

アレルギー炎症に関与する
インターロイキン 33 の放出機構の解析

長山瑞佳

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子免疫制御研究室

(河合太郎 教授)

令和 2 年 1 月 20 日

目次

博士論文要旨.....	4
1. 序論.....	6
1-1.アレルギー応答におけるインターロイキン-33 (IL-33) の役割.....	6
1-1-1.サイトカインによる炎症誘導とアレルギー応答.....	6
1-1-2.IL-33 によるアレルギー誘導機構.....	7
1-2. IL-33 の分子生物学的特徴.....	8
1-2-1. IL-33 の構造と受容体.....	8
1-2-3 IL-33 発現細胞とインフラマソームの関係性.....	11
1-2-4. 放出後 IL-33 のシグナル経路.....	12
2. 材料と方法.....	13
2-1. 使用した実験材料.....	13
2-2. IL-33 発現プラスミドの構築.....	15
2-3. IL-33 発現プラスミドを用いたスクリーニング.....	17
2-3-1. 使用する細胞種の検討.....	17
2-3-2. IL-33 発現プラスミドを用いた化合物スクリーニング.....	19
2-3-3. Nigericin 刺激の濃度変化または経時変化時の IL-33 放出量の検討.....	20
2-4. IL-33 の細胞外放出動態の観察.....	20
2-4-1. IL-33 の局在.....	20
2-4-2. IL-33 の放出動態の観察.....	21
2-5. IL-33 細胞外放出動態の経時的観察.....	21
2-6. GSDMD による IL-33 の放出の検討.....	21
2-6-1. GSDMD 発現プラスミドの構築.....	21
2-6-2. GSDMD による IL-33 放出誘導の検討.....	21
2-6-3. GSDMD-N 端断片による細胞死の検討.....	22
2-6-4. siRNA を用いたノックダウン解析.....	22
2-6-5. Nigericin による GSDMD 切断の検討.....	24
2-6-6. Nigericin 刺激による GSDMD の動態の観察.....	24
2-7. 活性酸素種 (ROS) による IL-33 放出の検討.....	25
2-7-1. Nigericin 刺激による ROS の産生の検討.....	25
2-7-2. 抗酸化剤 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) による IL-33 放出抑制の検討.....	25

2-7-3. PDTC による IL-33 放出抑制の動態の観察	25
2-7-4. プロテアーゼ阻害剤による IL-33 放出抑制の検討	25
2-8. 統計処理.....	26
3. 結果.....	27
3-1. 細胞死誘導能を有した化合物ライブラリーを用いたスクリーニング	27
3-2. Nigericin の刺激濃度・経時変化時の IL-33 放出量の検討	30
3-3. Nigericin 刺激時の IL-33 細胞外放出の観察	31
3-4. IL-33 の放出を制御する分子の同定.....	33
3-5. Nigericin 刺激による GSDMD 切断と IL-33 放出の上流因子の探索.....	37
3-6. GSDMD の切断を制御する因子の探索	40
4. 考察.....	41
5. 謝辞.....	45
6. 参考文献	46

博士論文要旨

所属 (主指導教員)	分子免疫制御研究室(河合太郎教授)		
氏名	長山瑞佳	提出	令和元年 12 月 11 日
題目	アレルギー炎症に関与する インターロイキン 33 の放出機構の解析		

【背景】

自然免疫は生体内に侵入する細菌などの病原体を察知し、その後の炎症反応の誘導や獲得免疫の成立に重要な役割を果たす第一線の生体防御機構である。マクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞は、Toll-like receptors (TLRs) などの自然免疫受容体を介して病原体成分を認識し、炎症性サイトカインやI型インターフェロンの産生を誘導する。一方、病原体感染や細胞障害を起因とした細胞死は、細胞膜の崩壊に伴い、種々の内在性リガンドを大量に細胞外へと放出する。近年、宿主由来の内在性リガンドは、自然免疫応答を惹起することで、炎症性サイトカインやインターフェロンとの協調した生体防御を構築することが明らかにされてきた。これら内在性因子は **Damage-associated molecular patterns (DAMPs)** と呼ばれ、核酸やタンパク質などが含まれる。

IL-33 は炎症性サイトカイン IL-1 ファミリーに属するサイトカインである。IL-1 は主に自然免疫系の細胞であるマクロファージや樹状細胞から主に産生され、リンパ球の活性化や炎症惹起に重要な役割を果たす。一方、IL-33 は主に上皮系の細胞から放出されると考えられており、IL-33 やその受容体欠損マウスの解析から寄生虫や細菌に対する免疫応答に必須の役割を果たすことが示されている。しかしながら、アレルギー炎症の病態形成に関与することも示されており、花粉症やダニアレルギーなどの増悪因子として機能することも報告されている。つまり IL-33 放出機構の解析はアレルギー制御の点からも重要である。そこで本研究では IL-33 の放出誘導機構を解明し、アレルギー応答制御機構の新たな理解を目指した。

【結果・考察】

外来刺激に対して IL-33 を産生する生体内での担当細胞は不明である。また、IL-1 は転写・翻訳を経て細胞外へと分泌される他のサイトカインと異なり、細胞死に伴い放出されることが示唆されている。そこでまず、IL-33 がどのような刺激で細胞外に放出されるか検討を行った。上皮系の細胞である HEK293 細胞に IL-33 発現プラスミドを導入し、保有している化合物ライブラリー156種類を用いて

スクリーニングを行った結果、Nigericin によって IL-33 が細胞外へ放出されることを ELISA 法により見出した。Nigericin は放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* 由来の抗生物質で、K⁺のイオノフォアとして作用することが報告されている。続いて、細胞死が誘導されるか WST-1 試薬を用いた実験により検証したところ、Nigericin 刺激後に細胞死が確かに誘導されていた。一方、細胞死を引き起こす抗ガン剤 Etoposide により刺激を行った場合、IL-33 の放出は誘導されず、Nigericin 刺激で誘導される特徴的な細胞死が IL-33 の細胞外放出に関与していることが示唆された。さらに詳しく解析を行ったところ、IL-33 は未刺激状態では核に局在を示していたが、Nigericin 刺激 1 時間後には IL-33 の局在が核から細胞質へと移行し、3 時間後には IL-33 の局在がほぼ消滅し、細胞外へと拡散することが示唆された。一方 Etoposide 刺激ではアポトーシスに特徴的な核の断片化を認めたが、IL-33 は核での局在を示した。これらのことから、Nigericin 刺激依存的に IL-33 の核外輸送ならびに細胞死を誘導する制御機構が存在することが示唆された。そこで、Nigericin が IL-33 の放出を制御する候補遺伝子として Gasdermin D (GSDMD) に着目した。GSDMD は様々な細胞障害に呼応し Caspase-1 等のタンパク質分解酵素で N 末端と C 末端に切断され、N 端断片が細胞膜上で孔を形成することが示されている。その結果、細胞死が誘導され DAMPs が放出される。そこで全長の GSDMD および N 端、C 端のみの発現プラスミドを作製し、IL-33 発現プラスミドと共にそれぞれ HEK293 細胞に導入後、放出された IL-33 量を測定した。その結果 GSDMD-N 端を発現させた場合に IL-33 の放出が誘導された。さらに Flag-GSDMD 発現プラスミドを導入した HEK293 細胞を Nigericin で刺激を行ったところ、Nigericin 刺激に伴い GSDMD の切断が誘導された。これらのことから、Nigericin により何らかのタンパク質分解酵素が活性化し、その結果 GSDMD の切断を伴う細胞死と IL-33 の放出が誘導されたと考えられた。

次に Nigericin による IL-33 の放出を阻害する薬剤の探索を行ったところ、pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) により IL-33 の放出が有意に抑制された。PDTC は抗酸化作用により活性酸素種 (ROS) を阻害する薬剤として知られている。そこで、PDTC 阻害時の IL-33 の放出動態を免疫染色により検討したところ、Nigericin 刺激後も IL-33 は核に局在を示した。また、Nigericin 刺激により ROS が産生されていることがわかった。これらより、Nigericin による ROS の産生が IL-33 放出に関与する可能性が示唆された。

以上の結果より IL-33 は Nigericin 刺激による ROS の産生・GSDMD の切断、それによる GSDMD-N 端断片の精製および GSDMD-N ポアの形成により放出される可能性が示唆された。本研究によりアレルギーだけでなく内在性リガンドが関与する様々な病態への理解が深まり、治療法確立への一つの手段が開かれることが期待される。

1. 序論

1-1. アレルギー応答におけるインターロイキン-33 (IL-33) の役割

1-1-1. サイトカインによる炎症誘導とアレルギー応答

サイトカインは細胞から放出される分泌タンパク質の総称であり、発生、分化、神経系、免疫系等における細胞間ネットワークの構築に重要な役割を果たしている^[1]。サイトカインの中で免疫細胞から放出されるものはインターロイキンと呼ばれ、現在ヒトでは48種類ほど発見されており、それぞれの役割も明らかにされつつある。また、インターロイキン以外にもTNF- α やインターフェロン等のサイトカインも免疫細胞から放出され、これらは炎症応答や抗ウイルス応答の誘導に重要な役割を果たしている^[2]。

病原体感染や環境因子暴露により免疫細胞から放出されたサイトカインは近隣の細胞に作用し、連鎖的に応答することで効率よく病原体が排除される。感染初期では好中球や好酸球、マクロファージなどの自然免疫細胞が直接病原体を認識し様々なサイトカインを放出することでそれらの感染局所への遊走や貪食能の増加を誘導する。サイトカインを起点としたこの一連の応答は炎症応答と呼ばれ、臨床的には発熱・膨張・発赤・疼痛・機能障害などの炎症5徴候と呼ばれる特徴からその存在が確認できる。この炎症応答はT細胞やB細胞といった抗原特異的な獲得免疫系細胞の活性化も誘導することから獲得免疫の成立に必須である。さらに炎症は感染により障害を受けた組織の修復にも重要である。

一方、慢性的あるいは過剰な炎症応答は組織傷害や自己に反応する自己抗体の分

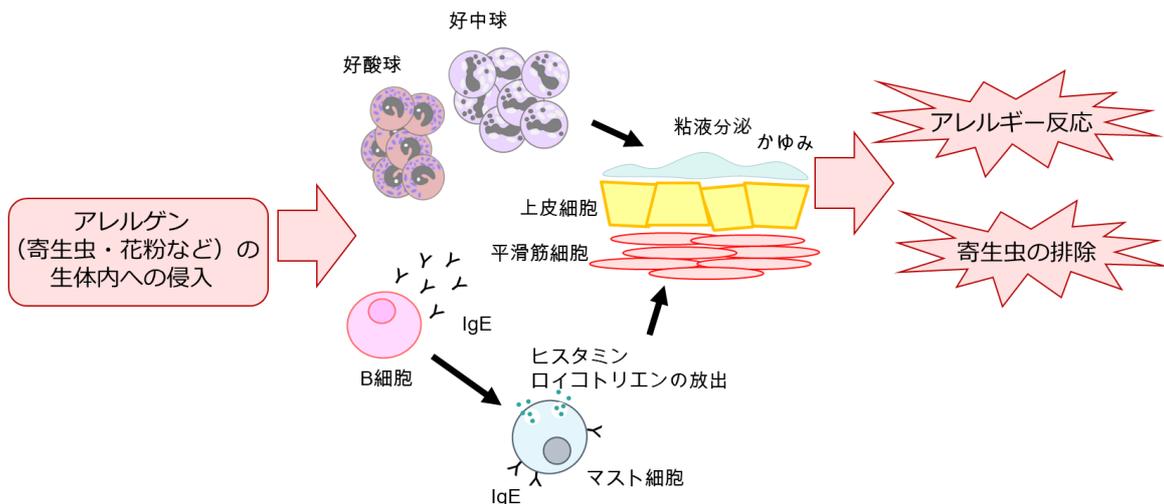


図 1-1. アレルゲンに対する炎症誘導機構

アレルゲン（花粉、寄生虫など）が体内に侵入すると好酸球・好中球が集積、またB細胞から放出されるアレルゲン特異的IgE抗体を介してマスト細胞が活性化する。これらはヒスタミンやロイコトリエンの放出を誘導し、粘液分泌やかゆみなどのアレルギー症状を引き起こす。

泌を誘導し、本来は無害であるはずの標的に対しての免疫応答を惹起する。このような反応はアレルギー反応と言われ、特に IgE を介した炎症応答はアレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎やリウマチ等の様々な疾患の原因と考えられている

(図 1-1)。以上の背景から、各種サイトカイン分泌制御の分子生物学的理解は、アレルギー性疾患の治療法開発、創薬開発にとって重要である。

1-1-2.IL-33 によるアレルギー誘導機構

近年、アトピー性皮膚炎やアレルギー性喘息等の上皮系の組織に主症状を呈するアレルギー性疾患の原因分子として IL-33 が報告されている^[3]。IL-33 はその受容体を発現する 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞、マクロファージ、mast 細胞、好酸球および最近発見された 2 型自然リンパ球 (Type 2 Innate Lymphoid Cell, ILC2) を活性化させ、IL-5 や IL-13 などの種々のサイトカイン産生を誘導することで、好酸球、好中球の局所への遊走および粘液の分泌を誘導する (図 1-2) ^{[4][5]}。さらに、これらのサイトカインは B 細胞のクラススイッチを誘導し、IgE 抗体産生を誘導する。抗原を認識した IgE が mast 細胞上の IgE 受容体 (FcεRI) に結合すると、mast 細胞から

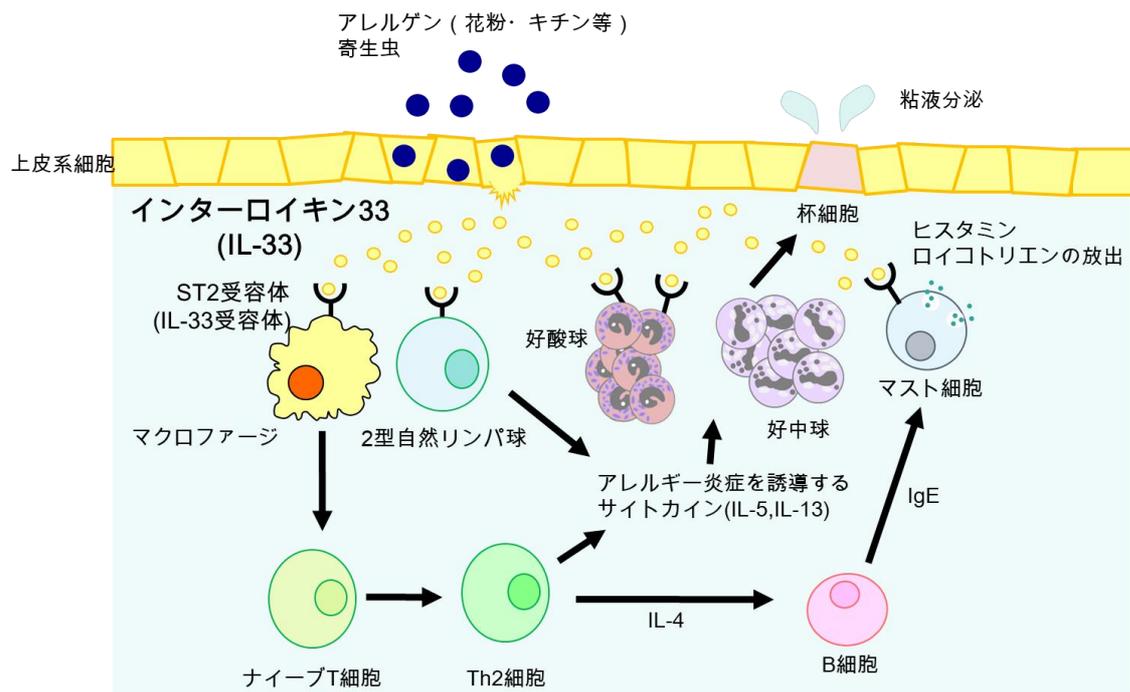


図 1-2. IL-33 によるアレルギー誘導機構

アレルギーの侵入により放出された IL-33 は ST2 受容体 (IL-33 受容体) を介して認識され、マクロファージや 2 型リンパ球、好酸球などを活性化する。それによりアレルギー炎症を誘導するサイトカインである IL-5 や IL-13 の産生や好酸球、好中球の集積が誘導される。さらに Th2 細胞により活性化された B 細胞より IgE 抗体が産生され、mast 細胞と IgE が結合することで mast 細胞からのヒスタミンの放出が誘導される。これらによりアレルギー反応が誘導される。

ヒスタミンが放出される。ヒスタミンは主にマスト細胞で蓄えられている生体アミンであり、放出されると気道の収縮や血管拡張作用を誘導し寄生虫等の病原体を排除する。これら好酸球、好中球性炎症、粘液産生の亢進、IgE 応答は寄生虫感染に対抗するための生体防御機構として存在しているが、これらの応答は生体にアレルギー症状を引き起こす。IL-33 ノックアウトマウスでは Th2 細胞やマスト細胞を介した好酸球の浸潤が顕著に減弱し、寄生虫感染時の生体防御反応が減弱するとともにアレルギー応答も減弱することが示されている^{[6][7]}。

