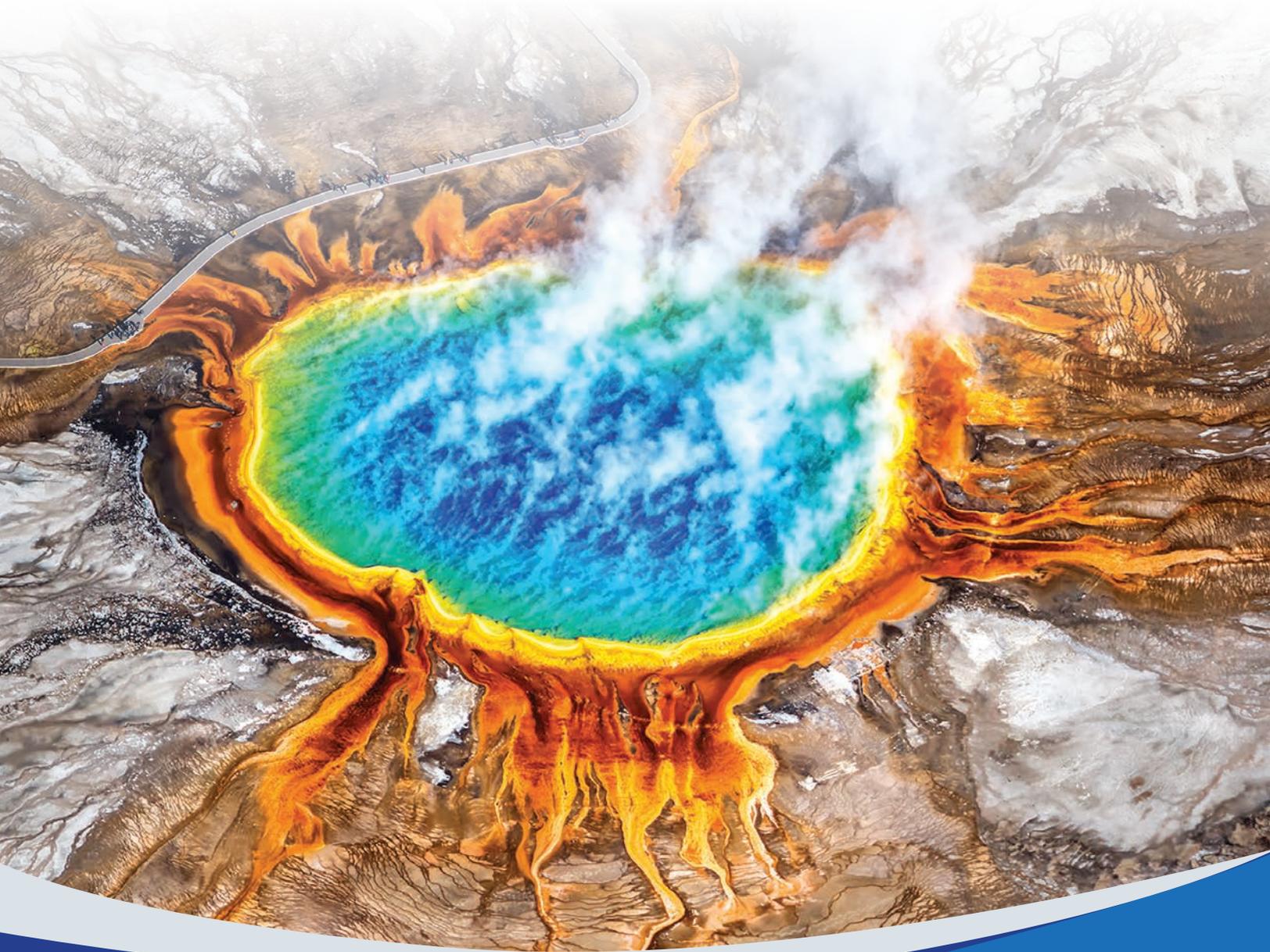


# INFLAMMASOMES

InvivoGen *infocus*

PRACTICAL GUIDE



## UNDERSTANDING INFLAMMASOMES

2002 年におけるインフラマソームの発見は、炎症がどのように惹起されるかを理解する上で突破口を提示する画期的なものでした。InvivoGen 社では、これら炎症性シグナル伝達のハブに関する研究支援ツールを包括的なラインアップで提供しています。

