

## 43. インフラマゾーム活性化と慢性炎症制御の分子基盤

鈴木 敏彦

\*琉球大学 大学院医学研究科 細菌学講座

Key words : インフラマゾーム, 炎症

### 緒言

インフラマゾームは、生体に対する様々な刺激（病原体、体内で生じた代謝産物等）を感知し、Nod 様受容体（Nod-like receptor）を介してカスパーゼ-1 を活性化する細胞内システムである。これにより炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$  や IL-18）が産生され、組織の炎症や再生修復が誘導される<sup>1,2)</sup>。Nod 様受容体の中でも、感染症や生活習慣病等のヒトの疾患にもっとも関与しているのが NLRP3（NLR family, pyrin domain containing 3）であり、特に最近では肥満、糖尿病、痛風といった慢性炎症疾患における増悪因子であることが報告されている。しかし、NLRP3 がどのように刺激を認識して活性化していくのか、その詳細な分子メカニズムは不明のままである。現在、1) 細胞膜傷害により細胞内カリウムイオン流出、2) ミトコンドリア傷害による mtDNA 等の漏出、3) ライソゾーム破綻、の3つの経路が知られている。そのうち3) の経路の詳細なメカニズムはよくわかっていない。

最近の研究により、レクチンファミリーのひとつガレクチン-3 が壊されたライソゾーム周辺に集積することが明らかになっている<sup>3)</sup>。そこで本研究では、NLRP3 活性化刺激因子によるガレクチン-3 のライソゾーム周辺への集積を確認するとともに、NLRP3 インフラマゾームの各コンポーネントである NLRP3 および ASC（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD）の挙動を解析した。

### 方法

マウス骨髄前駆細胞より、G-CSF 存在下で骨髄由来マクロファージ(BMDM)を分化誘導させた。これに各種 NLRP3 インフラマゾーム活性化物質を作用させ、細胞内の各分子の挙動について抗体を用いた多重蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡により解析を行った。

### 結果

ライソゾーム膜破綻を誘導する Leu-Leu-OMe を用いて刺激したところ、細胞内に円状のガレクチン-3 の集積が多数観察された。同時に ASC の局在を調べたところ、ガレクチン-3 と同様に多数の円状局在がみられ、さらにガレクチン-3 の集積部位と一致することがわかった。一方で、細胞膜傷害を誘導する ATP（あるいは Nigericin、未発表データ）を用いて刺激した場合には、ガレクチン-3 および ASC の集積は認められなかった。また、インフラマゾーム活性化時には、細胞内に1ないし2個の ASC の凝集体（スペック）が形成されることが知られている。スペック形成は Leu-Leu-OMe、ATP 刺激いずれの場合も観察された。また、Leu-Leu-OMe 刺激細胞でスペック形成時にはガレクチン-3 および ASC の集積は消失していた（図1）。したがって、ASC の細胞内集積はスペック形成前に一過性に生じることが示唆された。

Leu-Leu-OMe 刺激後のマクロファージに対して、ガレクチン-3、ASC および NLRP3 に対する抗体を用いて多重蛍光免疫染色を行ったところ、いずれも一過的に共局在することが認められた（図2）。また、NLRP3 欠損細胞での ASC 局在、ASC 欠損細胞での NLRP3 局在をそれぞれ解析したところ、いずれも場合でもガレクチン-3 の集積と共局在することがわかった。これらのことから、ASC と NLRP3 はそれぞれ独自にガレクチン-3 と共局在する性質をもつことが示唆された。

ガレクチン-3の集積がライソゾーム膜上で起きていることを確認するために、他の細胞小器官のマーカータンパクの抗体とともに多重染色を行った。その結果、ガレクチン-3の集積はミトコンドリア (Tom20)、小胞体 (Calreticulin) とは一致せず、ライソゾーム上 (LAMP1) であることが示された。このことから、ASC と NLRP3 の一過性の集積はガレクチン-3と同様にライソゾーム膜周辺に生じていることが示唆された。

