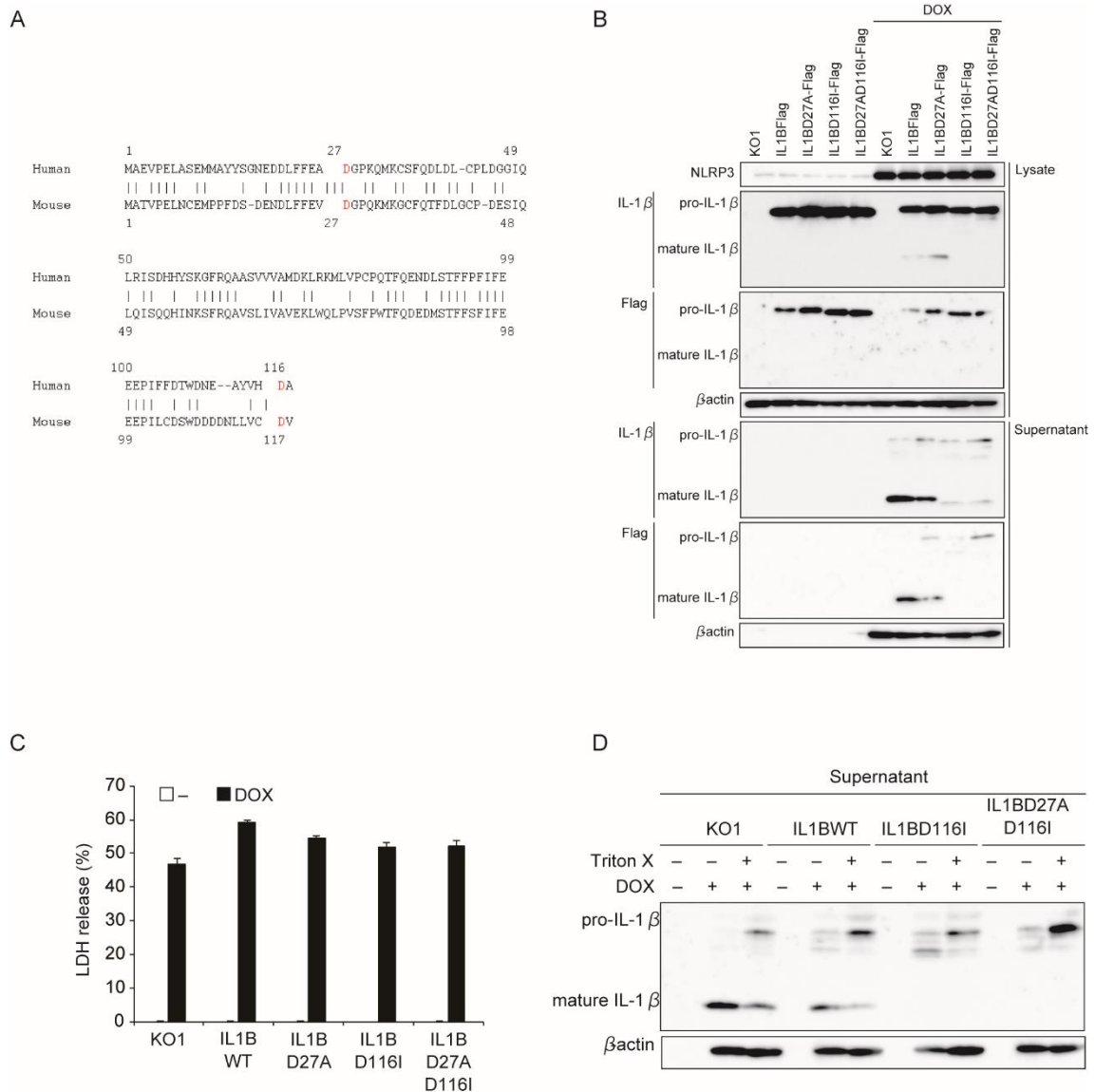


図 17. 変異型 IL-1 β を用いた解析

- A. ヒト IL-1 β (hIL-1 β) とマウス IL-1 β のアミノ酸配列。切断部位である ASP27 と ASP116 は赤文字で示した。
- B-D. 変異型 hIL-1 β (D27A、D116I、D27A/D116I) を導入した、NLRP3D303N-THP-1 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Dox 添加 6 時間後に解析した。
- B. 回収した培養上清、Lysate を Western blot 法で解析した。
- C. 培養上清中の LDH を測定した (n = 3)。
- D. Lysate を TritonX-100 で処理したのちに、IL-1 β の発現を Western blot 法で解析した。

3-6. Caspase-8 による GSDME 活性化の解析

これまでの結果より、NLRP3 活性化により惹起される Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスの実行因子は、GSDME であることが示された。そこで、GSDME 活性化に対する Z-VAD の影響を評価した。まず、WT マクロファージにおける Caspase-1 と、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおける Caspase-8/3 の活性化は、Z-VAD により抑制された(図 18A)。Schneider らによると、WT マクロファージにおける GSDMD の切断は Z-VAD で部分的に抑制されたと報告されており (21)、私の解析でも同様の結果が得られた。一方で、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおける GSDME の活性化は Z-VAD により完全に抑制されていた(図 18A)。つまり、GSDME の活性化はカスパーゼファミリーによるものであると予想された。そこで、責任カスパーゼを明らかにするため Caspase-3 および Caspase-8 の阻害剤である DEVD および IETD を用いて GSDME の活性化を惹起するカスパーゼの評価を行った。Casp1/11^{-/-}マクロファージにおける LDH の放出は、DEVD に比較して IETD がより強く抑制しており(図 18B)、また SYTOXG による経時的評価でも、IETD がより細胞死を抑制していた(図 18C)。さらに GSDME の切断に関しては、DEVD では抑制されていなかったが、IETD は完全に抑制することが示された(図 18D)。つまり、Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスには Caspase-8 が重要な役割を担っていることが示唆された。

次に、ヒトマクロファージにおける Caspase-8 の解析を行うため、Caspase-1/8 DKO THP-1 (CASP1/8 DKO THP-1)細胞を作製した(図 18A)。作製した細胞では、コントロール、CASP1KO THP-1 細胞に比較して LDH の放出が有意に抑制されており(図 18B)、さらに Western blot 法でも Caspase-3、GSDME の活性化が抑制されていた(図 18C)。これらの結果より、Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスにおいて、Caspase-8 が GSDME の活性化を惹起することが示された。