- Mini reviews
- Pathway illustrations
- Double-page poster
- Cell lines & Reagents
- Validation data

# InvivoGen *infocus*

## A PRACTICAL GUIDE TO UNDERSTANDING INFLAMMASOMES

4

### **INFLAMMASOME ACTORS**

Inflammasome sensors  
Adaptors  
Effectors

6

### **INFLAMMASOME CELLULAR ASSAYS**

Monitoring NLRP3-dependent responses  
Monitoring NLRC4-dependent responses  
Monitoring ASC-dependent responses  
Monitoring CASP-1-dependent responses  
Monitoring CASP-4-dependent responses

8

### **INFLAMMASOME ACTIVATION AND ASSEMBLY**

A "two-step" activation model  
NLRP3 inflammasome  
NLRC4/NAIP inflammasome  
CASP-11 & CASP-4/5 non-canonical inflammasomes

10

### **INFLAMMASOME ACTIVATION & RESPONSES AT A GLANCE**

Poster

12

### **INFLAMMASOME INDUCERS**

Canonical inflammasome inducers  
Non-canonical inflammasome inducers

14

### **PYROPTOSIS AND GASDERMIN D**

#### **GASDERMIN D CELLULAR ASSAY**

Monitoring GSDMD-dependent responses

15

### **INFLAMMASOME REGULATION**

#### **PRIMING AGENTS**

LPS  
Poly(I:C)  
Pam3CSK4

16

### **ASSESSING INFLAMMASOME ACTIVATION**

Monitoring ASC-specks in real-time  
Monitoring pyroptotic cell death  
Monitoring IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion

18

### **INFLAMMASOME INHIBITORS**

Caspase inhibitors  
Multi-target inhibitors  
NLRP3 inhibitors

19

### **INFLAMMASOMES IN DISEASE REFERENCES**

## ABBREVIATIONS

**AIM2**: Absent-in-melanoma-2

**ATP**: Adenosine tri-phosphate

**ASC**: Apoptosis-associated speck-like protein

**CARD**: Caspase recruitment domain

**CASP**: Caspase

**DAMPs**: Danger-associated molecular patterns

**GBPs**: Guanylate binding proteins

**GSDM**: Gasdermin

**HMGB1**: High mobility group B1 protein

**IFN**: Interferon

**IL-1**: Interleukin 1

**IRF**: Interferon regulatory factor

**IRGB10**: Interferon response gene B10 protein

**LDH**: Lactate dehydrogenase

**LRR**: Leucine-rich repeat

**LPS**: Lipopolysaccharide

**NAIP**: NLR family apoptosis inhibitory protein

**NEK7**: NimA-related protein kinase 7

**NF- $\kappa$ B**: Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells

**NBD**: Nucleotide-binding domain

**NLR**: Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat

**NLRP3**: NLR family PYD domain containing protein 3

**NLRC4**: NLR family CARD domain containing protein 4

**NOD**: Nucleotide-binding oligomerization domain

**OMVs**: Outer membrane vesicles

**PAMPs**: Pathogen-associated molecular patterns

**PRRs**: Pattern recognition receptors

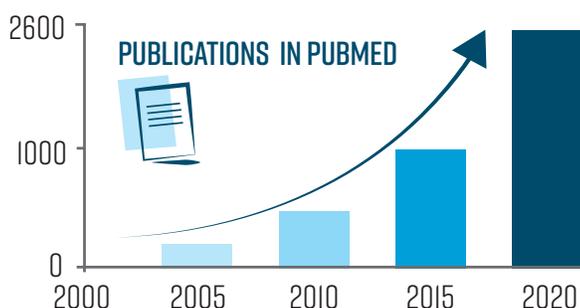
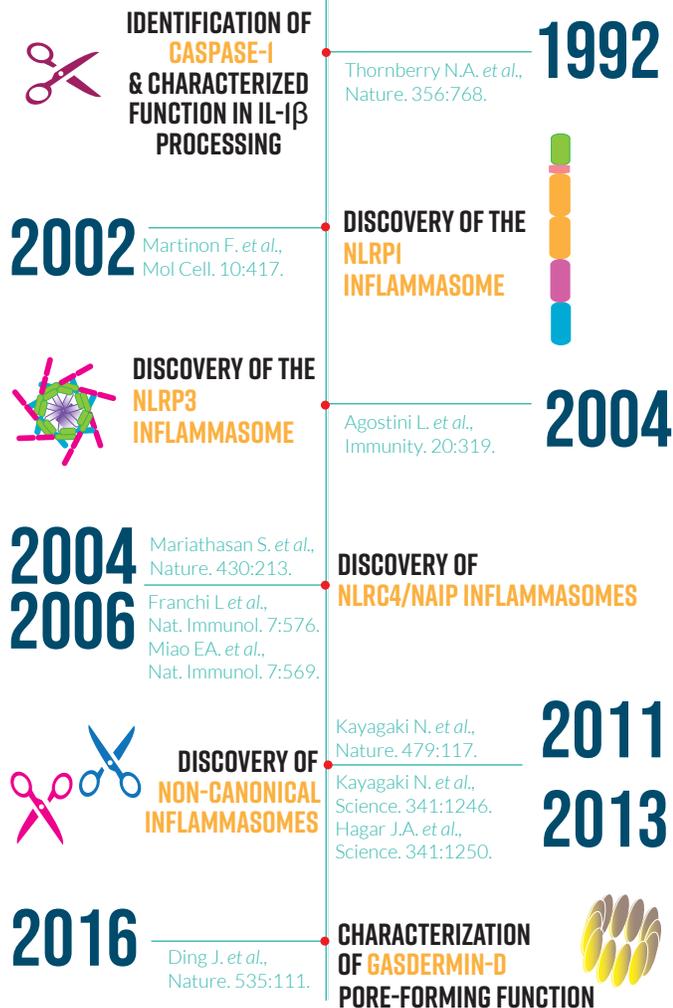
**PTM**: Post-translational modification

**PYD**: Pyrin domain

**TLRs**: Toll-like receptors

**炎**症は、微生物感染、アレルギー、自己免疫状態など、さまざまな種類の脅威を解決することを目的とした自然免疫反応です。主要な炎症エフェクターの1つに、1980年代に同定されたIL-1 $\beta$ サイトカインがあります。このサイトカイン分泌機構の詳細が明らかにされるまで20年の歳月を要しました。インフラマソームの発見は、炎症の惹起を理解する上での画期的で大きな一歩でした。インフラマソームは、細胞質基質に存在する多タンパク質複合体であり、その構築は、病原体関連分子パターン(PAMPs)および危険関連分子パターン(DAMPs)のセンサーによって引き起こされます。また、炎症性カスパーゼが、下流エフェクターのセンサーおよび/またはメディエーターとして機能する可能性があります。インフラマソームは微生物の除去に有益ですが、一方で、インフラマソームの異常または過剰刺激は、自己炎症性疾患、心臓代謝系および神経変性疾患、がんなどのさまざまな病理に関与します。InvivoGen社は、この限りのない分野の研究を支援するため、さまざまな細胞アッセイ、リガンド、阻害剤の豊富なコレクションを開発しました。

## A BRIEF HISTORY OF INFLAMMASOME BREAKTHROUGHS



**6 (AT LEAST) INFLAMMASOME SENSORS**

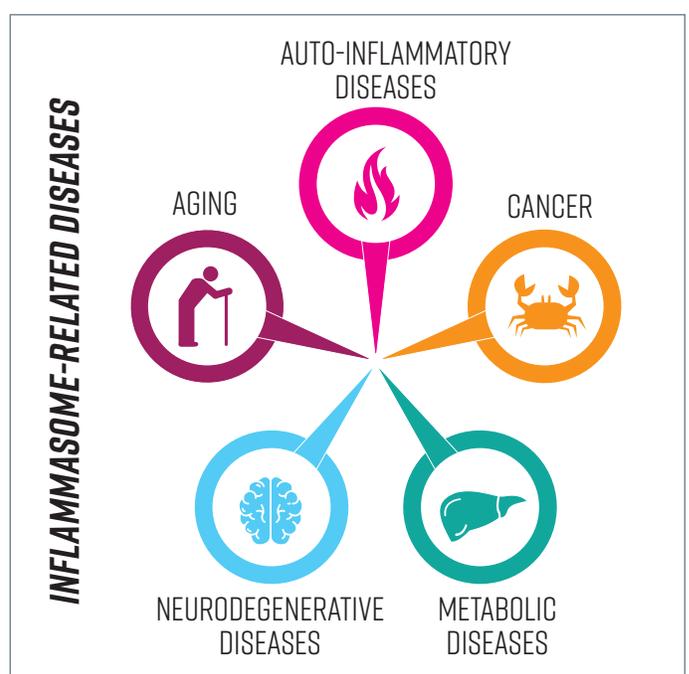
- NLRP1
- NLRP3
- NLRP4
- PYRIN
- CASPASE II-4/5
- AIM2

