

MARCH 2018

SUMMARY :

REVIEW

Inflammasomes: connecting innate and adaptive immunity

PRODUCTS

Inflammasome reporter cells

- THP1-HMGB1-Lucia™ Cells
- THP1-ASC-GFP Cells

Inflammasome inhibitors

Dectin reporter cells

- HEK-Blue™ hDectin-1a Cells
- HEK-Blue™ hDectin-1b Cells
- HEK-Blue™ mDectin-1b Cells

Reporter detection reagents

- QUANTI-Luc™ Gold

Inflammasomes : connecting innate and adaptive immunity

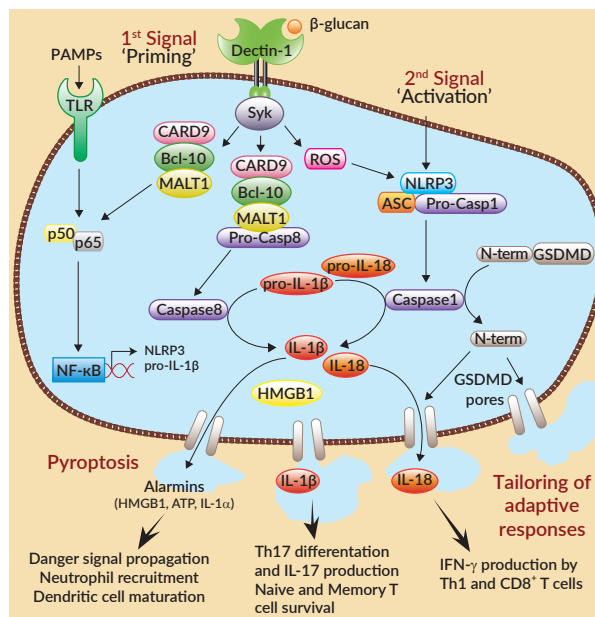
15 年前のインフラマソームの発見は、炎症の発生機序についての理解を促す飛躍的なものでした¹。それ以来、インフラマソームは様々な病態生理学的状態で重要な役割を果たすことが示されており、創薬における主要な標的となっています。本レビューでは、自然免疫および獲得免疫との間での、インフラマソームの中心的な役割について、焦点を当てて説明します。

インフラマソームは、細胞質センサー、アポトーシス関連スベック様タンパク質(ASC;または PYCARD)として知られるアダプター、および pro-caspase-1 からなる三分子複合体です。インフラマソームは、AIM2、Pyrin、および NOD 様受容体ファミリーに属する NLRP1、NLRP3、NLRC4 などのインフラマソームのセンサーによって特徴づけられています²。センサーは多様性と特異性を備えているため、外因性(微生物分子)または内因性(危険シグナル)といった広範囲の刺激に対して反応できます。

NLRP3 インフラマソームは、最も研究されたプロトタイプインフラマソームで、その活性化は 2 段階のプロセスを経ます。まず、リポポリサッカライド(LPS)などの微生物分子によって提供される第 1 のシグナル(プライミング)が、NF- κ B 依存性の NLRP3 および pro-IL-1 β の発現を誘導します。そして、構造的に無関係のさまざまな微生物分子(毒素など)や危険シグナル(尿酸-ナトリウム(MSU)など)によって生まれた第 2 のシグナルが、インフラマソームの多量化を誘発します。NLRP3 は、ASC のスベック凝集を促すため、caspase-1 の自己切断および活性化が起こります。活性化した caspase-1 は、IL-1 β および IL-18 のタンパク質分解性成熟と、Gasdermin D (GSDMD) の切断を誘導します。その後、細胞膜で GSDMD 孔が形成され、ピロトーシスと呼ばれる急速な炎症誘発性の細胞死を誘発します。この現象は、IL-1 β や IL-18、そして HMGB1 などのアラームの放出に関連していますが、特に好中球をリクルートすることによって、損傷または感染した細胞を超えた危険シグナルの伝播に寄与します^{2,3}。さらに、オリゴマー化したインフラマソーム分子が放出され得るため、周囲のマクロファージによる食作用後の炎症反応をさらに増幅します⁴。