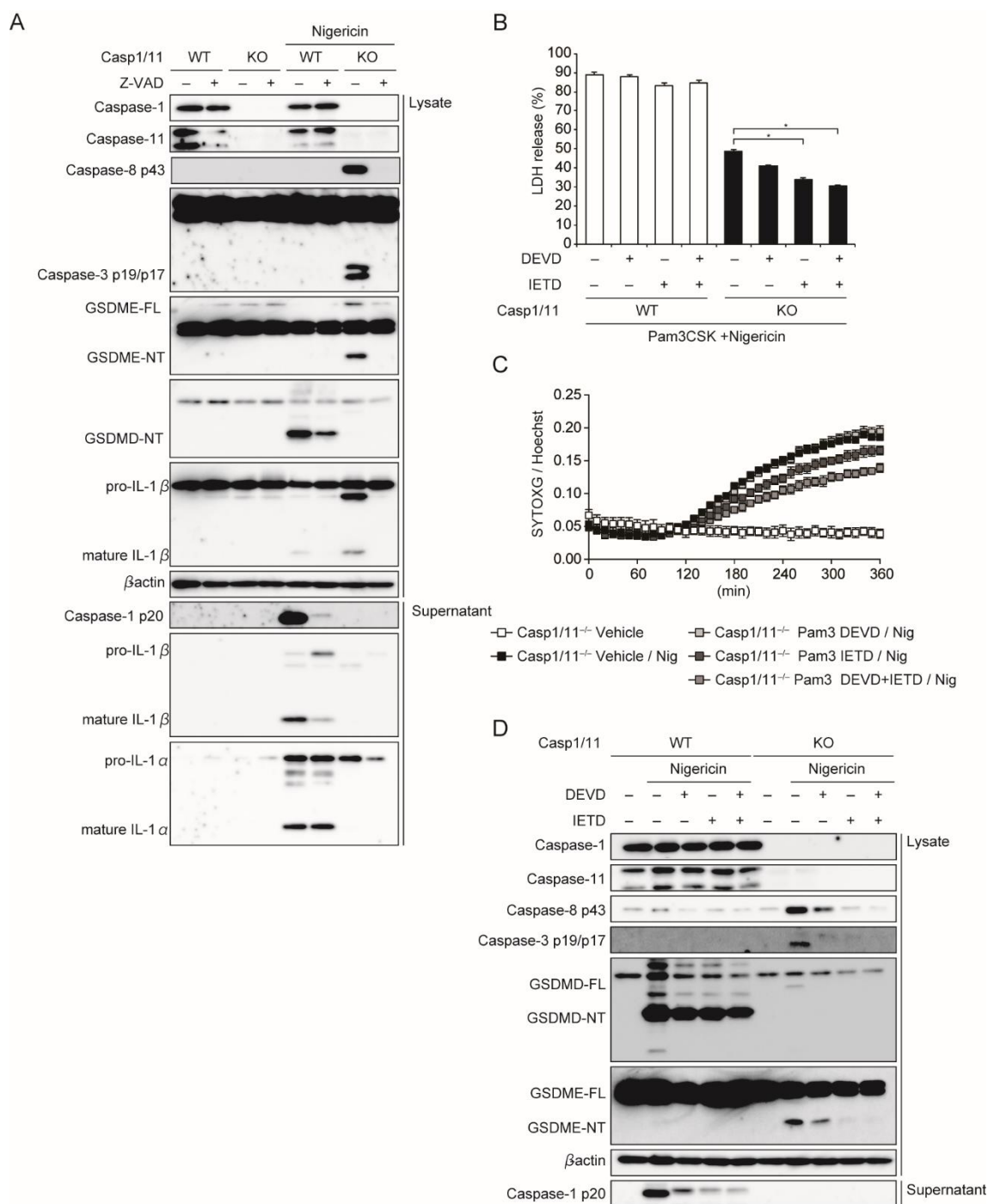


図 18. NLRP3 活性化による Caspase-3/8 の活性化、細胞死への影響

A. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージに Z-VAD を 30 分添加し、Nigericin 刺激 3 時間後の蛋白発現を Western blot 法で解析した。

B-D. WT、Casp1/11^{-/-}マクロファージに DEVD、IETD を 30 分添加し、Nigericin 刺激を行った。

B. Nigericin 刺激 6 時間後の培養上清中の LDH を測定した (n = 3)。

- C. Nigericin と同時に Hoechst33342、SYTOXG を添加。SYTOXG 陽性細胞／Hoechst33342 陽性細胞を 10 分毎に評価した(各 $n = 3$)。
- D. Nigericin 刺激 3 時間後の蛋白発現を Western blot 法で解析した。データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ であるものを*で示した。

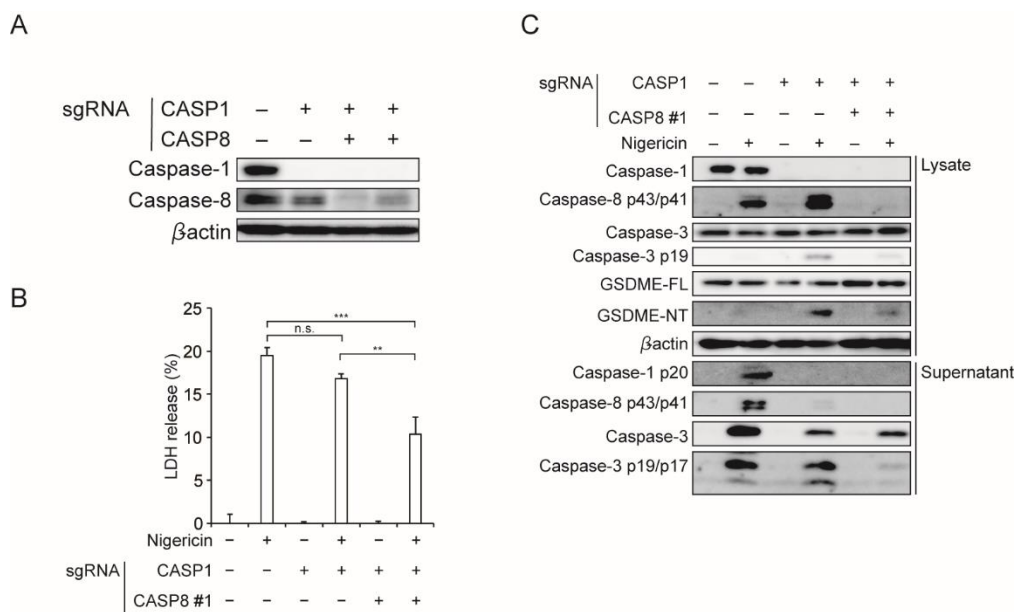


図 19. CASP1/8 DKO THP-1 細胞を用いた解析

- A. CASP1/8 DKO THP-1 細胞の欠損を、Western blot 法で確認した。
- B-C. コントロール細胞、CASP1 KO THP-1 細胞、CASP1/8 DKO THP-1 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Nigericin 刺激 8 時間で解析した。
- B. 培養上清中の LDH を測定した($n = 3$)。
- C. 蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

3-7. パイロトーシスと GSDME 活性化の解析

次に、NLRP3 インフラマソームの活性化が、Caspase-8 を介した GSDME の活性化を介して、Caspase-1/11 非依存的パイロトーシスを惹起しうるのかを評価するため、ヒト子宮頸がん細胞株の HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は、Caspase-1 は欠損しているが、Caspase-8 を発現している細胞株である(図 20A)。この HeLa 細胞に NLRP3D303N、ASC、GSDMD、GSDME をそれぞれ一過性に発現することにより惹起される細胞死を評価した。NLRP3D303N と ASC を共発現させると、NLRP3 インフラマソームが活性化され、Caspase-8,-3 の活性化がみられ、LDH の放出は認められなかった(図 20B、C)。さらには共焦点顕微鏡による観察では細胞と核の凝集や Hoechst33342 のシグナル増強などのアポトーシス細胞の特徴を認めた(図 20D)。NLRP3 インフラマソームと GSDME の共発現では、Caspase-8 の活性化と GSDME の切断を誘導し(図 20B)、さらに上清中への LDH の放出も認められた(図 20C)。さらに共焦点顕微鏡による評価では、細胞の膨潤を示し、パイロトーシス様の形態が観察された。

これまで、Caspase-8 が GSDMD を活性化するとの報告がある(24, 25)。ASC により活性化された Caspase-8 による GSDMD、GSDME の切断について確認するため、Flag タグ付きの GSDMD と GSDME を HeLa 細胞に導入して評価した。Caspase-1/11^{-/-}マクロファージと同様に、ASC により活性化された Caspase-8 は、GSDMD よりも、GSDME の活性化をより強く誘導していた。(図 21)。これまでの結果より、NLRP3 インフラマソームの活性化は、GSDME を介して Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスを惹起すると考えられた。一方で、Caspase-3 が GSDME を切断するとの報告もあり(22, 23)、Caspase-3 の GSDME 切断への関与を確認するため、Caspase-3 KO

