

論文の内容の要旨

論文題目 **Inflammasome-Caspase-1 経路の分子機構解明に向けた 化合物スクリーニング**

氏 名 劉 霆

【序論】

炎症反応は、外界からの細菌感染や外傷あるいは組織傷害による内在性のデンジャーシグナルに対する生体防御反応であり、マクロファージや好中球といった免疫細胞が重要な役割を担っている。マクロファージは、様々な炎症性刺激を受け取ると、刺激に応じたパターン認識受容体(膜孔形成毒素や尿酸結晶など広範な刺激を受容する NLRP3 や二重鎖 DNA を認識する AIM2 など)を介し inflammasome と呼ばれる細胞内タンパク複合体を形成し、最終的にシステインプロテアーゼである caspase-1 を活性化させる。活性化した caspase-1 は、NF- κ B 経路によって発現した炎症性サイトカイン IL-1 β や-18 を切断成熟し、非典型分泌経路によってこれらの分泌を促進すると同時に、パイロトーシスと呼ばれる炎症性細胞死を誘導する。Inflammasome 経路の制御異常は肥満や糖尿病など多くの炎症性疾患に関与することが知られている。活性化 caspase-1 が IL-1 β 分泌および細胞死を制御する分子機構は長らく不明であったが、近年の研究から caspase-1 の基質である Gasdermin-D がこれらの現象を誘導することが明らかになってきた。しかしながら、Gasdermin-D に依存しない IL-1 β 分泌および細胞死が起きることや、単球や樹状細胞などマクロファージ以外の細胞では細胞死を伴わない IL-1 β 分泌も報告されており、caspase-1 下流の分子機構はいまだ不明な点が多い。また、異なるパターン認識受容体を介した inflammasome の活性化機構についてもまだ完全に解明されたわけではない。

本研究では、初代培養腹腔マクロファージ(PM Φ)を用いたイメージング系と化合物ライブラリーを組み合わせた化合物スクリーニングを通して、inflammasome-caspase-1 経路活性化の分子機構を解明すると同時に inflammasome 経路が関与する炎症性疾患の新たな治療戦略の確立を目指した。

【実験と結果】

1. 細胞膜透過性上昇を指標とした化合物スクリーニング系の構築

これまで inflammasome 経路の分子機構解明を目指し行われた研究の多くは IL-1 β 分泌を指標としていたため、本研究では inflammasome 経路の活性化によって誘導される細胞死をスクリーニングの指標とすることで先行研究との差別化を図った。私が修士課程で行った caspase-1 活性化を可視化できる FRET プローブ SCAT1 を用いたライブイメージング解析から、inflammasome 活性化刺激によって細胞死を起こした PM Φ では、細胞膜透過性の上昇に伴い SCAT1 の蛍光が消失することが分かっていた(Liu, 2014)。この

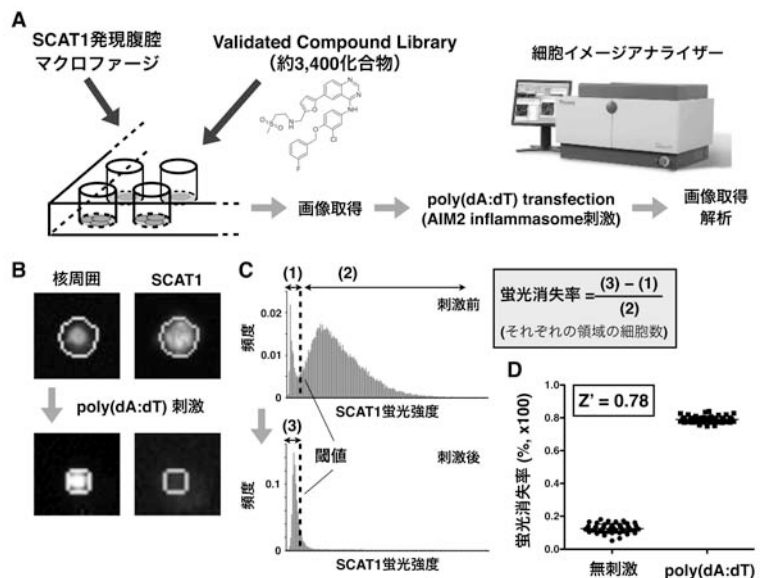


図1. 細胞膜透過性上昇を指標とした化合物スクリーニング系

(A) スクリーニング系の概要。
(B) 細胞イメージアナライザーによる核周囲およびSCAT1蛍光の取得領域の決定法。
(C) 蛍光消失率の算出法。
(D) 刺激の有無による蛍光消失率およびZ'-factor.

