68　炎症環境におけるプログラム細胞死クロストークの解明	森田　林平

【目的】細胞死は従来「プログラムされた自然死」apoptosis と「破壊的な死」necrosis に分類されてきた。近年、細胞死の分子メカニズムの解明が進むことにより、プログラム細胞死には様々なタイプが存在することが明らかになりつつある。中でも pyroptosis は分子複合体インフラマソームの形成により生じる活性型 caspase-1 により誘導され、マクロファージからの IL-1 の分泌による炎症反応を伴うユニークな細胞死である。

本研究では NLRP3 インフラマソームに着目しマクロファージのプログラム細胞死の制御機序の解明を目指した。アクチン結合因子 gelsolin が NLRP3 の結合因子であることを見出しており、本研究では gelsolin を軸とした解析を進めた。

【方法】マウス骨髄細胞よりマクロファージを分化誘導し、LPS で刺激した後に免疫沈降法と proximity ligation assay にて NLRP3 と gelsolin の結合を確認した。CRISPR / Cas9 によりマウスマクロファージ株 J774-1 細胞より *gelsolin* 遺伝子（*Gsn*）のノックアウト細胞クローンを樹立した。LPS と nigericin の刺激によりこの細胞クローンの NLRP3 インフラマソームを活性化させた後に、apoptosis、インフラマソーム活性による caspase-1 の活性化さらに LDH による細胞死を評価した。

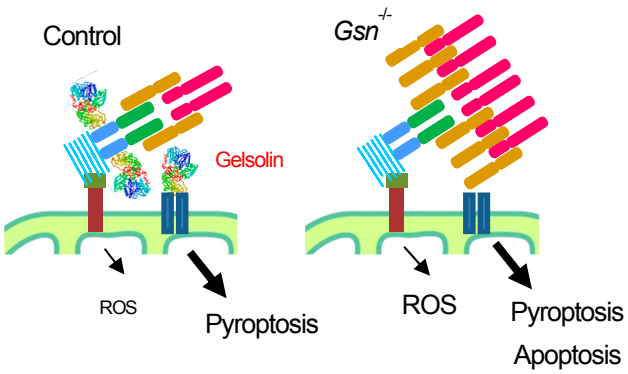
ミトコンドリアは NLRP3 インフラマソーム形成と共に apoptosis 起動の場である。そこでインフラマソーム活性時に gelsolin がミトコンドリアに結合するか否か、加えて *Gsn* 欠損により NLRP3 のミトコンドリアへの結合性が変化するのか否かを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ミトコンドリア由来活性酸素種（ROS）はプログラム細胞死の誘導因子として知られている。そこで *Gsn* 欠損が NLRP3 インフラマソーム誘導時の ROS 産生に影響を与えるか否か、MitoSOX で細胞をラベルしフローサイトメーターで ROS 産生を評価した。

【結果】マクロファージでは LPS 刺激により NLRP3 の発現が誘導されることが知られている。免疫沈降法と proximity ligation assay いずれにおいても NLRP3 と gelsolin の結合が認められた。即ち、インフラマソーム形成前には NLRP3 は gelsolin と結合して存在することが明らかとなった。

また *Gsn* 欠損 J774-1 細胞では LPS / nigericin 刺激に対してより強い caspase-1 と caspase-3 の活性化、IL-1 の産生、更にはより多くの細胞死と ROS 産生が見出されたことから、gelsolin は pyroptosis と apoptosis の 2 種類のプログラム細胞死を制御していることが見出された。NLRP3 インフラマソーム活性化刺激は gelsolin のミトコンドリアへの結合を誘導し、Gsn 欠損により NLRP3 のミトコンドリアへの結合がより強く観察されたことから、インフラマソーム形成時において gelsolin はミトコンドリアに結合することにより、NLRP3 インフラマソーム形成（pyroptosis 誘導と IL-1 産生）と apoptosis 誘導を共制御していることが示唆された。

Gelsolin は NLRP3 インフラマソーム形成と apoptosis 誘導を共制御する



68. 炎症環境におけるプログラム細胞死クロストークの解明

森田　林平

*国際医療福祉大学 医学部 免疫学

Key words：マクロファージ，インフラマソーム，プログラム細胞死

緒　言

細胞死は従来「プログラムされた自然死」apoptosis と「破壊的な死」necrosis に分類されてきた。近年、細胞死は「細胞の単なる終焉」ではなく、炎症等の生命反応を積極的に誘導する「生きた生命現象」であることが明らかとなり、細胞死誘導メカニズムの解明の重要性が高まりつつある。

