

# インフラマソームのアダプター分子による炎症スイッチ機構の解明

## Study of molecular switch mechanism of inflammasome adaptor protein

(日本免疫学会推薦)

代表研究者 慶應義塾大学 原 英樹 Keio University Hideki HARA  
協同研究者 ミシガン大学 ガブリエル ニュネツ University of Michigan Gabriel NUNEZ

The inflammasome, an innate immune system, is a protein complex composed of intracellular receptors, the adaptor ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), and the proteolytic enzyme caspase-1. Activation of inflammasome is induced after sensing of abnormal metabolites, alarmins, and microbial components by intracellular pattern-recognition receptors, resulting in the induction of the inflammatory cytokine production including IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) and IL-18 and the gasdermin D-mediated pyroptosis, an inflammatory programmed cell death. Inflammasome activation has been reported to be involved in the pathogenesis and severity of various inflammatory diseases and autoimmune diseases such as stroke, Alzheimer's disease, atherosclerosis, diabetes, rheumatoid arthritis, infectious diseases including COVID-19, cancers, and inflammatory bowel disease, but the molecular mechanisms triggering inflammasome activation under diseases remains poorly understood. In this study, we investigated a regulatory mechanism of inflammasome activation focusing on the adaptor protein ASC. As results, we found that modifications of ASC by kinases and protein-protein interaction are required for full activation of inflammasome. These results reveal a previously unrecognized regulatory systems of inflammasome activation in macrophages.

### 研究目的

自然免疫機構であるインフラマソームは細胞内で形成されるタンパク複合体であり、細胞内受容体、アダプターASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)、タンパク分解酵素カスパーゼ 1 前駆体から構成される (参考論文 1)。細胞内パターン認識受容体が異常代謝産物やアラミンなどの内因性異物、および微生物成分などの外因性異物を感知することでインフラマソーム複合体を形成する。インフラマソーム複合体が形成されるとカスパーゼ 1 前駆体が活性型となり、基質である炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ )前駆体や IL-18 前駆体を切断することで生物活性を有するアクティブフォームへと変換させる。また、カスパーゼ 1 は膜傷害タンパク質ガスダーミン D も活性型へと変換させることで膜傷害を伴うプログラム細胞死パイロトーシスを誘導する。異物が発生もしくは侵入した部位に応

じて、脳や血管、関節、肺、心臓、膵臓、腸といったあらゆる臓器でインフラマソームは活性化しうするため、脳梗塞やアルツハイマー病、動脈硬化、心筋梗塞、関節リウマチ、糖尿病、肺がん、大腸がんなど多様な炎症性疾患や自己免疫疾患の発症および重症化に関与することが報告されている (参考論文 2)。それに加えて、黄色ブドウ球菌などいくつかの感染症においてもインフラマソーム応答が病態を悪化させることをわれわれのグループは世界に先駆けて報告している (参考論文 3)。インフラマソーム応答の上流に位置する細胞内受容体として、NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing protein 3)や NLRP6、AIM2 (absent in melanoma 2)など 7 種類の分子がこれまで同定されており、それぞれ異なるリガンドを認識することで多様な異物に対応していることが明らかとなっている (参考論文 4)。一方で、細胞内受容体より下流のシグナル経路を制御する分子機構はい

まだ不明な点が多い。ASC やカスパーゼ 1 を含む下流の分子は細胞内受容体の種類によらずインフラマソーム応答に共通するため、特に感染症など複数のインフラマソームを活性化しうる疾患においては効果的な治療標的になると考えられる。そこで本研究では、インフラマソーム応答に共通するアダプター分子 ASC に着目した制御機構の探索を行った。インフラマソームの制御機構を解明することで、病的なインフラマソーム活性化だけを特異的に抑制することが可能となり、上述した疾患の治療および理解に繋がることが期待される。

## 研究経過

インフラマソーム活性化時に ASC がどのような分子と会合しているのか調べるために、NLRP3 インフラマソームを活性化する Nigericin で野生型マクロファージを刺激後、ASC の免疫沈降を行った。その結果、プロテイン Y が ASC と会合していることを見出した。そこで、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いてプロテイン Y を欠損するマクロファージを作製した。その結果、NLRP3 インフラマソームを活性化する ATP や AIM2 インフラマソームを活性化する poly(dA:dT) などに対する応答性が野生型マクロファージと比較して減弱することを見出した。このことから、プロテイン Y は細胞内受容体の下流で ASC と会合することにより ASC 依存的なインフラマソーム応答を制御していることが明らかとなった。今後、プロテイン Y による ASC の機能制御機構について詳細な検討を進める計画である。

次に ASC の翻訳後修飾がインフラマソーム応答に与える影響を検討した。ASC のリン酸化候補部位を絞り込むために各アミノ酸に変異を加えたところ、特に 144 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した ASC (Y144F) を発現するマクロファージにおいて、Nigericin や poly(dA:dT) に対する応答性が顕著に減少した。あわせて感染症における ASC リン酸化の影響を検討したところ、144 番目のチロシン以外にも 92 番目のセリンに変異を加えることで黄色ブドウ球菌感染におけるインフラマソーム応答が減少した。これらのアミノ酸以外にも ASC のリン酸化標的は報告されていることから (参考論文 5)、インフラマソームの活性化には ASC の複数のアミノ酸のリン酸化が関与しており、その組み合わせによって炎症応答が制御されていることが示唆された。

上記の結果を踏まえて、特に影響の大きかったリン酸化部位である ASC の 144 番目チロシンに競合拮抗するようなペプチドを作製した。Lipofectamine を用いてこのペプチドをマクロファージに導入したのちに LPS でプライミングを行い Nigericin で刺激した。その結果、インフラマソーム非依存的な TNF $\alpha$  の産生には影響がなかったが、インフラマソーム依存的な IL-1 $\beta$  産生はペプチド濃度依存的に抑制された。このことから、マクロファージにおけるインフラマソームの活性化に ASC のリン酸化は必須であり、なかでも 144 番目チロシンのリン酸化部位を阻害することでインフラマソームの活性化を抑制することがわかった。

これまでの研究から、ASC などのインフラマソーム構成因子を欠損したマウスに黄色ブドウ球菌やリステリアを感染させると野生型マウスと比較して臓器内菌数が低下し、マウスの生存率が改善することを突き止めている (参考論文 3)。このメカニズムを解明するために、カスパーゼ 1 の基質となる IL-1 $\beta$  および IL-18 の関与を各欠損マウスを用いて検討した。その結果、リステリアを感染した IL-1 $\beta$  欠損マウスでは野生型マウスと同程度の臓器内菌数が検出されたのに対して、IL-18 欠損マウスでは他のインフラマソーム構成因子欠損マウスと同様に臓器内菌数の減少が観察された。一方で、黄色ブドウ球菌感染でも検討を行ったところ、リステリア感染で得られた結果とは異なり、IL-1 $\beta$  欠損マウスと IL-18 欠損マウスの両方で臓器内菌数の低下が観察された。以上の結果から、インフラマソームの活性化は病原菌の生体内増殖を加速させ病状を悪化させるが、どのサイトカインが関与するのかは病原体に依存することが判明した。

最後に自己免疫疾患として多発性硬化症のモデルである EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) におけるインフラマソーム応答の影響を検討した。これまで NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 $\beta$  産生が EAE の病態形成に関与すると考えられてきた (参考論文 6)。そこで、他のインフラマソームの関与を検討するために、AIM2 欠損マウスにおける EAE の病態スコアを野生型マウスと比較した。その結果、野生型マウスと比較して特に後期における病態スコアが野生型マウスより低下した。また IL-1 $\beta$  だけでなく、IL-18 欠損マウスにおいても EAE の病態スコアが減弱したことから、インフ

ラマソーム活性化後、IL-1 $\beta$  と IL-18 が産生されることで協調的に EAE の炎症病態を形成していると考えられる。

## 考察

インフラマソームは、炎症性サイトカインの産生や炎症誘導性細胞死パイロトーシスを誘導することで多様な炎症応答を制御している。インフラマソームの細胞内受容体はそれぞれ特有のリガンドを認識することでカスパーゼ 1 を活性化させるが、1 種類のインフラマソームしか活性化しない疾患は稀であり、多くの場合、複数のインフラマソームが活性化される。そこで本研究では、特にインフラマソームの共通アダプター分子である ASC に注目してその制御機構の解析を行った。その結果、インフラマソームの活性化には ASC とプロテイン Y との相互作用が重要であり、さらに ASC に 144 番目チロシンを含む複数のアミノ酸がリン酸化される必要があることが明らかとなってきた。今後、ASC のリン酸化に関わるシグナル経路やプロテイン Y との相互作用機序を明らかにすることで、新たなインフラマソーム阻害薬の開発に結びつく可能性が期待される。

また、インフラマソーム応答によって誘発される免疫応答のうち、どれが病原微生物の生体内増殖に影響を及ぼしているのか検討を行った。その結果、黄色ブドウ球菌とリステリアなどのグラム陽性菌同士でも IL-1 $\beta$  と IL-18 の役割が異なることが判明した。これらの下流ではさらに IL-6 や IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) など多岐にわたるサイトカインの産生が制御を受けていることから、サイトカインをターゲットにした中和や競合阻害は一定の効果は認められるが感染症によっては複数のサイトカインを標的としなければならないことが明らかとなった。現在、薬剤耐性菌や新型コロナウイルスが世界的に蔓延しており、効果的な治療法の開発が危急の課題となっている。これらの難治性感染症において、インフラマソームが活性化すると病態が重症化することが最近の研究から明らかとなりつつある。今回の研究成果をもとに、インフラマソーム応答を効果的に制御できる分子標的を特定し特異的な阻害剤を開発することで、治療が困難な薬剤耐性菌や新型コロナウイルスに対する新たな対抗手段を得ることができると期待されている。

感染症に加えて、自己免疫疾患においてもインフ

ラマソーム依存的に産生される IL-1 $\beta$  および IL-18 が協調的に炎症病態の形成に関わることが本研究から示された。本研究で検討した疾患モデルだけでなく、脳神経系疾患や老年性疾患、悪性腫瘍など幅広い疾病の発症および重症化にインフラマソームが関与することが報告されていることから、本研究で得られた知見などをもとに、インフラマソーム阻害薬の開発をすすめることで、幅広い疾患の治療に応用できることが期待される。

## 参考論文

1. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 95-104.
2. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004, 117, 561-74.
3. Hara H, Seregin SS, Yang D, Fukase K, Chamailard M, Alnemri ES, Inohara N, Chen GY, Núñez G. The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection. *Cell* 2018, 175, 1651-1664.
4. Xue Y, Enosi Tuipulotu D, Tan WH, Kay C, Man SM. Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. *Trends Immunol.* 2019, 40, 1035-1052.
5. Song N, Li T. Regulation of NLRP3 Inflammasome by Phosphorylation. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2305.
6. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, Huang M, Schneider M, Miller SD, Ting JP. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J. Immunol.* 2010, 185, 974-81.

## 研究の発表

口頭発表

1. Tanishita Y, Sekiya H, Nunez G, Yoshimura A, Hara H. LLO promotes phosphorylation of the inflammasome adaptor ASC through Lyn to exacerbate infection. 第 95 回日本細菌学会総会. 2022 年 3 月 29 日、オンライン
2. Hara H, Nunez G, Yoshimura A. Lyn kinase signaling promotes inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. 第 50 回日本免疫学会総会. 2021 年 12 月 8 日、奈良

3. Hara H, Tanishita Y, Sekiya H, Nunez G, Yoshimura A. Molecular mechanism of inflammasome activation induced by Gram-positive bacteria infection. 第 44 回 日本分子生物学会年会. 2021 年 12 月 1 日、横浜
4. Hara H, Nunez G, Yoshimura A. Recognition of Gram-positive bacteria infection in macrophages through NLRP6 inflammasome. The 27th international symposium on molecular cell biology of macrophages. 2021 年 6 月 15 日、大阪
5. Hara H. Analysis of the mechanism by which Gram-positive bacteria activates NLRP6 inflammasome. 第 94 回細菌学会総会. 2021 年 3 月 26 日、岡山
6. Hara H, Nunez G, Yoshimura A. Gram-positive pathogens activate inflammasome to promote bacterial survival in infected mice. 第 93 回日本細菌学会総会. 2020 年 3 月 25 日、愛知

誌上発表  
該当なし