

がん微小環境研究プログラム 免疫炎症制御研究分野

1. 研究スタッフ

常勤

教授	須田 貴司	1998年4月～現在
助教	今村 龍	1998年10月～現在
	木下 健	1998年10月～現在

非常勤

非常勤研究員	茂谷 康	2007年4月～2011年3月
研究補助員	串山 裕子	2006年10月～現在
研究補助員	劉 璟壬	2011年11月～2012年3月
研究補助員	古市 いづみ	2012年4月～現在

2. 研究概要

当研究分野では、細胞死と免疫・炎症応答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た研究を行っている。近年は、特に細胞死と炎症の誘導・制御に働く NLR ファミリー蛋白とそのシグナル伝達分子 ASC に着目している。ASC は2つのホモフィリック相互作用ドメインから成る細胞質アダプター蛋白で、ASC の過剰発現でアポトーシスが誘導されること、多くのヒトがん組織において DNA メチル化による ASC の発現抑制が認められること、p53 により ASC の発現が誘導されることなどが報告されている。一方、NLR ファミリーは Apaf-1 と類似の構造を持つ細胞質蛋白群で、その一部は病原体成分などに応答し、自然免疫応答を活性化するパターン認識受容体として機能する。中でも NLRP3 や NLRC4 は ASC を介してカスパーゼ 1 を活性化することで、IL-1 β や IL-18 などの炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たすことが最近明らかにされた。また、我々が発見した NLR 蛋白 PYNOD (NLRP10)は、HEK293 細胞を用いた遺伝子再構成実験から、ASC やカスパーゼ 1 の機能を抑制する因子であることが示唆された。評価対象期間の研究から、我々は ASC ががん治療の標的分子となりうることを示すとともに、細胞死および炎症シグナル伝達における ASC の役割の一端を明らかにした。また、PYNOD トランスジェニックマウスや欠損マウスを作成し、PYNOD の生理的役割の解明に取り組んでいる。

3. 主な研究成果

1) ASC を標的としたがん治療モデルの検討

我々は以前、NLRC4(別名 CARD12)と NOD2 (ムラミルジペプチドに応答する NLR 蛋白) のキメラ蛋白 C12N2 を細胞に発現させ、ムラミルジペプチド刺激で細胞内の ASC を活性化する実験システムを確立した。今回、様々なヒトがん細胞株に C12N2 を発現させ、ムラミルジ

ペプチドで刺激すると、アポトーシスが誘導される細胞株とネクローシス様細胞死が誘導される細胞株に分けられることを見出した。ASCの活性化でアポトーシスが誘導される NUGC4 ヒト胃がん由来細胞株もネクローシス様細胞死が誘導される COLO205 ヒト大腸腺がん由来細胞株も、ヌードマウスの皮内に移植し、直径 5 mm 程度の腫瘍が形成された時点でムラミルジペプチドを静脈内投与すると、腫瘍の完全退縮が誘導された。これらの結果から、ASCの活性化はがん細胞にアポトーシスあるいはネクローシス様細胞死を誘導し、ASC はがん治療の分子標的となりうることが示された（原著論文 4）。

2) ASC 依存性細胞死の様式を決定する分子機構の解析

上述のように、ASC を活性化すると、細胞のタイプによってアポトーシスを起こす場合と、ネクローシス様細胞死を起こす場合がある。この ASC 依存性細胞死の様式を決定する因子を探索したところ、カスパーゼ 1 を発現する細胞のみがネクローシス様細胞死を起こすことを見出した。また、ネクローシスタイプの細胞のカスパーゼ 1 をノックダウンすると ASC の活性化に応答してアポトーシスを起こすようになり、逆に、アポトーシスタイプの細胞にカスパーゼ 1 を発現させるとネクローシス様細胞死を起こすようになることを示した。すなわち、ASC の活性化に応答して細胞がネクローシス様細胞死を起こすにはカスパーゼ 1 が必要であり、カスパーゼ 1 の存在しない細胞はアポトーシスを起こすことを示した。また、ASC 依存性ネクローシス様細胞死の誘導にカスパーゼ 1 の酵素活性は必要ないことを明らかにした（原著論文 3）。