一方、花粉症や食物アレルギー発症患者、アトピー性皮膚炎などの重篤なアレルギー応答が見受けられる患者において、IL-33 の過剰産生が認められることも報告されている^{[8][9]}。また、IL-33 は直接マスト細胞を活性化することでヒスタミンやロイコトリエンの産生を誘導することも報告されており、IgE を介さずに直接的にアレルギー症状を引き起こす可能性も示唆されている。これら一連の報告からアレルギー性炎症の発症と症状の進展における IL-33 の存在の重要性は強く認識されており IL-33 をターゲットとした分子標的薬の臨床試験が進行している一方、その源流である IL-33 の分泌機構については未だ不明な点が多い。

1-2. IL-33 の分子生物学的特徴

1-2-1. IL-33 の構造と受容体

IL-33 はヒトで 270、マウスで 266 アミノ酸から構成されるタンパク質であり、IL-1 α 、IL-1 β や IL-18 と同様に C 末端側に四面体構造モチーフである IL-1 様ドメインを有する IL-1 ファミリーに分類される (図 1-3)。IL-33 の N 末側には核局在化シグナルやクロマチン結合モチーフが存在し、IL-33 は定常状態においては核内に存在すると考えられている。

IL-33 はこの四面体構造モチーフを介して免疫系細胞の膜上に存在する ST2 受容体と結合する (図 1-4)。その後、ST2 は IL-1R3 と会合することでヘテロ二量体を形成し、細胞内領域の TIR ドメインを介して下流にシグナルを伝達する^[10]。したがって、IL-33 のサイトカインとしての生理活性部位は C 末端に存在し、その受容体である ST2-IL-1R3 ヘテロ二量体は、その結合するリガンドや構成成分に因んで IL-33 受容体または ST2 受容体と呼称される (以降では IL-33 受容体と明記する)。IL-33 受容体にリガンドが結合すると TLR ファミリーと同様に TIR ドメインを介してアダプター分子である MyD88 を動員する。最終的に、転写因子 NF- κ B や MAP キナーゼ経路を活性化することで、主に IL-5 や IL-13 のアレルギー性サイトカインの産生や、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。

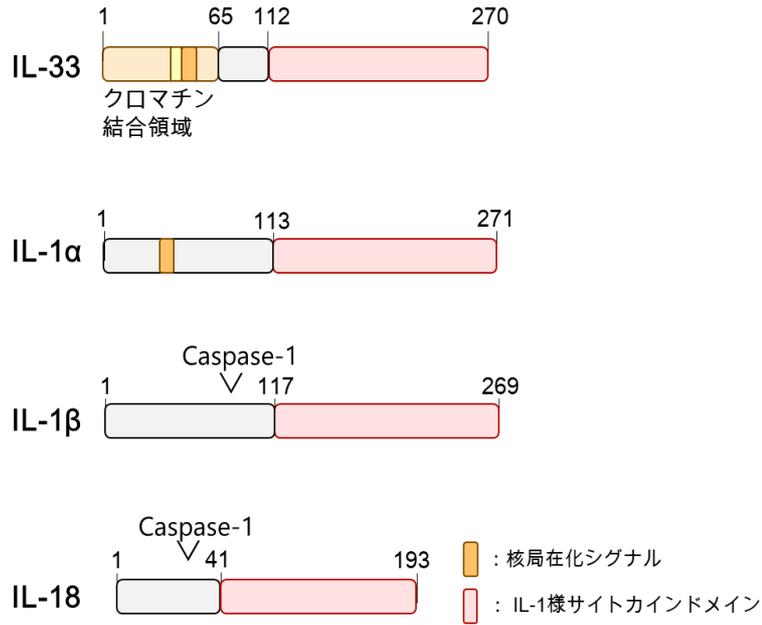


図 1-3. IL-1 ファミリーの構造

IL-1 ファミリーに分類される IL-33、IL-1α および IL-1β、IL-18 は C 末端側にファミリー間で広く保存された IL-1 様サイトカインドメインを有する。また、IL-33 と IL-1α は核局在化シグナルを有することから、通常、核に局在を示し、さらに IL-33 は N 末端側のクロマチン結合領域を介してクロマチン構造の安定化や遺伝子発現の調節に関与すると考えられている。ここではヒトのそれぞれの構造を示した。

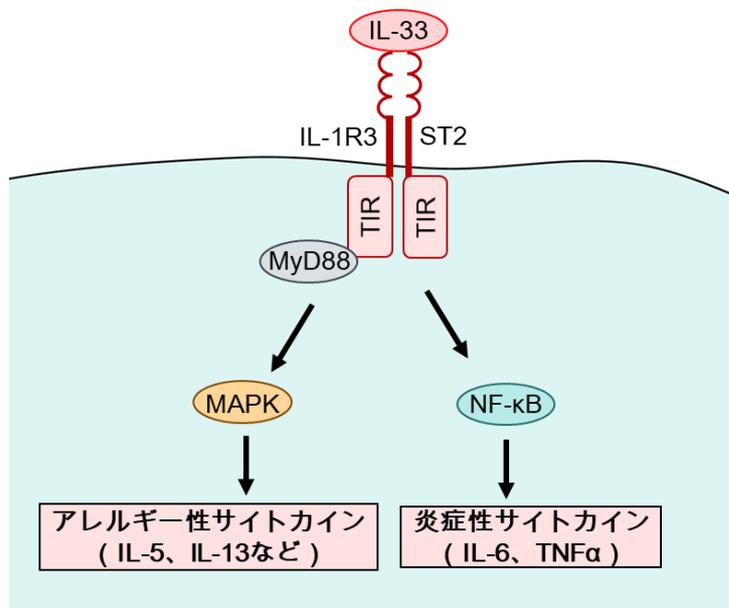


図 1-4. IL-33 受容体のシグナル伝達経路

放出された IL-33 は ST2 受容体により認識され、細胞内領域ある TIR ドメインを介して MyD88 を活性化する。最終的に転写因子である NF-κB や MAP キナーゼ経路を活性化することで、主に IL-5 や IL-13 のアレルギー性サイトカインの産生や、TNF-α などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。

1-2-2. IL-33 を含む IL-1 ファミリーサイトカインの切断修飾による分泌制御

IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインのほとんどが小胞輸送により細胞外に放出されるのに対し、IL-1 β や IL-18 は小胞体輸送に必要な輸送シグナル配列が存在しない。そのため、IL-1 β や IL-18 はパイロトーシスと呼ばれる一連のシグナル経路の活性化とそれに伴う細胞死により細胞外へ放出されることが知られている^[11]。パイロトーシスは病原体認識に関わるパターン認識受容体 (PRRs) のうちの 1 つである NLRP3 インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体の活性化により誘導される^[12] (図 1-5)。NLRP3 インフラマソームの主要な構成成分である NLRP3 は細胞質内に局在しており、ロイシンリッチリピートや Nucleotide binding-oligomerization domain モジュール、下流にシグナルを伝達する CARD ドメインを有している。NLRP3 は活性化に伴い構造が変化し、ASC、Caspase-1 と結合し、インフラマソームを形成す

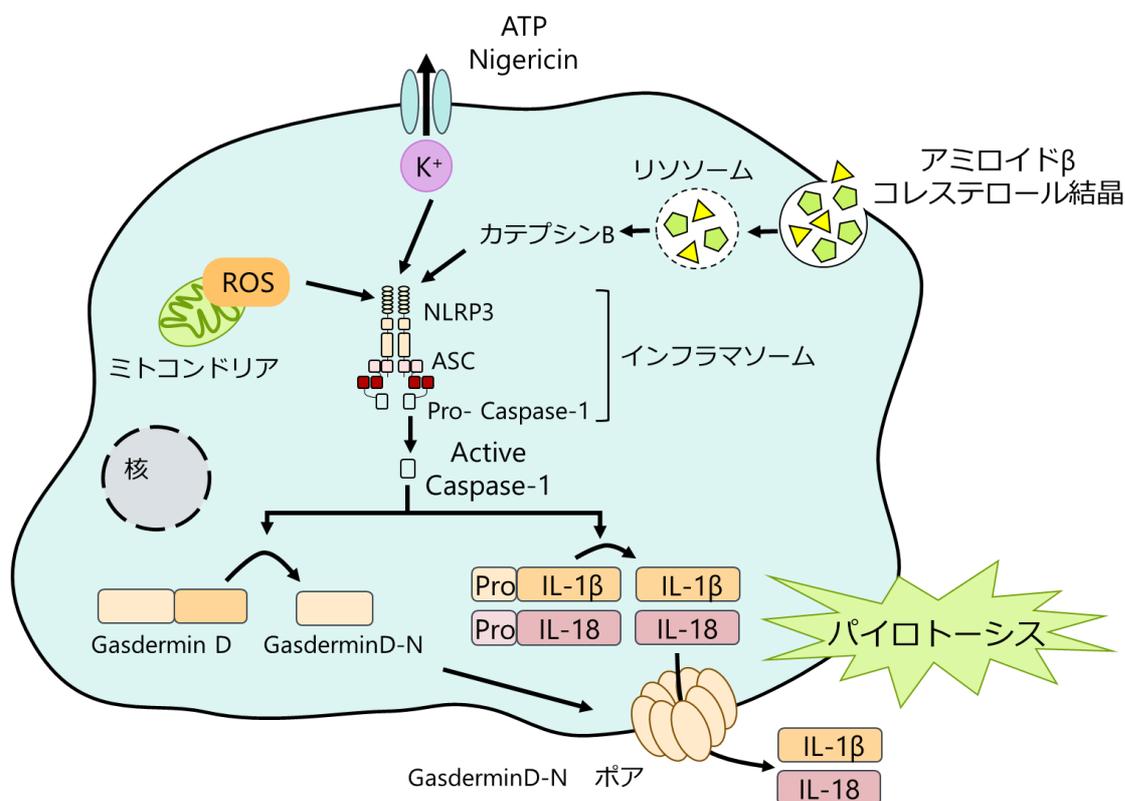


図 1-5. インフラマソームと IL-1 β および IL-18 の放出機構

NLRP3 は ROS の産生、K⁺の流出、リソソームの崩壊に伴うカテプシン B の細胞内放出などにより活性化され、インフラマソームが形成される。それにより活性化した Caspase-1 が GSDMD を切断し、GSDMD の N 端側が細胞膜と相互作用しポアを形成することでパイロトーシスと呼ばれる細胞死を誘導する。また活性化した Caspase-1 は IL-1 β 、IL-18 を前駆体から成熟型へと切断し、切断された IL-1 β 、IL-18 は GSDMD-N ポアを通して細胞外へと放出される。

る。この形成は、様々な病原体成分のみならず、免疫賦活剤として知られる水酸化アルミニウム (ALUM) やポタシウムイオノフォアとして知られる Nigericin、自己由来成分である細胞外 ATP、尿酸結晶、アミロイド β 、コレステロール結晶などで誘導される。これらのアゴニストはミトコンドリアからの活性酸素種 (ROS) 産生、 K^+ イオンの放出、リソソームの崩壊に伴うカテプシン B の細胞質内への放出を誘導し、これらが NLRP3 インフラマソーム形成の起点となっていると考えられている。すなわち NLRP3 インフラマソームは、細胞の障害を検知し炎症を誘導するセンサーであるといえる。Caspase-1 はシステインプロテアーゼであり活性型となると、IL-1 β や IL-18 の前駆体 (pro-IL-1 β 、pro-IL-18) に切断修飾を施すことで、成熟化 IL-1 β および IL-18 へと変換する (図 1-2)。さらに、Caspase-1 は Gasdermin D (GSDMD) と呼ばれる分子の切断を誘導することが近年明らかとなった^[13]。切断修飾後の GSDMD の N 端側は細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質と相互作用することで細胞膜に GSDMD-N ポアが形成され^{[14][15]}、チャネル様構造を取ることによって、パイロトーシスと呼ばれるネクロトーシス様細胞死を引き起こすとともに、細胞内容物の細胞外への放出を促す。これら一連の切断修飾および細胞死の誘導により、成熟化 IL-1 β および IL-18 は細胞外へと分泌することが可能となり生理作用を発揮する。このように、NLRP3 インフラマソームは、IL-1 β や IL-18 産生といった炎症を伴う細胞死 (パイロトーシス) を誘導する起点となっており、感染防御以外にも様々な炎症性疾患と関連している。実際、NLRP3 の変異がクリオピリン関連周期熱症候群と呼ばれる発熱を伴う炎症性疾患で認められている^[16]。

1-2-3 IL-33 発現細胞とインフラマソームの関係性

NLRP3 インフラマソーム経路を構成する一連のタンパク質群や IL-1 β 、IL-18 は主にマクロファージや樹状細胞に発現しているが、IL-33 は NLRP3 インフラマソームをほとんど発現しない表皮細胞や真皮細胞においてその発現量が高い。また、前述の通り、クロマチン結合シグナルを持つ IL-33 は核内に主に存在し、輸送シグナル配列を持たないことから^[17]、古典的な小胞体経由の分泌経路で放出される可能性は低いと考えられる。これらのことから、上皮組織を主症状とするアレルギー炎症における IL-33 の分泌機構は NLRP3 を介したパイロトーシスとは独立したものであることが予想される。事実、既存研究では細胞の機械的損傷や花粉やダニ抗原に含まれるプロテアーゼによる細胞障害により IL-33 の放出が誘導されることが明らかとなっている^[18]。以上のことから、特にアレルギー疾患において重要な上皮系の細胞における IL-33 の放出機構、並びに細胞死との関係性についての分子生物学的な理解は今もって不十分な状態である。

1-2-4. 放出後 IL-33 のシグナル経路

そこで本研究では IL-33 の細胞外放出機構の実態を解明するため、細胞死を誘導することで知られる化合物ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングを試み、放線菌由来のポタシウムイオノフォアである Nigericin 投与時に IL-33 が細胞外へ放出されることを見出した。

2. 材料と方法

2-1. 使用した実験材料

マウス

マウス (C57BL/6) は、日本クレアより購入後、奈良先端科学技術大学院大学の動物実験施設 SPF および水棲動物実験施設 (準 SPF) を使用し飼育管理した。動物実験を行う際は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、奈良先端科学技術大学院大学の動物実験委員会が定める規程を元に実験を行った。

培養細胞

- ヒト胎児由来腎臓ガン細胞：HEK293 細胞
- 肺由来ガン細胞：LLC 細胞
- ヒト子宮頸ガン細胞：HeLa 細胞
- マウス胎児皮膚由来繊維芽ガン細胞：NIH3T3 細胞

上記の 4 種類の細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Life Technologies) 含有の Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 培地 (Nacalai) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。細胞剥離剤には 10 mM EDTA (Nacalai) 含有 2.5 mg/L トリプシン溶液 (Nacalai) を使用した。

- マウス皮膚由来正常細胞：ケラチノサイト

新生児マウスの首を切り、四肢を切り落とした後、首側から腹部にかけて切り込みを入れ、背中側からピンセットを用いて皮膚をはがした。PBS で 3 回洗浄し、フィルター滅菌した 5 mg/mL Dispase 含有 PCT 培地 (CELLnTEC) に浸し、4°C で一晩インキュベートを行った。翌日 PCT 培地を入れた新しいペトリディッシュに皮膚細胞を移して洗浄を行い、ピンセットを用いて表皮と真皮に分離した。TrypLE Select を 5 mL 入れた 50 mL ファルコンチューブに表皮を漬け込んで 37°C で 10 分間インキュベートした。その後 PCT 培地を 25 mL 加え懸濁を行い、セルストレーナーで懸濁液を通して 160 G, 5 分間で遠心分離を行った。上清を捨てた後、PCT 培地で懸濁を行って 10 cm dish に細胞を播種した。

菌株

プラスミド構築時の形質転換に、大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 α 株) (Toyobo) を使用した。形質転換大腸菌は 100 μ g/mL アンピシリン (Nacalai) 含有 LB 液体および平板培地を用い、37°C条件下で一晩培養を行った。

プライマー・オリゴヌクレオチド

NCBI よりマウス由来の *Il33* 遺伝子配列に基づき、オープンリーディングフレームを含む領域を増幅可能なプライマーを設計した。これら実験に使用したプライマーのオリゴヌクレオチド合成は Greiner bio-one および Eurofins genomics に委託した。以下に設計したプライマーの塩基配列を示す。

表 2-1. IL-33 の pcDNA-Myc 発現プラスミド構築用プライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')	制限酵素
Myc- <i>Il33</i> -Forward	aaaggatcctgaaaaatgagacctagaatgaagtattc	<i>Bam</i> H I
Myc- <i>Il33</i> -Reverse	aaactcgaggattttcgagagcttaaacataatattg	<i>Xho</i> I