**3 PROTEINS IN CANONICAL ASSEMBLY**

SENSOR + ADAPTOR + CASPASE-1

**2 SIGNALS FOR INFLAMMASOME FORMATION**

PRIMING + ACTIVATION



**70**

**STUDIES IN** [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)

**InvivoGen**

**OFFERS >60**

CELLULAR ASSAYS, REAGENTS, AND GENE TOOLS TO ACCOMPANY YOUR SUCCESSFUL RESEARCH

# INFLAMMASOME ACTORS



インフラマソームは、炎症応答を促進する細胞質基質内のシグナル伝達ハブとして機能します。

インフラマソームは、一般に、センサーと、アダプタータンパク質に接続された炎症性カスパーゼで構成される細胞質基質内の多タンパク質複合体です。これらの構築は、種々の微生物由来および宿主由来の刺激によって開始されます。インフラマソームが活性化されると、細胞表面でガスダーミンDによる膜孔(ポア)形成が促進され、IL-1 $\beta$ およびIL-18炎症誘発性サイトカインの非従来型分泌、IL-1 $\alpha$ およびHMGB1アラミンの放出がもたらされ、最終的にはパイロトーシス細胞死が起こります。インフラマソームは、その構築にカスパーゼ-1を必要とする場合は「カノニカル(古典的)」と定義されるのに対し、その構築がヒトカスパーゼ-4またはカスパーゼ-5(あるいはそれらのマウス相同分子であるカスパーゼ-11)に依存する場合は「非カノニカル(非古典的)」と定義されます。

## Inflammasome sensors

インフラマソームは、そのセンサー機能にちなんで名付けられています。これらのセンサーは主に、タンパク質ドメイン構造に基づいて分類される細胞質内のパターン認識受容体(PRRs)です。それらのほとんどは、NLR(ヌクレオチド結合ドメイン(NBD)およびロイシンリッチリピート(LRR)受容体)ファミリー、特にNLRPおよびNLRCサブグループに属しています。NLRPとNLRCはN末端が異なっており、NLRPがピリンドメイン(PYD)を持つのに対し、NLRCはカスパーゼリクルドドメイン(CARD)を持ちます。NLRセンサーには、NLRP3、NLRP1、およびNLRC4が含まれ、これらは、そのインフラマソーム構築能に機能的に関連しています。AIM2やピリンなどの他の非NLRセンサーも、インフラマソームを構築します。これらのセンサーは、ASCアダプターの有無にかかわらず、カスパーゼ1(CASP-1)を凝集させ、カノニカルなインフラマソーム構築を開始します。非カノニカルなインフラマソームの構築には、センサーとエフェクターの両方の機能を示すヒトCASP-4/5またはマウスCASP-11が関与します。

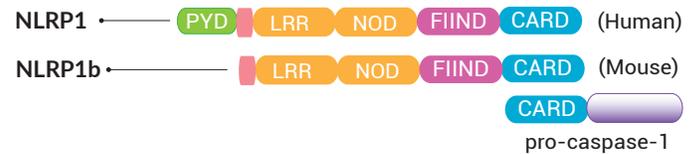
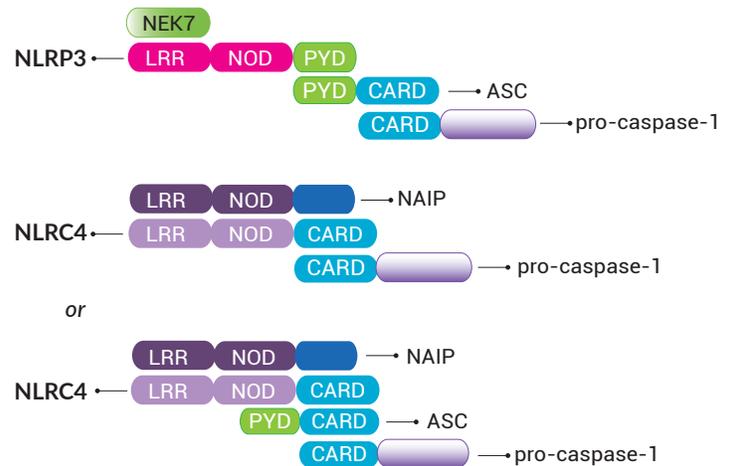
## Canonical inflammasome sensors