3) 細菌感染によるヒト単球系細胞株の ASC 依存性細胞死の分子機構の解析

サルモネラ菌などに感染したマクロファージは、しばしばネクローシス様の細胞死をおこす。このような細胞死は専ら細菌毒素による受動的な細胞死と考えられてきたが、最近このような細胞死も実は ASC が関与するマクロファージの能動的な細胞死（プログラム細胞死）であることが明らかになった。しかし、このような細胞死がカスパーゼ 1 依存性であるか否かについては、研究者間で意見が割れていた。今回我々は、緑膿菌や黄色ブドウ球菌感染によるヒト単球系細胞株のネクローシス様細胞死はカスパーゼ 1 の発現を RNAi でノックダウンすると抑制されるが、カスパーゼ 1 阻害剤では抑制されないことを見出した。すなわち、上述のヒトがん細胞の ASC 依存性ネクローシス様細胞死と同様、細菌感染によるヒト単球の細胞死もカスパーゼ 1 に依存するが、その酵素活性には依存しないことが判明した。我々の結果は、上述のカスパーゼ 1 依存性に関する議論に決着をつけるものと思われる（原著論文 3）。

4) ASC による遺伝子発現誘導の分子機構と誘導遺伝子レポトリの検討

我々は以前、HEK293 細胞に C12N2 と ASC を発現させた細胞株を作成し、MDP 刺激により ASC を活性化すると IL-8 の産生が誘導されること、この応答にカスパーゼ 8 依存性の NF- κ B の活性化が必要であることを報告した。今回、他の転写因子について検討したところ、ASC 活性化による IL-8 産生誘導には細胞自律的な AP-1 の活性化が寄与し、この AP-1 の活性化に

はカスパーゼ 8、JNK と p38 が必要であることが判明した。一方、ASC の活性化により APRE(STAT3)レポーターの活性化も誘導されるが、この応答はパラクライン因子の産生に依存した非細胞自律的な応答であることが判明した。また、DNA マイクロアレーを用いて ASC 活性化により誘導される遺伝子レパートリーを検討したところ、主に転写、炎症、細胞死などに関する遺伝子群の発現が誘導されることが判明した（原著論文 6）。

5) PYNOD の機能解析

PYNOD トランスジェニック (PYNOD-Tg) マウスは、細菌感染などによるマクロファージの IL-1 β 産生が野生型マウスに比べて低下していること、致死量の lipopolysaccharide (LPS) 投与に抵抗性を示すことなどを示した（原著論文 5）。PYNOD-Tg マウスの表現型は ASC 欠損マウスの表現型と類似している。さらに免疫染色により、ASC が形成するスペックに内在性の PYNOD が刺激依存的に共局在することが観察された。これらの結果は、これまで PYNOD を過剰発現させた培養細胞を用いて得られた知見とも一致し、PYNOD の発現が強く誘導された場合は、動物個体レベルでも ASC の機能を抑制するものと考えられる。一方、PYNOD 欠損 (PYNOD-KO) マウスの解析では、これまでのところマクロファージの IL-1 β 産生能やマウスの LPS 感受性の特段の亢進は認められていない（未発表）。したがって、恒常的な発現レベルの PYNOD は IL-1 β の産生抑制などに必要不可欠な役割を果たしていないと考えられる。これは、IL-1 β の産生制御に関わる分子機構の多重性によるものと考えられる。

