

免疫炎症制御研究分野

<研究スタッフ>

教授	須田 貴司		
助教	今村 龍	木下 健	
大学院生	茂谷 康 (D3)	王 強 (D2)	
研究補助員	串山 裕子		

<研究の概要>

本研究室では、免疫・炎症と細胞死の誘導および制御に関与する分子機構に着目し、それらの生理的機能とがんの発生、進展、退縮における役割の解明を目指している。現在は、免疫・炎症と細胞死の誘導・制御に働く NLR 蛋白群とそのシグナル伝達分子 ASC に着目して研究を行っている。

<今年度の研究成果及び進行中の研究課題と今後の研究計画>

1) ASC 活性化による細胞死の様態決定機構の解析：我々は、ASC の活性化で様々ながん細胞にアポトーシスが誘導され、腫瘍の退縮を誘導しうることを示してきた。また、昨年は COLO205 大腸腺癌細胞株では、ASC の活性化でアポトーシスではなく、ネクローシスが誘導されることを見出した。本年度は、COLO205 由来細胞株から ASC の活性化でアポトーシスが誘導される細胞株を単離し、親細胞株との遺伝子発現プロファイルの違いをマイクロアレイで比較し、細胞死の様態と相関する遺伝子を多数発見した。また、複数のメラノーマ、膵がん細胞、白血病細胞株についても ASC 依存性細胞死の様態を解析し、1 例を除きアポトーシスタイプとネクローシスタイプに分類できることを見出した。今後はこれらの細胞株を用い、細胞死の様態を決定する因子の同定を目指す。

2) ASC を活性化する天然物、化合物の探索：上述のように、我々は ASC ががん治療の標的分子となりうることを示した。そこで、本年度は ASC の活性化を誘導しうる化合物、天然物の探索を行った。まず、がん特定領域研究の支援班が提供する 300 種類の化合物を用い、ASC 発現細胞株に選択的に細胞死を誘導する物質のスクリーニングを行った。その結果、2 種類の関連物質が ASC 発現細胞株に比較的選択的な毒性を示すことを見出した。現在、東京理科大学の椎名勇教授との共同研究で、これらの物質の類縁化合物について、ASC 発現細胞をより選択的に殺傷するものが無いか検討を行っている。また、金沢大学の太田富久教授との共同研究で海洋微生物の抽出液中に ASC 発現細胞株に比較的選択的な毒性を示すものを見出した。今後は、これらの共同研究を発展させ、ASC 依存性に細胞死を誘導する物質の同定・開発を試みる。また、ASC 遺伝子の発現をモニターできるインジケータープラスミドを構築し、メラノーマの細胞を用いてインジケータ細胞を樹立した。今後は、この細胞を用いて ASC の発現を変化させる物質の探索も行う。

3)PYNOD トランスジェニック(tg)マウスの機能解析: PYNOD トランスジェニックマウス(PYNOD-Tg)を用いて PYNOD の抑制効果を解析した。PYNOD-Tg では IL-1 β の産生に必要な酵素であるカスパーゼ 1 のプロセッシングは正常におこるが、カスパーゼ 1 の活性は低下していた。PYNOD-Tg は LPS ショックに耐性であるが、LPS 投与後血清中の IL-1 β や TNF- α が野生型マウスに比べ低いレベルであった。また、PYNOD ノックアウトマウスの作製を行い PYNOD+/-マウスを樹立した。今後は PYNOD-/-マウスを樹立し、このマウスや PYNOD-Tg および ASC-/-マウスを用いて、感染や炎症刺激に対する反応性および発癌に対する影響を個体レベルおよび細胞レベルで検討する。

4)Staphylococcus aureus 感染 THP-1 細胞における TNF- α 産生メカニズムの解析: NLRP3 は HEK293 細胞を用いた過剰発現系ではアダプター分子 ASC 依存的にカスパーゼ 1、NF- κ B を活性化する。一方、NLRP3 欠損マウスのマクロファージを用いた解析では NLRP3 による NF- κ B の活性化は証明されていない。本年度は NF- κ B の活性化に NLRP3 が関与することを証明するため、ヒトマクロファージ培養細胞株(THP-1)の NLRP3 および ASC の発現をノックダウンし、NLRP3 活性化刺激に応じたサイトカイン産生誘導を調べた。その結果、1) この細胞株では *Staphylococcus aureus* 感染に伴う TNF- α と IL-1 β の mRNA 発現誘導が低下していた。2) この mRNA 発現誘導は cycloheximide の影響を受けなかった。3) ノックダウン細胞株では細菌感染に伴う NF- κ B 核移行が減弱していた。以上より、NLRP3 が細菌感染に伴う NF- κ B の活性化、サイトカイン mRNA 発現誘導に関与していることが示唆された。今後は種々のがん細胞株の NLRP3 がサイトカイン産生に関与する可能性を検証する。NLRP3 発現がん細胞について NLRP3 発現ノックダウン細胞株を樹立し、その形質の変化を解析する。

<論文発表>

原著

当研究室主体の発表論文

1. Hasegawa, M., Imamura, R., Motani, K., Nishiuchi, T., Matsumoto, N., Kinoshita, T., and Suda, T.: Mechanism and repertoire of ASC-mediated gene expression. J. Immunol. 2009, 182:7655-7662

<学会発表>

1. Motani, K., Imamura, R., Kawase, K., and Suda, T.: ASC mediates apoptosis or necrosis depending on the cell type. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Cell Death (Cold Spring Harbor) Oct. 2009
2. 今村龍、茂谷康、串山裕子、木下健、須田貴司: ASC; 細胞死と炎症シグナル伝達の接

- 点. 第 82 回日本生化学会大会、シンポジウム（神戸）2009 年 10 月
3. Motani, K., and Suda, T.: Role of NALP3 and ASC in necrotic cell death of macrophages infected with *Staphylococcus aureus*. 2009 日本免疫学会総会・学術集会, (大阪) 2009 年 12 月
 4. 木下健、今村龍、須田貴司 : The role for NLRP3 in the TNF- α production by macrophages. 第 32 回日本分子生物学会年会（横浜）2009 年 12 月