

令和元年5月27日現在

機関番号：13301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26110002

研究課題名(和文)パイロトーシスの分子機構と役割

研究課題名(英文)Molecular mechanisms and roles of pyroptosis

研究代表者

須田 貴司(Suda, Takashi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：70250090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 69,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では当初、カスパーゼ1誘導プログラム細胞死であるパイロトーシスの分子機構と役割の解明を目指した。最近、パイロトーシス実行蛋白GSDMDが同定されたが、GSDMD欠損細胞でもカスパーゼ1依存性細胞死が誘導される。この細胞死の分子機構を解析し、GSDMD欠損細胞や、元々GSDMDの発現が低い神経細胞やマスト細胞ではカスパーゼ1がBid依存性アポトーシスを誘導することを示した(Nat Commun, 2019)。また、がん治療モデルを用い、がん細胞にパイロトーシスを誘導するとアポトーシスを誘導した場合よりも強い抗腫瘍免疫を誘導しうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カスパーゼ1はアルツハイマー病、虚血性脳傷害、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患をはじめ、虚血性心疾患や腎疾患などで細胞死に関与するとの報告がある。カスパーゼ1依存性細胞死に関する我々の成果はこれらの疾患の発症機序の解明に寄与する可能性がある。また、最近、がん免疫療法の有効性が注目されており、がん細胞にパイロトーシスを誘導した方がアポトーシスを誘導するより、強く抗腫瘍免疫を活性化するという我々の発見は、がん治療の新しい指針の一つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify molecular mechanisms and roles of caspase-1-mediated cell death. Recent studies identified gasdermin D (GSDMD) as the effector molecule of pyroptosis, a caspase-1-dependent inflammatory cell death. However, GSDMD-deficient macrophages are still susceptible to caspase-1 activation. Thus, we investigated the molecular mechanism of caspase-1-dependent GSDMD-independent cell death. We found that GSDMD-deficient cells exhibit Bid-dependent apoptosis in response to caspase-1 activation. We found the same for inherently GSDMD-null/low cells such as neuronal cells and mast cells. These findings may contribute to understanding of the mechanism of caspase-1-related diseases such as neurodegenerative diseases. In addition, we demonstrated that pyroptotic cell death of tumor cells induces stronger anti-tumor immune responses than apoptotic cell death in an animal tumor therapy model. The latter finding may help to develop novel strategy of cancer therapy.

研究分野：分子生物学、免疫学、腫瘍生物学

キーワード：パイロトーシス アポトーシス カスパーゼ-1 がん治療 がん免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルス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起こす。以前は、このような細胞死は細菌毒素などによる細胞にとっては受動的な細胞死(非プログラム細胞死)と考えられていた。ところが近年、この細胞死はカスパーゼ1に依存したプログラム細胞死であることが判明した。このプログラム細胞死を起こした細胞は速やかに細胞膜が破綻し、IL-1などの炎症性サイトカインを含む様々な炎症誘導物質を放出する。そのため、この細胞死はアポトーシスとは異なる炎症誘導性のプログラム細胞死であるとされ、パイロトーシス(パイロは炎、熱の意)と命名された。一方、カスパーゼ1の活性化機構については、病原体や死細胞などに由来する炎症誘導物質(各々PAMPsおよびDAMPsと呼ばれる)に反応してNLRP4, NLRP3, AIM2などのパターン認識受容体、アダプター蛋白ASC、カスパーゼ1などから成るインフラマソームと呼ばれる蛋白複合体が形成され、この複合体に集積したカスパーゼ1が近接活性化を起こすことが明らかにされた。しかし、カスパーゼ1以降のパイロトーシス誘導分子機構は分かっていなかった。また、カスパーゼ1依存性細胞死は神経細胞や心筋細胞、がん細胞などでも報告されているが、これらの報告の多くは細胞死の様式をアポトーシスと記述しており、マクロファージ以外の細胞のカスパーゼ1依存性細胞死がアポトーシスかパイロトーシスかは分かっていなかった。また、アポトーシスとパイロトーシスという細胞死様式の違いが、それらによって引き起こされる生体応答にどのような影響を与えるのか、細胞死の様式のみを変化させて比較するような研究はこれまで行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、パイロトーシスの分子機構の解明とアポトーシスとパイロトーシスの違いが引き起こす生体応答の違いの解明を目的とした。具体的には以下の目的で研究を進めた。