4. 今後の研究目標

ASC ががん治療の標的分子となりうるという我々の結果に基づき、ヒトがん組織における ASC や NLR ファミリー遺伝子の発現について解析を進めている。ASC 依存性のネクローシス様細胞死に関しては、カスパーゼ 1 の下流で、どのような経路で細胞死が誘導されるのかを明らかにしたい。最近、他のグループから PYNOD 欠損マウスでは、抗原を取り込んだ樹状細胞の所属リンパ節への移動が著しく抑制されており、個体レベルでの抗原特異的 T 細胞応答が著しく減弱していることが報告された。今後、腫瘍免疫を含む獲得免疫系における PYNOD の役割についても解析を進める予定である。まだプレリミナリーな結果であるが、一部の消化器がんでは PYNOD mRNA の発現が上昇している可能性があり、がんのタイプ、悪性度、予後などとの関連を検討していく予定である。がん組織においては様々な原因でがん細胞や間質細胞の細胞死が誘導される。死細胞からは様々な生理活性因子が放出され、それらはがんの増殖や悪性化に影響を及ぼすと考えられる。さらに、近年、アポトーシス以外にも様々なプログラム細胞死の様式が存在することが明らかになってきた。そこで、今後、がん組織における細胞死の様式の違い、それらの放出する生理活性因子の違いが、がん微小環境、しいてはがんの増殖や浸潤・転移などにどのような影響を与えるか検討する予定である

5. 共同利用・共同研究拠点としての役割を果たすことに関連する活動について

以下の学外、学内共同研究を行った、または行っている。

共同研究（学外）

1. 「Toll 様レセプター刺激により誘導される前立腺癌細胞の細胞死メカニズムの解明」（原著論文1）島根大学医学部・原田 守 教授、原嶋 奈々江 助教
2. 「ASC が関わる炎症とプログラム細胞死のクロストーク解明」 千葉大学大学院医学研究院・神戸 直智 准教授
3. 「プログラムネクロシス細胞のメタボローム解析」理化学研究所植物科学研究センター・及川 彰 研究員
4. 「BCG の抗癌活性発現における炎症反応および免疫応答の分子基盤の確立」琉球大学熱帯生物圏研究センター・松崎 吾朗 教授、梅村 正幸 助教

共同研究（学内）

1. 「子宮内膜癌における NLRP3 の発現とその役割」（原著論文7）医薬保健研究域医学系 井上 正樹 教授、大野 智 准教授（現、東京女子医科大学 准教授）
2. 「虚血性急性腎障害における Fas リガンドの役割」医薬保健研究域医学系 和田 隆志 教授、古市 賢吾 准教授
3. 「ASC を活性化する海洋微生物由来天然物の探索」医薬保健研究域薬学系・太田 富久 教授、川畑 哲郎 助教
4. 「胃がん発症モデルマウスにおける PYNOD の役割の検討」がん進展制御研究所 腫瘍遺伝学研究分野 大島 正伸 教授
5. 「ヒト消化器がんにおけるインフラゾーム関連遺伝子発現の解析」がん進展制御研究所 腫瘍制御研究分野 源 利成 教授

6. 研究業績

原著論文

1. Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., and Harada, M.: Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012, 61(5):667-676
2. Furuichi, K., Kokubo, S., Hara, A., Kitajima, S., Toyama, T., Okumura, T., Suda, T., Mukaida, N., Kaneko, S. and Wada, T.: Fas ligand has greater impacts on apoptosis and inflammation in ischemic acute kidney injury than TNF- α . *Nephron Extra* 2012, 2(1):27-38
3. Motani, K., Kushiya, 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. *J. Biol. Chem.* 2011, 286(39):33963-33972
4. Motani, K., Kawase, K., Imamura, R., Kinoshita, T., Kushiya, H., and Suda, T.: Activation of ASC induces apoptosis or necrosis, depending on the cell type, and causes tumor eradication. *Cancer Sci.* 2010. 101(8):1822-1827

5. Imamura, R., Wang, Y., Kinoshita, T., Suzuki, M., Noda, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Okamoto, H., and Suda, T.: Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. *J. Immunol.* 2010. 184(10):5874-5884.
6. 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(12):7655-7662
7. Ohno, S., Kinoshita, T., Ohno, Y., Minamoto, T., Suzuki N., Inoue M., and Suda, T.: Expression of NLRP7 (PYPAF3, NALP7) Protein in Endometrial Cancer Tissues. *Anticancer Res.* 2008. 28(4C):2493-2497.