表 2-2 IL-33 の pFLAG-CMV-2 発現プラスミドの構築用プライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')	制限酵素
Flag- <i>Il33</i> -Forward	aaaagatctgatgagacctagaatgaagtattccaactc	<i>Bgl</i> II
Flag- <i>Il33</i> -Reverse	aaaggatccttagattttcgagagcttaaacataat	<i>Bam</i> H I
Flag- <i>GSDMD</i> -Forward	aaagaattctatgccatcgcccttgagaaagtggtc	<i>Eco</i> R I
Flag- <i>GSDMD</i> -Reverse	aaaggatccctaacaaggtttctggcctagacttg	<i>Bam</i> H I
Flag- <i>GSDMD</i> -C-Forward	ggggaattctgggattgatgaggaggaattaattgag	<i>Eco</i> R I
Flag- <i>GSDMD</i> -N-Reverse	aaaggatccctaactctgacaggagactgagctgctttcc	<i>Bam</i> H I

表 2-3. IL-33 の pEmYFP-n3 発現プラスミドの構築用プライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')	制限酵素
YFP- <i>Il33</i> -Forward	aaactcgagtgaaaaatgagacctagaatgaagtattc	<i>Xho</i> I
YFP- <i>Il33</i> -Reverse	aaaggatccaagattttcgagagcttaaacataatattg	<i>Bam</i> H I

表 2-4. IL-33 の GST タグ付き pFLAG-CMV-2 発現プラスミドの構築用プライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')	制限酵素
GST- <i>Il33</i> -Forward 1	aaagcggccgcaatgagacctagaatgaagtattcc	<i>Not I</i>
GST- <i>Il33</i> -Reverse 1	aaatccagtgggtaccgagattttcgagagcttaaacat	なし
GST- <i>Il33</i> -Forward 2	tcggtaccactggaagttctgtccag	なし
GST- <i>Il33</i> -Reverse 2	aaagggatcctcaatccgattttggaggatggtcg	<i>BamH I</i>

表 2-5. シーケンス用プライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')
pFlag-CMV-2 用-Fwd	aatgtcgtataaaccgccccggtgacgc
pFlag-CMV-2 用-Rev	tattaggacaaggctggtgggcac
pcDNA3-Myc 用-Fwd	cggtgggaggtctatataagc
pcDNA3-Myc 用-Rev	gcaactagaaggcacagtcgag
pEmYFP-n3 用-Fwd	aatgtcgtataaaccgccccggtgacgc
pEmYFP-n3 用-Rev	aaaggatccaagattttcgagagcttaacataatattg

2-2. IL-33 発現プラスミドの構築

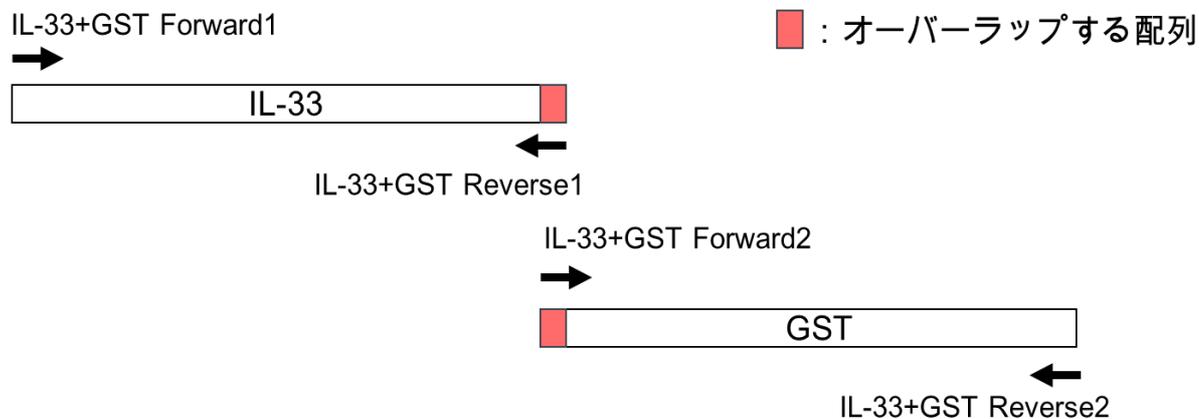
PCR

NCBI よりマウス由来 *Il33* の塩基配列情報を入手し、開始コドン上流にそれぞれの制限酵素配列を付加した Forward プライマーおよび終止コドン下流にそれぞれの制限酵素配列を付加した Reverse プライマーを設計した (表 2-1,2,3)。これらプライマーを用いてマウス由来 cDNA を鋳型として KOD Fx (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR 反応組成は KOD Fx のプロトコルに従い作製し、50 μ L に調製した。PCR 反応条件は、1 サイクル目は 95°C を 5 分間として、その後、95°C を 30 秒間、50-60°C を 30 秒間、68°C を 2 分間の反応を 40 サイクル行った。

また、GST タグ付き pFLAG-CMV-2 発現プラスミド作成にあたり *Il33* と GST を繋ぐ必要があるため、*Il33* の終止コドンから上流と GST の開始コドンから下流の部分を繋げたプライマーを作成した (表 2-4. 「GST-*Il33*-Reverse 1」)。その後「GST-*Il33*-Forward 1」と「GST-*Il33*-Reverse 1」、「GST-*Il33*-Forward 2」と「GST-*Il33*-Reverse 2」の組み合わせで、KOD Fx (TOYOBO) を用いてマウス由来 cDNA を鋳型に PCR を行った (図 2-1)。PCR 反応組成は KOD Fx のプロトコルに従い作製し、50 μ L に調製した。その後 *Il33* および GST の PCR 産物を以下に示した電気泳動と DNA 精製と同様に精製を行い、それぞれの DNA 溶液を混合して表 2 の「GST-*Il33*-

Forward 1」と「GST-IL33-Reverse 2」のプライマーを用いて PCR を行った。なお以下の操作のライゲーションの際にはこの DNA 断片を pFlag-CMV-2 に組み込んだ。

1回目PCR



2回目PCR

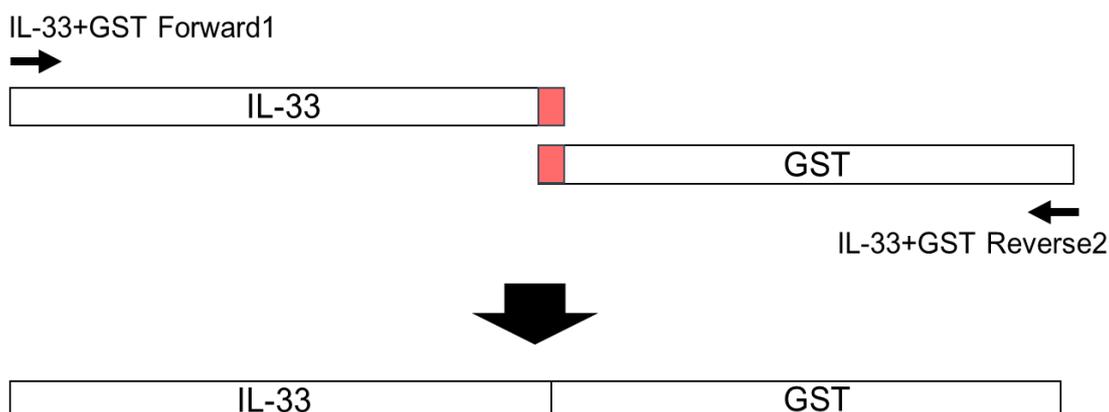


図 2-1. GST タグ付き IL-33 発現プラスミド作成方法

電気泳動および DNA 精製

電気泳動緩衝液として 1×TAE 緩衝液 (Nacalai) を使用した。DNA の染色のために 1/10000 倍容のミドリグリーン (日本ジェネティクス) を含む 0.8% アガロースゲルに 1/6 倍容の 6×Loading buffer (TOYOBO) を加えた PCR 産物を注入し、100 V で電気泳動を行った。ゲル中の DNA バンドは、泳動後に紫外線を照射することで検出した。目的の DNA 断片と思われるバンドをゲルから切り出し、illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) に従って、ゲル精製を行った。

ライゲーションおよび形質転換

精製した各 DNA 断片および pFlag-CMV-2、pcDNA3-Myc、pEmYFP-n3 をそれぞれに設定した制限酵素（pFlag-CMV-2 : *Bgl* II と *Bam*HI、pcDNA3-Myc : *Bam*HI と *Xho* I、pEmYFP-n3 : *Xho* I と *Bam*HI）（いずれも TOYOBO）で消化後、illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit で精製し、分光蛍光高度計 Nano drop（Thermo）で DNA 濃度を測定した。ライゲーション反応は、反応液全量の 1/2 倍容の 2×Ligation Mix（日本 Gene）、50 ng の pFlag-CMV-2 または pcDNA3-Myc または pEmYFP-n3 プラスミドのモル数の約 5 倍量に相当する各 DNA 断片を混合し、16°C にて 1 時間反応させた。その後、氷上で融解させた 30 μL の *E.coli* DH5α 株のコンピテントセル懸濁液をライゲーション反応液へ加えて穏やかに攪拌した。次に 42°C のヒートブロックで 1 時間加温した後、500 μL の LB 培地を加えて穏やかに混合し、37°C で 30 分間静置した。この培養液の 100 μL を 100 μg/mL アンピシリン（Nacalai）含有 LB 平板培地に滴下し、37°C で一晩培養を行った。

プラスミド抽出およびシーケンス分析

コロニーを形成した形質転換大腸菌を 2 mL の 100 μg/mL アンピシリン含有 LB 液体培地に接種し、37°C で一晩振とう培養を行った。培養液の 1.5 mL を遠心分離し、上澄みを除去した後、プラスミド抽出および精製は FastGene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス）に従って行った。精製プラスミドの濃度を分光蛍光高度計 Nano drop で測定し、その 100~200 ng をシーケンス反応の鋳型として用いた。またプライマーは表 4 に記載したプライマーそれぞれを使用した。シーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ABI）に従って行った。決定した塩基配列は、遺伝情報処理ソフト GENETYX により既知遺伝子と比較することで、発現プラスミドが構築されていることを確かめた。その後、高濃度の発現プラスミドを得るため、目的プラスミドを含む形質転換大腸菌を再度 50 ml の 100 μg/mL アンピシリン含有 LB 液体培地に接種し、37°C で一晩振とう培養後、Nucleo Bond Xtra Midi kit（TaKaRa）に従ってプラスミドを抽出して、以下の実験に使用した。

2-3. IL-33 発現プラスミドを用いたスクリーニング

2-3-1. 使用する細胞種の検討

タンパク質抽出サンプルの作製

6 well プレートに HEK293 細胞、LLC 細胞およびマウス皮膚由来正常細胞を播種し、細胞密度が翌日 7~8 割になるように前培養した。その 24 時間後 HEK293 細胞にはトランスフェクション試薬であるポリエチレンイミン（PEI）（Sigma）を用いて

IL-33 発現プラスミド (2 μg) を導入した (プラスミド : PEI=1:5) 。培地を除去して細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解液である RIPA buffer (0.5% DOC、1% NP-40、150 mM NaCl、0.1% SDS、50 mM Tris-HCl pH8.0) を 300 μL 加え、細胞膜を破壊するため QSONICA (ワケンビーテック) を用いて超音波処理の後、微量高速冷却遠心機 (TOMY) で遠心し上清を用いた。

ELISA による放出 IL-33 タンパク量の測定

刺激後の培養上清中の IL-33 タンパク質量を mouse DuoSet ELISA Development Kit (R&D) を用いて測定した。まず、PBS で 180 倍希釈した Capture 抗体を 96 well ELISA プレートに 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で加えて一晩反応させた。翌日、ELISA Wash Buffer (0.05% Tween20 (Nacalai) を含む PBS) で洗浄後、1% BSA 含有 PBS を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で加えて 1 時間ブロッキングを行った。ELISA Wash Buffer で洗浄後、各サンプル上清およびスタンダードとして 4000 pg/mL の IL-33 溶液を 2 倍毎で段階希釈した 8 つ検量線用コントロールサンプルを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ でそれぞれ滴下し、2 時間反応させた。ELISA Wash Buffer で洗浄を行い、1% BSA 含有 PBS で 180 倍希釈した Detection 抗体を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加えて 2 時間反応させた。ELISA Wash Buffer で洗浄後、1% BSA 含有 PBS で 200 倍希釈した Streptavidin-HRP を 20 分間反応させた。ELISA Wash Buffer で洗浄し、ELISA POD Substrate TMB kit (Nacalai) 中の Staining 溶液および Substrate 溶液の等量混合溶液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて発光させ、コントロールサンプルの発光度合を目安として、その反応を 25 μL の 1 M H_2SO_4 (Nacalai) で止めた。iMARK マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて発光強度を測定し、検量線を指標として各サンプル上清に含まれる IL-33 タンパク質量を算出した。

ウエスタンブロットによるタンパク質量の測定

SDS-PAGE

各タンパク質抽出サンプルは SDS sample buffer (125 M Tris-HCl pH8.0、4% SDS、20% Glycerol、0.01% BPB、0.2 M DTT) で調製し、95°C で 3 分間、熱変性処理を行った。その後、5~20% SDS ポリアクリルアミドゲル (アトー株式会社) および電気泳動緩衝液である SDS-PAGE Running buffer (0.25 M Tris、1% SDS、1.92 M Glycine) を用いて 500 V、20 mA、75 分間の条件で電気泳動を行った。

ウエスタンブロット

SDS-PAGE により分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Bio-Rad) および Transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH8.0、20% Methanol、1.92 mM Glycine) を用い

て 500V、200mA、75 分間の条件で転写を行った。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク (Nacalai) に室温で 1 時間インキュベートすることで、ブロッキングを行った。ブロッキング後、TBST buffer (0.5 M Tris-HCl pH8.0、1.38 M NaCl、0.027 M KCl、0.05% tween20) で洗浄し、5% ウシ血清アルブミン (BSA)

(Nacalai) 含有 TBST buffer で希釈した各種一次抗体を 4°C で一晩反応させた。再度 TBST で洗浄後、5% スキムミルク含有 TBST buffer で希釈した二次抗体を加えて室温で 30 分間インキュベートした。その後、TBST buffer で洗浄し、メンブレンを発光試薬 Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) の Enhanced Luminol Reagent および Oxidizing Reagent の等量混合溶液で反応させ、ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare) で蛍光を検出した。なお、使用した一次抗体と二次抗体の希釈率を以下に示した。

一次抗体

- Anti-Myc マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz)、1/1000 倍希釈

二次抗体

- HRP 標識 anti-IgG マウスモノクローナル抗体 (Sigma) 1/12000 倍希釈

2-3-2. IL-33 発現プラスミドを用いた化合物スクリーニング

HEK293 細胞への発現誘導と刺激条件の種類

2-3-1 と同様に HEK293 細胞に IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養後 1.5×10^4 個/well の細胞数で 96 well プレート HEK293 細胞へと継代を行った。その 24 時間後、各種 PRR リガンドである Poly (I:C) (Invivogen)、リポ多糖 (LPS) (Invivogen)、ODN1668 (Invivogen)、合成二本鎖 DNA (Immuno Stimulatory DNA; ISD) (Greiner bio-one)、合成化学物質である R837

(Invivogen)、並びにガン関連化合物ライブラリー、天然化合物ライブラリーI、天然化合物ライブラリーII (いずれも SIGMA-ALDRICH)、Etoposide、A23187、Nigericin を用いて 24 時間刺激を行った。刺激 24 時間後の培養上清中の IL-33 タンパク質量を 2-3-1 に記載した方法で mouse DuoSet ELISA Development Kit (R&D) を用いて測定した。

WST-1 による細胞生存率の測定

上記の ELISA で上清を回収後の 96 well プレートに生細胞のミトコンドリア脱水素酵素を用いて染色を行うことができる Cell Proliferation Reagent WST-1 (SIGMA-ALDRICH) を 10 μ L/well (残留メディウム量の 10 分の 1 量) 添加した。WST-1 試

薬添加後 30 分または 60 分後に iMARK マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて発光強度を測定し、未刺激状態と比較して細胞生存率を評価した。

2-3-3. Nigericin 刺激の濃度変化または経時変化時の IL-33 放出量の検討 HEK293 細胞への発現誘導と刺激条件

2-3-1 と同様に HEK293 細胞に IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養後 1.5×10^4 個/well の細胞数で 96 well プレートへと継代を行った。その 24 時間後、刺激濃度依存的に IL-33 が放出されるか検討を行うため、Etoposide を 50 μ M、100 μ M、200 μ M、400 μ M、800 μ M と、Nigericin を 12.5 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M と濃度を振って刺激を行った。また、経時的な IL-33 の放出されるのか検討を行うため 200 μ M Etoposide または 50 μ M Nigericin で 0、0.5、1、3、6、12、24 時間とタイムコースをとって刺激を行った。刺激後の培養上清中の IL-33 タンパク質量を 2-3-1 に記載した方法で mouse DuoSet ELISA Development Kit (R&D) および Cell Proliferation Reagent WST-1 (SIGMA-ALDRICH) を用いて測定した。