HeLa (CASP3 KO HeLa) 細胞を作製した(図 22A)。NLRP3 インフラマソームと GSDME を高発現した場合、コントロール細胞に比較して CASP3 KO HeLa 細胞では LDH 放出は、部分的にしか抑制されておらず(図 22B)、さらに GSDME の切断はやや減弱するものの、NT は Western blot 法で確認することができた(図 22C)。これらの結果により、GSDME の切断には Caspase-3 は必要不可欠ではないことが示唆された。

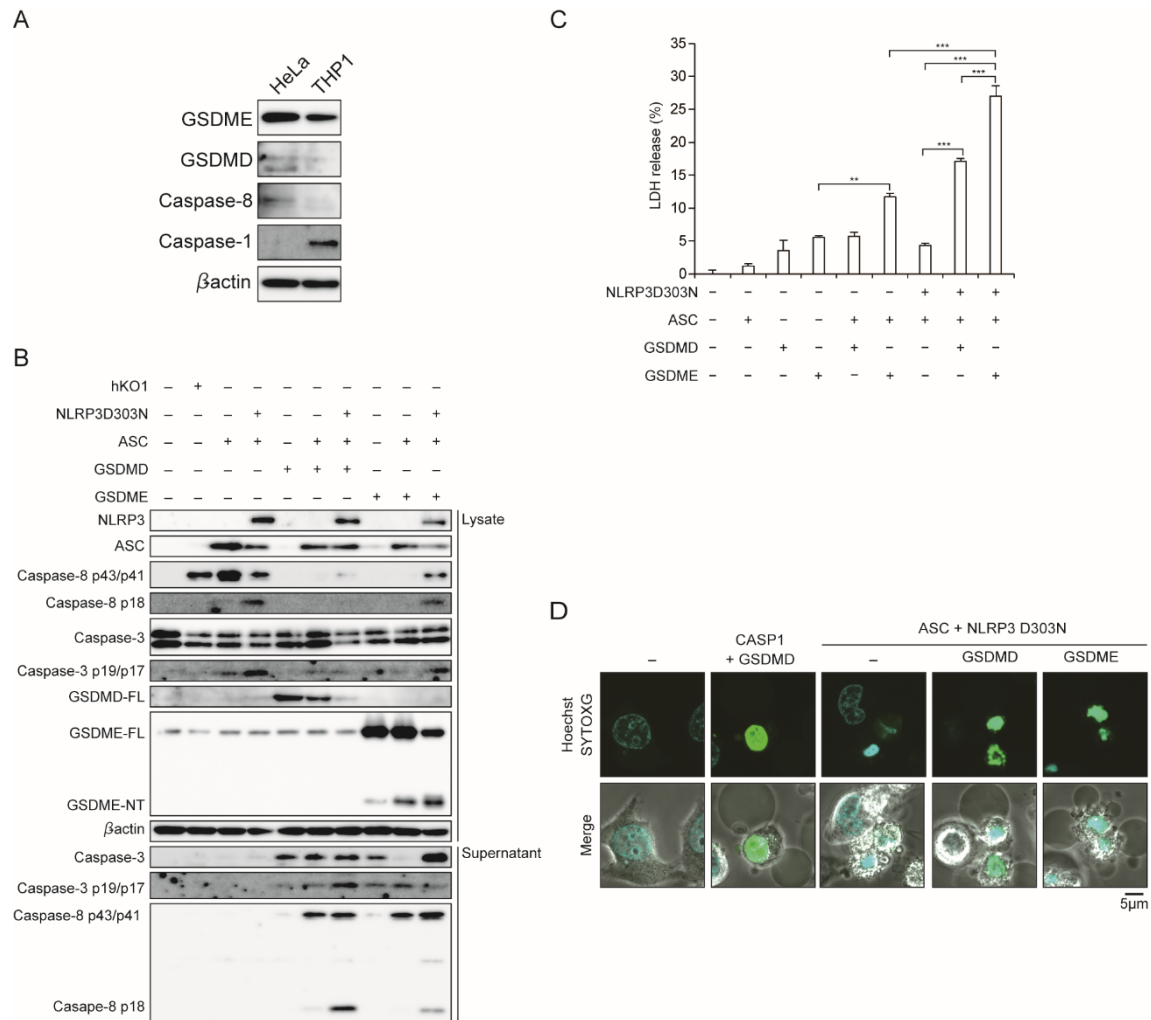


図 20. NLRP3 インフラマソームをトランスフェクションした HeLa 細胞の解析

A. HeLa 細胞の蛋白発現を Western blot 法で確認した。

B-D. HeLa 細胞に NLRP3D303N、ASC、GSDMD、GSDME それぞれのプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に解析を行った。

B. 蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

C. 培養上清中の LDH を測定した ($n = 3$)。

D. トランスフェクション 24 時間後に SYTOXG、Hoechst33342 を添加。共焦点顕微鏡で観察した。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

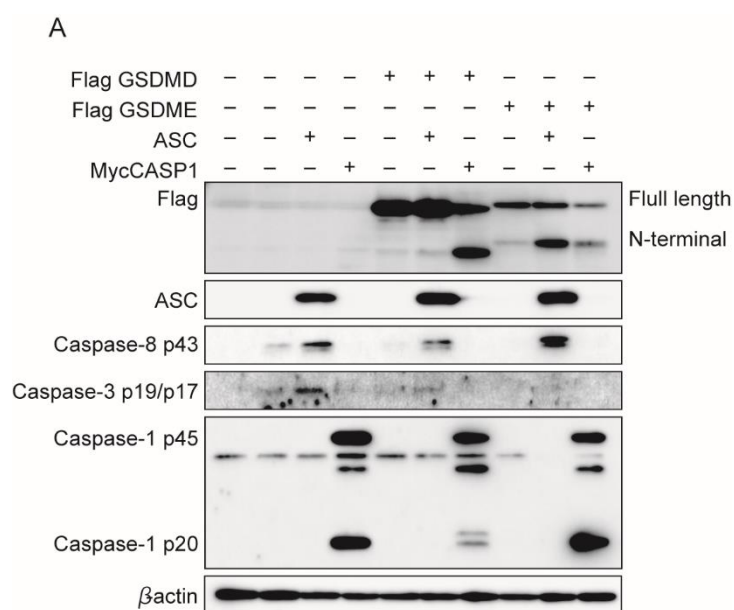


図 21. Flag GSDMD、Flag GSDME をトランスフェクションした HeLa 細胞の解析

HeLa 細胞に Flag GSDMD、Flag GSDME、ASC、Myc CASP1 それぞれのプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に解析を行った。NLRP3 インフラマソーム活性化が誘導する蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