1)パイロトーシスの分子機構の解明: shRNA ライブラリー等を用いてパイロトーシスシグナル伝達因子(Pyroptosis Signal Transducers、以下PYSTsと略)の遺伝子を網羅的に同定することを目指した。また、本研究の進行中に、他の研究グループから、カスパーゼ1などの基質でパイロトーシスの誘導に働くガスダーミンD(GSDMD)蛋白が同定された。ところが、細菌感染などでカスパーゼ1が活性化すると、GSDMD欠損マクロファージは野生型マクロファージに比べ少し遅れて細胞膜の崩壊(LDHタンパクの放出)を伴う細胞死を起こした。そこで、GSDMD非依存性細胞死誘導機構が存在すると予想し、その分子機構の解明を目指した。

2)パイロトーシスとアポトーシスのダイニングコードおよびそれらが惹起する生体応答の比較解析:パイロトーシスあるいはアポトーシスを刺激依存的に誘導しうるがん細胞株をマウスに移植し、生体内でこれら様式の異なる細胞死を誘導した際に惹起される生体応答の異同を明らかにすることを目指した。また、様々な細胞、刺激でパイロトーシスあるいはアポトーシスを誘導した細胞から放出される代謝産物のパターンや生理活性を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

1)パイロトーシスの分子機構の解明

1-1)PYSTsの同定と機能解析

ヒト単球様白血球細胞株NOMO-1に、ムラミルジペプチド(MDP)に反応してインフラマソームを形成するキメラ蛋白C12N2発現ベクターを導入した細胞株(NOMO1-C12N2)はMDPで刺激するとパイロトーシスを起こして、ほぼ全滅する。この細胞株にshRNAライブラリーを導入し、MDP刺激後に生き残った細胞内に濃縮されたshRNAを次世代シーケンサーを用いて解析することで、パイロトーシスを抑制するshRNAを網羅的に同定した。それらの標的遺伝子をPYSTsの候補遺伝子として以下の解析を行った。遺伝子機能の網羅的解析はGeneOntology(<http://geneontology.org/>)で行った。候補遺伝子産物とカスパーゼ1の相互作用は蛋白相互作用データベースBioGrid(<https://thebiogrid.org/>)で検索した。蛋白間相互作用の確認と細胞内局在の検討はPYSTsにエピトープタグを付加し、HEK293T細胞発現系と免疫沈降法で行った。相互作用領域、アミノ酸の解析は系統的欠損変異体およびアラニン置換変異体を用い、上記相互作用解析法で行った。

1-2)カスパーゼ1依存性GSDMD非依存性細胞死の分子機構の解析

マウス大腸がん細胞株Colo26にFKBP-F36V変異体(Fv)三量体(Fv3)とカスパーゼ1の融合蛋白を導入し、CL26-iCasp1細胞株を樹立した。この細胞株をFv架橋剤AP20187で刺激することでカスパーゼ1を活性化し、パイロトーシスを誘導した。CRISPR-Cas9法でGSDMD、各種カスパーゼ、Bidなどの変異体を作成した。カスパーゼ1欠損マウスはWinnie W. Wong博士(BASF Bioresearch Corporation) GSDMD欠損マウスは城石俊彦教授(国立遺伝学研究所)より、Bid欠損マウスは竹原徹郎教授(大阪大学)より供与された。野生型およびこれら遺伝子改変マウスより、骨髄由来マクロファージ、骨髄由来マスト細胞、大脳皮質細胞などを調整し、実験に供した。細胞死は顕微鏡による形態観察、WST-1アッセイ、LDHアッセイ、propidium iodide+蛍光annexin V染色後のフローサイトメトリー解析、TMRM染色によるミトコンドリア膜電位のフローサイトメトリー解析などで多角的に解析した。各種カスパーゼ、GSDMD、Bid等の切断活性化はウエスタンブロット法で解析した。

