

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590374

研究課題名(和文) 抗炎症NLRファミリー分子PYNODの発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Analyses of molecular mechanism for regulating gene expression of anti-inflammatory NLR family member PYNOD

研究代表者

今村 龍 (Imamura, Ryu)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10311680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜のTLR蛋白群および細胞質のNLR蛋白群は、病原微生物センサーである。申請者らは、自ら同定したNLR蛋白、PYNODが炎症抑制活性を持つことを見出した。さらに胃癌マウスモデルの病変部でPYNODの発現が、著明に上昇していることを発見した。炎症～発がん過程でPYNODの発現が上昇し、抗炎症作用の一端を担っているものと推測される。しかし他のマウス疾患モデルの腸炎や大腸がんではPYNODの発現増強が認められなかった。一方ヒト胃癌患者サンプルで、papillary type adenocarcinomaの組織型を含むサンプルにおいてPYNODの発現が上昇していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)： Many members of the nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD) and leucine-rich-repeat (LRR)-containing protein (NLR) family play important roles in pathogen recognition and inflammation. We identified PYNOD/NLRP10, one of the member of this family that lacks LRR, and found that PYNOD inhibit inflammatory signal mediated by caspase-1 and ASC. To further investigate physiological function of PYNOD, we have established PYNOD-deficient mice. PYNOD-deficient mice exhibited no obvious gross abnormalities, no evidence of autoimmunity and spontaneous tumor formation, and normal innate immune responses.

However, we have found that PYNOD is highly expressed in stomach of gastric cancer mouse model (Gan mice), in which inflammatory COX-2/PGE2 pathway and Wnt signaling are activated simultaneously in gastric mucosa. Furthermore, we also detected high PYNOD expression in tumor region containing papillary type adenocarcinoma from gastric cancer patients.

研究分野：免疫学

キーワード：NLRファミリー 自然免疫 PYNOD 胃癌 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

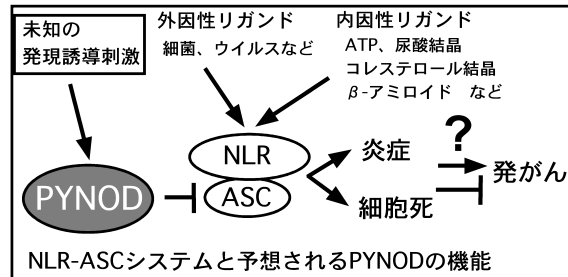
(1) 2011年のノーベル医学・生理学賞の対象となった Toll-like receptor (TLR) は、細胞外の病原微生物を監視する自然免疫システムのセンサーであり、主に細胞膜に存在する。これに対し、最近、細胞質にも病原体の侵入を監視し、自然免疫を活性化するセンサー蛋白が存在することが明らかになった。このような細胞質病原体センサーとして、少なくとも一部の NLR ファミリー (Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family) 蛋白が重要な役割を果たすことが明らかになっている。

(2) 面白いことに NLR 蛋白は、細菌やウイルスなどの病原体成分ばかりでなく、ATP や痛風の原因となる尿酸結晶、アルツハイマー病の原因といわれる β アミロイド、動脈硬化と関係するコレステロール結晶など様々な内因性のリガンドにも反応し、炎症応答を惹起することが明らかになってきている。さらに、NLR ファミリー遺伝子の突然変異はクローン病をはじめとする種々の自己炎症性疾患の原因となる。

(3) 我々は世界に先駆けて、この細胞質センサーである NLR ファミリーに着目しその生理的・病理的機能について解析を進めてきた。また細胞質蛋白質 ASC は NLR 蛋白とカスパーゼ 1 をつなぐアダプターとして働くことが明らかになっている。NLR 蛋白-ASC-カスパーゼ 1 の複合体により、カスパーゼ 1 が活性化され、IL-1β や IL-18 等の炎症性サイトカインの前駆体から活性型へのプロセシングが触媒されるが、我々はさらに ASC がアポトーシスの誘導や、NF-κB および AP-1 などの転写因子の活性化にも働くことを明らかにした。(Hasegawa, M., et al. J. Biol. Chem. 280, 2005, Oncogene 26, 2007, J. Immunol. 182, 2009)

(4) 一方、PYNOD は、我々が発見、同定した NLR 蛋白であるが、細胞レベルでの再構成実験の結果、この蛋白質は逆に ASC やカスパーゼ 1 の活性化を阻害する機能を持つことが判明した。(Wang, Y., et al. Int. Immunol. 16, 2004) さらに PYNOD トランスジェニックマウスはエンドトキシンシ