興味深いことに、IL-1 β の分泌は、「過剰活性化」の状態において、無傷の貪食細胞でのピロトーシスとは無関係に発生する可能性があります^{5,6}。実際、インフラマソーム誘発性過剰活性樹状細胞(DC)は、T 細胞応答の増強を引き起こします。抗原提示というその機能を維持するのに加えて、この細胞は、IL-1 β および IL-18 の分泌を介したヘルパー T 細胞の応答にも関与します。これらのサイトカインは、Th1/Th17 応答を促進させることが明らかになっています。IL-18 は、プライミングされた Th1 細胞による IFN- γ 産生を増幅し、それらの Th1 分化を強化する一方、IL-1 β は Th17 の分化および IL-17 の分泌を促進します。また、IL-1 β はナイーブ T 細胞およびメモリー T 細胞の生存率も向上させます^{7,8}。インフラマソーム依存性 IL-1 β による Th17 応答は、真菌感染に対する宿主防御に不可欠です。 β -グルカンを感じ取る C 型レクチン受容体である Dectin-1 が、*Candida albicans* といった真菌性病原体を認識すると、Syk 依存性の NF- κ B 活性化、NLRP3 インフラマソームの凝集、および IL-1 β 媒介性 Th17 応答が起こるため、効果的な抗カンジダ免疫がもたらされます^{9,10}。特筆すべきこととして、Dectin-1 シグナル伝達が、非古典的な caspase-8 インフラマソームを介して、IL-1 β 産生を引き起こすことも挙げられます⁹。

獲得免疫の形成において IL-1 β や IL-18 が多様な機能を果たすことから、インフラマソームをワクチン・アジュバント開発に利用することに大きな注目が集まっています。Th1 を介した液性応答、Th1/Th17/細胞傷害性 T 細胞免疫、免疫学的記憶等は、インフラマソーム活性化リガンドを用いて操作できる可能性があります¹¹。例えば、I 型インターフェロン(IFN)は、pro-IL-1 合成を阻害し、IL-18 の成熟を促進することが知られているが、この I 型インターフェロン(IFN)の誘導を、DC でのインフラマソームの活性化と組み合わせることは、防御性 Th1 応答を増強させるための有望な方法です¹¹。このような組み合わせは、カチオン性多糖キトサンといった特定の粒子状ワクチン・アジュバントを必要とする可能性があります。近年、I 型 IFN 産生と NLRP3 インフラマソーム活性化の誘導が、Th1 応答をもたらすことが示されました¹³。獲得免疫におけるインフラマソームの役割をよりよく理解するため、そして、より良いワクチン・アジュバントを開発するためには、今後も更なる研究が求められています。



1. Martinon F. et al., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol Cell*. 10:417-26. 2. Broz P. and Dixit V.M., 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 16:407-20. 3. Kovacs S.B. and Miao E.A., 2017. Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends Cell Biol*. 27:673-84. 4. Baroja-Mazo A. et al., 2014. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol*. 15:738-48. 5. Broz P. et al., 2010. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*. 8:471-83. 6. Evavold C.L. et al., 2018. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity*. 48:1-10. 7. Evavold C.L. and Kagan J.C., 2018. How inflammasomes inform adaptive immunity. *J Mol Biol*. 430:217-37. 8. Zhu J. et al., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 28:445-489. 9. Tang J. et al., 2018. Regulation of C-type lectin receptor-mediated antifungal immunity. *Front Immunol*. 9:123. 10. Geijtenbeek T.B.H. and Gringhuis S.I., 2016. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 16:433-48. 11. Muñoz-Wolf N. et al., 2017. The role of inflammasomes in adjuvant-driven humoral and cellular immune responses. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. 23-42. 12. Dostert C. et al., 2013. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. *Curr Opin Immunol*. 25:359-65. 13. Carroll E.C. et al., 2016. The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*. 44:597-608.

