

## 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  | 助教  | 木下 健 |
| 博士研究員       | 張 培培  |     |      |
| 大学院生 (博士課程) | 串山 裕子 | 研究生 | 趙 天祥 |
| 技術補佐員       | 齋藤 翔子 |     |      |

### 【研究概要】

細胞死と炎症は共にかん微小環境に大きな影響を及ぼすことから、我々は細胞死と炎症のシグナル伝達の接点で働く蛋白分子群に着目した研究を行っている。近年は、特に自然免疫応答や細胞死の誘導・制御に働く NLR ファミリー に属する細胞内蛋白質に着目した研究を行っている。具体的には、1) PYNOD (NLRP10)の獲得免疫応答における役割, 2) がん細胞における NLRP3 の役割, 3) パイロトーシス (NLR 蛋白などが関与するカスパーゼ 1 依存性プログラム細胞死) の分子機構の研究などを行っている。詳細は以下の通りである。

### <2013 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

#### 1) 獲得免疫系における PYNOD の機能解析:

PYNOD は我々が発見した NLR ファミリーに属する蛋白質である。我々は細胞レベルでの解析や PYNOD トランスジェニックマウスの解析から、PYNOD はカスパーゼ 1 の機能を阻害することで、IL-1 $\beta$ などの産生を抑制する作用を持つことを示してきた。ところが、PYNOD 欠損マウスを樹立したところ、明確な自然免疫応答の異常は認められず、むしろ獲得免疫応答の一種である遅延型過敏症応答が著明に抑制されていることが判明した。Eisenbarth らは、PYNOD 欠損マウスでは、抗原を取り込んだ末梢組織の樹状細胞が所属リンパ節へ移動するプロセスが障害されていると報告した。しかし、我々の解析ではそのような異常は確認できなかった。そこで、PYNOD 欠損マウスの T 細胞の抗原応答性や樹状細胞の抗原提供能について *in vitro* 実験系で検討したが、有意な機能低下は認められなかった。今後は、PYNOD 欠損マウスの T 細胞や樹状細胞の生体内での動きをさらに詳細に解析していく予定である。また、PYNOD 欠損マウスの腫瘍免疫応答についても検討する。

一方、大島教授らが開発した C2mE および Gan マウスの胃病変部で PYNOD

の発現が増強していたことから、胃病変形成における PYNOD の関与を検討する目的で、PYNOD 欠損 C2mE および Gan マウスを作成した。PYNOD 欠損 C2mE マウスの胃病変に関して明瞭な差は認められなかった。さらに PYNOD 欠損 Gan マウスについて、現在経過観察中である。

## 2) がん細胞における NLRP3 の役割の解析：

NLRP3 はインフラマソーム（カスパーゼ 1 活性化複合体）を形成する NLR 蛋白の一つとして注目されているが、我々は NLRP3 が NF- $\kappa$ B 活性化にも寄与することを示してきた。また、各種がん細胞株において NLRP3 をノックダウンすると IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , MT1-MMP の mRNA 発現が抑制されることを見出した。そこで、GEO (Gene Expression Omnibus) で種々のヒトがん組織における NLRP3 mRNA の発現を検索したところ、グリオーマにおいて亢進していることが判明した。また、グリオーマ細胞株 U87MG において NLRP3 発現をノックダウンすると TGF- $\beta$ , MT1-MMP の発現低下、MT1-MMP の基質 (MMP2) 切断活性の減弱、*in vitro* マトリゲル浸潤アッセイにおける浸潤能低下などが認められた。今後は、NLRP3 ノックダウン細胞のがん特性の *in vivo* モデルでの解析、NLRP3 による TGF- $\beta$ , MT1-MMP 発現誘導の分子機構の解析、グリオーマ治療抵抗性における NLRP3 の関与の可能性の検証などを行う予定である。

また、今後の有望な遺伝子ターゲティング、ゲノム編集技術になると考えられる人工ヌクレアーゼ TALEN の作製技術を導入した。これまでにヒト NLRP3 および caspase-1 遺伝子を標的とする TALEN を設計し、caspase-1 ゲノム遺伝子切断活性を有する TALEN を構築できた。引き続き、caspase-1 ノックアウト細胞の作製および NLRP3 に対する TALEN 構築・ノックアウト細胞作製を試みる。

## 3) パイロトーシスの分子機構の解析：

パイロトーシスはカスパーゼ 1 依存性のネクロトーシス様プログラム細胞死で、細菌などに感染したマクロファージで見られる細胞死として発見された。我々は、カスパーゼ 1 を発現する多くのがん細胞株でもパイロトーシスが誘導されることを見出した。また、パイロトーシスはカスパーゼ 1 に対する shRNA で抑制されるが、カスパーゼ 1 阻害剤では抑制されないことを見出し、カスパーゼ 1 の酵素活性に依存しないパイロトーシス誘導機構が存在することを見出した。そこで、パイロトーシスの分子機構をさらに明らかにするために、現在 shRNA ライブラリーを用いたパイロトーシス関連遺伝子の同定を目指した研究を進めている。

## 【 研究業績 】

### <論文発表>

原著

(当研究室主体)

1. Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiyama, H., Nagata, S., and Suda, T.  
Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. *Int. Immunol.* 2013, 25:363-372

### <学会発表>

1. 須田貴司: パイロトーシス細胞の貪食とそのメカニズム 第22回日本 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム (京都) 2013年7月
2. 須田貴司: パイロプトーシスとその被貪食機構 第86回日本生化学会大会 シンポジウム, (横浜) 2013年9月

### <外部資金>

1. 須田貴司, 科学研究費 基盤研究 (B) (代表): 炎症抑制型 NLR 蛋白 PYNOD の生理的・病的役割の解明. 5,330 千円
2. 今村 龍, 科学研究費 基盤研究 (C) (代表): 抗炎症 NLR ファミリー分子 PYNOD の発現制御機構の解析. 2,210 千円
3. 木下 健, 科学研究費 基盤研究 (C) (代表): 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. 1,040 千円

### <共同研究>

学外

1. 広島大学生物圏科学研究科 加藤 範久 教授  
NLRP3 インフラマソーム活性化におけるビタミン B6 の効果の検討
2. 東京薬科大学生命科学部 田中 正人 教授, 西躰 元 助教  
腫瘍随伴マクロファージによるがん死細胞貪食とがん免疫抑制機構の解明
3. 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  
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
4. 京都府立医科大学大学院医学研究科 鈴木孝禎 教授  
HDAC 阻害剤の IL-1 $\beta$  産生誘導機構の解析

5. 鳥取大学医学部 林 眞一 教授, 吉野 三也 准教授  
PYNOD 欠損樹状細胞の抗原輸送能の検討

所内

1. 腫瘍遺伝学研究分野 大島 正伸 教授  
胃がん発症モデルマウスにおける PYNOD の役割の検討
2. 腫瘍制御研究分野 源 利成 教授  
ヒト消化器がんにおけるインフラマゾーム関連遺伝子発現の解析