プログラム細胞死の形態学的及び分子レベルの解析が進むことにより、プログラム細胞死には apoptosis 以外に necroptosis、pyroptosis、NETosis が存在することが明らかとなった。現在これらの細胞死は独立した生命現象と考えられている［1，2］。

中でも pyroptosis は分子複合体インフラマソームの形成により生じる活性型 caspase-1 により誘導され、マクロファージからの IL-1 の分泌による炎症反応を伴うユニークな細胞死である。NLRP3、ASC と pro-caspase-1 から構成される NLRP3 インフラマソームはミトコンドリア上で形成され、痛風等の生活習慣病、自己免疫疾患、感染症の炎症病態に大きく関与している［3，4］。

私達は現在までに NLRP3 インフラマソームの新規活性化因子の探索（chitin）や活性化制御の細胞内シグナル因子の同定（Bruton's tyrosine kinase）を行ってきた［5，6］。その後、未だ不明点の多い NLRP3 インフラマソーム形成メカニズムによりダイレクトに迫るため、マクロファージ中の NLRP3 に直接結合する細胞内分子を免疫沈降と質量分析により探索した。その結果、NLRP3 の結合因子としてアクチン調節因子であるゲルゾリン（gelsolin）を見出した。

本研究では gelsolin による NLRP3 インフラマソーム形成制御メカニズムを解明すると共に、gelsolin を軸としたマクロファージのプログラム細胞死のクロストークの解明を目指した。

方法および結果

1.　NLRP3 と gelsolin の結合の観察

質量分析の結果を免疫沈降法と proximity ligation assay（PLA）で確認した。

免疫沈降法では LPS で 3 時間刺激されたマウス骨髄マクロファージから細胞溶解液を作製し、抗 NLRP3 抗体で免疫沈降の後に、抗 gelsolin 抗体でブロットした。一方、PLA では上記のマクロファージをアセトン固定し、マウス抗 NLRP3 抗体とウサギ抗 gelsolin 抗体で probe した後に Duolink® PLA システムによりシグナルを増幅させた。

いずれの方法においても LPS 刺激を受けたマクロファージでは NLRP3 と gelsolin が結合している所見が得られた（図 1）。

2.　*Gsn* ノックアウト細胞（*Gsn*-KO J774-1）の作製

lentiCRISPR v2 ベクターに gelsolin 遺伝子（*Gsn*）を標的とする guide RNA を組み込み、マウスマクロファージ株 J774-1 に遺伝子導入した後に、puromycin で選択し限界希釈法により細胞をクローニングした。Western blot にて gelsolin の欠損を確認した。コントロール細胞（Ctrl J774-1）として酵母 GAL promoter を標的とする guide RNA を上記と同様に導入した細胞を作製した。

*現在の所属：日本医科大学 微生物学・免疫学教室

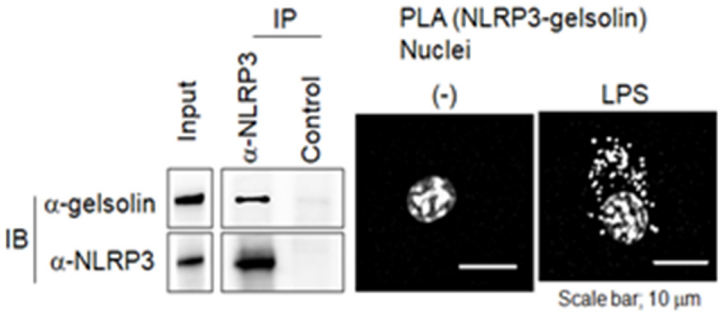


図 1. LPS 刺激マクロファージでの gelsolin と NLRP3 の結合
左：免疫沈降、右：PLA

3. Gelsolin の NLRP3 インフラマソーム活性と apoptosis に対する影響の観察

Gsn-KO および Ctrl J774-1 を LPS で 3 時間刺激（シグナル 1）した後に nigericin で刺激した（シグナル 2）。インフラマソーム活性は培養上清中の IL-1β と活性型 caspae-1 p20 を ELISA と Western blot で、apoptosis は Western blot で活性型 caspase-3 の検出で各々評価した。また、上清中の LDH 濃度の測定により細胞死を評価した。その結果、*Gsn* 欠損により caspae-1 p20 と IL-1β が増加することが見出された。加えて、*Gsn* 欠損により活性型 caspase-3 と LDH が上昇することも判明した（図 2）。これらの所見より、gelsolin は NLRP3 インフラマソーム活性と apoptosis の抑制因子であることが明らかとなった。また、NLRP3 インフラマソームの活性化は pyroptosis を誘導することから、gelsolin は pyroptosis と apoptosis という 2 種類のプログラム細胞死を制御するユニークな分子であることが明らかとなった。