2)パイロトーシスとアポトーシスが惹起する生体応答の比較解析

マウス胸腺腫細胞株 EL4 に Fv3 とカスパーゼ 1、8 または 9 の融合蛋白を導入し、各々 EG7-C1、EG7-C8、EG7-C9 細胞株を樹立した。AP20187 で EG7-C1 を刺激することでパイロトーシスを、EG7-C8、EG7-C9 細胞を刺激することでアポトーシスを誘導した。これらの腫瘍細胞株を同系マウスにの背部皮内に移植して腫瘍を形成させた後、AP20187 をマウスに投与することで、腫瘍細胞にパイロトーシスあるいはアポトーシスを誘導することによるがん治療モデルを作成した。腫瘍長径と短径はノギスで計測した。腫瘍内浸潤細胞や所属リンパ節細胞の組成分析は各種マーカーの蛍光抗体染色後、フローサイトメトリー解析で行った。単離脾細胞をマイトマイシン C 処理した腫瘍細胞と 5 日間共培養し、CTL を誘導した。CTL 活性は蛍光標識 EG7 細胞と 4 時間共培養した後、蛍光標識 EG7 細胞の生存率をフローサイトメトリーで解析することで算出した。

3) パイロトーシス細胞とアポトーシス細胞が放出する代謝産物の網羅的解析

ヒト大腸がん細胞株 COL0205 に、C12N2 発現ベクターを導入した細胞株 (CLC12N2) は MDP で刺激するとパイロトーシスを起こす。我々は以前、この細胞株より、親株同様 MDP 刺激でパイロトーシスを起こすクローン (CLC12N2-Pyr) とアポトーシスを起こすクローン (CLC12N2-Apo) を樹立した。また、ヒト膵がん細胞株 PK8 に C12N2 を導入した細胞株 (PK8C12N2) は MDP 刺激すると一部の細胞がパイロトーシス、他の一部の細胞がアポトーシスを起こす。そこで、PK8C12N2 から MDP 刺激でパイロトーシスを起こすクローン (PK8C12N2-Pyr) とアポトーシスを起こすクローン (PK8C12N2-Apo) を樹立した。これらの細胞セットを用い、MDP で刺激することで、同じ親株に由来するヒト細胞に同じ刺激を加え、パイロトーシスを起こした細胞の培養上清とアポトーシスの培養上清をセットで調製した。また、2) に記載したマウス胸腺腫細胞株 EG7-C1、EG7-C8、EG7-C9 細胞株を AP20187 で刺激し、パイロトーシスやアポトーシスを誘導した培養上清もセットで調製した。さらに、Pam3CSK4 でプライムした野生型マウス由来腹腔マクロファージ (PEC) とカスパーゼ 1 欠損マウス由来 PEC をニゲリシンで刺激すると、野生型 PEC はパイロトーシスを起こし、カスパーゼ 1 欠損マクロファージはアポトーシスを起こす。そこで、これらの細胞を Pam3CSK4 + ニゲリシンで刺激した上清もセットで調製した。及川彰博士(理化学研究所、田中正人班連携研究者)との共同研究で、これらの培養上清のメタボローム解析を行った。

4) パイロトーシスの選択的な阻害剤・誘導剤の探索

NOM01-C12N2 を用いたパイロトーシス実験系を利用し、袖岡幹子博士(理化学研究所、計画班)との共同研究でパイロトーシスの選択的な阻害剤・誘導剤を探索した。

4. 研究成果

1) パイロトーシスの分子機構の解明

1-1) PYSTs の同定と機能解析

shRNA ライブラリースクリーニングで、パイロトーシス誘導後に生き残った細胞に濃縮された shRNA の標的遺伝子を PYST 候補遺伝子とした。標準化濃縮率 1 位 (最大 z-score=54.4) の遺伝子 PYCARD はカスパーゼ 1 の活性化に働くアダプター蛋白 ASC をコードする遺伝子であり、このスクリーニングは有効と判断された。濃縮率で上位 45 位以内 (最大 z-score 5 の遺伝子の GO enrichment 解析を行ったところ、細胞分裂や紡錘体形成に関連する遺伝子が有意に濃縮されていることが判明し、パイロトーシスの誘導過程に細胞分裂関連分子が寄与している可能性が浮上した。標準化濃縮率 2 位の PYST1 (仮名、最大 z-score=36.0) も細胞分裂関連蛋白であるが、カスパーゼ 1 との結合が報告されていた。また、PYST1 の阻害剤がパイロトーシスを阻害したことから、この蛋白に着目して研究を進めた。しかし、PYST1 をノックダウンすると細胞増殖ができないため、PYST1 ノックダウン細胞や欠損安定細胞株の樹立は困難であった。そこで、カスパーゼ 1 と結合できない PYST1 変異体の作成を目指して、PYST1 のカスパーゼ 1 結合部位の探索を行った。HEK293 T 細胞に PYST1 の各ドメインとカスパーゼ 1 を共発現させ、免疫沈降法でカスパーゼ 1 と相互作用するドメインを探索したところ、N 末側の 280 アミノ酸の領域 (PYST1-N280) がカスパーゼ 1 と相互作用することを見出した。そこで、この領域で蛋白分子表面に露出すると予想されるアミノ酸に系統的にアラニン置換変異を導入して、免疫沈降法でカスパーゼ 1 との相互作用に必須な PYST1 のアミノ酸を同定しようと試みたが、カスパーゼ 1 との共沈が有意に減少する変異体は得られなかった。このことから、PYST1 とカスパーゼ 1 の相互作用は多くのアミノ酸が関与し、特定のアミノ酸の置換で相互作用を消失させることは困難であると判断された。この間に、2 つの研究グループから、カスパーゼ 1 などの基質でパイロトーシスの誘導に働く GSDMD 蛋白が同定された。GSDMD は我々のスクリーニングでは標準化濃縮率 92 位 (z-score=3.1) にランクされていたが、解析は及んでいなかった。

1-2) カスパーゼ 1 依存性 GSDMD 非依存性細胞死の分子機構の解析

GSDMD はカスパーゼ 1 で切断されると、その N 末端側の断片が直接細胞膜に孔を形成することが報告されたが、細菌感染などでカスパーゼ 1 が活性化すると、GSDMD 欠損マクロファージは野生型マクロファージに比べ少し遅れて細胞膜の崩壊 (LDH タンパクの放出) を伴う細胞死を起こすことが判明した。このことから、GSDMD 非依存性細胞死誘導機構が存在すると予想された。そこで、GSDMD 欠損細胞などを作成し、カスパーゼ 1 による GSDMD 非依存性細胞死誘導機構を詳細に解析したところ、カスパーゼ 1 はガスダーミン非存在下では Bid 依存性のアポトー

シスを誘導することを見出した。GSDMD 欠損細胞でも、カスパーゼ 1 活性化により LDH 放出が観察されるのは、アポトーシスを起こした細胞が引き続いてセカンダリーネクロシスを起こすためと考えられる。最近、アポトーシス細胞では、カスパーゼ 3 がガスダーミン E を切断することで、セカンダリーネクロシス/パイロトーシスを起こすことが報告された。そこで、GSDMD 欠損ヒト大腸がん細胞株を用い、さらにガスダーミン E 遺伝子をノックアウトしたところ、カスパーゼ 1 の活性化による細胞膜の LDH 放出が強く抑制された。

次に、元々 GSDMD が発現していないために、カスパーゼ 1 が活性化するとアポトーシスを起こすような細胞が存在するのではないかと考えた。実際、筋委縮性側索硬化症モデルマウスにおける脊髄神経細胞死と酸素・グルコース欠乏条件で培養した大脳皮質神経細胞死の実験系でカスパーゼ 1 依存性のアポトーシスが誘導されること、この時 Bid の活性化を伴うことが報告されていた。しかし、これらの神経細胞が GSDMD を発現しているか、またカスパーゼ 1 依存性神経細胞死に Bid が必須であるかは不明であった。そこで、脊髄や大脳皮質の神経細胞における GSDMD の mRNA および蛋白の発現を RT-PCR 法とウエスタンブロット法で解析したところ、これらの細胞では GSDMD の発現が極めて低いことが判明した。また、カスパーゼ 1 欠損マウスおよび Bid 欠損マウスより単離した大脳皮質神経細胞を酸素・グルコース欠乏条件で培養したところ、野生型の神経細胞に比べ、アポトーシスの誘導が著明に抑制された。したがって、酸素・グルコース欠乏条件における大脳皮質神経細胞死はカスパーゼ 1 と Bid に依存した細胞死であると考えられる。さらに、公開された遺伝子発現解析データベース (BioGPS) で、カスパーゼ 1 と Bid を発現し、GSDMD の発現が少ない組織・細胞を検索したところ、マスト細胞が該当した。そこで、マクロファージではパイロトーシスを誘導するリポポリサッカライド + ニゲリシンでマスト細胞を刺激したところ、アポトーシスが誘導され、カスパーゼ 1 欠損マウス由来のマスト細胞ではこの細胞死が抑制された。さらに、Bid 欠損マウスのマスト細胞では、カスパーゼ 1 は野生型細胞と同様に活性化型に転換されたが、カスパーゼ 3 の活性化型への転換は抑制された。以上の結果から、人工的なガスダーミン欠損細胞ばかりでなく、元々 GSDMD の発現が低い神経細胞やマスト細胞でも、カスパーゼ 1 の活性化により Bid 依存性のアポトーシスが誘導されることが判明した。これらの結果は、Nature Communications (2019) で発表した。

2) EG7-C1, EG7-C8, および EG7-C9 細胞株を AP20187 で刺激すると、予想通り EG7-C1 はパイロトーシス、EG7-C8, と EG7-C9 はアポトーシスを起こして、いずれも 4 時間以内にほぼ全滅した。死細胞から放出される炎症誘導物質 (DAMPs) として知られる HMGB1 蛋白と ATP について、AP20187 で処理した細胞からの放出を検討したところ、HMGB1 はいずれの細胞でも LDH の放出より少し早いタイミングで放出されたが、パイロトーシスを起こした EG7-C1 細胞から放出される HMGB1 は NF- κ B の活性化と炎症性サイトカイン産生誘導に働く酸化型の割合が多かった。対照的に、アポトーシスを起こした EG7-C8 や EG7-C9 から放出された HMGB1 は、制御性 T 細胞や前駆血管内皮細胞、間葉系幹細胞をリクルートする CXCL12 に結合してその走化作用を増強する還元型の割合が高かった。したがって、パイロトーシス細胞から放出される HMGB1 は炎症を促進し、アポトーシス細胞から放出される HMGB1 は組織再生や免疫抑制に作用すると考えられる。また、EG7-C1 細胞は AP20187 処理後 15 分以内に速やかに大量の ATP を放出したが、EG7-C8 や EG7-C9 細胞は細胞膜の崩壊 (LDH の放出) 以降もほとんど ATP が放出されなかった。アポトーシス細胞では、細胞膜が崩壊する以前に、ATP が枯渇してしまう可能性が考えられる。