InvivoGen

ASIA
Unit 106, 1F,
15W Phase 3, Hong Kong Science Park,
Pak Shek Kok,
Hong Kong

T: +852 3622 3480
F: +852 3622 3483

info.hk@invivogen.com
www.invivogen.com

Inflammasome Reporter Cells

InvivoGen社はインフラマソーム研究のための2種類のTHP-1由来のレポーター細胞を開発しました。THP-1は、*in vitro*でのインフラマソーム活性化の研究で最も一般的に使用されているヒトモデルの単球細胞株です。IL-1 β の最適な放出を得るため、インフラマソーム誘導剤による刺激の前に、プライミングする必要があります。InvivoGen社のTHP-1由来インフラマソームレポーター細胞は、ピロトーシスおよびASCスペック構造の研究用にデザインされています。

THP1-HMGB1-Lucia™ Cells NEW

THP1-HMGB1-Lucia™細胞は、ピロトーシスを確実かつ簡便に定量するためのユニークなツールです。このアッセイは、従来の乳酸脱水素酵素(LDH)活性アッセイに代わるものであり、細胞溶解させた後に、細胞外に放出されたHMGB1に結合したLuciaルシフェラーゼを測定します。

- **迅速性**：上清と検出薬を混合して、発光を測定可能
- **高感度**：LDHアッセイよりバックグラウンドが低く、検出範囲が広い
- **簡便性**：必要な上清はわずか10 μ l - 動態観察が可能
- **柔軟性**：ピロトーシスとIL-1 β 放出の評価が可能

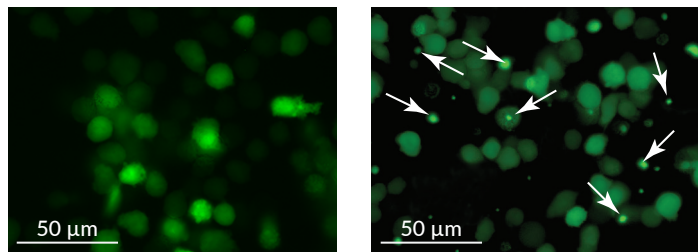
THP1-HMGB1-Lucia™細胞は通常、NigericinやCPPD結晶(NLR3インデューサー)やpoly(dA:dT)(AIM2インデューサー)等のインフラマソーム誘発剤で処理する前に、LPSによるプライミングが必要です。インフラマソームが活性化すると、ピロトーシスによる細胞外へのHMGB1::Lucia放出が起こります。上清中のHMGB1::Luciaの放出量は、セレンテラジン基質を含むQUANTI-Luc™を添加後に生成される発光シグナルを検出することによって、容易に測定が可能となります。

また、IL-1 β レポーター細胞株であるHEK-Blue™ IL-1 β を使用することで、HMGB1::Lucia細胞の上清中のIL-1 β 活性を評価できます。この細胞株は、NF- κ B誘導性の分泌性胎盤アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーター遺伝子を含むため、QUANTI-Blue™を用いてその発現量を測定することができます。

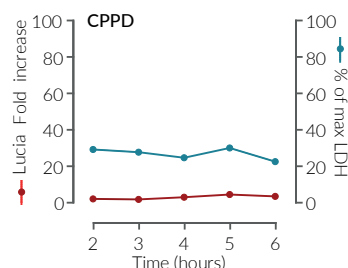
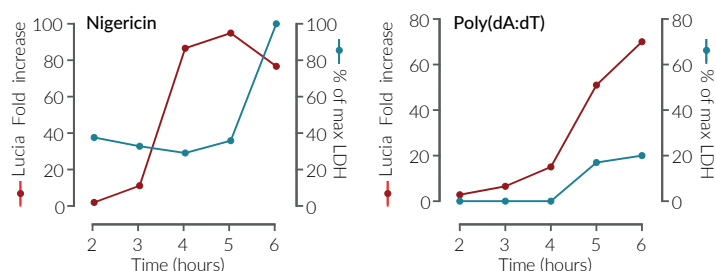
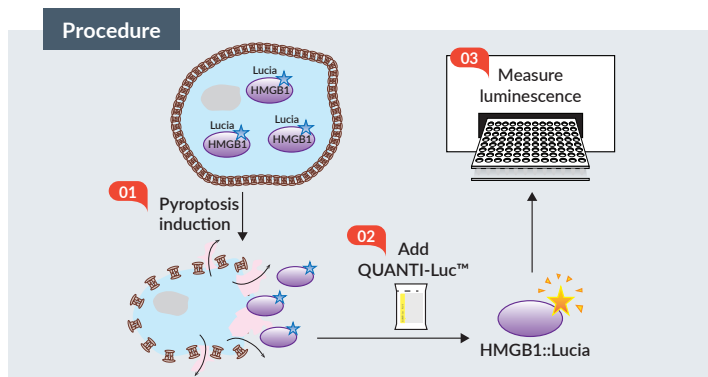
インフラマソーム誘導物質は、ピロトーシスおよびIL-1 β 分泌をそれぞれ特異的に誘発することができます。すなわち、NigericinはCPPDと比べて、ピロトーシスを迅速かつ強力に誘導しますが、IL-1 β は僅かしか産生しません。一方で、CPPDはピロトーシスを誘発できませんが、IL-1 β の高度な産生を誘引することができます。Poly(dA:dT)を用いたトランスフェクションは、ピロトーシスおよびIL-1 β の両者を誘導します。

THP1-ASC-GFP Cells

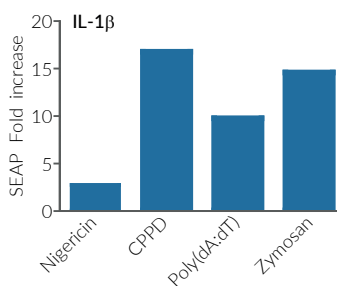
THP1 ASC-GFP細胞はASC::GFP融合タンパク質を安定的に発現するので、「スペック」と呼ばれる大型のASCタンパク質複合体を視覚的にモニタリングできます。ASC::GFP融合タンパク質は、LPSプライミングの誘導で、NF- κ B誘導性プロモーターによって発現します。その後、Poly(dA:dT)といった化合物で刺激すると、インフラマソームの活性化が起こります。このインフラマソームの活性化は、発光しているASCスペック構造を可視化することで分析が可能となります。



Visualization of ASC speck formation by fluorescence microscopy: THP1-ASC-GFP cells were primed with 1 μ g/ml LPS-EK for 3 hours, inducing the expression of the ASC::GFP fusion protein in the cytoplasm (left panel). Cells were then incubated with 250 ng/ml complexed Poly(dA:dT) and ASC speck formation was monitored over 1 to 3 hours post-activation. In most cells, only one speck forms upon inflammasome activation (arrows in right panel). Scale bar: 50 μ m.



Pyroptosis response of THP1-HMGB1-Lucia™ cells: cells were primed with 1 μ g/ml LPS-EK for 3h and then incubated with inflammasome inducers (8 μ M Nigericin, 0.5 μ g/ml complexed Poly(dA:dT) or 100 μ g/ml CPPD). Lucia luciferase activity and LDH release in the supernatant were quantified at 2, 3, 4, 5 and 6 hours post-induction.



NF- κ B response of HEK-Blue™ IL-1 β cells: THP1-HMGB1-Lucia™ cells were incubated with inflammasome inducers (8 μ M Nigericin, 100 μ g/ml CPPD, 0.5 μ g/ml complexed Poly(dA:dT) or 1 mg/ml Zymosan). After 24h, supernatants were incubated with HEK-Blue™ IL-1 β cells overnight and SEAP activity was assessed using QUANTI-Blue™.