2-4. IL-33 の細胞外放出動態の観察

2-4-1. IL-33 の局在

24 well プレートにカバーガラス (Matsunami) を入れ、その上に Poly-L-Lysine (Sigma) を 100 μ L ずつ添加し 20 分間コーティングした。Poly-L-Lysine を除去し、PBS でカバーガラスを 3 回洗浄後、翌日に細胞密度 70% 程度となるように HEK293 細胞および HeLa 細胞、NIH3T3 細胞を前培養した。翌日 PEI を用いて Myc-IL-33 発現プラスミド (500 ng/well) を導入した (プラスミド : PEI = 1:5)。24 時間後、PBS で 3 回洗浄し 20 分間 4% パラホルムアルデヒド (Nacalai) に漬けて固定を行った。その後 PBS で 3 回洗浄し、100 mM グリシン (Nacalai) 含有 0.02% Triton (Nacalai) PBS を加えて 30 分反応させた後、10% FBS 0.02% Triton 含有 PBS を加え 1 時間反応させてブロッキングを行った。PBS で 3 回洗浄し、1 次抗体である Anti-Myc マウスモノクローナル抗体を 1/2000 倍希釈したものを添加し 4°C オーバーナイトで反応させた。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体である Anti-Mouse Alexa Flour 568 (invitrogen) を 1/20000 倍希釈したものを添加し暗所で 1 時間反応させた。PBS 洗浄後 Hoechst33342 (Dojin) を 1/10000 倍希釈し 10 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄後スライドガラスに Fluoro-Keeper (Nacalai) を滴下し、その上にカバーガラスを被せることで封入を行った。その後、共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) を用いて IL-33 の核局在および刺激による細胞外放出を観察した。

2-4-2. IL-33 の放出動態の観察

2-4-1 と同様に細胞の調節およびトランスフェクションを行った。その 24 時間後 200 μ M Etoposide、50 μ M Nigericin で 0、1、3 時間とタイムコースをとって刺激を行い、PBS で 3 回洗浄後 20 分間 4% パラホルムアルデヒド (Nacalai) に漬けて固定を行った。その後 2-7-1 と同様にスライドガラスを作成し、共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) を用いて IL-33 の核局在および刺激による細胞外放出を観察した。また IL-33 の局在が核から細胞質へと移行した割合を測定しグラフを作製した。

2-5. IL-33 細胞外放出動態の経時的観察

Glass-bottom ディッシュ (MatTek corporation) に翌日に細胞密度 70%程度となるように HEK293 細胞を播いた。24 時間後 HEK293 細胞に対し、PEI を用いて YFP-IL-33 発現プラスミド (2 μ g) を導入した (プラスミド : PEI=1:5)。その 2 日後、50 μ M Nigericin で刺激し、共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) を用いて 10 分刻みで 160 分間経時的に撮影した。

2-6. GSDMD による IL-33 の放出の検討

2-6-1. GSDMD 発現プラスミドの構築

2-2 と同様に Flag タグ付き GSDMD および GSDMD-N 端、GSDMD-C 端の発現プラスミドの作製を行った。プラスミド完成後は 2-3-1 と同様に HEK293 細胞に GSDMD および GSDMD-N 端、GSDMD-C 端の発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションし、それぞれの発現をウエスタンブロットで検出した。なお、使用した一次抗体と二次抗体の希釈率を以下に示す。

一次抗体

- Anti-Flag マウスモノクローナル抗体、1/1000 倍希釈

二次抗体

- HRP 標識 anti-IgG マウスモノクローナル抗体 (Sigma) 1/12000 倍希釈

2-6-2. GSDMD による IL-33 放出誘導の検討

6 well プレートに HEK293 細胞を播種し、細胞密度が翌日 7~8 割になるように前培養した。その 24 時間後 HEK293 細胞にはトランスフェクション試薬である PEI を用いて IL-33 発現プラスミド (1 μ g) と GSDMD 発現プラスミドまたは GSDMD-N

端発現プラスミド、GSDMD-C 端発現プラスミド (1 µg) をそれぞれ導入した (プラスミド : PEI=1:5)。その 48 時間後 2-3-1 と同様の方法で上清中に放出された IL-33 量を ELISA で測定した。

2-6-3. GSDMD-N 端断片による細胞死の検討

6 well プレートに HEK293 細胞を播種し、細胞密度が翌日 7~8 割になるように前培養した。その 24 時間後 HEK293 細胞にはトランスフェクション試薬であるポリエチレンジイミン (PEI) (Sigma) を用いて GSDMD 発現プラスミドまたは GSDMD-N 端発現プラスミド、GSDMD-C 端発現プラスミド (1 µg) をそれぞれ導入した (プラスミド : PEI=1:5)。その 48 時間後放出された LDH を、細胞毒性検出キット^{PLUS} (Roche) を用いて検出を行った。まず細胞上清を回収し 300 G, 5 分間で遠心を行い、その上清をサンプルとして用いた。またネガティブコントロールとして何も施していない HEK293 細胞を、ポジティブコントロールとして HEK293 細胞に細胞毒性検出キット^{PLUS} 内の Lysis Solution を培養液の 10 分の 1 量添加したものを使った。新しい 96 well プレートにサンプルの上清 25 µL に対し、細胞毒性検出キット^{PLUS} 内の Dye Solution と Catalyst を 11250 : 250 で混合した溶液を 25 µL 添加し、よく混合したのち暗所で 30 分反応させた。その後 iMARK マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて発光強度を測定し、ネガティブコントロールを 0%、ポジティブコントロールを 100% として細胞死誘導率を算出した。

2-6-4. siRNA を用いたノックダウン解析

ノックダウンサンプルの作製

siRNA を用いたノックダウンを行うため pSUPER プラスミドを用いた。プロトコルに従い、ヒト GSDMD mRNA CDS の 835-857 を標的とした配列を含むプライマーを設計し (表 2-6)、オリゴヌクレオチドを合成した。合成したオリゴヌクレオチドをアニーリング後、BgIII で処理した pSUPER プラスミドに挿入した。またネガティブコントロールとして本研究室で所有していた pSUPER に Scramble 配列を挿入したものをを用いた。10 cm dish に HEK293 細胞を前培養後、siRNA-Scramble および siRNA-GSDMD プラスミドをそれぞれ 10 µg 導入した。その 48 時間後 TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.) を加え細胞を溶解した。TRI Reagent に対して 5 分の 1 量のクロロホルムを加えボルテックスで混和した後、4°C、14000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に 100 µl のクロロホルムを加え、再度同様の操作でクロロホルム抽出を行った。その後、回収した上清に 500 µl のイソプロパノール (Nacalai) を加え、4°C、14000 rpm で 15 分間遠心を行った。上清を除去した後、800 µl の 70% エタノールを加え、4°C、14000 rpm で 5 分間遠心を行った。上清

を除去し、37°Cに設定したヒートブロックにより 70%エタノールを飛ばし、10-50 μ l の Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理済み滅菌水 (0.1% DEPC) に溶解することで total RNA を得た。その後、RNA の濃度を NanoDrop One / OneC (Thermo Fisher Scientific) により計測した。そして、0.5 から 1 μ g の RNA をテンプレートとして、ReverTraAce (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。cDNA 反応溶液は ReverTraAce のプロトコルに従い、10 μ l の反応溶液として調製し、30°C で 10 分間、42°C で 60 分間、99°C で 5 分間の逆転写反応を行った。

表 2-6. pSUPER プラスミド構築用プライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')	制限酵素
<i>hGSDMD</i> siRNA-Forward	gatccctccttctcttcccggataagaagttcaagagacttcttatccgggaaga gaaggatttta	<i>Bam</i> H I
<i>hGSDMD</i> siRNA-Reverse	agcttaaaaatccttctcttcccggataagaagtctcttgaacttcttatccgggaag agaaggaggg	<i>Xho</i> I

Real-time PCR

上記の方法により合成した cDNA をサンプルとして、Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies)、および Light Cycler 96 (Roche) を用いて Real-time PCR を行った。Power SYBR Green PCR Master Mix のプロトコルに従い 20 μ l の反応溶液を調製した。PCR 条件は、1 サイクル目は 95 °C で 10 分間反応させ、その後 95 °C で 10 秒間、60 °C で 1 分間の反応を 50 サイクル行った。内部標準遺伝子として GAPDH 遺伝子を使用し、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いてサンプル中の mRNA 量を相対的に評価した。使用したプライマーの配列を以下に示した (表 2-7)

表 2-7. Real-time PCR に用いたプライマー

名前	Primer 配列 (5'-3')
<i>hGSDMD</i> Forward	catggtggggagttcatc
<i>hGSDMD</i> Reverse	caccctggccgagatag
<i>GAPDH</i> Forward	aatcccatcaccatctcca
<i>GAPDH</i> Reverse	tggactccacgactactca

siRNA-GSDMD による IL-33 放出阻害の検討

2-3-1 と同様に HEK293 細胞に IL-33 発現プラスミドおよび siRNA-Scramble または siRNA-GSDMD プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養後 1.5×10^4 個/well の細胞数で 96 well プレートへと継代を行った。その 24 時間後、50 μ M Nigericin で刺激を行い、刺激 2 時間後の培養上清中の IL-33 タンパク質量を 2-3-1 に記載した方法で mouse DuoSet ELISA Development Kit (R&D) を用いて測定した。また 2-4-1 と同様に細胞の調節を行い、その 24 時間後 50 μ M Nigericin で刺激を行った。その 1 時間後、PBS で 3 回洗浄後 20 分間 4% パラホルムアルデヒド (Nacalai) に漬けて固定を行った。その後 2-7-1 と同様にスライドガラスを作成し、共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) を用いて IL-33 の核局在および刺激による細胞外放出を観察した。また IL-33 の局在が核から細胞質へと移行した割合を測定しグラフを作製した。

2-6-5. Nigericin による GSDMD 切断の検討

2-3-1 と同様に HEK293 細胞に Flag-GSDMD 発現プラスミドをトランスフェクションした。その後 50 μ M Nigericin で刺激後ウエスタンブロットを行った。用いた一次抗体と二次抗体の希釈率を以下に示す。

一次抗体

- Anti-Flag マウスモノクローナル抗体、1/1000 倍希釈

二次抗体

- HRP 標識 anti-IgG マウスモノクローナル抗体 (Sigma) 1/12000 倍希釈

2-6-6. Nigericin 刺激による GSDMD の動態の観察

2-4-1 と同様に細胞の調節および Flag-GSDMD 発現プラスミドのトランスフェクションを行った。その 24 時間後 50 μ M Nigericin で 0、1、2、3 時間とタイムコースをとって刺激を行い、PBS で 3 回洗浄後 20 分間 4% パラホルムアルデヒド (Nacalai) に浸漬することで固定を行った。その後 2-7-1 と同様にスライドガラスを作成し、共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) を用いて GSDMD の局在および Nigericin 刺激による局在の変化を観察した。

2-7. 活性酸素種 (ROS) による IL-33 放出の検討

2-7-1. Nigericin 刺激による ROS の産生の検討

Cell ROX による ROS の産生の検討

24 well plate に 2.0×10^6 cells / well で細胞懸濁液を播種し、24 時間培養後に Nigericin 刺激を行い、その 10 分後に終濃度が 1 mM になるように CellROXTM Deep Red (Thermo Fisher Scientific) を加えた。15 分間 37 °C でインキュベート後、PBS で細胞を洗浄し、PBS で再懸濁した細胞の蛍光強度を FACS Accuri にて測定し、解析を行った。

2-7-2. 抗酸化剤 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) による IL-33 放出抑制の検討

2-3-1 と同様に HEK293 細胞に IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養後 1.5×10^4 個/well の細胞数で 96 well プレートへと継代を行った。その 24 時間後、PDTC で 30 分刺激後、50 μ M Nigericin 刺激を行った。その 2 時間後の培養上清中の IL-33 タンパク質量を 2-3-1 に記載した方法で mouse DuoSet ELISA Development Kit (R&D) および Cell Proliferation Reagent WST-1 (SIGMA-ALDRICH) を用いて測定した。

2-7-3. PDTC による IL-33 放出抑制の動態の観察

2-4-1 と同様に細胞の調節および Myc-IL-33 発現プラスミドのトランスフェクションを行った。その 24 時間後 50 μ M PDTC で刺激を行った。その 30 分後 50 μ M Nigericin で 0、1、2 時間とタイムコースをとって刺激を行い、PBS で 3 回洗浄後 20 分間 4% パラホルムアルデヒド (Nacalai) に浸漬することで固定を行った。その後 2-7-1 と同様にスライドガラスを作成し、共焦点蛍光顕微鏡 LSM 700 (ZEISS) を用いて GSDMD の局在および Nigericin 刺激による局在の変化を観察した。また IL-33 の局在が核から細胞質へと移行した割合を測定しグラフを作製した。

2-7-4. プロテアーゼ阻害剤による IL-33 放出抑制の検討

2-3-1 と同様に HEK293 細胞に IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養後 1.5×10^4 個/well の細胞数で 96 well プレートへと継代を行った。その 24 時間後、カルパイン阻害剤である PD150606 または pan-Caspase 阻害剤である Z-VAD で 30 分前処理をした後、50 μ M Nigericin で刺激を行った。その 2 時間後の培養上清中の IL-33 タンパク質量を 2-3-1 に記載した方法で mouse DuoSet ELISA

Development Kit (R&D) および Cell Proliferation Reagent WST-1 (SIGMA-ALDRICH) を用いて測定した。

2-8. 統計処理

実験成績は、 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ で表した。2 群間の比較は、Student の t 検定により行った。P < 0.05 を * で、P < 0.01 を ** で、P < 0.005 を *** で示し、有意差有りとして判定した。