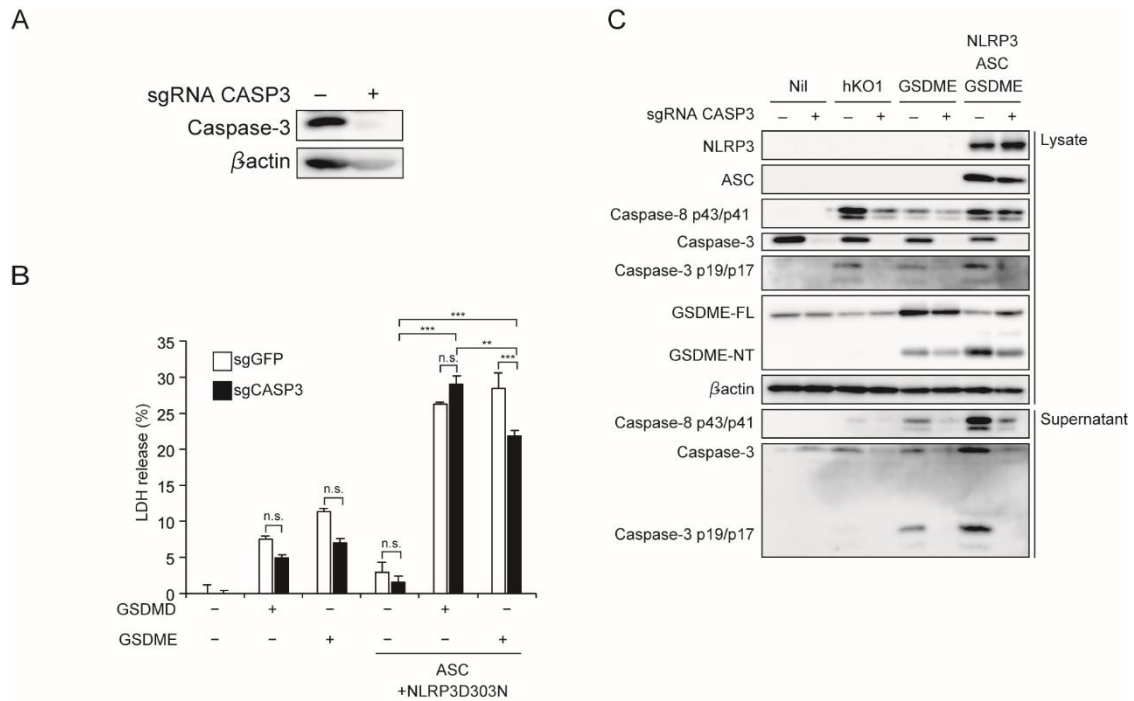


図 22. CASP3 KO HeLa 細胞を用いた解析

A. CASP3 KO HeLa 細胞の欠損を Western blot 法で確認した。

B-C. CASP3 KO HeLa 細胞に NLRP3D303N、ASC、GSDME それぞれのプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に解析を行った。

B. 培養上清中の LDH を測定した (n = 3)。

C. 蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

次に、GSDME のパイロトーシスへの関与を確認するため、GSDMD/GSDME DKO THP-1 細胞を作製した(図 23A)。Caspase-3/8 の活性化、GSDME の切断は、コントロール細胞に比較して、GSDMD KO THP-1 細胞でより強く惹起されていた(図 23B)。また、GSDMD KO THP-1 細胞に比較して、GSDMD/E DKO THP-1 細胞では、LDH の放出が有意に抑制されており(図 23C)、SYTOXG の経時的評価でも細胞死の抑制が確認された(図 23D)。つまり、Caspase-8 の活性化を介したパイロトーシスには、GSDMD だけではなく GSDME も実行因子として関与していることが示された。

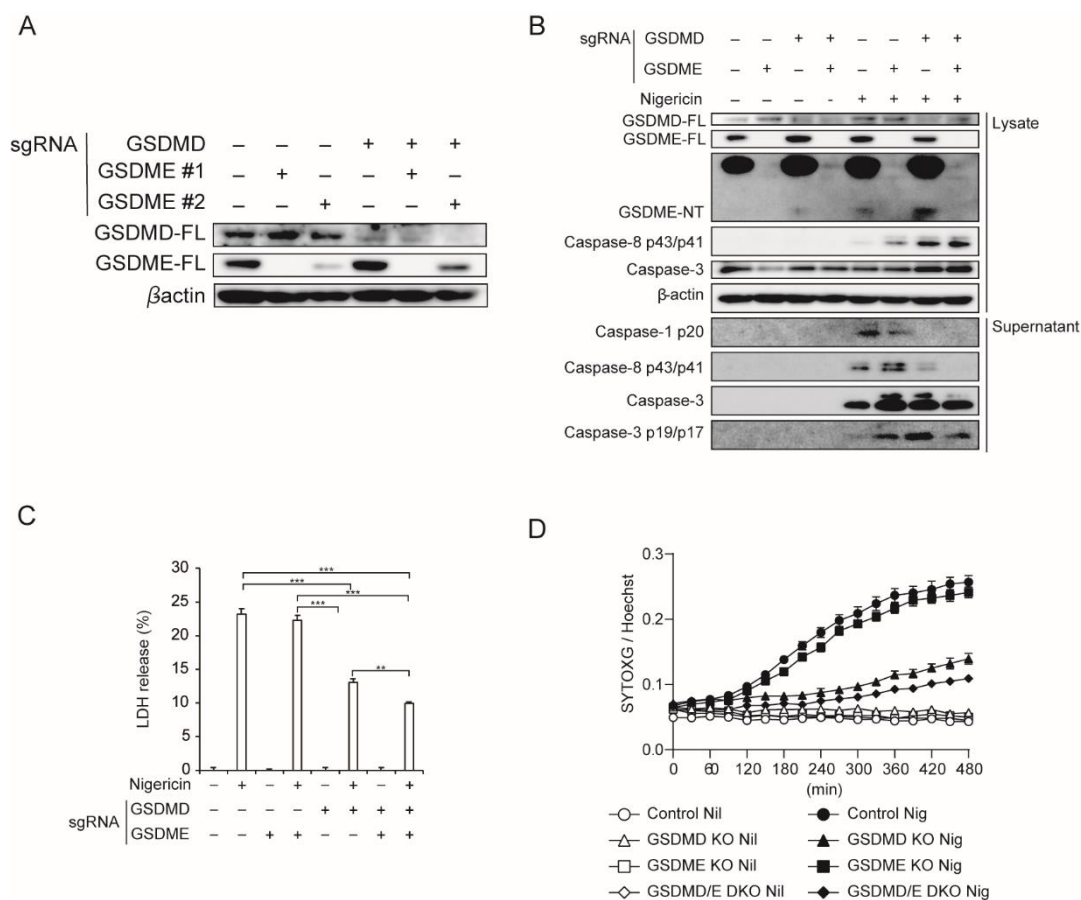


図 23. GSDMD/GSDME DKO THP-1 細胞を用いた解析

A. GSDMD/GSDME DKO THP-1 細胞の欠損を Western blot 法で確認した。

B-C. コントロール細胞、GSDMD KO、GSDME KO、GSDMD/GSDME DKO THP-1 細胞を PMA で 48 時間処理を行い、マクロファージ様に分化させ、Nigericin 刺激 8 時間で解析した。

B. 蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

C. 培養上清中の LDH を測定した (n = 3)。

D. Nigericin と同時に SYTOXG、Hoechst33342 を添加し、SYTOXG 陽性細胞 / Hoechst33342 陽性細胞を 30 分毎に評価した (各 n = 3)。

データは平均値 + 標準誤差で表示し、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

3-8. インフラマソーム阻害剤によるパイロトーシスの解析

NLRP3 と Caspase-1 を標的とした、炎症性疾患に対する薬剤は以前より報告されている (26, 27)。そこで、Caspase-1 阻害剤である VX765、NLRP3 阻害剤である MCC950 が、パイロトーシスに与える影響を確認した。WT マクロファージにおいて VX765 は、濃度依存的に細胞死惹起時間を遅延させた (図 24A)。これと同様に、LDH 放出は、刺激 1 時間後では完全に抑制されるものの、刺激後 3-6 時間では抑制されなかった (図 24B)。つまり、VX765 は遅延性のパイロトーシスを完全には抑制できないことが示された。さらに、刺激 1 時間後の IL-1 α の分泌は有意に抑制されていたものの、刺激 6 時間後では、IL-1 α の分泌が認められたが (図 24C)、IL-1 β の分泌に関しては、刺激時間に関係なく抑制していた (図 24D)。一方、MCC950 は濃度依存的に細胞死を抑制しており (図 25A)、LDH、IL-1 α/β ともに有意に抑制されていた (図 24B、25B、C)。

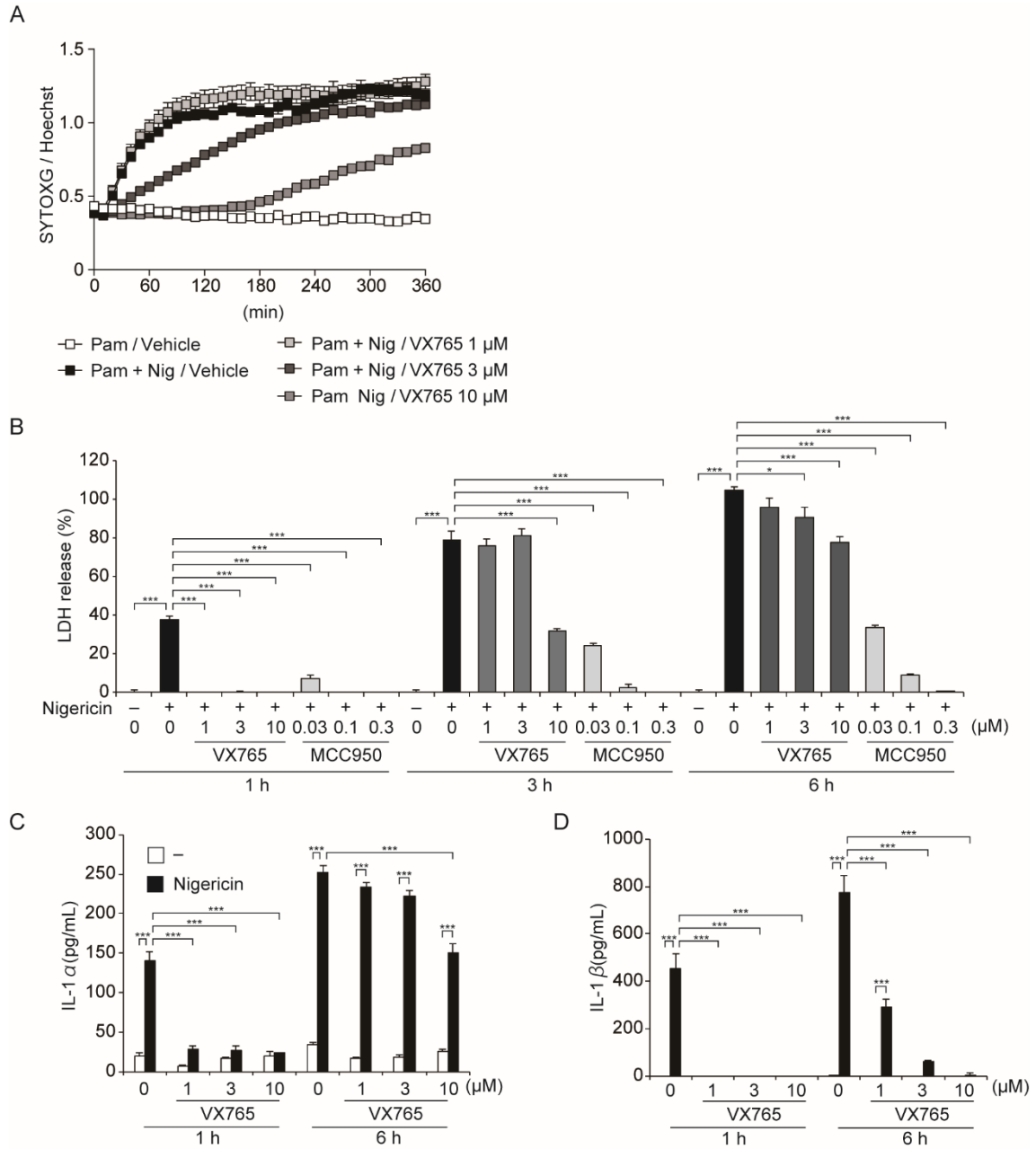


図 24. VX765 を用いた解析

- A. WT マクロファージに VX765、MCC955 を添加 30 分後に、Nigericin 刺激を行った。
 Nigericin 刺激と同時に SYTOXG、Hoechst33342 を添加し、SYTOXG 陽性細胞／
 Hoechst33342 陽性細胞を 30 分毎に評価した(各 n = 3)。
- B-D. WT マクロファージに VX765、MCC955 を添加 30 分後に、Nigericin 刺激した。
- B. Nigericin 刺激 1、3、6 時間後の培養上清中の LDH を測定した(n = 3)。
- C. Nigericin 刺激 1、6 時間後の培養上清中の IL-1 α を測定した(n = 3)。
- D. Nigericin 刺激 1、6 時間後の培養上清中の IL-1 β を測定した(n = 3)。

データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.05$ であるものを*、 $p < 0.01$ であるものを**、 $p < 0.001$ であるものを***で示した。

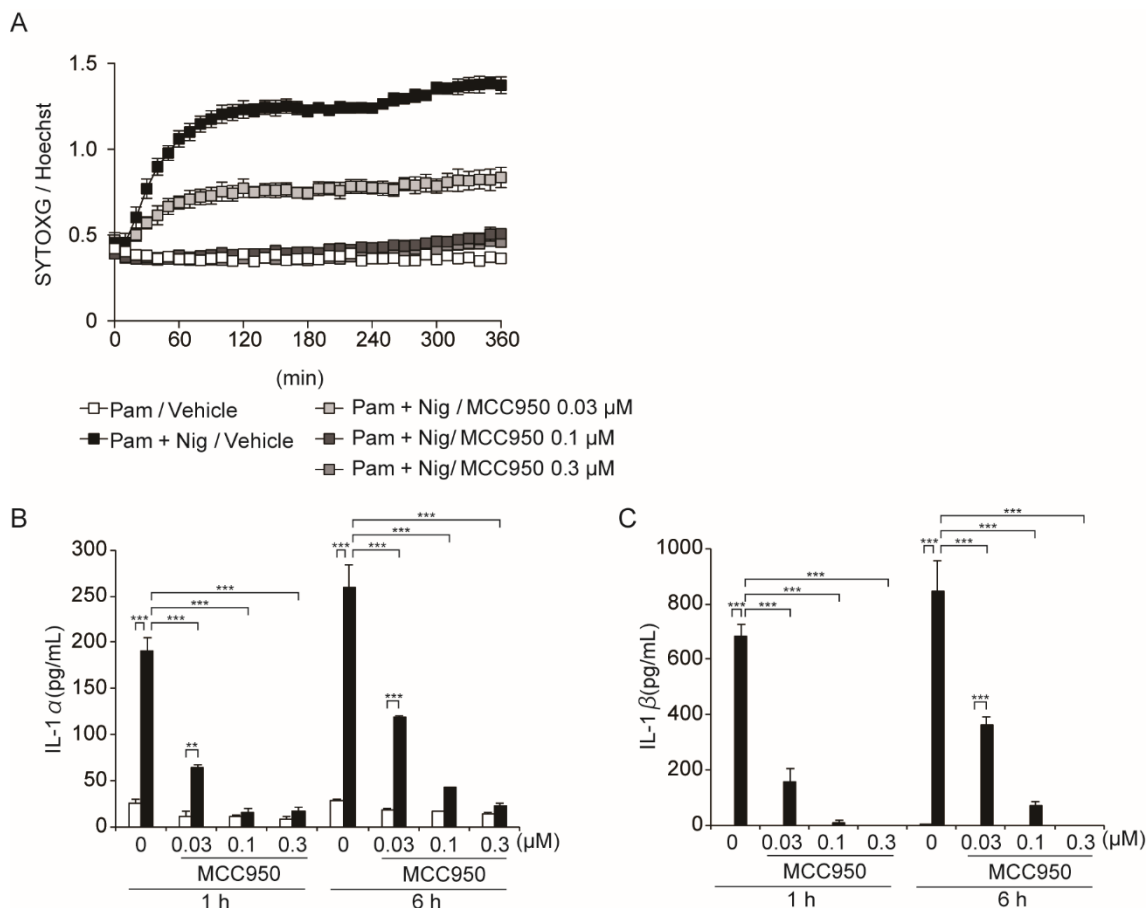


図 25. MCC955 を用いた解析

- A. WT マクロファージに MCC955 を添加 30 分後に、Nigericin 刺激を行った。Nigericin 刺激と同時に SYTOXG、Hoechst33342 を添加し、SYTOXG 陽性細胞／Hoechst33342 陽性細胞を 30 分毎に評価した (各 $n = 3$)。
- B-C. WT マクロファージに MCC955 を添加 30 分後に、Nigericin 刺激を行い、刺激 1、6 時間後の培養上清を回収した。
- B. 培養上清中の IL-1 α を測定した ($n = 3$)。
- C. 培養上清中の IL-1 β を測定した ($n = 3$)。

さらに VX765 併用下で、遅延性に誘導される細胞死における GSDMD/E の解析を行った。VX765 の濃度依存的に GSDMD の切断は抑制されるのに反して、GSDME の切断は強く惹起されていた (図 26A)。つまり、VX765 添加時に惹起されて

いる細胞死は GSDMD もしくは GSDME が惹起するパイロトーシスであることが示唆された。最後に、VX765 による細胞死の遅延と Caspase-11 の関わりを評価した。

Caspase-11^{-/-}マクロファージに VX765 を添加しても、WT マクロファージと比較して GSDMD の切断に差は認めず、細胞死惹起の遅延も認められなかった(図 27A、B) また、LDH 放出も WT マクロファージと差が認められなかった(図 27C)。これらの結果より、Caspase-1 阻害剤はパイロトーシス中の IL-1 α には影響を及ぼさないが、IL-1 β の分泌は有意に抑制することが示された。

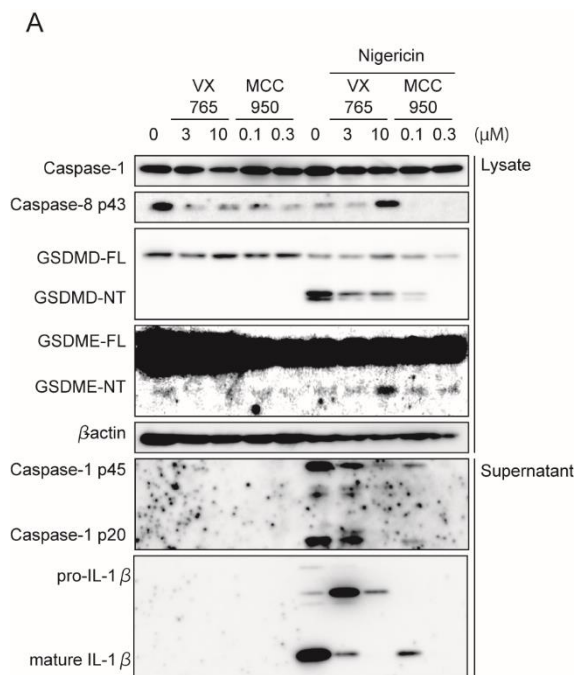


図 26. VX765、MCC950 添加時の蛋白の発現および活性化

A. WT マクロファージに VX765、MCC950 を添加 30 分後に、Nigericin 刺激 3 時間で Lysate、培養上清を回収。蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。

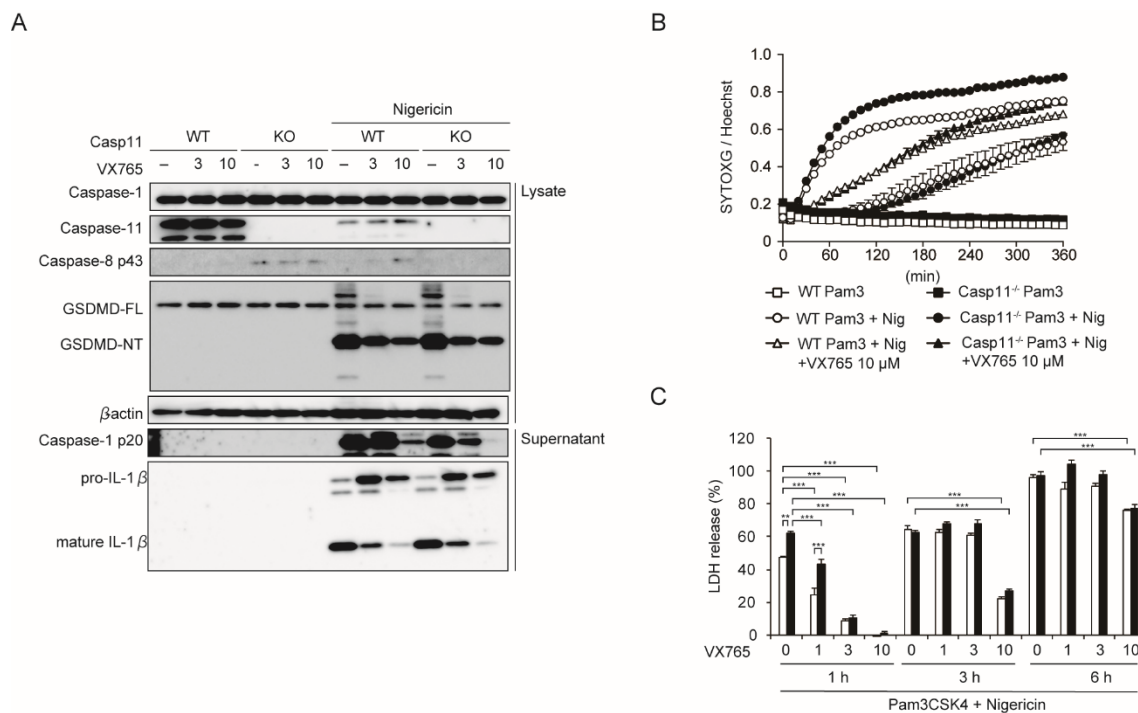


図 27. Casp11^{-/-}マクロファージを用いた解析

WT、Casp11^{-/-}マクロファージに VX765、MCC955 を添加 30 分後に、Nigericin 刺激を行い解析した。

- Nigericin 刺激 3 時間後に Lysate、培養上清を回収。蛋白の発現、活性化を Western blot 法で解析した。
- Nigericin 刺激と同時に SYTOXG、Hoechst33342 を添加し、SYTOXG 陽性細胞／Hoechst33342 陽性細胞を 30 分毎に評価した(各 n = 5)
- Nigericin 刺激 3 時間後の培養上清中の LDH を測定した(n = 3)。

4. 考察

本研究では、以下の点を明らかにした。1) Caspase-1/11 欠損下において、NLRP3 インフラマソーム活性化によりネクロース様細胞死が惹起される 2) Caspase-1/11 非依存的な細胞死は ASC により誘導される 3) ASC は、Caspase-8 を介する GSDME によるパイロトーシスと、RIPK3 を介するネクロプトーシスを誘導する 4) Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスでは、IL-1 β ではなく IL-1 α が産生される 5) パイロトーシス細胞では pro-IL-1 β が細胞内にとどまっている 6) Caspase-1 阻害剤を用いて薬理的に Caspase-1 を阻害しても、パイロトーシス細胞からは IL-1 α が産生される。以上のことから、NLRP3 インフラマソームの活性化は ASC と Caspase-8 を介した IL-1 α の産生を伴うネクロース様細胞死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の経路が明らかになった(図 28)。

