

NLRP3 インフラマソームの細胞内再構成による機能解析

河野 肇

帝京大学医学部内科学講座

研究要旨

- ・ HEK293T 細胞において、NLRP3 の発現によるインフラマソーム speckle の形成、Nigericin 投与による更なる speckle 形成の促進を定量的に再構成する系を構築した。
- ・ クリオピリン関連周期性発熱と関連する機能亢進型 NLRP3 (D303N, H312P, A352V, R260W) においては、野生型 NLRP3 に比較して、speckle の形成の亢進が認められた。
- ・ 画像解析が high throughput system 対応であることを生かし、インフラマソーム機能に関連する因子の新規同定を進めている。

A . 研究目的

NLRP3 インフラマソームの機能はクリオピリン関連周期性発熱のみならず、各種感染症、結晶誘発性関節症、死細胞に対する炎症反応、糖尿病や動脈硬化などの慢性炎症性疾患に至るまで広範囲の生体反応において重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしその分子メカニズムについては未だ十分解明されていない。

B . 研究方法

Fugene6 もしくは electroporation を用いた遺伝子導入により、蛍光 (Cerulean) -ASC を安定的に導入した HEK293T 細胞およびマクロファージ細胞株 RAW264.7 を樹立した。RAW264.7 細胞には遺伝子導入を容易とするためレトロウイルスレセプターを発現させた。これらの細胞は導入遺伝子保持のために puromycin の添加下に培養された。画像取得を蛍光顕微鏡にて行った後、ImageJ ソフトウェアを用いてその細胞面積、およびインフラマソーム活性の指標である speckle の解析を行った。

面積の取得には以下のマクロを用いた

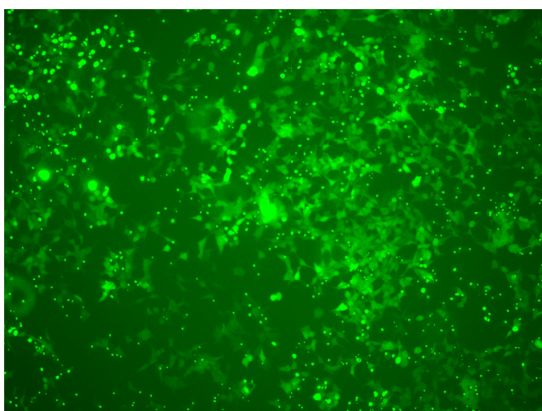
```
run("Set Measurements...", "area area_fraction\nredirect=None decimal=3");\nrun("Set Scale...", "distance=139.88 known=300\npixel=1 unit=microm");\nrun("Subtract Background...", "rolling=200");\nrun("Enhance Contrast", "saturated=0.2");\nrun("8-bit");\n//run("Threshold...");
```

```
setAutoThreshold( " Huang dark " );\nrun("Measure");
```

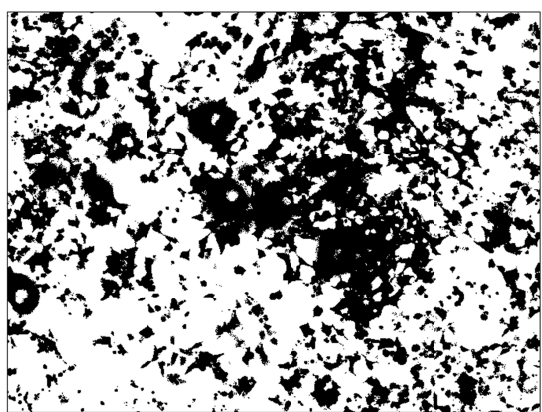
speckle の取得には以下のマクロを用いた。

```
run("Set Measurements...", "area area_fraction\nredirect=None decimal=3");\nrun("Set Scale...", "distance=139.88 known=300\npixel=1 unit=microm");\nrun("Find Maxima...", "noise=20 output=[Maxima\nWithin Tolerance]");\nrun("Analyze Particles...", "size=5-120\ncircularity=0.00-1.00 show=Outlines display clear\nsummarize");
```