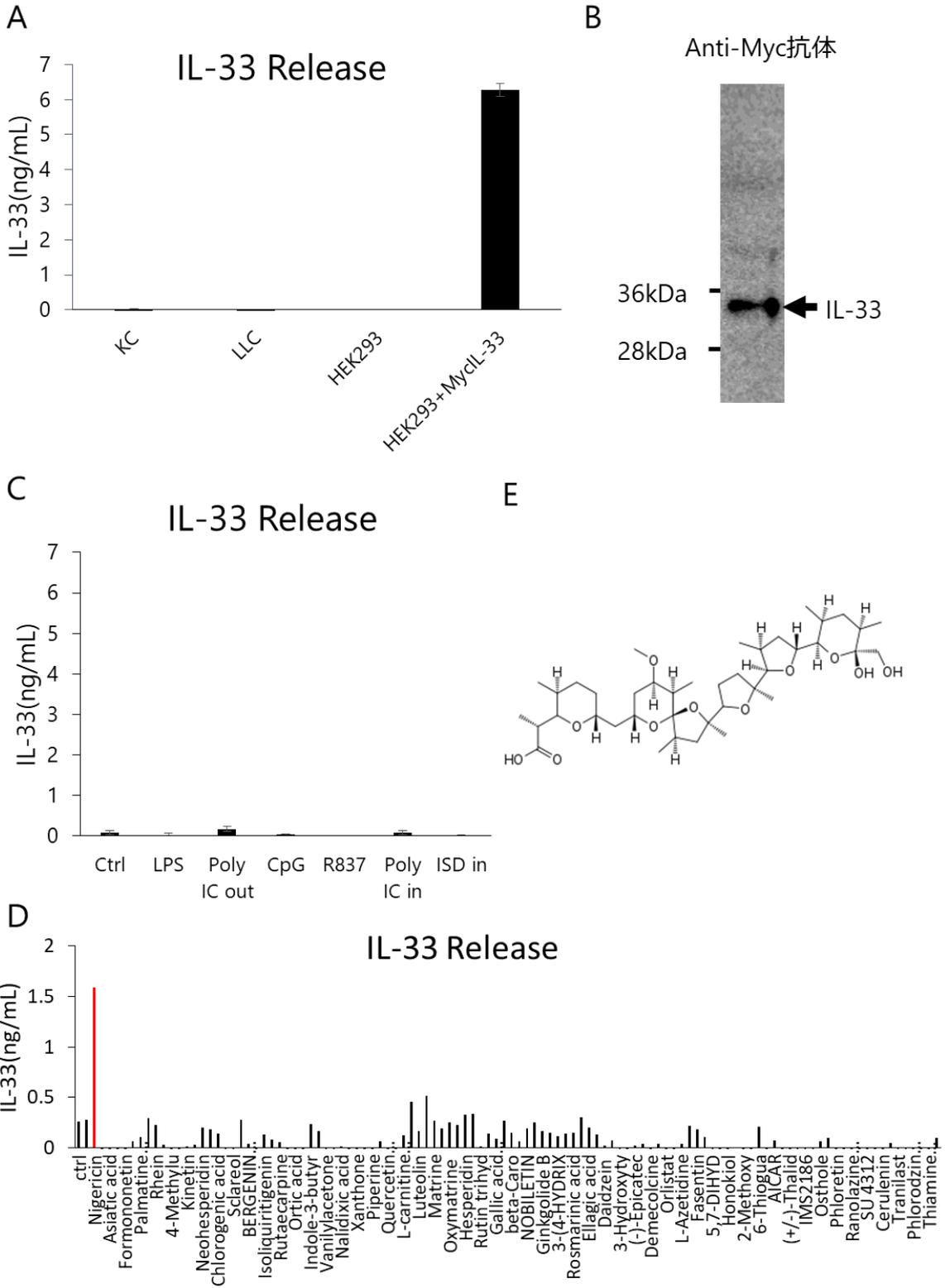
3. 結果

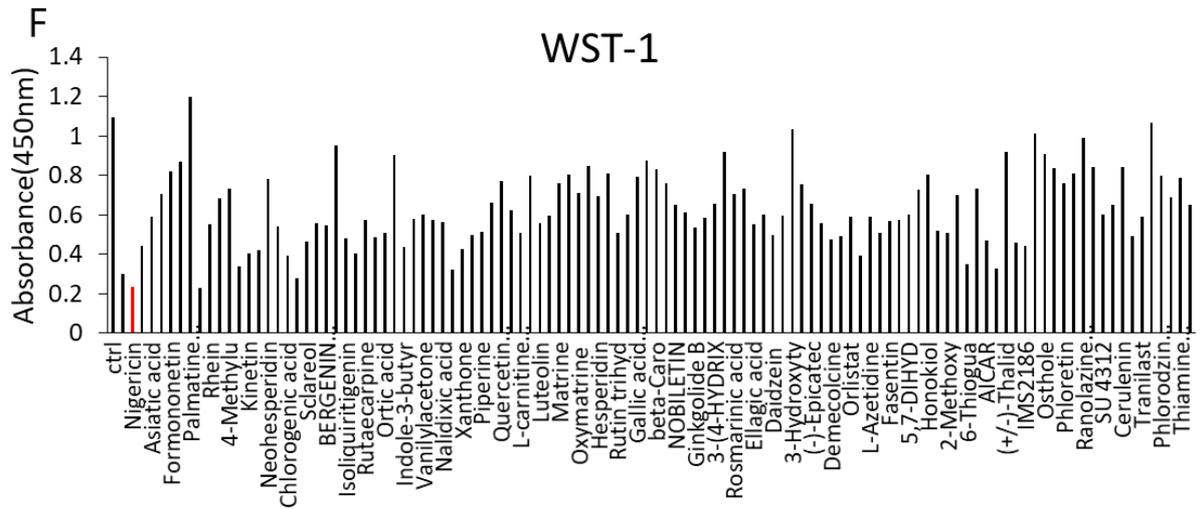
3-1. 細胞死誘導能を有した化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

IL-33はマウスの皮膚や肺の上皮系細胞で恒常的に発現することが報告されている。そこで、マウス皮膚由来正常細胞、肺ガン細胞株 LLC 細胞、ヒト胎児由来腎臓ガン細胞 HEK293 における ELISA による IL-33 のタンパク質量の定量を行ったがいずれも検出限界以下だった (図 3-1A)。そこで IL-33 を発現した HEK293 細胞を得るため、HEK293 細胞に Myc タグを付加した IL-33 発現プラスミドを一過性に発現させ、超音波処理後の IL-33 の放出を ELISA および抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロットで検討した。その結果両方のアッセイにおいても IL-33 の発現が検出され (図 3-1A,B)、IL-33 発現 HEK293 細胞が得られたので、以降では主に IL-33 発現 HEK293 細胞を各実験系に使用した。

次に TLR や細胞内 RNA センサー (RLR)、細胞内 DNA センサーの合成リガンド (リポ多糖 (LPS) : TLR4 リガンド、Poly (I:C) out : TLR3 リガンド、CpG : TLR9 リガンド、R837 : TLR7/8、Poly (I:C) in : RLR リガンド、ISD : 細胞内 DNA センサーリガンド) で IL-33 発現 HEK293 細胞を刺激後、ELISA にて細胞上清中の IL-33 タンパク質量を測定したが、IL-33 の細胞外放出は認められなかった (図 3-1C)。そこで、細胞死を誘導することが知られる 156 種類の化合物ライブラリーを用いて同様のアッセイを行った。その結果、Nigericin 投与時において IL-33 の顕著な細胞外放出認められた (図 3-1D)。Nigericin は放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* 由来の抗生物質として単離されたカルボニル化合物であり (図 3-1E)、 H^+ 、 K^+ 、 Pb^{2+} などのイオノフォアとして作用すると考えられている。また、生細胞に活性が認められるミトコンドリア脱水素酵素を染色する WST-1 アッセイにより生細胞の割合を評価したところ、Nigericin を含めた約 51% (79 種) の化合物において、無刺激時と比べて染色量が 50%以上減少しており、細胞死の誘導が確認された (図 3-1F)。また Nigericin と同様にイオノフォアとして働くカルシウムイオノフォア A23187 およびアポトーシスを誘導する抗ガン剤 Etoposide で IL-33 発現 HEK293 細胞に刺激を行ったところ Nigericin のみに IL-33 の細胞外放出が認められた (図 3-1G)。以上のことから、HEK293 細胞で IL-33 は Nigericin 刺激特異的に細胞外放出が増進することが示された。

☒3-1





G

IL-33 Release

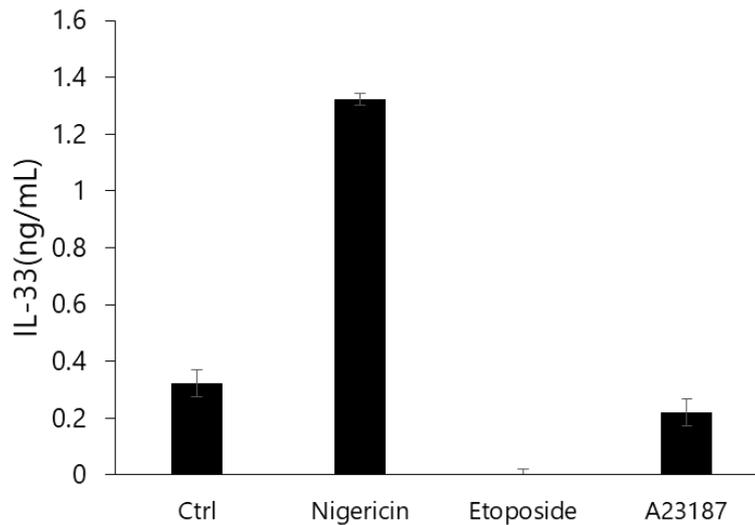


図 3-1. IL-33 を放出する薬剤のスクリーニング

A. マウス皮膚由来正常細胞 (KC)、LLC 細胞、HEK293 細胞または Myc-IL-33 発現プラスミドを用いて IL-33 を発現させた HEK293 細胞を超音波処理し、IL-33 発現量を ELISA で測定した。B. Myc-IL-33 発現プラスミドを発現させた HEK293 細胞の IL-33 発現量をウエスタンブロットで検討した。C. TLR および RLR リガンド刺激による IL-33 細胞外放出量を ELISA で測定した。D. HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし、化合物ライブラリーによって刺激を行った。その 24 時間後放出された IL-33 タンパク量を ELISA で測定した。E. Nigericin の構造 F. 化合物ライブラリーで刺激時の細胞生存率を WST-1 アッセイで測定した。G. Nigericin および Etoposide、A23817 刺激 24 時間後の放出された IL-33 タンパク量を ELISA で測定した。

3-2. Nigericin の刺激濃度・経時変化時の IL-33 放出量の検討

次に、Nigericin の刺激濃度・時間依存的に IL-33 の細胞外放出が亢進されるか検討を試みた。まず、異なる濃度の Nigericin（刺激なし、12.5 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M）で IL-33 発現 HEK293 細胞を刺激し、ELISA にて IL-33 の細胞外放出量を測定したところ、50 μ M 以上の濃度においては顕著な IL-33 の細胞外放出が認められた（図 3-2A）。一方、Etoposide 刺激の場合、濃度依存的な IL-33 の細胞外放出は確認されなかった。また、刺激なしの条件以外の Nigericin および Etoposide 刺激で細胞死が誘導されていることを WST-1 アッセイにより確認した（図 3-2B）。次に、50 μ M Nigericin 刺激後の経時的な IL-33 の細胞外放出量の検討を行った（図 3-2C）。その結果、Nigericin 刺激後の細胞外放出は 3 時間後以降から時間依存的に上昇することが明らかとなった。また、Nigericin を介した死細胞数は刺激後 0.5 時間から増加し、3 時間後にほぼ全ての細胞で細胞死が誘導されていた

図3-2

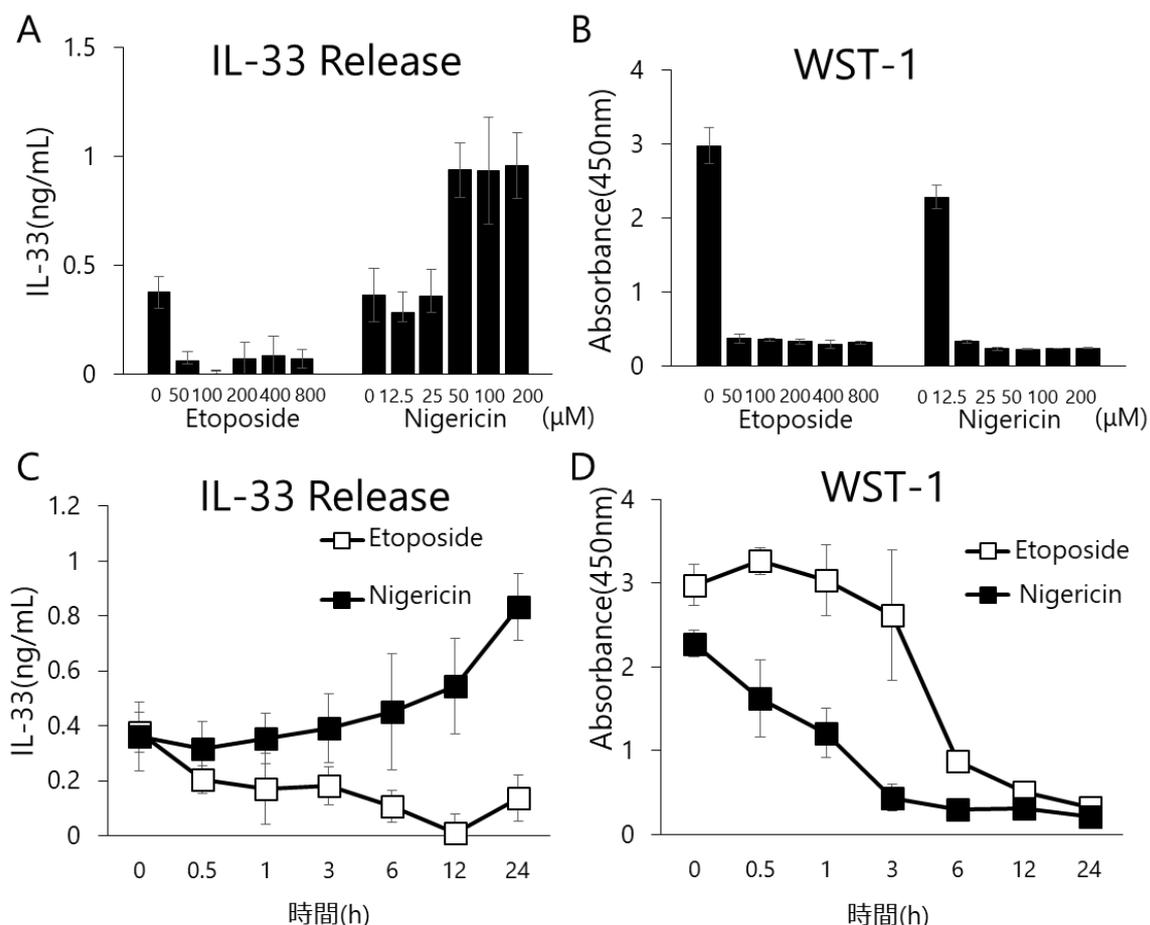


図 3-2. Nigericin 刺激による IL-33 細胞外放出の濃度依存的および経時変化
Nigericin および Etoposide 刺激濃度変化時の IL-33 放出量を ELISA (A) および WST-1 (B) で測定した。また、50 μ M Nigericin および 200 μ M Etoposide 刺激経時変化時の IL-33 放出量を ELISA (C) および WST-1 (D) で測定した。

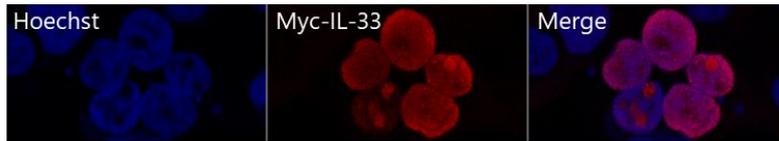
(図 3-2D)。200 μ M Etoposide 刺激においても時間依存的に細胞死が誘導されていることが確認された。以上のことから、Nigericin、Etoposide いずれも細胞死を誘導するものの、Nigericin 刺激によってのみ濃度・時間依存的に IL-33 が細胞外へと放出されることが示唆された。

3-3. Nigericin 刺激時の IL-33 細胞外放出の観察

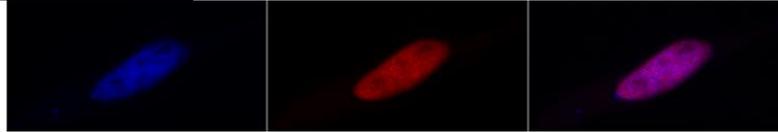
次に、IL-33 の細胞外放出過程の可視化を目的に、Nigericin 刺激前後における IL-33 の細胞内動態を免疫染色にて観察した。Myc タグを付加した IL-33 発現プラスミドを HEK293 細胞、HeLa 細胞および NIH3T3 細胞に導入し、核マーカーである Hoechst33342 と抗 Myc 抗体で染色を行った。その結果、IL-33 は Hoechst33342 と共局在することが認められた (図 3-3A)。また、Nigericin 刺激 1 時間後には IL-33 は核外へと移行し始め、Nigericin 刺激 3 時間後には IL-33 の核の局在が完全に消滅し、細胞外へと広がる様子が観察された (図 3-3B)。一方、Etoposide 刺激後 1 時間および 3 時間でも IL-33 は Hoechst33342 と共局在することが観察された (図 3-3B)。次に Nigericin 刺激 1 時間後の IL-33 の核から細胞質へと移行した割合を測定した。IL-33 が核に発現している細胞のうち、IL-33 の局在が細胞質に移行している細胞数を計測することで IL-33 の局在の細胞質移行割合をした (図 3-3C)。その結果、Nigericin 刺激を行うと約 42% の細胞で IL-33 の局在が核から細胞質へと移行し、Control に比べて有意に誘導されていることがわかった。さらに、より詳細な IL-33 の細胞外放出過程を観察するために、YFP タグを付加した IL-33 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し、蛍光顕微鏡にて IL-33 の細胞内局在を経時的に観察した。Nigericin 刺激後、10 分毎に計 16 回 (160 分間) の撮影を行った結果、Nigericin 刺激後 0 分から 40 分においては YFP 融合 IL-33 タンパク質の蛍光が細胞内に確認できるものの、Nigericin 刺激 50 分後から細胞死様の細胞形態へと変化し、それ以降経時的に細胞内の GFP 蛍光の減衰が観察された (図 3-3D)。最終的に Nigericin 刺激 140 分から 150 分後にかけて、細胞内 YFP 蛍光が完全に消失することが確認された。これらのことから、Nigericin 刺激依存的に IL-33 が核から細胞死が起こった後に細胞外部へと放出されることが示唆された。

図3-3

A HEK293(ヒト胎児腎細胞)



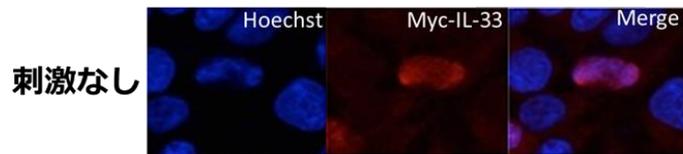
HeLa(ヒト子宮頸がん細胞)