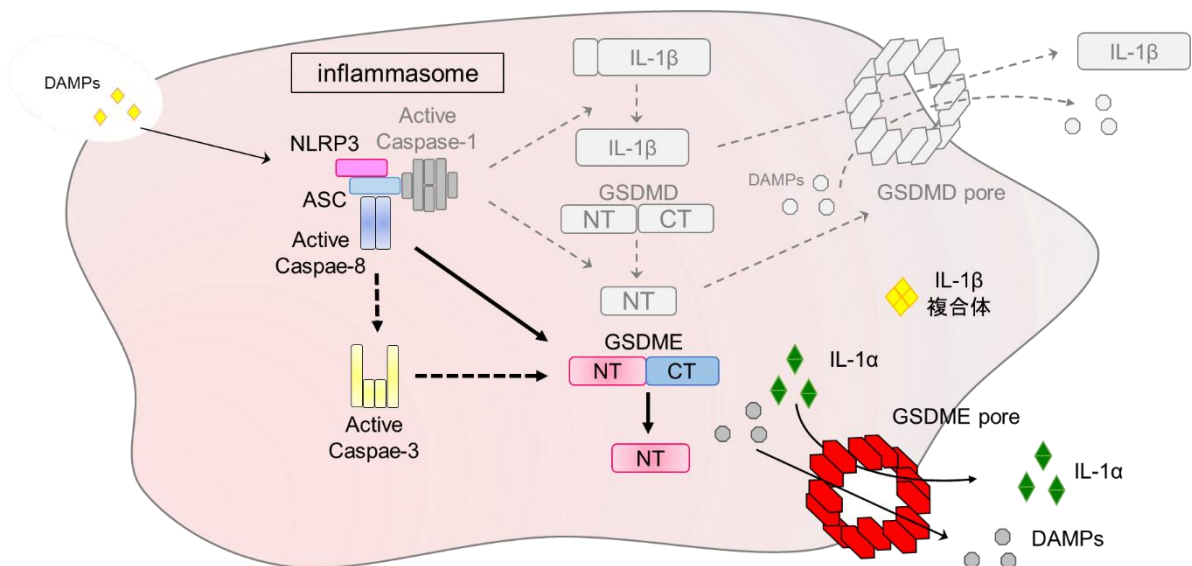


図 28. NLRP3 インフラマソームによる新たな細胞死経路

NLRP3 インフラマソームの活性化は、Caspase-8 の活性化とともに、GSDMD 非依存的なパイロトーシスを誘導することが報告されている (21)。GSDMD 非依存的なパイロトーシス惹起の詳細なメカニズムは不明であったが、本研究では GSDMD 非依存的なパイロトーシスに GSDME が寄与することを示した。つまり、Caspase-1/11^{-/-}マウスマクロファージにおいて、ASC が Caspase-8 の活性化を誘導し、さらには活性化した Caspase-8 が GSDME のプロセッシングを介してパイロトーシスを惹起することを明らかにした。Orning や Sarhan らはエルシニア感染が、Caspase-8 による GSDMD のプロセッシングを介したパイロトーシスを誘導することを報告しているが (24, 25)、本研究では、Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおいて活性化された Caspase-8 は GSDMD のプロセッシングを誘導せず、代わりに GSDME のプロセッシングを誘導することが示された。さらに、HeLa 細胞による解析においても、インフラマソームの活性化により ASC を介して誘導される Caspase-8 の活性化は、GSDMD に比較し GSDME のプロセッシングをより強力に誘導することが示された。そこで、私は NLRP3 インフラマソームにより誘導される Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスには、GSDMD ではなく GSDME がより寄与しているのではないかと考えた。GSDME のプロセッシングが Caspase-3 により誘導され、パイロトーシスが惹起されとの報告がある (22, 23)。本研究では、Caspase-8 による GSDME 切断の直接的な評価は不十分ではあるが、Caspase-3 の阻害に比較して、Caspase-8 の阻害が GSDME のプロセッシングへ与える影響がより大きいとの結果を得ることができた。つまり、NLRP3 インフラマソームの活性化により Caspase-1 非依存的に惹起されるパイロトーシスには、Caspase-8 による GSDME のプロセッシングが重要な役割を担っていることを示した。

本研究では、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD 処理後の Caspase-1/11^{-/-}マクロファージで惹起される細胞死が RIPK3 阻害剤によって有意に抑制することも明らかとなった。

このことから、Z-VAD によりカスパーゼが阻害された場合、NLRP3 インフラマソームの活性化は、パイロトーシスだけでなくネクロプトーシスも誘導することが示唆された。しかしながら、Caspase-8 の活性阻害は RIPK3 依存的なネクロプトーシスを誘導することが報告されていることから (6)、Z-VAD 処理後に NLRP3 インフラマソームにより誘導されたネクロプトーシスは Z-VAD により Caspase-1、Caspase-8 ともに阻害されたために惹起されたのではないかと考えている。以上のことから、NLRP3 インフラマソームにより誘導されるネクローシス様細胞死には、ネクロプトーシスではなく GSDME によるパイロトーシスがより多く寄与していると予想された。

本研究では、さらに、パイロトーシスによる IL-1 α と IL-1 β の分泌メカニズムを明らかにした。Caspase-1/11 非依存的なネクローシス様細胞死では、IL-1 β の分泌は抑制される一方で、IL-1 α は多量に分泌されることが示された。Antonopoulos らは、Caspase-1 欠損下では、Caspase-8 が IL-1 β のプロセッシングを誘導することを示している

(16)。しかし、本研究では Caspase-8 による IL-1 β のプロセッシングは、不完全なものであり、Caspase-8 によりプロセッシングされる IL-1 β は IL-1 β (p28) であることが明らかとなった。さらに Caspase-1 欠損下において NLRP3 インフラマソーム活性化が誘導したパイロトーシス細胞内には、pro-IL-1 β が残留していることも示された。pro-IL-1 β が細胞内に残留するメカニズムは不明であるが、ガスダーミンが形成する細胞膜孔は高分子量物質を通過させるには不十分なのではないかと考えられた。また、遺伝子変異導入部位でプロセッシングされた IL-1 β は、パイロトーシス細胞から培養上清中に分泌されなかった。つまり、培養上清中に IL-1 β が分泌されるためには、正常部位での pro-IL-1 β のプロセッシングが重要であることが示唆された。Monteleone らは、切断された成熟型 IL-1 β と細胞膜成分のホスファチジルイノシトールとの結合が、細胞外への IL-1 β の放出を促進していると報告しており (28)、このメカニズムはパイロトーシス細胞に

における IL-1 β の分泌にも寄与していると考えられる。一方で、ATP などのネクローシス様細胞死を惹起する刺激により、pro-IL-1 β が細胞外へ放出されとの報告もあるが

(4)、その分泌メカニズムは明らかではない。Caspase-1 以外の好中球分解酵素などのタンパク分解酵素による pro-IL-1 β のプロセッシングが、結果として炎症を惹起しているとの報告もある (29-31)。これらのことを考えると、パイロトーシス細胞において pro-IL-1 β が細胞内に保持される仕組みは、他のタンパク分解酵素による細胞外 pro-IL-1 β のプロセッシングを抑制し、急性炎症における過剰な炎症を抑止することに寄与していると推測される。

近年、Schneider らは NLRP3 インフラマソームが GSDMD 非依存的に誘導する細胞死として secondary パイロトーシスを惹起すると報告した。この細胞死の誘導メカニズムは本研究での知見と類似しているが、Caspase-1 による IL-1 β の切断・分泌機構が誘導されており、その点が本研究と異なる。本研究ではパイロトーシスの特徴の一つである IL-1 β の産生を認めず、IL-1 α の産生が認められており、私は NLRP3 インフラマソーム活性化時に Caspase-1 非依存的に誘導される IL-1 α 分泌を伴ったパイロトーシスを incomplete パイロトーシスと定義した。さらに Tsuchiya らは、GSDMD 欠損下では、Caspase-1 の活性化により Bid/Caspase-9 依存的なアポトーシスが誘導されると報告した。本研究では、GSDME 依存的な incomplete パイロトーシスでは、Caspase-8 がイニシエーターカスパーゼとして機能していることを示している。以上のことより、報告されている GSDMD 非依存的な secondary パイロトーシスもしくはアポトーシスと、本研究における incomplete パイロトーシスは異なる機序であることが示唆された。