NLRP3(別名:クリオピリン、NALP3)は、Tschoppらが2004年にそのインフラマソームの構築機能について報告して以来、最も研究されているセンサーです[1]。このLRR-NOD-PYDセンサーは、構造的にも化学的にも無関係な多様な刺激(例えば、膜孔形成毒素、イオンチャネル活性化因子、尿酸結晶、 $\beta$ -アミロイドタンパク質など)によって活性化されることから[2-4]、NLRP3はこれらの分子に直接結合しないことが示唆されています。このセンサーはむしろ、イオンの不均衡など、下流の細胞質基質内のストレスシグナル、特に、細胞恒常性の障害を感知する収束ポイントであり得るK<sup>+</sup>流出を感知します[5]。重要なこととして、NLRP3は、アルツハイマー病、2型糖尿病、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)などの多くの炎症性病理に関与しています(p.8&19参照)。

NLRC4(別名:lpaf)は、インフラマソーム応答を促進することが2004年にDixitらによって初めて報告されました[6]。その後、VanceらやShaoらによる独創的な研究により、NLRC4がNAIPs(NLRファミリーアダプター阻害タンパク質)と相互作用する間接センサーであることが実証されました。これらは、細胞内バクテリアによって生成されるPAMPs(フラジェリンなど)やバクテリア分泌系の成分(ニードルやインナーロッドなど)に直接結合します。ヒトでは単一のNAIPがNLRC4の上流で作動し、これらの活性化因子をそれぞれ認識するのに対し[7]、マウスでは複数のNAIPsが各分子に対して異なる親和性を持つことが報告されています[8-11]。NLRC4インフラマソームは、バクテリアの侵入から、肺、胃、腸などの粘膜バリアを保護しているとされています[12](p.9&19参照)。

NLRP1(別名:NALP1)は、NLRファミリーで最初に特定されたインフラマソームセンサーであり、その後2001~2002年にTschoppのチームによって特性が明らかにされました[13,14]。ヒトNLRP1は、CARDドメインとPYDドメインを備えています。マウスNLRP1パラログ(a, b, c)はすべてPYDドメインを欠いていますが、中でもNLRP1bが最もよくそれに特徴付けられます。ヒトおよびマウスのNLRP1は、CARDの上流に固有のFIINDドメイン(ドメインを発見する機能)を備えています。NLRP1は、同定された同族リガンドなしでもそのままの状態を安定的に維持します[15,16]。NLRP1bの活性化は、病原性酵素(例:炭疽菌致死因子タンパク質またはフレクスナー赤痢菌IpaH7.8)によって誘導され、FIINDの自己タンパク質分解とN末端ドメインのプロテアソーム分解が引き起こされます[16]。

## CANONICAL INFLAMMASOMES



## NON-CANONICAL INFLAMMASOMES



AIM2(Absent-in-melanoma 2)は、PYDドメインとオリゴヌクレオチド結合ドメインを含む非NLRタンパク質です。AIM2は、微生物または(細胞損傷後の)宿主由来の細胞質基質二本鎖(ds)DNAのための受容体であり、DNAの配列ではなく、長さに依存して機能します[17-19]。AIM2のインフラマソーム構築機能は、マウス骨髄系細胞では十分に確立されている一方で、ヒト細胞ではそれほど明確ではありません[19-21]。

ピリン(Pyrin)は、変異型地中海熱(MEFV)遺伝子を示すMEFV患者で初めて同定されました。その活性化については、PYDドメインが関与していることを除いて、まだ完全に解明されていません。さらに、その同族リガンドについても未だ同定されていません。これは、細胞骨格動態の異常を感知することが示されており、クロストリジウム・ディフィシル・トキシンBやクロストリジウム・ボツリヌス・トキシンC3などのRho修飾タンパク質によって活性化される可能性があります[15]。

NLRP6およびNLRP9bセンサーは、最近、複数の報告で関心を集めているものであり、マウス、より具体的には腸管上皮細胞において、インフラマソーム応答を媒介することが示唆されています[15]。