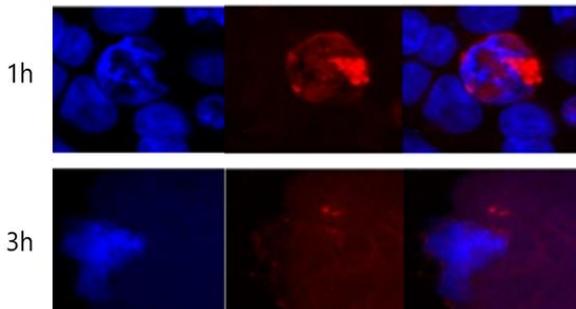
NIH3T3(マウス繊維芽細胞)



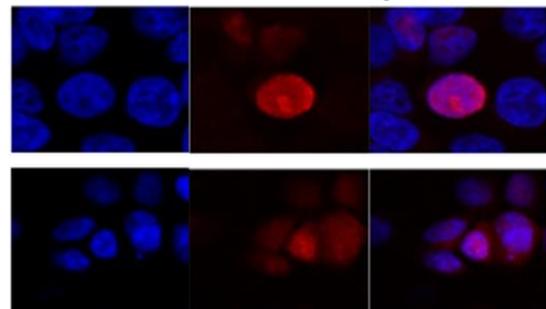
B



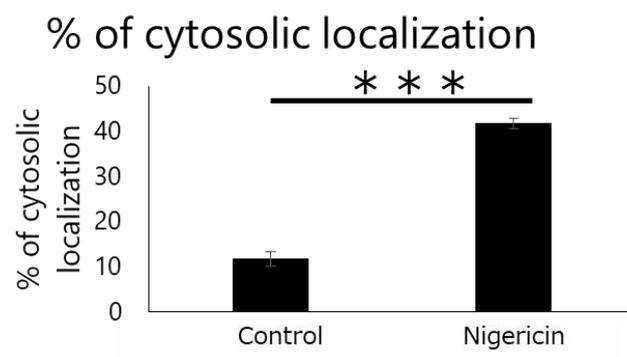
Nigericin刺激



Etoposide刺激



C



D

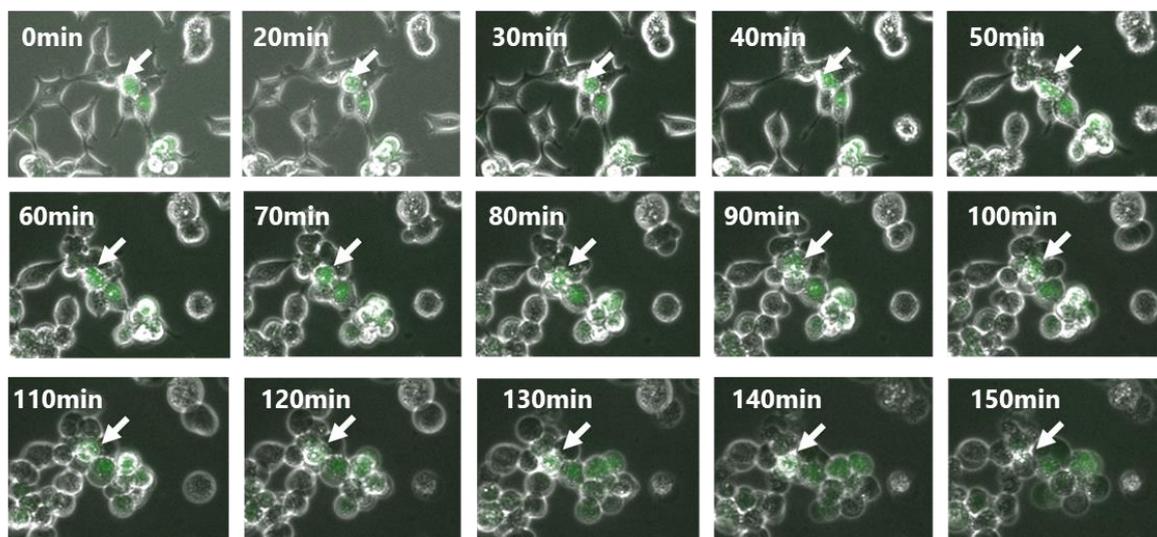


図 3-3. IL-33 細胞外放出動態の観察

A. HEK293 細胞、HeLa 細胞、NIH3T3 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし免疫染色を行って IL-33 の局在を観察した。 B. Nigericin および Etoposide 刺激による IL-33 細胞外放出動態を観察するため HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションし免疫染色で観察した。 C. B と同様に染色した細胞のうち IL-33 発現が核で認められたものを母集団として IL-33 の局在が細胞質へ移行した細胞数を計測し割合を算出してグラフにした。 D. HEK293 細胞に YFP-IL-33 発現プラスミドをトランスフェクションしタイムラプスを行った。矢印は Nigericin 刺激による細胞死および IL-33 の放出が誘導されている細胞を示す。

3-4. IL-33 の放出を制御する分子の同定

これまでの実験より Nigericin によって誘導される特異的な IL-33 の細胞外放出機構の存在が示唆された。そこでこの放出を制御する分子を同定するため、IL-33 と相互作用する分子の探索を試みた。GST タグ付きの IL-33 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し、そのライセートを抗 Myc 抗体ビーズを用いてプルダウンアッセイを行った。プルダウンアッセイ後のサンプルを CBB 染色にて解析したところ、コントロール (Myc 空発現プラスミドを用いたプルダウンアッセイサンプル) を指標に IL-33 タンパク質のバンドは確認できたものの、非特異的バンドが多数確認され、IL-33 に特異的に結合する分子のバンドを判定するのは困難であった (未発表データ)。次に IL-33 と関わると考えられる候補遺伝子を絞り直接的に関係を検討することとした。そこで着目したのが GSDMD である。GSDMD は Nigericin 刺激によって活性化された Caspase-1 により切断され、その N 端側が細胞膜と相互作用することで GSDMD-N ポアを形成することで知られている。そこで IL-33 はこの GSDMD-N ポアにより放出されるのではないかと仮説を立て、実験を行った。まず Flag タグ付きの GSDMD の全長の発現プラスミド、GSDMD-N 端のみの発現プラスミド、GSDMD-C 端のみの発現プラスミドを作成し、HEK293 細胞に導入して、抗 Flag 抗体を用いてウエスタンブロットにより検討した (図 3-4A)。その結果それぞれのプ

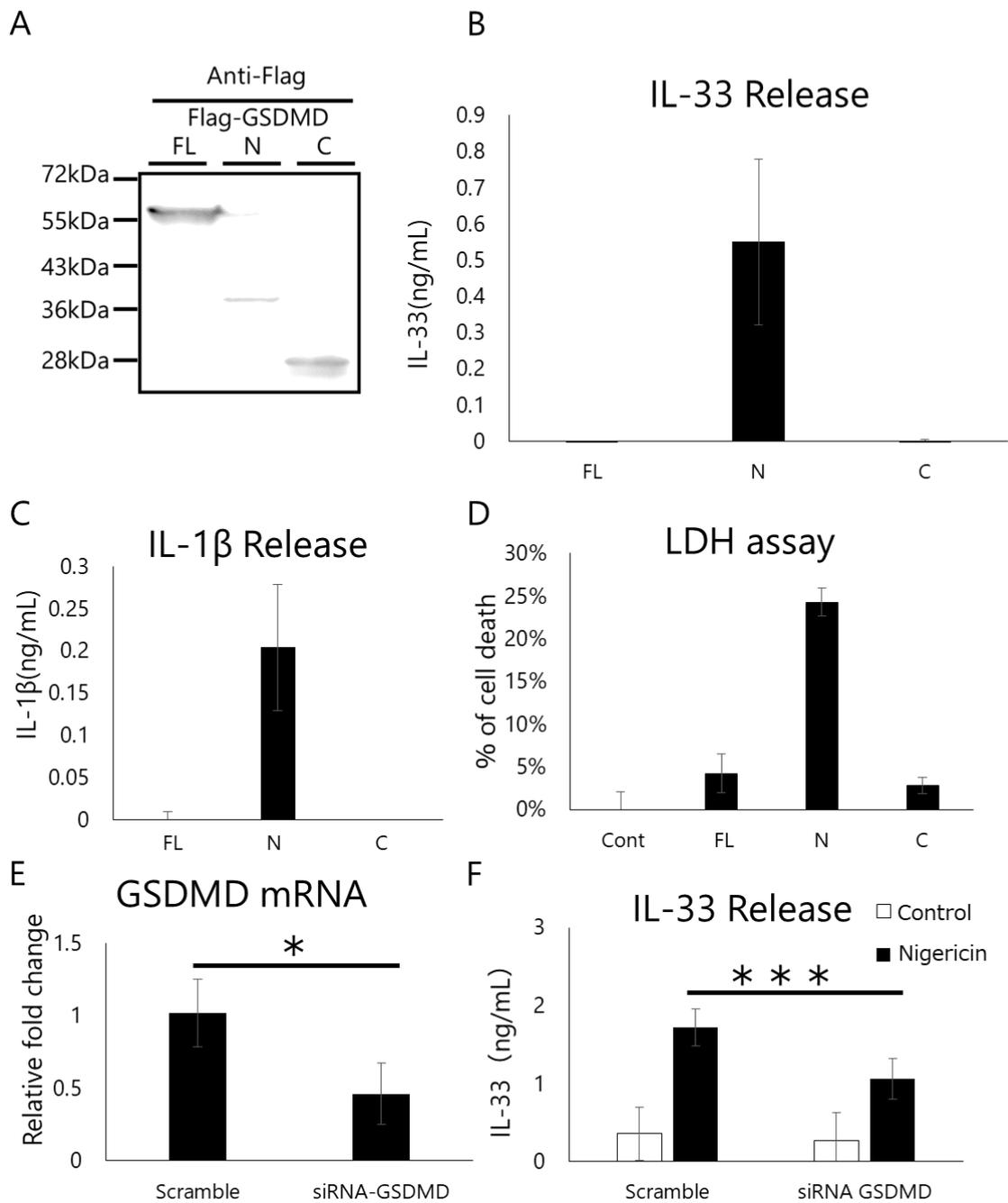
ラスミドの作成が成功し、それぞれのタンパク質が検出された。そこで次に GSDMD の N 端断片が IL-33 の放出に関与しているか検討を行うため、HEK293 細胞に IL-33 プラスミドと共に GSDMD の全長、GSDMD-N 端、GSDMD-C 端プラスミドをそれぞれ導入し、上清中の IL-33 量を ELISA にて測定した (図 3-4B)。その結果 GSDMD-N 端プラスミドを導入したサンプルのみで IL-33 の放出が認められた。また IL-1 β でも同様に GSDMD-N 端断片により放出が誘導されるか検討を行った (図 3-4C)。その結果、IL-33 と同様に GSDMD-N 端のみの発現プラスミドを導入したもので IL-1 β の放出が誘導されることが認められた。また GSDMD-N 端のみの発現プラスミドを導入すると細胞死が誘導されるのか検討を行うため、LDH アッセイを行った (図 3-4D) その結果 GSDMD-N 端を発現させた HEK293 細胞で細胞死が誘導されていることがわかった。

次に GSDMD が IL-33 の放出を制御する遺伝子であるか検討を行うため siRNA による GSDMD 遺伝子のノックダウンを行った。HEK293 細胞に GSDMD を標的とする siRNA、またはコントロールとして siRNA-Scramble 導入し、GSDMD 遺伝子がノックダウンされているか Real-time PCR により測定した (図 3-4E)。その結果、GSDMD の発現量が約 55%減少していることが確認できた。次に IL-33 発現プラスミドと siRNA-GSDMD を HEK293 細胞に導入後 Nigericin 刺激を行って、GSDMD が IL-33 の放出を制御しているか検討を行った (図 3-4F)。その結果 Nigericin による IL-33 放出の誘導はコントロールである siRNA-Scramble 発現細胞に比べて GSDMD ノックダウン細胞で有意に減少することがわかった。また siRNA-GSDMD によって IL-33 の放出を阻害した時の IL-33 の局在を検討するため、IL-33 発現プラスミドと siRNA-GSDMD を HEK293 細胞に導入後 Nigericin 刺激を行って 1 時間後に免疫染色を行った (図 3-4G)。その結果 Nigericin 刺激による IL-33 の核から細胞質への移行は、GSDMD ノックダウン細胞では核のままであることがわかった。また IL-33 の局在が核から細胞質へ移行した割合をグラフにすると、コントロールである siRNA-Scramble 発現細胞の Nigericin 刺激と比較して、Nigericin 刺激した GSDMD ノックダウン細胞で有意に IL-33 の細胞質移行が減少していることが明らかとなった (図 3-4H)。

次に GSDMD が Nigericin により切断修飾を受けるかどうか検討を行うため、Flag-GSDMD 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し、Nigericin 刺激を行ってウェスタンブロットを行った (図 3-4I)。その結果 Nigericin 刺激によって GSDMD が切断され、GSDMD-N 端断片が作製されていることがわかった。以上の結果より Nigericin 刺激により GSDMD が切断されることと、GSDMD-N 端断片により IL-33 が放出されることがわかった。また切断された GSDMD-N 端断片の局在を観察するため、Flag-GSDMD 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入後 Nigericin 刺激 1、2、3 時間後

において免疫染色による観察を行った（図 3-4J）。その結果、未刺激状態では GSDMD は細胞質に局在を示すが、Nigericin 刺激後 2 時間、3 時間で細胞膜へ集積する様子が観察された。

図3-4



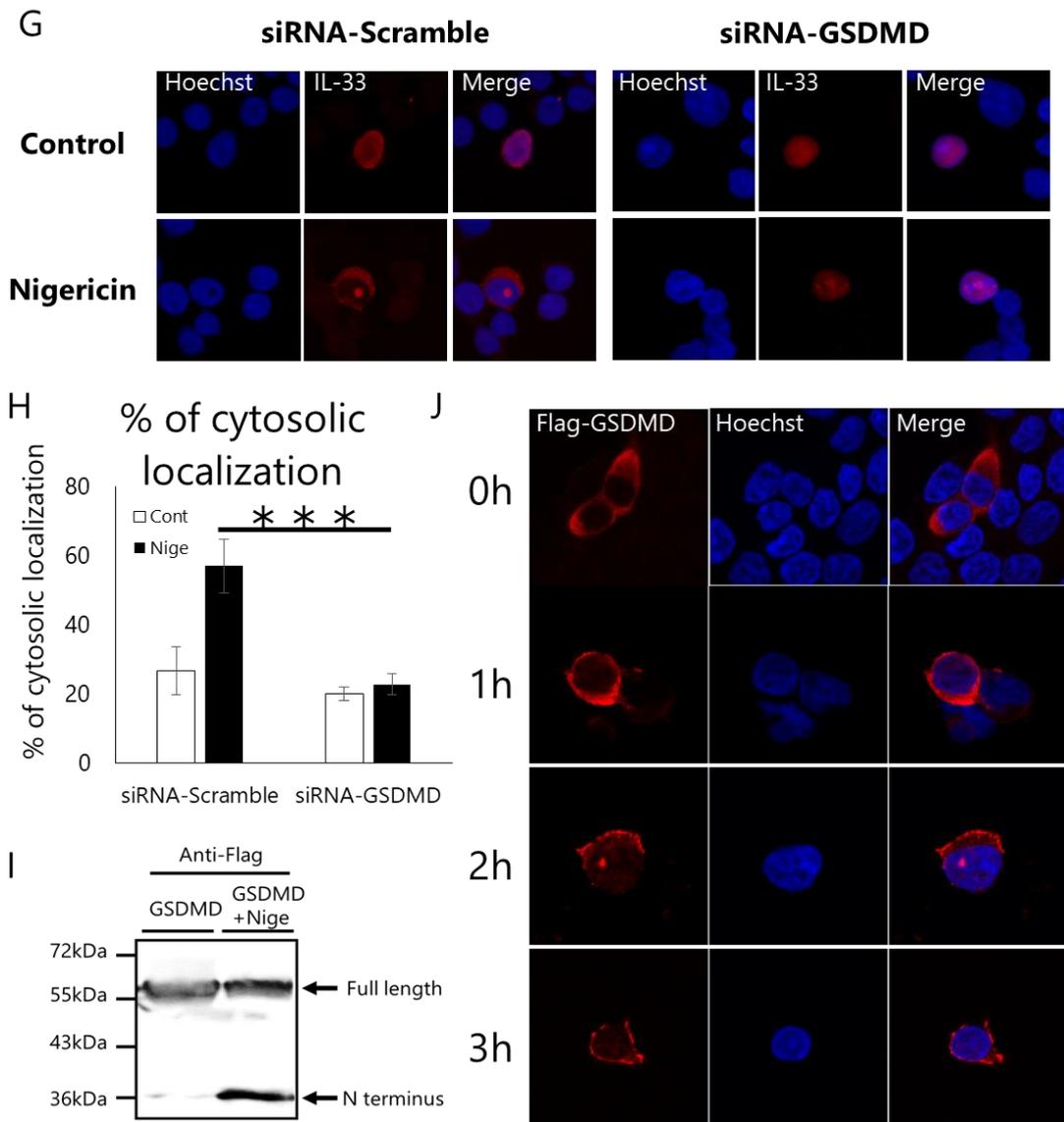


図 3-4. IL-33 の放出を制御する分子の同定

A. Flag-GSDMD、GSDMD-N 端のみ、GSDMD-C 端のみ発現プラスミドを発現させた HEK293 細胞のそれぞれの発現量をウエスタンブロットで検討した。 B. HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドと Flag-GSDMD、GSDMD-N 端のみ、GSDMD-C 端のみ発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションし、放出された IL-33 タンパク量を ELISA で測定した。 C. HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドと Flag-GSDMD、GSDMD-N 端のみ、GSDMD-C 端のみ発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションし、放出された IL-33 タンパク量を ELISA で測定した。 D. HEK293 細胞に Flag-GSDMD、GSDMD-N 端のみ、GSDMD-C 端のみ発現プラスミドをそれぞれトランスフェクションし、LDH アッセイによって細胞死を起こしている細胞の割合を測定した。 E. HEK293 細胞に siRNA-Scramble または siRNA-GSDMD プラスミドをトランスフェクション後 real-time PCR で GSDMD の発現量を測定した。 F. HEK293 細胞に siRNA-Scramble または siRNA-GSDMD プラスミドと Myc-IL-33 発現プラスミドをトランスフェクション後 Nigericin 刺激を行い、放出された IL-33 量を ELISA にて測定した。 G. HEK293 細胞に siRNA-Scramble または siRNA-GSDMD プラスミドと Myc-IL-33 発現プラスミドをトランスフェクション後 Nigericin 刺激を行い免疫染色で観察した。 H. G と同様に染色した細胞のうち IL-33 発現が核で認められたものを母集団として IL-33 の局在が細胞質へ移行した細胞数を計測し割合を算出してグラフにした。白が Control (Cont)、黒が Nigericin (Nige) 刺激の結果を示している。 I. Flag-GSDMD 発現プラスミドを発現させた HEK293 細胞に Nigericin 刺激を行い、GSDMD の切断断片をウエスタンブロットで検討した。 J. Flag-GSDMD 発現プラスミドを発現させた HEK293 細胞に Nigericin 刺激を行い、1、2、3 時間後の GSDMD の動態を免疫染色で検討した。