蛍光消失は非常に劇的な表現型であったため、本スクリーニングの指標として適すと考えられた。化合物ライブラリーには創薬機構の Validated Compound Library を用いた。このライブラリーは活性が既知の化合物または off-patent の薬剤で構成されるため、候補化合物を絞り込んだ後のターゲットタンパク質の同定が比較的容易であると考えられる。Inflammasome を活性化させる刺激には、AIM2 inflammasome 活性化刺激である二重鎖 DNA を模倣する poly(dA:dT) の transfection を選択した。この刺激は、一部の inflammasome を構成するパターン認識受容体の発現に必要な、LPS などによる NF- κ B 経路を活性化させるプライミングの過程を必要としない刺激系である。以上を組み合わせ、化合物を予め添加した 96 ウェルプレートに SCAT1 を発現する PM Φ を蒔種し、poly(dA:dT) 刺激前後における SCAT1 の蛍光強度変化を細胞イメージアナライザーによって単一細胞レベルで検出する系を構築した(図 1A)。具体的には、個々の細胞について核領域周囲を規定し、同領域における SCAT1 の蛍光強度を定量するアルゴリズムを用いた(図 1B)。得られた SCAT1 蛍光強度に対する頻度分布について、蛍光強度の閾値を設定することで、刺激前後に蛍光消失が生じた割合を蛍光消失率として算出した(図 1C)。無刺激の対照群と刺激群でこの蛍光消失率について、アッセイ系の最適度を表す Z'-factor を算出したところ(一般に Z' は 0.5 以上が好ましい)、Z' = 0.78 という高い値を示した(図 1D)ため、inflammasome 刺激によって引き起こされる SCAT1 蛍光消失を単一細胞レベルで検出する信頼性の高いスクリーニング系が構築できたと考えられる。

2. いくつかのスクリーニング系を用いた候補化合物の絞り込み

構築したスクリーニング系を用いて、Validated Compound Library に含まれる化合物存在下での蛍光消失率を算出した。さらに、各々のプレートにおいて、蛍光消失率の対照群に対する変化率を蛍光消失阻害率と定義し、プレート間の比較を行う指標とした。消失阻害率が 50% 以上または -20% 以下の化合物群について同様のアッセイをさらに 3 度行い、アッセイ系の偽陽性を排除した 66 の 1 次候補化合物を得た(図 2A)。次に、これら化合物が inflammasome 活性化刺激添加前に細胞や核の形態に与える影響を蛍光顕微鏡によって観察し(図 2B)、変化の少ない 34 の化合物を 2 次候補とした。さらに、得られた候補化合物が inflammasome 経路に与える効果を詳細に確認するため、1) SCAT1 ライブイメージングによる caspase-1 活性化検出、2) ELISA による IL-1 β 分泌検出、3) LDH 放出測定による細胞死検出を行った(図 2C)。その結果、inflammasome 経路を抑制する可能性がある 8 つの化合物を同定した(図 2D)。これらの化合物については、NLRP3 inflammasome 活性化刺激である Nigericin 刺激に対する効果も確認した(図 2D)。