## Non-canonical sensors

ヒトの**カスパーゼ-4**および**カスパーゼ-5** (CASP-4/5)とマウスの**カスパーゼ-11** (CASP-11)は、二機能性の分子です。これらは、細胞質基質内リポポリサッカライド(LPS)の直接センサーと、インフラマソームの直接エフェクターの両方として機能します。より正確には、CASP-11/4/5は非カノニカルなインフラマソームを構築し、CASP-1 依存性のIL-1 $\beta$ およびIL-18 分泌と、CASP-1 非依存性細胞死を引き起こします [22, 23] (p.9&13 参照)。

## KEY POINT

### CANONICAL AND NON-CANONICAL

「カノニカル」と「非カノニカル」という用語は、インフラマソームのタイプだけでなく、その活性化につながる経路のタイプも表しています。NLRP3とCASP-11は、それぞれカノニカルなインフラマソームと非カノニカルなインフラマソームを構築します。ただし、NLRP3は、カノニカルまたは非カノニカルのいずれかの経路を介して活性化されます。詳細については、8~9頁をご参照ください。

## Adaptors

**ASC** (別名:PYCARD)は、CARD ドメイン1つとPYD ドメイン1つの2種類の結合ドメインを備えたアダプターであり、センサーとプロカスパーゼ-1との間の相互作用を可能にします。このタンパク質は、NLRP3やAIM2など、CARD ドメインを含まないインフラマソームセンサーによって動員されます。これは、NLRP1、NLRC4、CASP-11/4/5 インフラマソームの構築では必要とされません [15, 23]。休止細胞において、ASCは、細胞質と核の両方で可溶的で、拡散した形態で存在します。インフラマソームが活性化されると、ASC分子は細胞ごとにマイクロメートルサイズの大きな単一の「スペック」を形成し、それによってCASP-1 活性化部位の凝集が起こります [24] (p.16 参照)。

**NEK7** (NIMA 関連プロテインキナーゼ7)は、以前は有糸分裂に関連付けられたセリン-スレオニンキナーゼであり、最近になって、K<sup>+</sup> 流出の下流での、すべての既知の活性化因子によるNLRP3 活性化に必須であることが確認されました。NEK7 非存在下では、NLRP3 活性化因子に対するCASP-1 の活性化とIL-1 $\beta$  の放出は、*in vitro* および *in vivo* で抑制されます [25]。構造学的研究により、NEK7は、LRR ドメインへの結合を介して隣接するNLRP3 分子に架橋し、それによって足場機能を発揮することが示されています [26]。

## Effectors

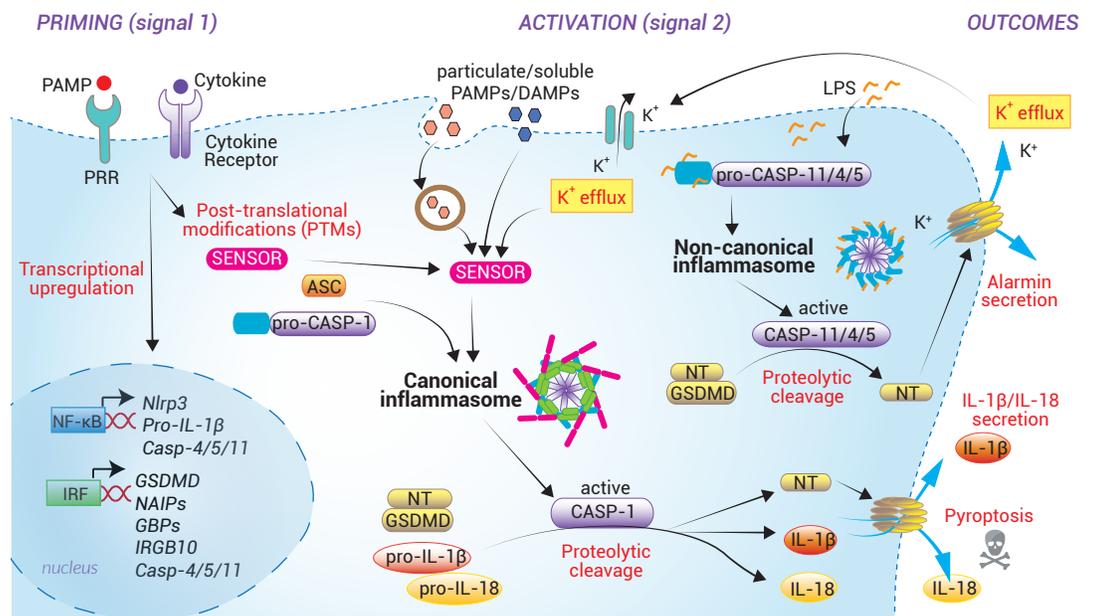
**カスパーゼ-1** (CASP-1)は、IL-1 $\beta$  変換酵素 (ICE) として最初に同定されたシステインプロテアーゼです [27]。CASP-1は、N末端のCARD ドメイン1つと、2つの触媒サブユニット p20 および p10 で構成される、不活性なプロカスパーゼ-1 チモージェンとして合成されます。CASP-1は、CARD ドメインを介してカノニカルなインフラマソームに動員されます。四量体型のCASP-1 (およびCASP-4 またはCASP-11)は、近接誘導による自己消化活性化と、p20 および p10 の放出を可能にすることが報告されています [28]。活性型CASP-1は、pro-IL-1 $\beta$  および pro-IL-18 サイトカイン、ならびにガスダーミンDを、生理学的に活性化形態に切断します (以下参照) [28, 29]。その正確な作用機序をさらに理解するには、構造学的研究が必要です。