ックに耐性を示し、このマウスから調製したマクロファージにおいてもカスパーゼ 1 の活性が抑制されていることを明らかにした。(Imamura, R., et al. J. Immunol. 184, 2010) つまり PYNOD は NLR ファミリー蛋白の中でも抗炎症作用を持つユニークな分子である。(下図参照)



(5) 現在 PYNOD の生理的役割を解明するために、PYNOD ノックアウトマウスを樹立し解析を進めている。また PYNOD は、マクロファージなどの細胞や皮膚、大腸、心臓といった組織で恒常的に発現しているが、発現量は決して高くない。そこで我々は、生体内には何らかの PYNOD 発現誘導刺激が存在するのではないかという発想に至った。

2. 研究の目的

(1) 胃がんの発生においては、上皮細胞での Wnt シグナル亢進および間質細胞でのプロスタグランジン E2(PGE2)の産生が重要と考えられている。当がん進展制御研究所の大島正伸教授のグループが、この2つのシグナルを単独で活性化させたトランスジェニックマウス(K19-Wnt1 および K19-C2mE)を作製したところ、それぞれ前癌病変や過度の炎症といった異常が見られるものの、発がんに至ることはなかった。ところが交配により双方のシグナルを同時に活性化させたトランスジェニックマウス(K19-Wnt1/C2mE, Gan マウス)では全例で胃がんの発生が認められた。(Oshima, H., et al. Gastroenterology 131, 2006)

(2) 大島正伸教授との共同研究により、これらのトランスジェニックマウスの胃病変部における遺伝子発現データの中から NLR ファミリー遺伝子の発現プロファイルを抽出したところ、大変興味深いことに、C2mE マウス(炎症)および Gan マウス(胃がん発症)で、PYNOD 遺伝子の発現が著明に上昇

していることを発見した。この結果は我々の当初の発想をサポートするものであり、PYNOD の発現が誘導される細胞および環境（刺激）が生体内に存在するというを示唆している。過度の炎症が発生している病変部(C2mE マウス)で PYNOD の発現が上昇していることから炎症～発がんのプロセスにおいて PYNOD の発現が上昇し、抗炎症作用の一端を担っているのではないかと考えられる。そこで本研究課題では、PYNOD の発現誘導がおこる組織および細胞、そして発現誘導刺激の探索、さらにその分子メカニズムに迫ることを研究目的とする。

3. 研究の方法

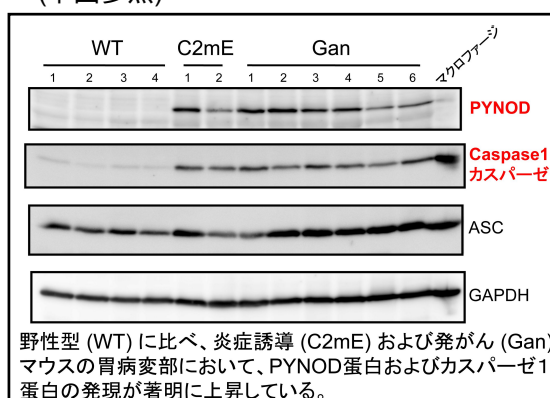
(1) C2mE マウス（炎症誘導マウス）の胃病変部における PYNOD 発現誘導細胞の同定を行う。(2)-1 ヘリコバクター感染時の胃炎病変部、(2)-2 他臓器での実験的炎症誘発時の病変部（腸炎、肝炎、肺炎）(2)-3 ヒトの疾患（胃がん・大腸がん）における病変部、について PYNOD 分子発現を検討する。(1)(2) に関してはウェスタンブロット法、定量 RT-PCR および免疫組織染色の手法によってアプローチする。さらに(3) PYNOD の発現誘導をモニターするために、PYNOD 遺伝子の発現制御下（遺伝子上流 10 kb 領域）で PYNOD-GFP 融合蛋白が発現するインジケータ細胞を作製し、シグナル伝達経路を解析する。加えて(4) このインジケータ細胞を用いて、PYNOD 発現誘導に関わるシグナル伝達分子を Expression cloning の手法により同定することを試みる。

4. 研究成果

(1) Wnt-1, Cox-2, mPGES-1 遺伝子を同時に発現させたトランスジェニックマウス(Gan マウス)は、高頻度に胃がんの発生が認められる。これらのトランスジェニックマウスにおける NLR ファミリー遺伝子の発現をマイクロアレイで解析したところ、PYNOD の発現が C2mE(Cox-2+mPGES-1)マウス(炎症誘導マウス)および Gan マウス(胃がん発

症マウス)で著明に上昇していることを発見した。さらにこれらのマウスモデルにおいて胃の組織から蛋白を抽出し、我々がこれまでに樹立していた抗マウス PYNOD モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットングによる解析を行ったところ、マイクロアレイの結果と相関して蛋白レベルでも PYNOD の高発現が認められた。興味深いことに、PYNOD の制御標的因子のひとつと想定されるカスパーゼ1の発現も PYNOD と同様の発現パターンを示すことが明らかとなった。

(下図参照)



(2) PYNOD を高発現している細胞を同定する目的で、胃がんモデルマウスから組織切片を作製し、PYNOD に対する免疫組織染色を試みた。しかしこれまでに作製していた抗マウス PYNOD モノクローナル抗体は、組織染色において特異性を示すものではなかった。そこで他の NLR ファミリー蛋白と相同性がない PYNOD の C 末端を抗原蛋白として新たに複数のモノクローナル抗体を樹立した。これらの抗体はウェスタンブロットングにおいては特異性を示したが、野性型と PYNOD 欠損マウスの組織切片を用いた免疫組織染色において特異性を示さなかった。

(3) 胃がんマウスにおける PYNOD 発現の結果をふまえて、ヒトの疾患についても検討を加えた。当がん進展制御研究所の源利成教授との共同研究により、胃がん患者のサンプルについてヒト PYNOD の発現を定量 PCR で検討したところ、papillary 組織型胃がんを含むサンプルについて、約 50% の症例で

PYNOD の発現が、腫瘍部位で高いという結果を得た。そこでマウスモデルと同様に免疫組織染色およびウエスタンブロッティングによる PYNOD の検出を試みた。前述の抗マウス PYNOD 抗体と同様の方法で抗ヒト PYNOD モノクローナル抗体を複数樹立し、ウエスタンブロッティングで特異性を確認した。次に、定量 PCR によって PYNOD の発現が高かった胃癌組織サンプルに対して免疫染色を行ったが、特異的な染色が見られなかった。さらに papillary 組織型を含む凍結ヒト胃癌検体ブロックから蛋白を抽出しウエスタンブロッティングを行ったが、正常部位とがん病変部との間で有意な PYNOD 発現の差は認められなかった。マウスおよびヒト PYNOD に対するモノクローナル抗体については、組織染色を指標として継続樹立中である。

(4) 他の臓器における炎症・発がんマウスモデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の経口投与によって誘導される大腸炎および DSS 経口投与とアゾキシメタン腹腔投与の組み合わせによって誘導される大腸がんの病変部位における PYNOD の発現をウエスタンブロッティングによって検証したが、コントロールと比較して有意な PYNOD 蛋白の増加は認められなかった。

(5) PYNOD の内在性発現が認められるマウス細胞株およびマウス腹腔マクロファージに対して、様々なサイトカイン、PAMPs、UV 照射あるいは感染による刺激を行ったが、PYNOD の発現上昇を誘導できる刺激を見つけることができなかった。さらに同細胞についてプロスタグランジン E2 による直接刺激も行ったが、やはり PYNOD の発現上昇は認められなかった。

(6) 我々は PYNOD 欠損マウスの樹立に成功し、生理的あるいは病理的な解析を行っている。PYNOD 欠損マウスは正常に発育し、外見上の異常は認められない。妊孕性も正常

であり、自己免疫疾患やがんなどを自然発症する表現型も認められなかった。さらに PYNOD 欠損マウスから調整したマクロファージや樹状細胞における自然免疫系の応答は正常であり、LPS 腹腔投与によるエンドトキシンショック応答も野性型と比べて差は認められなかった。

(7) PYNOD の自然免疫系での役割は未だ不明であるが、同時期に別グループから、PYNOD 欠損マウスの表現型に関する論文が Nature 誌に発表された。(Eisenbarth, SC., et al. Nature 484, 2012) 彼らの報告によると PYNOD 欠損マウスの著明な欠陥は、樹状細胞が炎症局所からリンパ節に移動できないことであった。ところが、我々が樹立した PYNOD 欠損マウスにおいては、樹状細胞の移動に関して異常は認められなかった。驚くべきことに、2015 年になって同グループから、彼らの樹立した PYNOD 欠損マウスには、全く別の遺伝子 DOCK8 に変異が入っており、樹状細胞の移動の異常は、この DOCK8 遺伝子の変異によるものであることが報告された。(Krishnaswam, J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112, 2015) したがって、PYNOD の生理的・病理的役割は未解明のままである。