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
THP1-HMGB1-Lucia™ cells	3-7 x 10 ⁶ cells	thp-hmgLuc
THP1-ASC-GFP cells	3-7 x 10 ⁶ cells	thp-ascGFP
HEK-Blue™ IL-1 β cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-il1b
CPPD	5 mg	tlrl-cppd
Nigericin	10 mg	tlrl-nig
Poly(dA:dT)	200 μ g	tlrl-patn

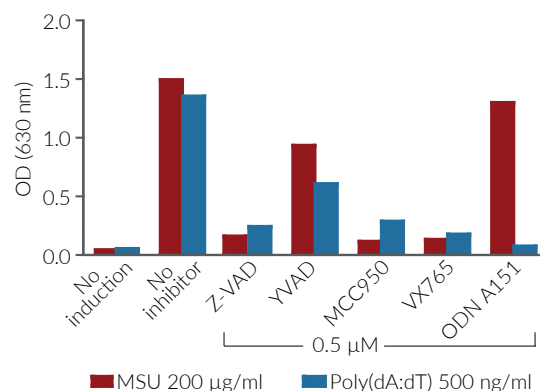


www.invivogen.com/inflammasome-test-cells

Inflammasome inhibitors

InvivoGen 社では、インフラマソーム誘導性免疫応答を遮断することが知られている阻害剤を幅広く提供しています。これらの阻害剤は、NLRP3、AIM2、カスパーゼ -1 などのさまざまな標的に作用します。これらの阻害剤は、THP1-HMGB1-Lucia™ 細胞を使って、インフラマソームの活性化を測定し、HEK-Blue™ IL-1β 細胞を使って、IL-1β の発現量を測定することで、その阻害剤の機能を確認しています。さらに、InvivoGen 社のインフラマソーム阻害剤は、細菌汚染物質が存在しないことを試験で確認しているため、実験で誤った結果が出ることを防ぐことができます。

PRODUCT	MAIN TARGET	QUANTITY	CAT. CODE
Ac-YVAD-cmk	Caspase-1	5 mg	inh-yvad
MCC950	NLRP3	10 mg	inh-mcc
ODN TTAGGG (A151)	AIM2	200 µg	tlrl-ttag151
VX-765	Caspase-1	10 mg	inh-vx765i-1
Z-VAD-FMK	Pan-caspase	1 mg	tlrl-vad



Effect of inflammasome inhibitors on IL-1β release by THP1-HMGB1-Lucia™ cells: THP1-HMGB1-Lucia™ cells were primed with LPS and treated with MSU (200 µg/ml) or Poly(dA:dT) complexes (0.5 µg/ml) in the presence of various inhibitors at 0.5 µM. After overnight incubation, cell supernatants were added to HEK-Blue™ IL-1β cells for 16 hours. IL-1β levels were determined by assessing SEAP activity in the supernatant using QUANTI-Blue™.

 www.invivogen.com/inflammasome-inhibitors

Dectin-1a and Dectin-1b reporter cells

InvivoGen 社では、ヒト胚性腎細胞株 HEK293 由来の新シリーズの Dectin-1 レポーター細胞を提供しています。Dectin-1 は、真菌細胞壁のグルコースポリマーである β-グルカンを認識する C 型レクチン受容体 (CLR) であり、抗真菌系の自然免疫において重要な役割を果たします。

HEK-Blue™ hDectin-1a Cells

NEW

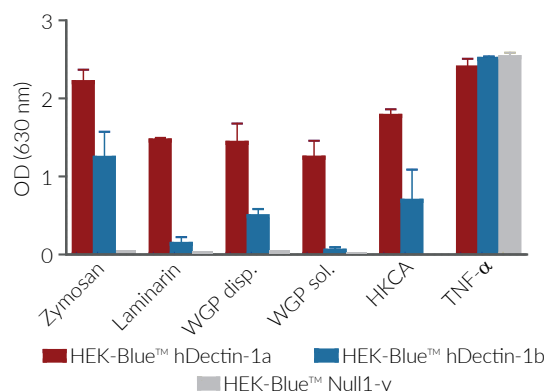
HEK-Blue™ hDectin-1b Cells

HEK-Blue™ mDectin-1b Cells

NEW

Dectin-1 は、2 つの主要なアイソフォーム、すなわち、完全長の A アイソフォームと "STALK 配列" が無い B アイソフォームにスプライシングされます。これらは、可溶性および粒子状の β-グルカンに対して同じ応答を誘導することはありません¹。また、低い発現量で Dectin-1 の両アイソフォームを内在的に発現するマウス RAW 264.7 マクロファージとは対照的に、HEK293 細胞では Dectin-1 を発現しません。そのため、InvivoGen 社では、ヒト Dectin-1a または -1b アイソフォームのいずれか、および NF-κB 誘導性分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP) を高レベルで安定的に発現する HEK-Blue 細胞を作製しました。これらの細胞は、NF-κB 活性化をもたらし Dectin-1 シグナル伝達経路に関与する遺伝子も発現します。

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
HEK-Blue™ hDectin-1a cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-hdect1a
HEK-Blue™ hDectin-1b cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-hdect1b
HEK-Blue™ mDectin-1b cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-mdect1b
HEK-Blue™ Null I-v cells (control)	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-null1v
QUANTI-Blue™ (5 pouches)	5 x 100 ml	rep-qb1
Zymozan (<i>S. cerevisiae</i>)	100 mg	tlrl-zyn
Laminarin (<i>L. digitata</i>)	100 mg	tlrl-lam
WGP dispersible (<i>S. cerevisiae</i>)	50 mg	tlrl-wgp
WGP soluble (<i>S. cerevisiae</i>)	50 mg	tlrl-wgps
HKCA (<i>C. albicans</i>)	10 ⁹ cells	tlrl-hkca



NF-κB responses of HEK-Blue™ hDectin-1a and -1b and HEK-Blue™ Null I-v cells to Dectin-1 agonists: 10 µg/ml Zymozan, Laminarin, WGP soluble, 100 µg/ml WGP dispersible, or 3 x 10⁶ cells/ml HKCA. 10 ng/ml TNF-α was used as a positive control. After 24h, SEAP activity was assessed in the supernatant using QUANTI-Blue™.

HEK-Blue™ hDectin-1a 細胞は粒子状および可溶性の両者のリガンドに対してよく反応しますが、HEK-Blue™ hDectin-1b 細胞は粒子状リガンドに対する応答や、可溶性リガンドに対する応答が弱くなります。これは、ラミナリンといった可溶性 Dectin-1 リガンドについて長年論じられてきた拮抗活性の理論と合致しています。さらに、これらの結果は、可溶性リガンドのサイズと純度が、そのアゴニスト / アンタゴニスト活性を決定することを示す、最近の報告をさらに裏付けています²。InvivoGen 社の細胞株では、特異的な方法で、この可溶性および粒子状化合物の生物活性を特定できます。

1. Heinsbroek, S.E, et al, 2006. Expression of functionally different Dectin-1 isoforms by murine macrophages. *J Immunol.* 176: 5513. **2. Smith A.J., et al, 2018.** Immunoregulatory activity of the natural product Laminarin varies widely as a result of its physical properties. *J Immunol.* 200:788.

 www.invivogen.com/hek-blue-clr

Reporter Detection Reagents

QUANTI-Luc™ Gold NEW

最適化された Lucia およびセレンテラジン・ルシフェラーゼ検出アッセイ

- 2種類が入ったレポーター検出キット：QUANTI-Luc™ Plus および QLC Stabilizer
- 2つの選択肢：いずれも QUANTI-Luc™ Plus を使用します
 - QLC Stabilizer を利用せずに、より強度な発光シグナルを観察
 - QLC Stabilizer を使用して、より強度な発光シグナルを 10 分以上安定的に維持
- ハイスループットスクリーニングに最適
- 細胞上清、または細胞に直接使用可能

QUANTI-Luc™ Gold は、セレンテラジンを利用したルシフェラーゼ(例えば、Lucia、Gaussia、Renilla ルシフェラーゼ)の活性を検出するのに使用できる新しいレポーター検出キットです。最適化されたセレンテラジン含有薬である QUANTI-Luc™ Plus と、QLC Stabilizer が含まれています。このキットを使用することで、ルシフェラーゼ活性を柔軟に測定できます：

(a) 安定剤の QLC Stabilizer を使わず QUANTI-Luc™ Plus のみでは、InvivoGen 社 標準品の QUANTI-Luc™ と比較して、光点が増強された発光を検出できます。