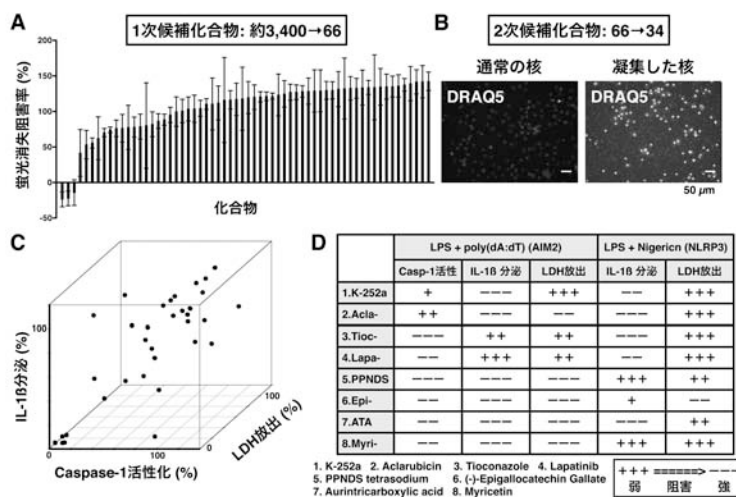


図2. いくつかのスクリーニングによる候補化合物の絞り込み

(A) 蛍光消失阻害率：蛍光消失率の対照群に対する変化率。Mean \pm SD, n = 3。
 (B) 蛍光顕微鏡による核の形態観察。inflammasome 刺激投与前に核凝集を誘導した化合物を排除した。
 (C) 候補化合物の Caspase-1 活性化、IL-1 β 分泌、LDH 放出に対する効果。(100% = DMSO 対照群)
 (D) 得られた 8 つの候補化合物の概要。

3. Lapatinib は NLRP3 inflammasome 形成を阻害する

得られた候補化合物のうち、EGFR および Her2 の二重チロシンキナーゼ阻害剤である Lapatinib は、AIM2 inflammasome 活性化刺激である poly(dA:dT) による IL-1 β 分泌に効果を示さなかったが、NLRP3

inflammasome 活性化刺激である Nigericin や Silica crystals による IL-1 β 分泌を抑制した(図3A)。また、Lapatinib 投与は Nigericin 刺激後早い段階での LDH 放出を抑制した。さらに、Nigericin 刺激による caspase-1 の切断活性化および IL-1 β の切断成熟は、Lapatinib 投与によって抑制された(図3B)。重要なことに、NLRP3 やアダプタータンパク質 ASC、pro-caspase-1、pro-IL-1 β の発現量は Lapatinib 投与の影響を受けなかった(図3B)。続いて、Lapatinib が NLRP3 inflammasome 形成を抑制するか確認するため、inflammasome 形成に必要な ASC の oligomerization および ASC speck 形成について検討した。その結果、Lapatinib は Nigericin 刺激による ASC oligomerization および ASC speck 形成を阻害したが(図3C)、AIM2 inflammasome 活性化刺激である poly(dA:dT)によるこれら ASC の指標には効果を示さなかった。最後に、NLRP3 inflammasome 活性化に対する EGF-EGFR の効果を検討するため、Nigericin 刺激に対し EGFR 阻害剤 Erlotinib または EGF を投与したが、Erlotinib および EGF は IL-1 β 分泌量に劇的な効果を示さなかった(図3D)。以上の結果から、Lapatinib が EGF-EGFR 非依存的に NLRP3 inflammasome 形成を阻害し、その下流での caspase-1 活性化、IL-1 β 分泌、LDH 放出を抑制することが示唆された。