(8) 前述の胃癌マウスモデルである C2mE マウス(炎症誘導)および Gan マウス(発がん)と PYNOD 欠損マウスの交配を行い、PYNOD の炎症誘導および発がんに与える影響を個体レベルで検討した。C2mE/PYNOD 欠損マウスは C2mE マウスと同様に炎症が誘発され、組織変化や炎症細胞の浸潤などに差は認められなかった。一方、Gan/PYNOD 欠損マウスは、現在までのところマウス個体数が十分ではないものの、Gan マウスと比較すると腫瘍形成能がむしろ低くなる傾向が認められた。当初の予想に反して、PYNOD がむしろ腫瘍形成に必要なのかもしれない。PYNOD の発がんへの寄与に関しては、発現増強のメカニズムとともに in

vivo レベルでのさらなる解析が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 4 件)

1 Kinoshita, T., Imamura, R., Kushiyaama, H., and Suda, T. NLRP3 Mediates NF- κ B Activation and Cytokine Induction in Microbially Induced and Sterile Inflammation. PLoS One. 査読有 2015 in press

DOI: 10.1371/journal.pone.0119179

2 Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiyaama, H., Nagata, S., and Suda, T.

Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and efficiently engulfed by macrophages. Int. Immunol. 査読有 2013 25: 363-372

DOI: 10.1093/intimm/dxs161

3 Furuichi, K., Kokubo, S., Hara, A., Imamura, R., Wang, Q., Kitajima, S., Toyama, T., Okumura, T., Matsushima, K., Suda, T., Mukaida, N., Kaneko, S., and Wada, T. Fas ligand has a greater impact than TNF- α on apoptosis and inflammation in ischemic acute kidney injury. Nephron Extra 査読有 2012 2:27-38

DOI: 10.1159/000335533

4 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 査読有 2012

61:667-676

DOI: 10.1007/s00262-011-1132-1

{ 学会発表 } (計 8 件)

1 Kushiyaama, H., Imamura, R., Kinoshita, T., and Suda, T. 「HDAC inhibitors (HDACI) induce IL-1 production in human

monocytes by activating NLRP3 inflammasome.」日本癌学会シンポジウム / 共同利用・共同研究拠点シンポジウム 石川県立音楽堂 (石川) 2015 年 1 月 21 日

2 Yoshino, M., Imamura, R., Murata, A., Shimoda, Y., Hikosaka, M., Suda, T., and Hayashi, S. 「Migration of skin antigen-transporting cells in PYNOD-deficient mice.」第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都) 2014 年 12 月 10 日

3 Imamura, R., and Suda, T. 「Role of PYNOD (NLRP10) in the migration of effector T cells to inflamed tissues.」第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都) 2014 年 12 月 10 日

4 木下 健、今村 龍、須田貴司 「がん細胞における自然免疫センサー分子 NLRP3 の役割」第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 11 月 25 日

5 Kushiyaama, H., Suda, T., Imamura, R., and Kinoshita, T. 「HDAC 阻害剤はヒト単球に NLRP3 インフラマソーム依存性の IL-1 産生を誘導する」第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 27 日

6 Imamura, R., and Suda, T. 「Functional analyses of PYNOD (NLRP10) in mice.」3rd International Symposium on Carcinogenic Spiral and International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa Kanazawa Excel Hotel Tokyu (石川) 2013 年 1 月 25 日

7 Kinoshita, T., Imamura, R., and Suda, T. 「The role of NLRP3 in the induction of cytokine gene expression in tumor cells.」第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場 (福岡) 2012 年 12 月 12 日

8 Imamura, R. and Suda, T. 「Functional analyses of PYNOD (NLRP10) in mice.」第 41 回日本免疫学会学術集会 神戸国際会議

場 (兵庫) 2012 年 12 月 6 日

〔図書〕(計 1 件)

今村 龍 他、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、サイトカインのすべて「インターロイキン 14 (IL-14)」2012、861(97-102)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) がん進展制御研究所ホームページ
<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken>

(2) 腫瘍動態制御研究分野ホームページ
<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shuyoudoutaiseigyo/index.html>

(3) 免疫炎症制御研究分野ホームページ
<http://dimb.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今村 龍 (IMAMURA, Ryu)
金沢大学・がん進展制御研究所・助教
研究者番号：10311680

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：