総説・著書

1. 須田貴司: ASC ; 細胞死と炎症の接点で働くアダプター分子. *実験医学* 2008年、第26巻 : 3013-3018頁
2. 須田貴司: 細菌感染による能動的細胞死とインフラマソーム. *実験医学* 2012年、第30巻 : 566-570頁

主な学会発表

1. Suda, T., Hasegawa, M., Motani, K., Matsumoto, N., Kinoshita, T., Imamura, R.: Mechanism and repertoire of ASC-mediated gene expression. *Keystone Symposia Innate Immunity: Signaling Mechanisms.* (Keystone, Colorado) Feb. 2008
2. 須田貴司: NLRファミリー: 新しいアポトーシスと炎症の接点. 第29回日本炎症・再生医学会、シンポジウム (東京) 2008年7月
3. Kou Motani, Takashi Suda: ASC mediates apoptotic or necrotic cell death depending on the cell type. 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2008年10月
4. Imamura, R., Suda, T.: Anti-inflammatory role of PYNOD in mice. 2008 日本免疫学会総会・学術集会, (京都) 2008年12月
5. 木下健、今村龍、須田貴司: マウス NLRP2 による炎症制御機構. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008年12月
6. 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
7. 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
8. 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

9. 木下健、今村龍、須田貴司 : The role for NLRP3 in the TNF production by macrophages. 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2009 年 12 月
10. Motani, K., Kawase, K., Imamura, R., Kinoshita, T., Kushiyama, H., and Suda, T.: Activation of ASC induces apoptotic or necrotic cell death depending on the cell type and causes tumor rejection. 5th International Symposium of Institute Network (Kanazawa) June, 2010
11. Motani, K., Imamura, R., Kushiyama, H., Kinoshita, T., and Suda, T.: Molecular switch for the ASC-mediated apoptosis and necrosis. 14th International Congress of Immunology (Kobe) Aug, 2010
12. Imamura, R., Motani, K., Kinoshita, T., Wang, Q., Kushiyama, H., and Suda, T.: Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 14th International Congress of Immunology (Kobe) Aug, 2010
13. Harashima, N., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., and Harada, M.: Toll-like receptor 3-ligand induced apoptotic and autophagic cell death and growth arrest in human prostate cancer cells. 14th International Congress of Immunology (Kobe) Aug, 2010
14. 木下健、須田貴司 : The role for NLRP3 in the IL-1 β secretion by tumor cells. 第 69 回日本癌学会学術総会, (大阪) 2010 年 9 月
15. 須田貴司 : 細胞死と炎症シグナルのクロストーク. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ, (神戸) 2010 年 12 月
16. Motani, K., Kushiyama, H., Imamura, R., Kinoshita, T., and Suda, T.: Caspase-1 induces ASC-mediated necrosis independently of its catalytic activity. 13th International TNF Conference (Awaji) May, 2011
17. Imamura, R., Kinoshita, T., Wang, Q., Kushiyama, H., and Suda, T.: Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 日本分子生物学会 第 11 回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム (金沢) 2011 年 5 月
18. 須田貴司: 細胞死の様態を決定する新しい分子機構. 第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム, (東京) 2011 年 7 月
19. Kushiyama, H., Imamura, R., Suda, T.: Trichostatin A induces macrophage IL-1 β production by activating NLRP3 inflammasome. 2011 年日本免疫学会学術集会 ワークショップ, (幕張) 2011 年 11 月
20. Suda, T., NLRs: cytoplasmic stress sensors mediating inflammation and cell death. 第 34 回日本分子生物学会年会 シンポジウム, (横浜) 2011 年 12 月
21. Kinoshita, T., Imamura, R., and Suda, T.: NLRP3 mediates NF- κ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会, (横浜) 2011 年 12 月