3-5. Nigericin 刺激による GSDMD 切断と IL-33 放出の上流因子の探索

これまでの結果より、IL-33 の放出は Nigericin 刺激により誘導されることがわかってきた。更に Nigericin 刺激により GSDMD の切断が誘導され、GSDMD の N 端側が細胞膜と相互作用することにより GSDMD-N ポアが形成されること、そしてその GSDMD-N ポアの形成およびそれによる細胞死の誘導により IL-33 が放出されることがわかってきた。そこで次に GSDMD の上流因子を探索するために活性酸素種

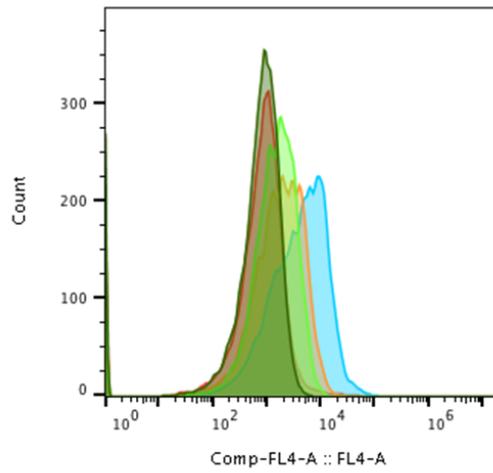
(ROS) に着目した。ROS とは細胞がストレスや刺激に応答して産生する活性酸素の総称である。ROS によって誘導される酸化ストレス応答としてはパイロトーシスなどの細胞死やそれによる炎症誘導が知られており、様々な疾患との関係性示唆されている。実際ミトコンドリア内で ROS が発生することでミトコンドリア DNA が放出され、それにより NLRP3 が活性化されパイロトーシスが誘導されることが言われている^[19]。そこで Nigericin 刺激による GSDMD の切断および IL-33 の放出に ROS が関与しているか検討を行うため、細胞内 ROS の産生を測定することができる試薬である Cell ROX を用いて実験を行った。まずどの Nigericin 刺激濃度で ROS が検出できるか条件の探索を行うため、50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、2.5 μ M の Nigericin で 10 分刺激を行い、CellROX で染色を行った (図 3-5A)。その結果 2.5 μ M の Nigericin で蛍光強度が上昇する様子が観察された。そこでこの濃度を用いて ROS の検出を行ったところ、Nigericin 刺激群では 3-5A と同様に蛍光強度の上昇が見られ、コントロールとの比較では有意に蛍光強度が上昇していることがわかった (図 3-5B)。

これまでの結果から Nigericin 刺激によって ROS の産生が誘導されることがわかった。そこで次に ROS の産生を阻害したときに IL-33 の放出が抑制されるか検討を行うため、抗酸化剤である PDTC を用いて実験を行った。HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドを導入後 PDTC で前処理し、その 30 分後に Nigericin で刺激を行い、2 時間後放出された IL-33 量を ELISA で測定した。その結果 50 μ M の PDTC で Nigericin と比べて有意に IL-33 の放出量が減少することがわかった (図 3-5D)。

これまで Nigericin 刺激により IL-33 は核から細胞質へ移行し放出されることがわかってきた。そこでこの PDTC による IL-33 の放出阻害はどの段階で抑制されているのか検討を行うため、免疫染色を行った (図 3-5E)。その結果 Nigericin 刺激によって誘導される IL-33 の細胞質への移行が、PDTC による ROS の阻害により有意に抑制されることがわかった (図 3-5F)。

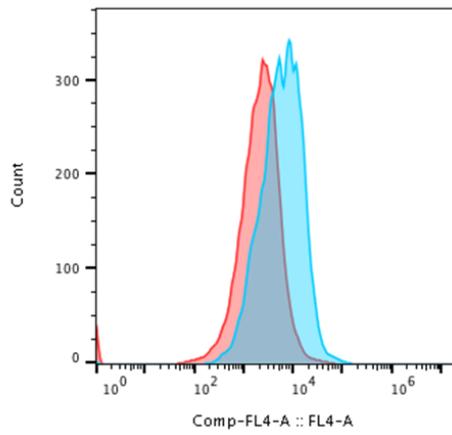
3-5

A



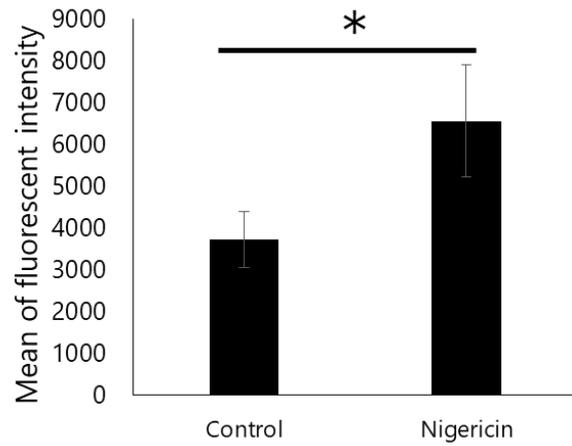
Sample Name	Subset Name	Count
50uM Nige	Cell	9803
25uM Nige	Cell	9601
12.5uM Nige	Cell	9477
2.5uM Nige	Cell	9727
Cont	Cell	8982

B



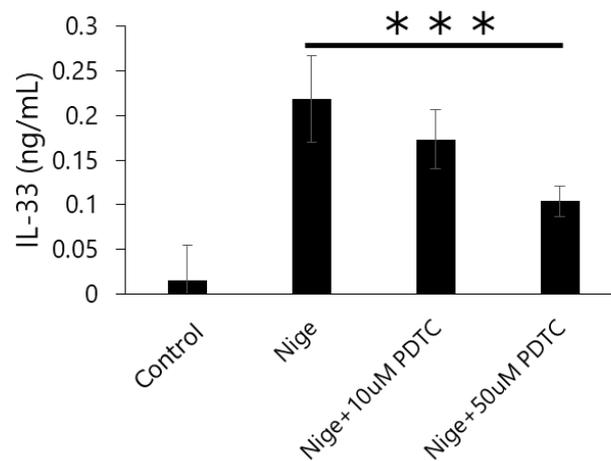
Sample Name	Subset Name	Count
F01 Nige2.fcs	Cell	12802
D02 Cont.fcs	Cell	10488

Cell ROX



C

IL-33 Release



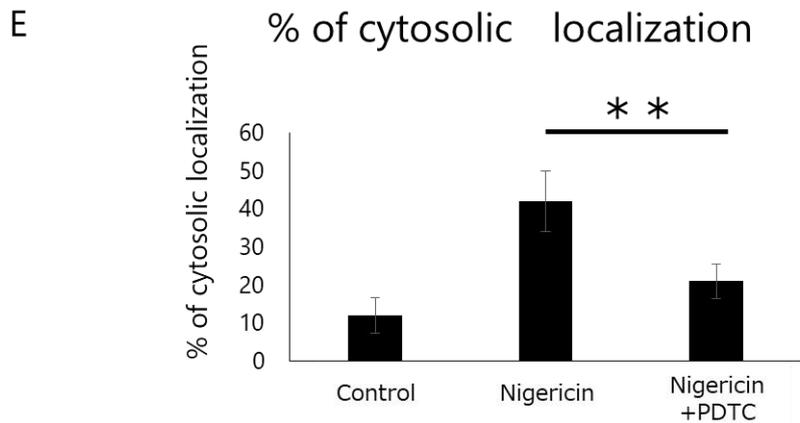
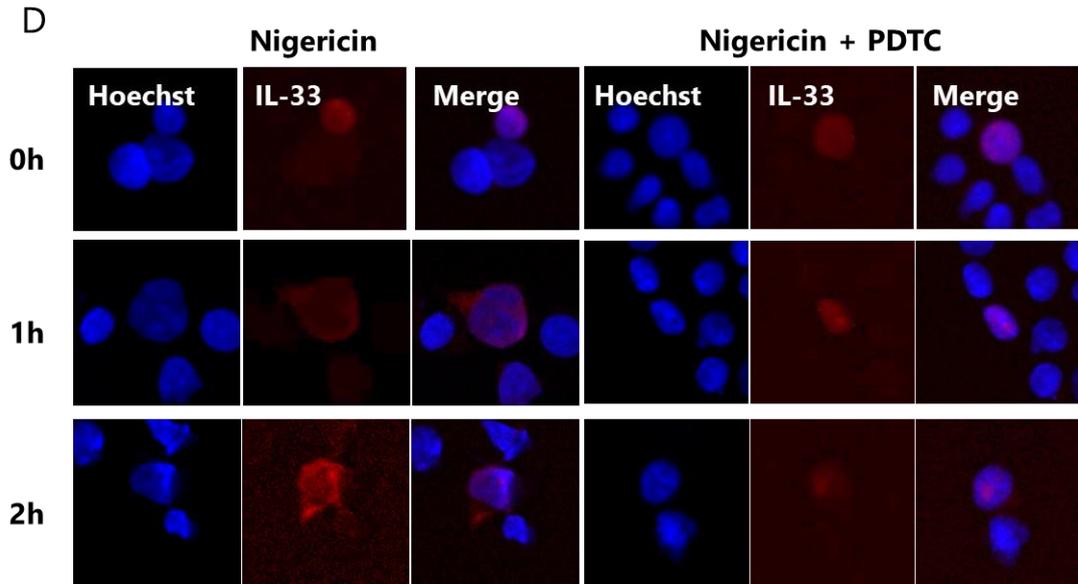


図 3-5. GSDMD の上流因子の探索

A. HEK293 細胞を 50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、2.5 μ M の Nigericin (Nige) 刺激または Control (Cont) の産生された ROS を Cell ROX で測定した。B. HEK293 細胞を Nigericin (Nige) 刺激または Control (Cont) で産生された ROS を Cell ROX で測定した。また蛍光強度の平均値をグラフにした。C. HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドを導入し、抗酸化剤である PDTC で刺激 30 分後に Nigericin (Nige) 刺激を行った。その 2 時間後放出された IL-33 量を ELISA にて測定した。D. HEK293 細胞に Myc-IL-33 を導入後、PDTC 刺激を行った。その 30 分後 Nigericin 刺激を行い 1、2 時間後に免疫染色を行った。E. B と同様に染色した細胞のうち IL-33 発現が核で認められたものを母集団として IL-33 の局在が細胞質へ移行した細胞数を計測し割合を算出してグラフにした。

3-6. GSDMD の切断を制御する因子の探索

これまで Nigericin 刺激により ROS の産生、および GSDMD の切断が誘導されることがわかってきた。これより GSDMD は何らかのプロテアーゼにより切断されることで IL-33 の放出を誘導すると考えられる。そこで次に GSDMD を切断しているプロテアーゼの探索を行った。本研究では数あるプロテアーゼの中でも Calpain と Caspase に着目した。Calpain は Ca^{2+} 依存的に活性化され、Calpain の活性化と IL-33 の放出との関係性や細胞死との関係性について報告がある^{[20][21]}。またこれまで GSDMD は Caspase-1 により放出されることが報告されてきたが、HEK293 細胞は Caspase-1 の発現がないという報告がある^[22]。その上 GSDMD は Caspase-1 以外にも Caspase-11 により切断されるという報告があること^[23]から、GSDMD の切断には他の Caspase が関与している可能性も考えられる。これらのことから Calpain 阻害剤である PD150606 と pan-Caspase 阻害剤である Z-VAD によって Nigericin 刺激による IL-33 の放出誘導を阻害できるか検討した。Myc-IL-33 発現プラスミドを導入した HEK293 細胞に Calpain 阻害剤である PD150606 と pan-Caspase 阻害剤である Z-VAD を投与 30 分後、Nigericin 刺激を行い放出された IL-33 量を ELISA で測定した。その結果 Z-VAD による Caspase の阻害は IL-33 の放出に影響を及ぼさなかったのに対し、Calpain 阻害剤である PD150606 で有意に IL-33 の放出が抑制された (図 3-6)。

図3-6

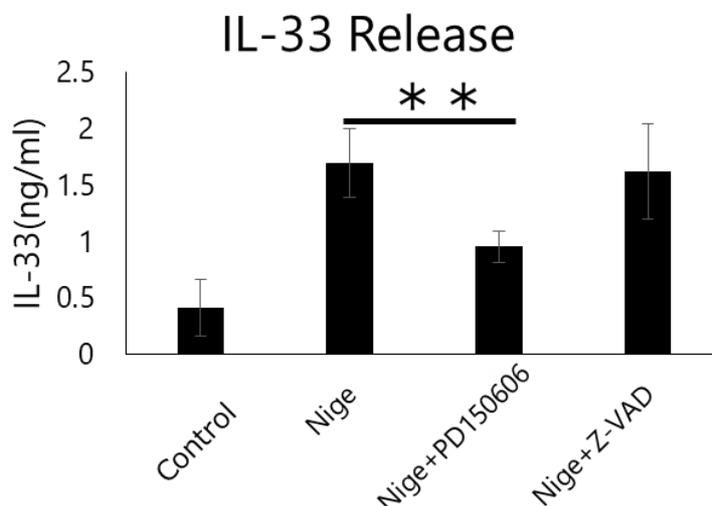


図 3-6. GSDMD の切断を制御する因子の探索

HEK293 細胞に Myc-IL-33 発現プラスミドを導入し、Calpain 阻害剤である 150606 または pan-Caspase 阻害剤である Z-VAD で刺激 30 分後に Nigericin (Nige) 刺激を行った。その 2 時間後放出された IL-33 量を ELISA にて測定した。

4. 考察

これまで IL-33 は細胞死や物理的な膜の崩壊によって細胞質外に受動的に放出されるサイトカインであると考えられてきた^[24]。一方、真菌や一部のアレルゲンによって誘導される IL-33 の放出には細胞死が必ずしも必要でないとの報告もあり^[25]、IL-33 の細胞外への放出についての詳細な分子生物学的機序については未だ不明な点が多い。

我々は薬剤スクリーニングによって IL-33 の分泌を誘導する分子として Nigericin を見出した。Nigericin はカリウム (K^+) を主なターゲットとする脂質分子で、細胞膜を透過することで細胞質内に存在する K^+ を細胞外へと排出する。このような各種イオンを標的とする膜透過性分子はイオノフォアと呼ばれ、細胞死の誘導やストレス応答の解析に広く用いられている。一方、スクリーニングに用いたその他の薬剤 (図 3-1A-F)、並びに Ca^{2+} イオノフォアである A23187 やアポトーシス誘導剤である Etoposide の刺激では細胞死の誘導は確認できたものの、IL-33 の放出は確認できなかった (図 3-1G, 図 3-2A-D)。このことから、IL-33 の分泌には、 Ca^{2+} 流入やアポトーシスに伴う膜や核の崩壊とは独立した何らかの制御機構が存在していることが強く示唆された。

IL-33 はクロマチン結合領域を持ち、主に核内に局在していることが示されている^[26]。これと一致して、我々が作成した IL-33 発現プラスミドとそれによる HEK293T での強制発現においても、IL-33 はそのほとんどが核内に局在していることが蛍光顕微鏡による観察から確認できた。この強制発現細胞に Nigericin 刺激を行ったところ、核内に局在していた IL-33 が細胞質に移行後放出されることが明らかとなった (図 3-3A-B)。一方、IL-33 を放出しない刺激である Etoposide の投与では IL-33 の細胞質への移行が認められず断片化した核に留まっていたことから、細胞外への IL-33 の放出には、核から細胞質への IL-33 の局在変化が重要であると考えられる。事実、既存研究においては細胞内移行が起こらない IL-33 の変異体では、その細胞外への放出が減少することが報告されている^[27]。

次に、Nigericin によって細胞質へ移行した IL-33 がどのように細胞外へ放出されているのかを検討するため、我々は細胞膜に対しポア形成能を持つ GSDMD に着目した。本研究の図 3-4 に示した通り、Nigericin 刺激は GSDMD の切断を誘導し、その N 端側が細胞膜と相互作用し GSDMD-N ポアの形成およびそれによる細胞死が誘導されることが明らかとなった。実際に、GSDMD の N 末端のみを発現させた細胞では、Nigericin 刺激を加えていないにもかかわらず、細胞上清中への IL-33 の放出と細胞死が確認された。さらに、GSDMD のノックダウン細胞では、Nigericin による IL-33 の放出が有意に減少した。興味深いことに、蛍光顕微鏡による観察から

GSDMD ノックダウン細胞では、核から細胞質への IL-33 の移行も優位に抑制されていた。GSDMD-N 断片のほとんどが細胞質、及び細胞膜に局在していたことから、GSDMD-N は核膜へのポア形成能は有していないと考えられる。にもかかわらず、GSDMD-N の存在が核内の IL-33 の細胞質内への局在変化を誘導したことから、細胞膜へのポア形成が IL-33 の細胞外への放出のみならず、その前段階である細胞内での局在変化の両方に必須であることが示唆された。

Nigericin の刺激によって誘導される K^+ の細胞外への放出はミトコンドリア電位の変化による ROS の発生と NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導する^[28]。さらに、我々が IL-33 の放出に必要な分子として見出した GSDMD は、NLRP3 インフラマソームによって誘導される細胞死であるパイロトーシスの実行因子であることが近年の研究により明らかとなっている^[29]。そこで、Nigericin 刺激による GSDMD の切断についての詳細な分子機序の解明のため、この NLRP3 インフラマソームに注目することとした。多くの既存研究では、Nigericin を用いたインフラマソームの活性化誘導はマクロファージや樹状細胞においてのみ確認されている。一方、我々が使用した HEK293 細胞やその他の上皮系細胞においては NLRP3 および Caspase-1 が発現していないという報告がある^[22]。実際に z-VAD による Caspase の阻害では Nigericin による IL-33 の放出を抑制することは出来なかったことから、本研究の条件下では GSDMD の切断は NLRP3 インフラマソーム経路による Caspase-1 やアポトーシス経路による Caspase-3 の活性化とは独立したものである可能性が示唆された。一方、本研究の図 3-5 に示した通り、Nigericin の刺激により NLRP3 インフラマソームの上流と考えられている ROS の産生が誘導されることが確認され、PDTC 投与によるその阻害が IL-33 の放出を抑制することも確認された。以上の結果から、Nigericin 刺激によって誘導される ROS が、Caspase 非依存的なシグナル経路を介して GSDMD の切断を誘導している可能性が示唆された。

細胞質内でのイオンバランスの変化は様々なシグナル経路、特にプロテアーゼを介する経路の活性化を誘導する^{[30][31]}。そこで我々は、Caspase 以外の切断酵素による GSDMD の切断の可能性を考慮し、阻害剤によるその関与についての検討を行ったところ、 Ca^{2+} 依存的な細胞内プロテアーゼである Calpain の阻害剤により IL-33 の分泌が抑制されることを見出した。Calpain はヒトで約 15 種類確認されているが、その基質となる配列については疎水性のアミノ酸が比較的多い部分を標的とする傾向が明らかになっているものの、詳細な標的については不明であり、GSDMD がその直接的な基質になり得るかについては今後の検証が必要である。Nigericin は K^+ 特異的なイオノフォアであり、Calpain に重要な Ca^{2+} の細胞内濃度を直接変化させることはない^{[32][33]}。先行研究では、Nigericin による細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇は、Caspase-1 依存的なパイロトーシスと膜の崩壊によって誘導されることが報告されている

^[34]。一方、我々の図 3-1G 並びに図 3-6 による結果から、Ca⁺特異的イオノフォアである A23187 による刺激では IL-33 の放出は誘導されず、Caspase 阻害剤でもその放出が減弱しなかった。これらの結果と先行研究の比較から、特に上皮系細胞においては、IL-33 の放出には細胞膜孔の形成が重要であり、それに伴う細胞内の何らかのシグナル経路の活性化が、核内から細胞質への IL-33 の局在変化を誘導しているものと考えられる。実際にこれを支持するように、物理的な膜の破壊のみならず、GSDMD と同様に Caspase-1 非依存的なポア形成能を持つ MLKL と呼ばれる分子が IL-33 の放出に重要であるとの報告もある^{[35][36]}。さらに、アレルギー性炎症を誘発するアレルゲンに含まれるプロテアーゼは細胞死を誘導することなく IL-33 の放出を誘導する報告もあることから^[37]、プロテアーゼによる IL-33 の切断修飾と細胞内の局在変化、並びに膜のポア形成と細胞死がそれぞれ同時並行的に進行している可能性も考えられる。

我々は GSDMD-N のみを強制発現させる実験系を用い、Caspase-1 や NLRP3 インフラマソームの関与を排除することで、細胞膜のポア形成や ROS・Calpain が IL-33 の細胞内局在の変化と細胞外への放出に重要であることを見出した (図 4)。特に GSDMD-N による IL-33 の細胞内局在変化は新規の発見であり、その分子機序の解明が IL-33 の分泌機構、生理活性制御のより詳細な理解に有用であると考えられる。事実、IL-33 の細胞内への移行と細胞質内での未知の酵素による IL-33 の切断修飾が分泌制御の起点になることが先行研究により示唆されている^[27]。加えて他の IL-1 ファミリーサイトカインは Caspase 以外にもカテプシン G やエラスターゼなど 6 種類のプロテアーゼにより IL-1 様サイトカインドメインの前の部分で切断されることによってその活性が著しく変化することが知られており^[38]、IL-33 においてもこれらプロテアーゼによる IL-33 アミノ酸 95-270 または 109-270 での切断修飾がその活性を 10~30 倍まで上昇させるとの報告もある^[39]。

我々の結果は、これまで受動的な放出であると考えられてきた上皮細胞における NLRP3 インフラマソーム非依存的な IL-33 の放出について、膜孔形成を起点とした能動的な新規分子生物学的制御機構が存在することを示唆するものである。今後は GSDMD-N を用いて細胞膜のポア形成と ROS、Calpain の階層的関係性をさらに詳細に検討することで、IL-33 のより詳細な分泌制御機構を明らかにしていく。その知見はアレルギー性炎症の起点である IL-33 の放出を標的とした治療、創薬開発に繋がることが期待される。

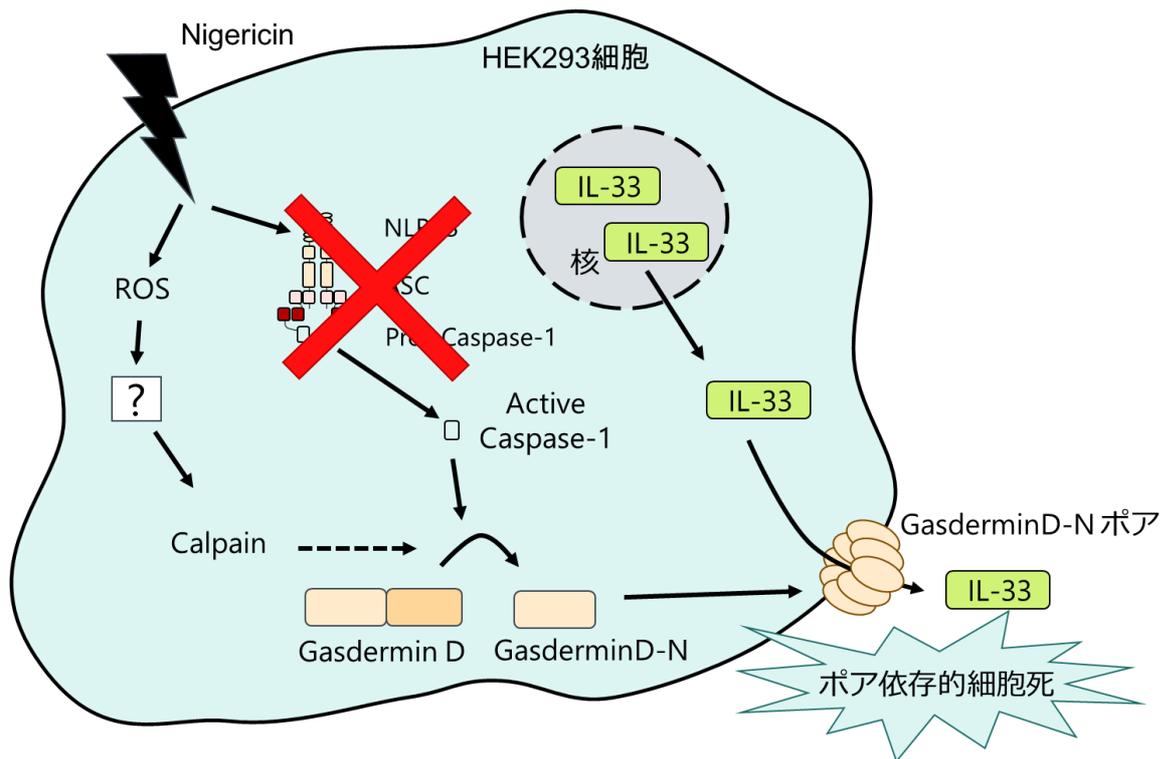


図 4. IL-33 放出経路のモデル図

実験結果より IL-33 は Nigericin 刺激による GSDMD の切斷、GSDMD-N 端断片の形成による GSDMD-N ポアの形成およびそれによる細胞死により放出されることがわかった。また Nigericin 刺激で ROS が產生されること、抗酸化剤で IL-33 の放出が抑制されること、Calpain 阻害剤で IL-33 の放出が阻害されることがわかった。通常、Nigericin 刺激では NLRP3 インフラマソーム経路が活性化されるが、HEK293 細胞には NLRP3 インフラマソーム経路が存在しないため NLRP3 インフラマソーム非依存的なシグナル経路の存在が示唆された。これらのことから考えられる放出経路をモデル図として示す。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究を実施する機会を与えて頂くとともに、多大なるご指導・ご助言を頂きました河合太郎教授に厚く御礼申し上げます。また、研究に対する心構えや多岐にわたる実験手技を丁寧にご指導頂きました川崎拓実助教、織大祐助教に深く感謝いたします。

本研究における実験へのご指導・ご助言だけでなく研究生活に関わる様々なことを教えてくださいました、末吉拓也氏、村瀬本弥氏をはじめ、研究室の皆さんに心から感謝致します。また、研究生活に係る事務手続きを始めとする様々な活動においてお世話になりました、前秘書の阿部香代さん、および秘書の鈴木千裕さんに深く御礼申し上げます。

アドバイザーとして貴重なご意見を頂きました稲垣直之教授、木俣行雄准教授をはじめ、講義を通してバイオロジーの面白さと奥深さを伝えて頂きました先生方に心より感謝いたします。最後に精神的、経済的に支えて頂いた両親に深謝いたします。

6. 参考文献

- [¹] Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*, 37(S1), S34-S45.
- [²] Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582.
- [³] Liew, F. Y., Pitman, N. I., & McInnes, I. B. (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 103.
- [⁴] Licona-Limón, P., Kim, L. K., Palm, N. W., & Flavell, R. A. (2013). TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature immunology*, 14(6), 536-542.
- [⁵] Gause, W. C., Wynn, T. A., & Allen, J. E. (2013). Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 607-614.
- [⁶] Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., Sudo, K., Okumura, K., Saito, H., & Sudo, K. (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18581-18586.
- [⁷] Haenuki, Y., Matsushita, K., Futatsugi-Yumikura, S., Ishii, K. J., Kawagoe, T., Imoto, Y., Fujieda, S., Yasuda, M., Hisa, Y., Akira, S., Nakanishi, K., & Nakanishi, K. (2012). A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(1), 184-194.
- [⁸] Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A., & Alenius, H. (2012). IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(5), 1392-1400.
- [⁹] Meephansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Tominaga, S. I., & Ohtsuki, M. (2012). Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(11), 2593-2600.
- [¹⁰] Martin, M. U. (2013, December). Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. In *Seminars in immunology* (Vol. 25, No. 6, pp. 449-457). Academic Press.
- [¹¹] Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018.
- [¹²] Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., & Flavell, R. A. (2011). Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity*, 34(5), 665-679.
- [¹³] Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F. & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660-665.
- [¹⁴] Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.C., & Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535(7610), 111-116.

- [15] Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153-158.
- [16] Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H. et al.:(2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.*, 29, 301-305
- [17] Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., ... & Gorman, D. M. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5), 479-490.
- [18] Cayrol, C., Duval, A., Schmitt, P., Roga, S., Camus, M., Stella, A., ... & Girard, J. P. (2018). Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nature immunology*, 19(4), 375.
- [19] Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., ... & Rentsendorj, A. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*, 36(3), 401-414.
- [20] Scott, I. C., Majithiya, J. B., Sanden, C., Thornton, P., Sanders, P. N., Moore, T., ... & Cohen, E. S. (2018). Interleukin-33 is activated by allergen-and necrosis-associated proteolytic activities to regulate its alarmin activity during epithelial damage. *Scientific reports*, 8(1), 3363.
- [21] Graham, R. M., Thompson, J. W., & Webster, K. A. (2015). BNIP3 promotes calcium and calpain-dependent cell death. *Life sciences*, 142, 26-35.
- [22] Chen, J., & Chen, Z. J. (2018). PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 564(7734), 71.
- [23] Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., ... & Liu, P. S. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666.
- [24] Cayrol, C., & Girard, J. P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 9021-9026.
- [25] Kakkar, R., Hei, H., Dobner, S., & Lee, R. T. (2012). Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6941-6948.
- [26] Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D. A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., & Girard, J. P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 282-287.
- [27] Luzina, I. G., Clerman, A., Fischelevich, R., Todd, N. W., Lockatell, V., & Atamas, S. P. (2019). Identification of the IL-33 protein segment that controls subcellular localization, extracellular secretion, and functional maturation. *Cytokine*, 119, 1-6.
- [28] Heid, M. E., Keyel, P. A., Kamga, C., Shiva, S., Watkins, S. C., & Salter, R. D. (2013). Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *The Journal of Immunology*, 191(10), 5230-5238.
- [29] Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F. &

Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660-665.

- [30] Filippi-Chiela, E. C., Viegas, M. S., Thomé, M. P., Buffon, A., Wink, M. R., & Lenz, G. (2016). Modulation of autophagy by calcium signalosome in human disease. *Molecular pharmacology*, 90(3), 371-384.
- [31] Kondratskiy, A., Kondratska, K., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2532-2546.
- [32] Pressman, B. C. (1976). Biological applications of ionophores. *Annual review of biochemistry*, 45(1), 501-530.
- [33] Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(5), C1100-C1108.
- [34] Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M., & Dubyak, G. R. (2015). K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *The Journal of Immunology*, 194(8), 3937-3952.
- [35] Rickard, J. A., O'Donnell, J. A., Evans, J. M., Lalaoui, N., Poh, A. R., Rogers, T., ... & Hall, C. (2014). RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell*, 157(5), 1175-1188.
- [36] Shlomovitz, I., Erlich, Z., Speir, M., Zargarian, S., Baram, N., Engler, M., ... & Gerlic, M. (2019). Necroptosis directly induces the release of full-length biologically active IL-33 in vitro and in an inflammatory disease model. *The FEBS journal*, 286(3), 507-522.
- [37] Cayrol, C., Duval, A., Schmitt, P., Roga, S., Camus, M., Stella, A., ... & Girard, J. P. (2018). Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nature immunology*, 19(4), 375.
- [38] Lefrançois, E., Duval, A., Mirey, E., Roga, S., Espinosa, E., Cayrol, C., & Girard, J. P. (2014). Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43), 15502-15507.
- [39] Lefrançois, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J. P., & Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1673-1678.