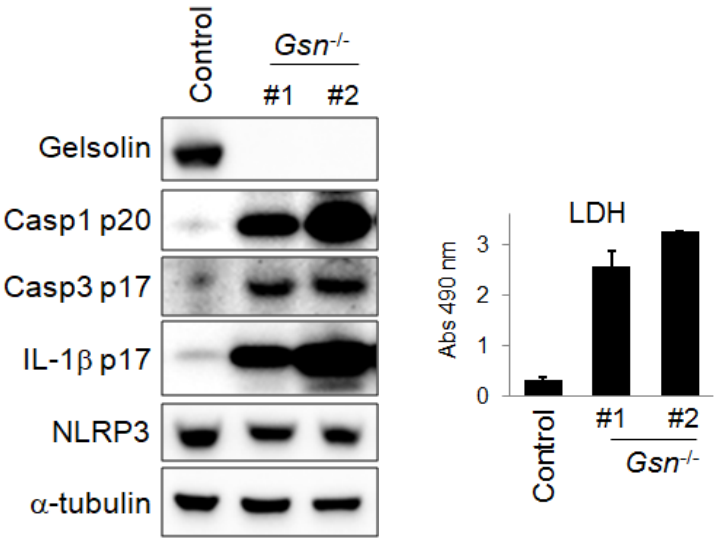


図 2. *Gsn* 欠損による NLRP3 インフラマソーム活性の亢進
左：*Gsn* 欠損による活性型 caspae-1 & -3 と IL-1β の増加
右：LDH の増加

4. Gelsolin、NLRP3 とミトコンドリアの結合の観察

Gelsolin が NLRP3 インフラマソーム形成と共に apoptosis 起動の場でもあるミトコンドリアに結合するか否か、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。マウス骨髄マクロファージを LPS と nigericin で刺激した後に、MitoSpy Orange でミトコンドリアをラベルし、アセトン固定の後に抗 gelsolin 抗体で染色した。更に *Gsn*-KO および Ctrl J774-1 の NLRP3 インフラマソームの活性を誘導した後に MitoSpy Orange でラベルし、抗 NLRP3 抗体で染色した。

NLRP3 インフラマソームの形成の際、gelsolin はミトコンドリアに結合すことを見出した（図 3 上段)。加えて、gelsolin の欠損により NLRP3 のミトコンドリアへの結合が促進されることより（図 3 下段)、炎症マクロファージにおいて gelsolin はミトコンドリアと結合することにより、pyroptosis と apoptosis を制御していることが予想された。

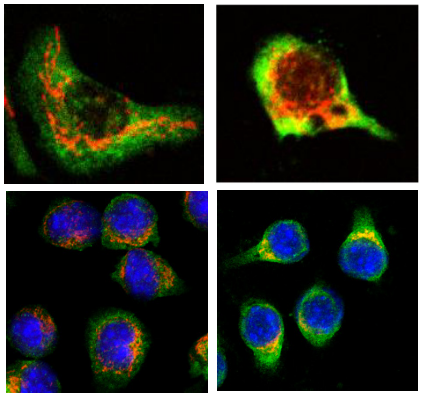


図 3. Gelsolin は NLRP3 のミトコンドリアへの結合を抑制する

上：Gelsolin（緑）とミトコンドリア（赤）との結合

左：LPS刺激、右：LPSとnigericin刺激

下：NLRP3（緑）とミトコンドリア（赤）との結合

左：Ctrl、右：$Gsn^{-/-}$ J774-1（LPSとnigericin刺激）

5. Gelsolin の活性酸素種（ROS）産生に対する影響の観察

ミトコンドリア由来活性酸素種（ROS）はプログラム細胞死の誘導因子として知られている。そこで *Gsn*-KO および Ctrl J774-1 の NLRP3 インフラマソームの活性を誘導した後に MitoSOX でラベルしフローサイトメーターで ROS 産生を評価した。

Ctrl と比べて *Gsn*-KO では休止状態のみならず炎症刺激に対しても ROS 産生が更新していた（図 4)。これらの結果より gelsolin は炎症刺激によるミトコンドリアからの ROS 産生を抑制していることが示唆された。