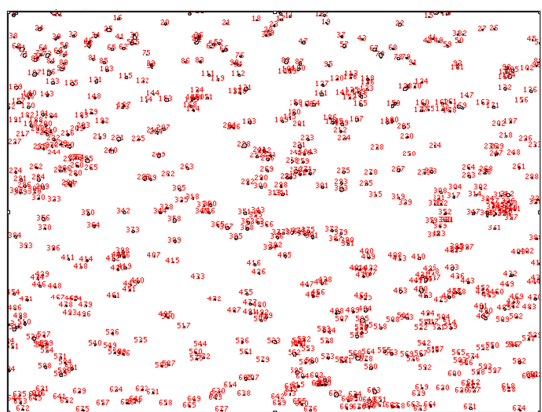
取得画像



面積取得画像



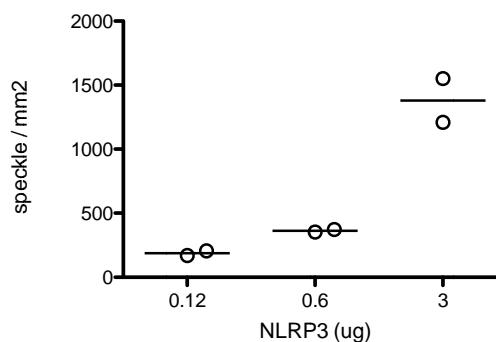
speckle 取得画像



C . 研究結果

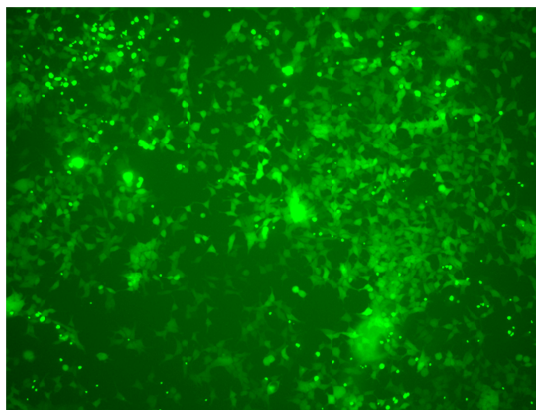
ASC-Cerulean 発現 HEK-293T に野生型 NLRP3 を transfect するとその用量依存性に ASC の細胞一極への集中(speckle)、即ちインフラマソームの形成が観察された。

[図] HEK293T 細胞におけるインフラマソーム再構成

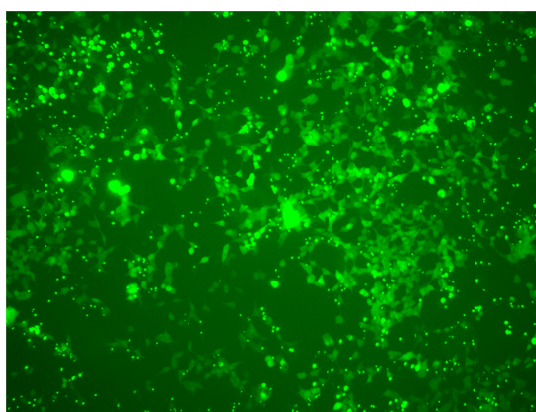


また、Nigericin 投与による speckle 形成の促進が認められた。

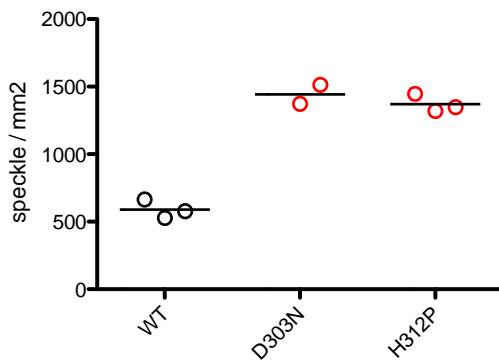
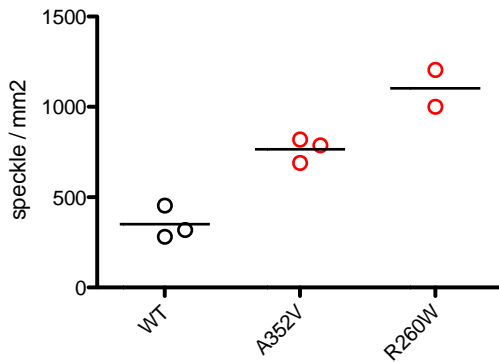
[図] Nigericin 投与前



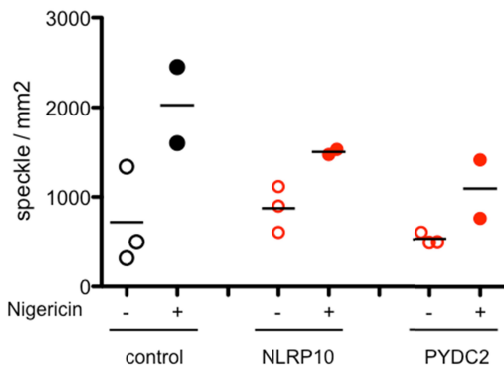
[図] Nigericin 投与後



クリオピリン関連周期性発熱と関連する機能亢進型 NLRP3 (D303N, H312P, A352V, R260W)においては、野生型 NLRP3 に比較して、speckle の形成の亢進が認められた。



また、NLRP3 インフラマソーム形成阻害に関連することが知られている PYDC2 の共発現においては、speckle 形成の低下が認められた。



D . 考察

今後、画像取得およびその処理を自動化し、ハイスループットシステムを構築し、ライブラリースクリーニングを行うことにより新規のインフラマソーム形成制御の分子機構を同定することを目標とする。

E . 結論

HEK293T 細胞において、NLRP3 の発現によるインフラマソーム speckle の形成、Nigericin 投与による更なる speckle 形成の促進を定量的に再構成する系を構築した。

クリオピリン関連周期性発熱と関連する機能亢進型 NLRP3 (D303N, H312P, A352V, R260W) においては、野生型 NLRP3 に比較して、speckle の形成の亢進が認められた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nature Immunology* 2013
- Yanagida T, Orihashi K, Kono H. In vivo evaluation of neutrophil recruitment in response to sterile particulates. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1040: 211-21, 2013
- Kono H, Onda A, Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Current Opinion in Immunology* 26: 147-156, 2014

2. 学会発表

Kono H, Yanagida T, Kikuchi H, Asako K. Anti-inflammatory Property of HDL in NOD1 Ligand induced Kawasaki Arteritis in Mice. *ACR2013 2013 San Diego*

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし