

論文内容の要旨

Caspase-11 contributes to site-1 protease cleavage and SREBP1 activation in the
inflammatory response of macrophages

炎症性カスパーゼ 11 は、マクロファージの炎症応答において、
site-1 プロテアーゼの切断と SREBP1 の活性化に寄与する

日本医科大学大学院医学研究科 代謝・栄養学

大学院生 成英瀾

Frontiers in Immunology (2023) 掲載予定

ステロール調節配列結合蛋白 (Sterol regulatory-element binding proteins, SREBPs) は、脂質代謝を制御する重要な転写因子である。マクロファージが炎症刺激を受けて活性化されると主要なアイソフォームである SREBP1a が誘導され、脂肪酸の不飽和化や貪食が亢進し、炎症を収束させる。ところが、マクロファージの炎症刺激において、SREBP1a が活性化される分子メカニズムは十分に理解されていない。

カスパーゼは細胞死や炎症に関わる複数のプロセスを制御するタンパク分解酵素群である。本研究では、炎症性カスパーゼのひとつであるカスパーゼ 11 に着目し、SREBP1a の活性化における役割を検討した。

解析には、マウス骨髄由来マクロファージ(BMDM)を用いた。BMDM を LPS で刺激し炎症応答を誘導すると、カスパーゼ 11 の mRNA 発現が 1 時間後に増加し始め、6 時間でピークに達した。ウエスタンブロットでは、LPS 刺激によるカスパーゼ 11 前駆体 (43、38kD) および活性型 (30kD) の増加が確認された。このことより、BMDM においては LPS 単独刺激によってカスパーゼ 11 が活性化されることが明らかとなった。

次に、ウエスタンブロットを用いて SREBP1 の活性化を評価した。野生型マウス由来の BMDM では LPS 刺激 6 時間目に SREBP1 の活性化が確認できたが、カスパーゼ 11 欠損 (*Casp4*^{-/-})BMDM ではその活性化が減弱していた。このことより、マクロファージにおいて、カスパーゼ 11 は SREBP1 の活性化に必須であると考えられた。

SREBP1 は前駆体として合成され、ゴルジ体で site-1 protease (S1P) というプロテアーゼによって切断・活性化されることが知られている。S1P のアミノ酸配列を検索したところ、カスパーゼ 11 によって認識される切断配列が存在した。免疫蛍光染色を用いた検討の結果、BMDM を LPS で刺激すると、刺激後 3、6 時間目にはカスパーゼ 11 および S1P の発現が増加し、少なくともその一部がゴルジに共局在した。ウエスタンブロットでも、LPS 処理 6 時間目に、野生型 BMDM では pro-S1P(148kD)と secreted-S1P(98kD、活性化型)の発現が増加した。一方、*Casp4*^{-/-}マクロファージでは、pro-S1P(148kD)と secreted-S1P(98kD)の有意な増加は観察されなかった。これらの結果よりマクロファージの炎症応答においては、S1P がカスパーゼ 11 によって切断・活性化され、それに引き続く SREBP1 の活性化に寄与する可能性が高いと考えられた。

次に、*in vitro* の再構築系を用いて S1P とカスパーゼ 11 の結合を検証した。FLAG-S1P および HA-カスパーゼ-11 の発現プラスミドを作製し、HEK293T 細胞にトランスフェクトした。抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法により、S1P とカスパーゼ 11 が直接結合することを明らかにした。同様の手法を用い、カスパーゼ 11 は S1P の N 末端と C 末端の 2 カ所で結合することも見出した。さらに、内因性タンパク結合についても検討した。BMDM を用いた免疫沈降法による検討の結果、LPS 刺激後には内因性の S1P がカスパーゼ 11 と直接結合することを明らかにした。

HEK293T 細胞に S1P とカスパーゼ 11 を共発現させると、Pro-S1P(148kD)、B-form (120kD)、および secreted-S1P(98kD)の量が減少し、培地中に S1P の 50 kD フラグメント

が検出された。50kD のフラグメントは、カスパーゼ 11 を共発現しないと検出されないことから、カスパーゼ 11 による切断によって生じるフラグメントだと考えられた。前述のマウス S1P のアミノ酸配列解析において、⁶⁹⁴LLVD⁶⁹⁷ 部位がカスパーゼ 11 で切断される可能性があることが分かっている。そこで、694 番目と 697 番目のアミノ酸を変異させた S1P を発現する S1P 発現プラスミドを作成した。カスパーゼ 11 と S1P または S1P 変異体 (L694A/D697E) を 293T 細胞に発現させたところ、S1P 変異体を発現した細胞では secreted-S1P (98kD) が減少し、カスパーゼ 11 依存的な切断によって生じる 50kD のフラグメントは検出されなかった。これらの結果より、カスパーゼ 11 による ⁶⁹⁴LLVD⁶⁹⁷ 部位での S1P の切断が、S1P プロセッシングの促進に重要であることが明らかとなった。

これまでの結果からカスパーゼ 11 が S1P の活性化に必須であることが明確である。次に、カスパーゼ 11 と SREBP1 の活性化の関連についてさらに検証した。*Casp4*^{-/-}, *Sreb1*^{-/-} ならびに野生型マウスから BMDM を調製し、LPS 刺激前後における遺伝子発現の変化を RNA-seq を用いて比較した。Gene set enrichment analysis (GSEA) の結果、*Casp4* 欠損および *Sreb1* 欠損細胞では、いずれもインターフェロン応答や IL2、STAT5 シグナルに関与する遺伝子など、炎症関連遺伝子の発現の有意な変動が見られた。このことから、カスパーゼ 11 はマクロファージにおける SREBP1 の活性化に寄与することが確認できた。

最後に、今回見出したカスパーゼ 11 依存的な SREBP1 活性化メカニズムが、ヒトにもあてはまるかどうかを検証した。マウスのカスパーゼ-11 に対応する、ヒトのオルソログは CASP4 と CASP5 であり、CASP4 と CASP5 は極めて相同性が高いことが知られている。ヒト単球由来 THP-1 細胞に LPS 刺激を加えて炎症を惹起すると、CASP4 はタンパクレベルにおいて発現誘導されず、CASP5 が誘導された。siRNA を用いて CASP4 または CASP5 をノックダウンすると、CASP5 をノックダウンしたときに SREBP1 下流遺伝子 (HMGCR, HMGCS1) の発現が抑制された。これらの結果より、ヒト単球/マクロファージにおいては、CASP5 が SREBP1 の活性化に寄与すると考えられた。

マクロファージは慢性炎症の制御に重要である。今後、今回明らかにしたカスパーゼ 11 依存的な SREBP1 の活性化が、慢性炎症の病態形成にどのように関わるのか、さらに検討してゆきたい。