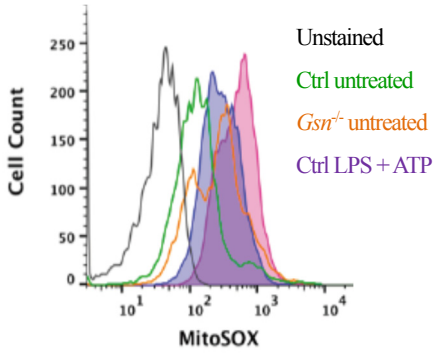


図 4. *Gsn* 欠損による ROS 産生の行進

フローサイトメーターで ROS 産生を測定

考　察

本研究ではインフラマソームの活性化誘導前の NLRP3 の分子状態に着目することで、NLRP3 インフラマソームの制御因子の同定を試みた。その結果、複数の NLRP3 結合因子が見出されたが、中でもアクチン調節因子である gelsolin が Jurkat 細胞の apoptosis を抑制することが既に報告されていることから［7］、gelsolin はプログラム細胞死に対してユニークな制御因子であることが予測された。

本研究により炎症マクロファージにおいて gelsolin はミトコンドリア上の NLRP3 インフラマソーム形成と apoptosis 誘導を制御する因子であることが明らかとなった（図 5）。一方、本研究によりアクチン調節因子 gelsolin は炎症環境においてマクロファージの生存を維持するユニークな因子であることが示唆される。

生体炎症環境において、gelsolin によるマクロファージの生存維持が炎症の経過と組織修復に対してどのような意義を有するのであろうか。現在 *Gsn*-flox マウスを作製中であり、今後このマウスを用いて本研究で見出した現象の生理的意義を明らかにしてゆく。

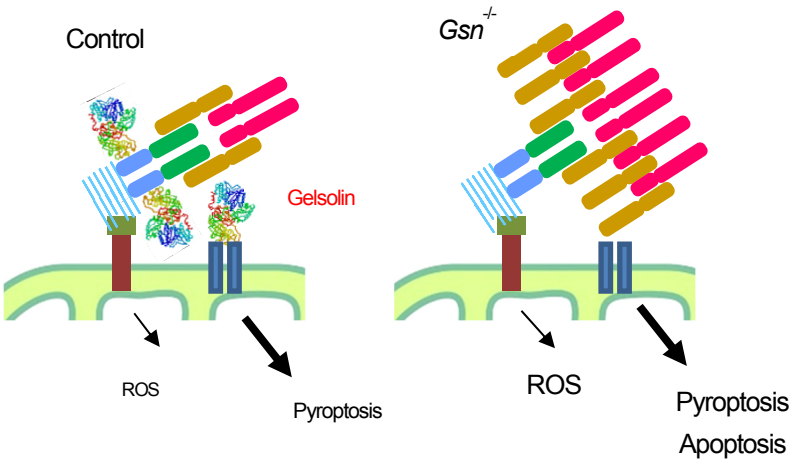


図 5.　Gelsolin はミトコンドリアに結合し NLRP3 インフラマソームの活性化と apoptosis を抑制する

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、延世大学校医科大学の Lark Kyun Kim 博士である。

文　献

1）　Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. Nat Rev Immunol. 2017 Apr;17(4):262-275. doi: 10.1038/nri.2017.9. Epub 2017 Mar 13. Review. PubMed PMID: 28287107.

2）　Salvesen GS, Hempel A, Coll NS. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. FEBS J. 2016 Jul;283(14):2577-98. doi: 10.1111/febs.13616. Epub 2015 Dec 31. Review. PubMed PMID: 26648190; PubMed Central PMCID: PMC5606204.

3）　Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. 2011 Jan 13;469(7329):221-5 PubMed PMID: 21124315 DOI: 10.1038/nature09663

4）　Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. Nat Immunol. 2013 May;14(5):454-60. doi: 10.1038/ni.2550. Epub 2013 Mar 17. PubMed PMID: 23502856.

5) Kim LK, Morita R, Kobayashi Y, Eisenbarth SC, Lee CG, Elias J, Eynon EE, Flavell RA. AMCase is a crucial regulator of type 2 immune responses to inhaled house dust mites. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jun 2;112(22):E2891-9. doi: 10.1073/pnas.1507393112. Epub 2015 May 18. PubMed PMID: 26038565; PubMed Central PMCID: PMC4460510.

6) Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, Morita R. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. Nat Commun. 2015 Jun 10;6:7360. doi: 10.1038/ncomms8360. PubMed PMID: 26059659; PubMed Central PMCID: PMC4490404.

7) Koya RC, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. J Biol Chem. 2000 May 19;275(20):15343-9. PubMed PMID: 10809769.