Caspase-1/11^{-/-}マクロファージにおいて VX-765 による Caspase-1 の阻害は、incomplete パイロトーシスと、それに付随する IL-1 α の産生を抑制せず、一方で MCC-950 による NLRP3 インフラマソームの阻害は、IL-1 α/β の産生と、incomplete パイロトーシス

イロトーシスを完全に抑制した。つまり薬剤による Caspase-1 の阻害でも incomplete パイロトーシスが惹起され、IL-1 α の産生が認められた。IL-1 α 、IL-1 β の受容体は IL-1 レセプターで同一であるが、それぞれのサイトカインの機能は異なることが報告されている (32)。特に、IL-1 α に関しては創傷治癒後の血小板新生などへの関与も指摘されている。このことより、炎症反応において、IL-1 β の産生を抑制しつつ、IL-1 α の産生を誘導しうる Caspase-1 阻害剤は NLRP3 インフラマソームが惹起する炎症性疾患の新たな治療法の開発につながると考えられる。

本研究では、NLRP3 インフラマソームの活性化が、今まで報告されていない経路を介して Caspase-1/11 非依存的なパイロトーシスを惹起することを明らかにした。しかしながら、以下の点については、今後、より詳細な解析が必要であると考えられた。まず、in vitro における Caspase-1/11 非依存的な incomplete パイロトーシスのメカニズムは明らかになったが、この細胞死の生理学的意義における評価は不十分である。また、incomplete パイロトーシスの生理学的意義にも通ずるが、in vivo モデルにおける解析が不十分である。創傷治癒や炎症性疾患の病態における incomplete パイロトーシスの意義についてはさらなる解析が必要であると考えるが、これら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される。

5. おわりに

本研究では、NLRP3 インフラマソームの活性化が、ASC を介した Caspase-8 の活性化と GSDME のプロセッシングを誘導し、さらにプロセッシングされた GSDME の N 末端領域が細胞膜孔を形成することで Caspase-1 非依存的に incomplete パイロトーシスを惹起することを示した。この incomplete パイロトーシスでは、これまで報告されていたパイロトーシスの特徴の一つである IL-1 β の産生が抑制されており、代わりに IL-1 α の産生が惹起されていることが明らかとなった。

本研究成果が、NLRP3 インフラマソームが関与する炎症性疾患の新規治療法につながることを期待される。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました自治医科大学歯科口腔外科学講座森良之先生、自治医科大学分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 高橋将文先生、唐澤直義先生に深謝致します。

また、研究の計画・遂行にあたり、自治医科大学口腔外科学講座、自治医科大学分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部の皆様には並々ならぬご助力とご協力を頂きました。心より御礼を申し上げます。

7. 参考文献

1. Karasawa T and Takahashi M. Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*.24:443-451.2017
2. Lamkanfi M and Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*.157:1013-22.2014
3. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA and et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*.256:97-100.1992
4. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, Quadroni M, Drexler SK and Tschopp J. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*.36:388-400.2012
5. Martin SJ. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system. *The FEBS journal*.283:2599-615.2016
6. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H and Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*.15:135-47.2014
7. Martin SJ, Henry CM and Cullen SP. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Molecular cell*.46:387-97.2012
8. Tonnus W and Linkermann A. The in vivo evidence for regulated necrosis. *Immunological reviews*.277:128-149.2017

9. Tonnus W, Meyer C, Paliege A, Belavgeni A, von Massenhausen A, Bornstein SR, Hugo C, Becker JU and Linkermann A. The pathological features of regulated necrosis. *The Journal of pathology*.247:697-707.2019
10. Bertheloot D and Latz E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cellular & molecular immunology*.14:43-64.2017
11. Miao EA, Rajan JV and Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews*.243:206-14.2011
12. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang Y, Bertram EM, Goodnow CC and Dixit VM. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*.526:666-71.2015
13. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F and Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*.526:660-5.2015
14. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang DC and Shao F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*.535:111-6.2016
15. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H and Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*.535:153-8.2016
16. Antonopoulos C, Russo HM, El Sanadi C, Martin BN, Li X, Kaiser WJ, Mocarski ES and Dubyak GR. Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3

Inflammasome Signaling. *The Journal of biological chemistry*.290:20167-84.2015

17. Vajjhala PR, Lu A, Brown DL, Pang SW, Sagulenko V, Sester DP, Cridland SO, Hill JM, Schroder K, Stow JL, Wu H and Stacey KJ. The Inflammasome Adaptor ASC Induces Procaspace-8 Death Effector Domain Filaments. *The Journal of biological chemistry*.290:29217-30.2015
18. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, Roberts TL, Schroder K, Vince JE, Hill JM, Silke J and Stacey KJ. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell death and differentiation*.20:1149-60.2013
19. 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. *The Journal of biological chemistry*.286:33963-72.2011
20. Satoh T, Kambe N and Matsue H. NLRP3 activation induces ASC-dependent programmed necrotic cell death, which leads to neutrophilic inflammation. *Cell death & disease*.4:e644.2013
21. Schneider KS, Gross CJ, Dreier RF, Saller BS, Mishra R, Gorka O, Heilig R, Meunier E, Dick MS, Cikovic T, Sodenkamp J, Medard G, Naumann R, Ruland J, Kuster B, Broz P and Gross O. The Inflammasome Drives GSDMD-Independent Secondary Pyroptosis and IL-1 Release in the Absence of Caspase-1 Protease Activity. *Cell reports*.21:3846-3859.2017

22. Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G and Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications*.8:14128.2017
23. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, Wang K and Shao F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*.547:99-103.2017
24. Orning P, Weng D, Starheim K, Ratner D, Best Z, Lee B, Brooks A, Xia S, Wu H, Kelliher MA, Berger SB, Gough PJ, Bertin J, Proulx MM, Goguen JD, Kayagaki N, Fitzgerald KA and Lien E. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science*.362:1064-1069.2018
25. Sarhan J, Liu BC, Muendlein HI, Li P, Nilson R, Tang AY, Rongvaux A, Bunnell SC, Shao F, Green DR and Poltorak A. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during Yersinia infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.115:E10888-E10897.2018
26. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Nunez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA and O'Neill LA. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine*.21:248-55.2015
27. Lee C, Do HTT, Her J, Kim Y, Seo D and Rhee I. Inflammasome as a promising therapeutic target for cancer. *Life sciences*.231:116593.2019

28. Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, von Pein JB, Holley CL, Boucher D, Shakespear MR, Kapetanovic R, Rolfes V, Sweet MJ, Stow JL and Schroder K. Interleukin-1beta Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell reports*.24:1425-1433.2018
29. Mizushima Y, Karasawa T, Aizawa K, Kimura H, Watanabe S, Kamata R, Komada T, Mato N, Kasahara T, Koyama S, Bando M, Hagiwara K and Takahashi M. Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1beta Contributes to Acid Aspiration-Induced Acute Lung Injury. *Journal of immunology*.203:236-246.2019
30. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA and Joosten LA. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annual review of immunology*.33:49-77.2015
31. Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Mizushima Y, Nakamura J, Kamata R, Kasahara T, Horie H, Sata N and Takahashi M. Interaction of Neutrophils with Macrophages Promotes IL-1beta Maturation and Contributes to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of immunology*.199:3306-3315.2017
32. Di Paolo NC and Shayakhmetov DM. Interleukin 1alpha and the inflammatory process. *Nature immunology*.17:906-13.2016