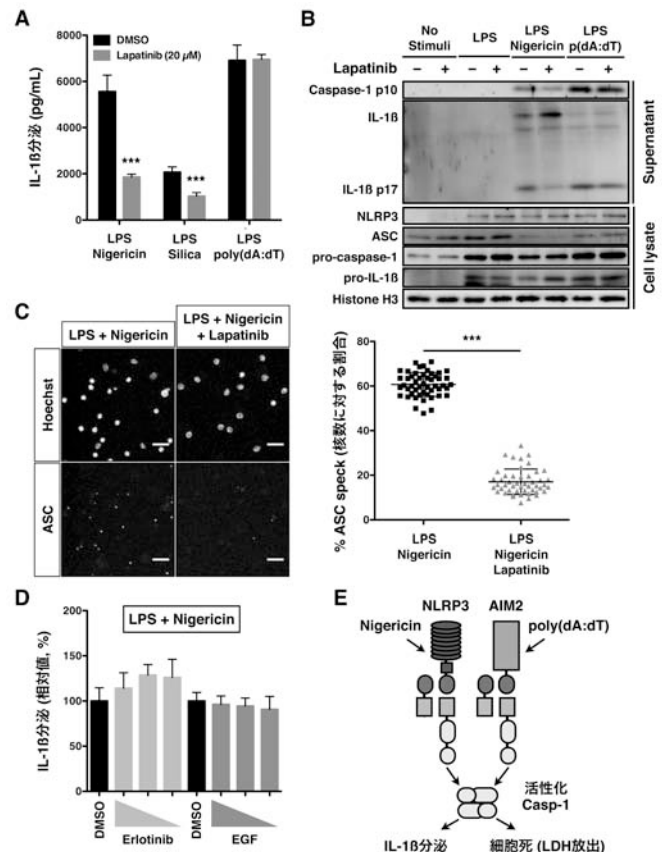


図3. LapatinibはNLRP3 inflammasome形成を阻害する
 (A) 様々なinflammasome刺激によるIL-1 β 分泌に対するLapatinibの効果。
 (B) Caspase-1切断活性化、IL-1 β 切断成熟に対するLapatinibの効果。
 (C) Nigericin刺激によるASC speck形成に対するLapatinibの効果。
 (D) Nigericin刺激によるIL-1 β 分泌に対するErlotinibまたはEGFの効果。
 (E) NLRP3およびAIM2 inflammasome活性化機構の概要。
 Mean \pm SD, n = 4 (A, D), n > 45 (C), p^{***} < 0.001.

4. NF449 は AIM2 inflammasome 形成を部分的に阻害する

得られた候補化合物のうち、PPNDS、Epi-、ATA および Myri-は poly(dA:dT)刺激によるすべてのアウトプット(SCAT1 イメージングによる caspase-1 活性化、IL-1 β 分泌および LDH 放出)を劇的に抑制したため、caspase-1 の上流で AIM2 inflammasome を制御すると考えられる。そこで、poly(dA:dT)刺激の最上流である poly(dA:dT)の取込みを、immortalized Bone Marrow Macrophage (iBMM)を用いた dsDNA 取り込みアッセイで検討した。候補化合物が iBMM に対しても PM Φ と同様の抑制作用を示すことは予め確認した。その結果、poly(dA:dT)刺激による IL-1 β 分泌を抑制した全化合物投与下で poly(dA:dT)取り込み率が大幅に低下することがわかった(図 4A)。これらの結果は、上記化合物群が poly(dA:dT)の transfection 過程を阻害したことで、AIM2 inflammasome の活性化を誘導できなかったことを示唆する。

ところが、PPNDS の標的とされる P2X1 受容体のアンタゴニストである他の化合物についても同アッセイを用いて確認したところ、NF449 が poly(dA:dT)の取込み非依存的に IL-1 β 分泌を抑制することを発見した。NF449 投与下での IL-1 β 分泌量は、poly(dA:dT)濃度を变化させた時に得られる poly(dA:dT)取込み率と IL-1 β 分泌量の相関から想定される IL-1 β 分泌量に比べ減少した(図 4B、C)。この結果は、NF449 が poly(dA:dT)取込みを阻害する以外の機構で poly(dA:dT)刺激による IL-1 β 分泌を抑制し得ることを示唆する。次に、他の AIM2 inflammasome 活性化刺激に対する NF449 の効果を確認するため、Nelfinavir(NFR)刺激による IL-1 β 分泌を検討した。NFR 刺激に対し、NF449 投与は濃度依存的に IL-1 β 分泌をわずかに確実に

阻害した(図 4D)。一方、NLRP3 inflammasome 活性化刺激である Nigericin に対して、NF449 投与は IL-1 β 分泌を抑制せず、TNF- α 分泌にも影響を与えなかった(図 4E)。さらに、NF449 投与は poly(dA:dT) 刺激による ASC oligomerization および ASC speck 形成を抑制した(図 4F)。以上の結果から、NF449 は AIM2 inflammasome 形成を部分的に抑制することが示唆された。