(b) QUANTI-Luc™ Plus とともに、安定剤の QLC Stabilizer を利用することで、増幅された発光シグナルの安定性が 10 分以上続きます。この場合、ハイスループットスクリーニングや経時的研究に理想的です。

QUANTI-Luc™ Gold で示された発光シグナルは、ルミノメーターを用いて定量化し、相対発光量 (RLU) として表すことができます。

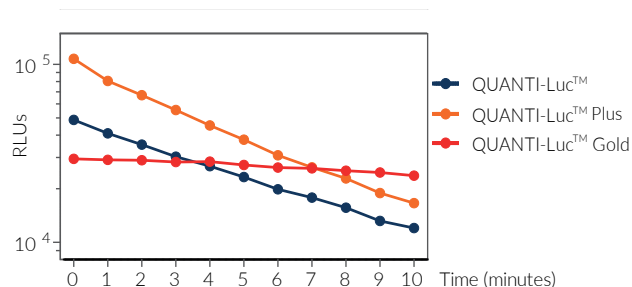
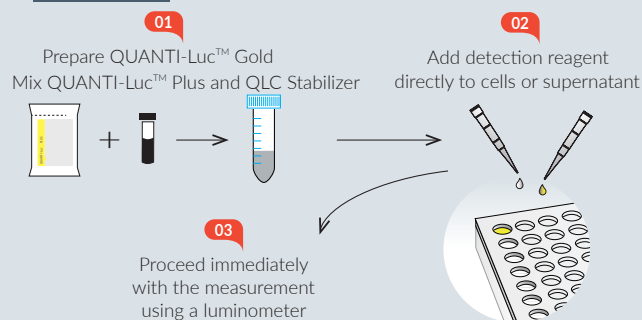


- 1 pouch:**
5 x 96-well plates or 2 x 1536-well plates
- 2 pouches:**
10 x 96-well plates or 5 x 1536-well plates
- 5 pouches:**
25 x 96-well plates or 13 x 1536-well plates



www.invivogen.com/reporter-detection

Procedure



Lucia luciferase activity detection with QUANTI-Luc-based detection media: THP1-Dual™ cells were stimulated for 24h with 10 µg/ml 2'3'-cGAMP. The ISG response was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™, QUANTI-Luc™ Plus, or QUANTI-Luc™ Gold (QUANTI-Luc™ Plus with QLC Stabilizer). Relative light units (RLUs) were measured over 10 minutes.

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
QUANTI-Luc™ Gold	1 pouch (25 ml)	rep-qlcg1
	2 pouches (50 ml)	rep-qlcg2
	5 pouches (125 ml)	rep-qlcg5
	1 pouch (500 ml)	rep-qlcg-500
QUANTI-Luc™	2 pouches (50 ml)	rep-qlc1
	5 pouches (125 ml)	rep-qlc2
	1 pouch (500 ml)	rep-qlc-500

Selective Antibiotics

Cell-culture tested antibiotics

- 無菌
- エンドトキシンフリー
- 機能試験済み

InvivoGen 社は、トランスフェクションされた哺乳動物細胞セレクション用の、細胞培養試験済みの抗生物質を幅広く提供しています。これらの抗生物質は無菌かつエンドトキシンフリーのため、トランスフェクションした細胞での細菌性エンドトキシンによる影響を排除します。これらは、厳密な物理化学的、微生物学的、細胞学的試験等を通してその機能が検証されており、哺乳動物細胞において、細胞毒性を起こさことなく長期的安定性を示すことが証明されています。

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
Blasticidin	100 mg (10 x 1 ml)	ant-bl-1
G418 (Geneticin)	1 g (10 x 1 ml)	ant-gn-1
Hygromycin B Gold™	1 g (10 x 1 ml)	ant-hg-1
Puromycin	100 mg (10 x 1 ml)	ant-pr-1
Zeocin™	1 g (10 x 1 ml)	ant-zn-1



www.invivogen.com/selective-antibiotics

InvivoGen

Europe Tel: +33 562 71 69 39
USA Tel: +1 888 457 5873
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30
Fax: +1 858 457 5843
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com
info@invivogen.com
info.hk@invivogen.com