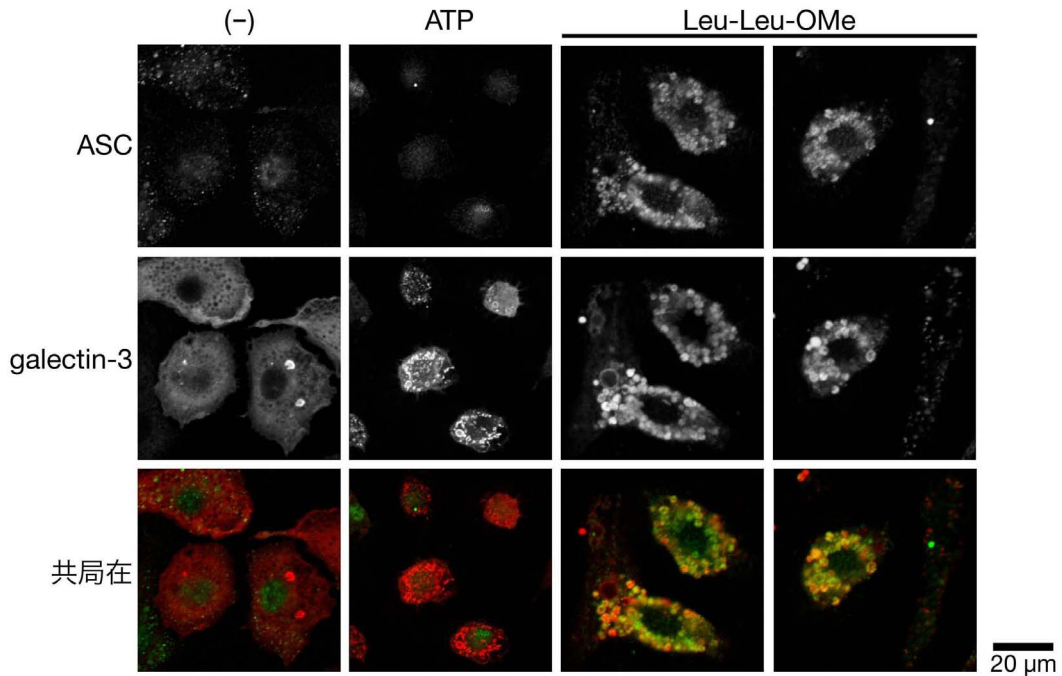


図1. ASC とガレクチン-3 の共局在

BMDM に ATP あるいは Leu-Leu-OMe を作用させ、細胞内の ASC およびガレクチン-3 の局在を解析した。細胞内の ASC を FITC ラベル (共局在では緑で表示) の抗 ASC 抗体で、ガレクチン-3 を Cy5 ラベル (共局在では赤で表示) の抗ガレクチン-3 を用いて蛍光免疫染色を行った。Leu-Leu-OMe 刺激により、ASC とガレクチン-3 の共局在 (黄色) が認められる。このような挙動は ATP 刺激では観察されなかった。

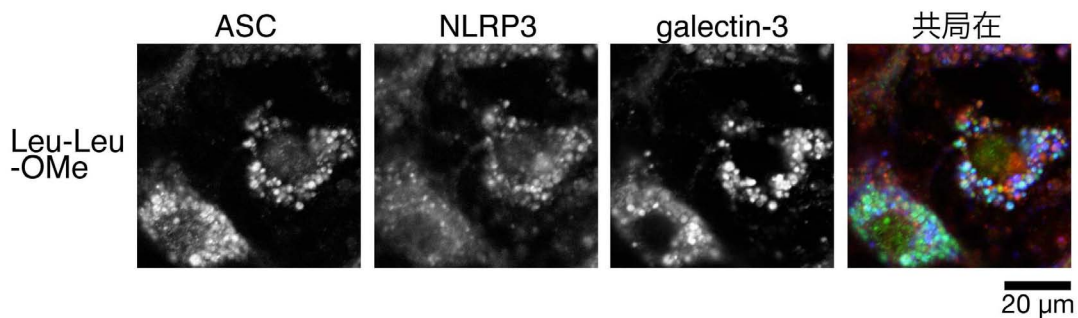


図2. ASC、NLRP3、ガレクチン-3 の共局在

BMDM に Leu-Leu-OMe を作用させ、細胞内の ASC、NLRP3 およびガレクチン-3 の局在を解析した。FITC ラベル (緑色) の抗 NLRP3 抗体、TRITC ラベルの (赤色) 抗 ASC 抗体、Cy5 ラベル (青色) の抗ガレクチン-3 抗体による蛍光免疫染色を行った。3 分子が共局在して白っぽい部分が観察された。

## 考 察

本研究では、NLRP3 活性化を引き起こすライソゾーム破綻経路に注目し、その活性化メカニズムについて免疫染色の手法を用いて解析した。その結果、ASC と NLRP3 の一過的なライソゾーム膜周辺への集積を見出した。この知見は、ライソゾーム膜近傍で NLRP3 と ASC によるインフラマゾーム活性化に必要な相互作用が起きている可能性を示唆している。もともと ASC は微小管に沿って存在し、活性化後にはミトコンドリアに集積するとする報告がある。しかし、我々のデータでは ASC は細胞質にびまん性に散在しており、ライソゾーム破綻後にみられる一過性の集積はミトコンドリアではなくライソゾーム周囲に認められている。今後、ASC をはじめ NLRP3 の詳細な細胞内局在の解析が必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) Higa N, Toma C, Nohara T, Nakasone N, Takaesu G, Suzuki T. Lose the battle to win the war: bacterial strategies for evading host inflammasome activation. *Trend Microbiol* 2013; 21(7):342-349. PubMed PMID 23712018, doi: 10.1016/j.tim.2013.04.005.
- 2) Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016; 16(1):7-21. PubMed PMID 26655628, doi: 10.1038/nri.2015.7.
- 3) Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J*. 2013; 32(17):2336-2347. PubMed PMID: 23921551, doi: 10.1038/emboj.2013.171.