次に、これらの腫瘍細胞を同系マウスの背部皮下に移植して形成させた腫瘍内に AP20187 を投与したところ、いずれの腫瘍も著明な増殖抑制・退縮が誘導された。ところが、腫瘍が退縮したマウスに親株の EG7 細胞を攻撃接種したところ、EG7-C1 腫瘍が退縮したマウスは EG7-C8 や C9 が退縮したマウスに比べ、EG7 腫瘍の増殖を拒絶する率が有意に高かった。また、EG7-C1 腫瘍が退縮したマウスの脾細胞からは、EG7-C8 や C9 が退縮したマウスの脾細胞に比べ、より強い抗腫瘍 CTL 活性が誘導された。以上の結果から、生体内でがん細胞にパイロトーシスを誘導するとアポトーシスを誘導した場合よりも強い抗腫瘍免疫を誘導されることが判明した。

3) 研究方法に記載したアポトーシス細胞培養上清とパイロトーシス細胞培養上清のセットのメタボローム解析で、少なくとも 1 種類の培養上清で放出され、物質が特定できた代謝産物は 58 種類あった。また、アポトーシス細胞から選択的に放出される代謝産物やパイロトーシス細胞から選択的に放出される物質が複数同定できた。さらに、これらの代謝物の一つに IL-1 の産生を阻害する活性と、細胞に感染したリステリアの増殖を抑制する生物活性を見出した。

4) 理化学研究所の袖岡幹子博士 (計画班) との共同研究で、パイロトーシスの阻害剤・誘導剤を探索した。その結果、袖岡らが独自に開発した化合物を含む複数の化合物がパイロトーシスを阻害剤することを見出した。現在、これらの阻害剤の標的蛋白の同定を試みている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, Mahib MR,

Yamaguchi Y, Miura M, Kinoshita T, Kushiya H, Sakurai M, Shiroishi T, and Suda T: Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. Nat Commun. 2019, 10:2091. doi:10.1038/s41467-019-09753-2. 査読有
Nakajima S, Imamura R, Yoshino M, Sakurai M, Tsuchiya K, Sugihara K, Asano M, and Suda T: Characterization of Innate and Adaptive Immune Responses in PYNOD-deficient mice. ImmunoHorizons, 2018, 2:129-141 doi:10.4049/immunohorizons.1700074. 査読有
Zhang P, Tsuchiya K, Kinoshita T, Kushiya H, Suidasari S, Hatakeyama M, Imura H, Kato N, and Suda T: Vitamin B6 Prevents IL-1 Protein Production by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. J Biol Chem. 2016, 291:24517-24527. 査読有
Kinoshita T, Imamura R, Kushiya H, and Suda T: NLRP3 mediates NF- B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. PLoS One. 2015, 10:e0119179. doi:10.1371/journal.pone.0119179. 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

須田貴司: Switches between apoptosis and pyroptosis in macrophages and cancer cells. Australia-Japan Meeting on Cell Death, 2018
須田貴司:がん細胞におけるインフラマソームを介したアポトーシスとパイロトーシスの分子機構とがん治療効果. 第26回日本 Cell Death 学会 シンポジウム 2017 年
須田貴司:細胞死研究の潮流. 第25回日本 Cell Death 学会 教育講演 2016 年
須田貴司:ビタミン B6 の新しい抗炎症作用. 日本 Shock 学会 日本 Cell Death 学会合同シンポジウム 2016 年
須田貴司: Novel anti-inflammatory function of vitamin B6 by inhibition of the NLRP3 pathway. Japan Australia Meeting on Cell Death. 2015
須田貴司:パイロトーシスの分子機構と役割. 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」キックオフシンポジウム 2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
研究室ホームページ: <http://dimb.w3.kanazawa-u.ac.jp/>
金沢大学研究トピック: <https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/67529>
プレスリリース: <https://www.kanazawa-u.ac.jp/wp-content/uploads/2019/05/190523.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 穰、木下 健、土屋 晃介、中嶋 伸介

ローマ字氏名：Yutaka Suzuki, Takeshi Kinoshita, Kosuke Tsuchiya, Shinsuke Nakajima

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。