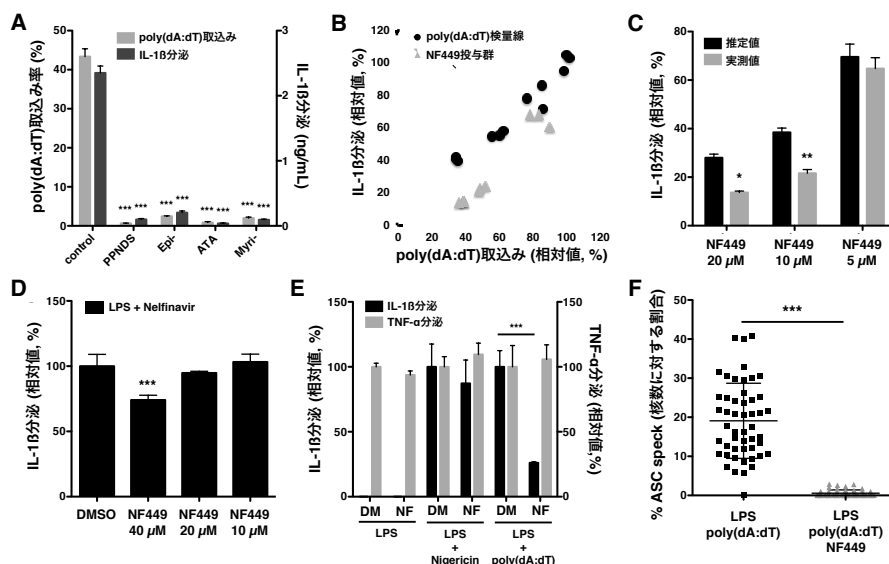


図4. NF449はAIM2 inflammasome形成を部分的に阻害する

(A) 候補化合物のdsDNA取込み率。(B-C) dsDNA取込みとIL-18分泌の相関およびNF449投与の効果。
(D) Nelfinavir刺激によるIL-18分泌に対するNF449投与の効果。
(E) 様々なinflammasome活性化刺激によるIL-18分泌およびTNF- α 分泌に対するNF449投与の効果。
(F) poly(dA:dT)刺激によるASC speck形成に対するNF449投与の効果。
(A-D) iBMM, (E, F) PM Φ , Mean \pm SD, n = 3 - 4 (A-E), n > 45 (F), $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$.

【まとめと考察】

本研究では、PM Φ を用いたイメージング系と化合物ライブラリーを組み合わせた化合物スクリーニングを通して、NLRP3 inflammasome 形成およびそのアウトプットである炎症性サイトカイン IL-1 β 分泌および炎症性細胞死を特異的に阻害する化合物として Lapatinib を同定した。Lapatinib は EGFR、Her2 二重チロシンキナーゼ阻害剤であり、主に Her2 が過剰発現したがんに対する分子標的治療薬として臨床で使用されている。近年、炎症性サイトカインの持続的分泌を伴う慢性炎症ががんの発症や悪性化に関与することが明らかになってきた。本研究において EGF および EGFR は NLRP3 inflammasome 活性化機構に関与しないことが示唆されたが、今後、Lapatinib が NLRP3 inflammasome 活性化を抑制する分子機構を *in vitro* および *in vivo* で詳細に解析することで、がんのみならず慢性炎症に関与する多くの病態に対する新たな治療戦略の基礎となることが期待される。また、本研究では、スクリーニングで得られた化合物に関連する化合物として用いた NF449 が AIM2 inflammasome を部分的だが特異的に阻害することを明らかにした。NF449 は G タンパク質の G_{αs} サブユニットに対する特異的アンタゴニストとして同定され、ATP 受容体 P2X1 のアンタゴニストとしても研究で使用されている。近年、GPCR の下流で cAMP 量の増加や PKA の活性化が NLRP3 のユビキチン化を介しその活性を特異的に抑制することがいくつかのグループから報告された。NF449 が G_{αs} サブユニットの抑制を介し AIM2 inflammasome を抑制するかはまだ不明だが、今後この化合物が inflammasome 活性化を抑制する分子機構について詳細に解析することで、異なるパターン認識受容体で構成される inflammasome の普遍的な制御機構の解明につながることを期待される。

【参考文献】 Liu, T. et al., *Cell Reports* 8, 2014