特許

1. 発明者 : 須田貴司、他 2 名

- 発明の名称：予防・治療薬。
日本特許登録番号：04339405
登録日：2009年7月10日
2. 発明者：須田貴司、他2名
発明の名称：予防・治療薬。
カナダ特許登録番号：2270423
登録日：2009年9月15日
3. 発明者：須田貴司、他3名
発明の名称：Fas ligand derived polypeptides。
米国特許登録番号：7622554
登録日：2009年11月24日
4. 発明者：須田貴司、他3名
発明の名称：A Fas ligand, a fragment thereof and DNA encoding the same
カナダ特許登録番号：2153507
登録日 2009年12月29日

7. 外部資金受け入れ状況

2012年度

1. 須田貴司：科学研究費補助金 基盤研究（B）研究代表者「炎症抑制型NLR蛋白PY NODの生理的・病理的役割の解明」直接経費 4100千円
2. 今村 龍：科学研究費補助金 基盤研究（C）研究代表者「抗炎症NLRファミリー分子PYNODの発現制御機構の解析」直接経費 1700千円
3. 今村 龍：科学研究費補助金 新学術領域（発がんスパイラル）（公募）研究代表者「胃がんおよび大腸がんの発症における細胞質病原体センサー蛋白の役割の解明」直接経費 4500千円
4. 木下 健：科学研究費補助金 基盤研究（C）研究代表者「自然免疫ストレスセンサーNLRPの新機能とその分子機構解明」直接経費 900千円

2011年度

5. 須田貴司：科学研究費補助金 基盤研究（B）研究代表者「炎症抑制型NLR蛋白PY NODの生理的・病理的役割の解明」直接経費 6000千円
6. 今村 龍：科学研究費補助金 基盤研究（C）研究代表者「皮膚におけるASCおよびPYNODの機能の解明」直接経費 700千円
7. 今村 龍：科学研究費補助金 新学術領域（発がんスパイラル）（公募）研究代表者「胃がんおよび大腸がんの発症における細胞質病原体センサー蛋白の役割の解明」直接経費 4500千円
8. 木下 健：科学研究費補助金 基盤研究（C）研究代表者「自然免疫ストレスセンサーNLRPの新機能とその分子機構解明」直接経費 2400千円

2010年度

9. 今村 龍：科学研究費補助金 基盤研究（C）研究代表者「皮膚におけるASCおよびPYNODの機能の解明」直接経費 1400千円

2009 年度

10. 須田貴司：科学研究費補助金 がん特定領域（がん特性）研究代表者「ASCを標的とした癌治療法の開発」直接経費 5500 千円
11. 今村 龍：科学研究費補助金 基盤研究（C）研究代表者「皮膚における ASC および PYNOD の機能の解明」直接経費 1500 千円

2008 年度

12. 須田貴司：科学研究費補助金 がん特定領域（がん特性）研究代表者「ASCを標的とした癌治療法の開発」直接経費 5700 千円

8. 特記事項

学会等での活動状況（役員等）

日本免疫学会 評議員（2003 年～現在）

日本免疫学会アウトリーチ活動（出張講義、公開講座など、2008～2009 年）

日本 Cell death 学会 評議員（2010 年～現在）

第 34 回日本分子生物学会年会 プログラム委員（2011 年）

第 13 回 TNF 国際会議 組織委員（2011 年）

学術・社会活動

The Journal of Biochemistry 編集委員（2008 年 1 月～2011 年 12 月）

富山県薬事研究所外部評価委員（2010 年 4 月 1 日～現在）

教育活動

金沢大学医学部において基礎免疫学の講義、実習を担当

金沢大学公開講座 「がん研究最前線」（2012 年 5 月）