**ガスダーミンD** (GSDMD、別名:DFNA5L またはFKSG10)は2004年に最初に同定されたものの、その生理学的機能については、ほぼ15年の間不明のままでした。この細胞質基質内タンパク質は、リンカーを挟んで2つの異なるドメインを備えています。C末端ドメイン (GSDMD-CT)は、N末端ドメイン (GSDMD-NT) に対して阻害機能を発揮します。GSDMD-NTフラグメントの放出には、活性化されたCASP-1 またはCASP-11/4/5 によるリンカー内でのタンパク質切断が必要となります。その後、GSDMD-NTは原形質膜のリン脂質に結合することで、そのオリゴマー化と、内径約18nmの膜孔 (ポア) 形成を引き起こします [30]。GSDMD 膜孔は、成熟型IL-1 $\beta$  およびIL-18、ならびにアラミンの分泌を可能にします (以下参照)。最終的に、それらが蓄積することでパイロトーシス細胞死を引き起こします (p.14 参照)。

**インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) とIL-18**は、ゲートキーパーサイトカインであり、炎症の活性化と調節に関連する多くのイベントにおいて、極めて重要な役割を果たしています。IL-1 $\beta$ は、発熱や血管拡張に加えて、感染組織または損傷組織への免疫細胞の浸潤を制御する遺伝子の発現を誘導します。IL-18は、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の産生に必要であり、適応免疫を媒介する共刺激サイトカインです。これら2つのサイトカインは、pro-IL-1 $\beta$  および pro-IL-18 チモージェンとして合成され、その成熟型を作成するためには切断が必要となります [31]。これらのサイトカインは、小胞を介した生合成経路による分泌に必要なN末端シグナルシーケンスを欠いているため、通常とは異なる経路で (つまり、GSDMD 膜孔を介して) 分泌されます。

**アラミン (Alarmin)**は、感染または損傷に反応して、損傷した細胞や死にかけている細胞によって放出されるDAMPsです。これらの分子は、恒常性が維持されている時は細胞質基質内に低濃度で存在し、インフラマソーム応答時に早期に分泌できるようになっています。それを受けて、これらの発現が増加することで、「危険」シグナルの伝播が可能になります。インフラマソームの活性化時に放出される主要なアラミンとして、IL-1 $\alpha$  [32] とHMGB1 (高移動度群ボックス-1タンパク質) [33] の2つが特定されています。

「プライミング」と「活性化」という2つのステップは、すべてのインフラマソームがそれらの構築と媒介応答に必要なステップです。



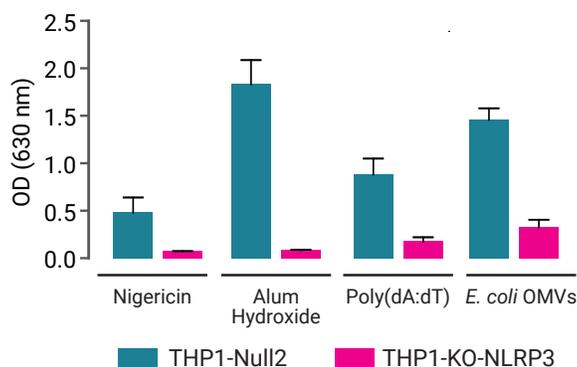
# INFLAMMASOME CELLULAR ASSAYS

InvivoGen 社は、インフラマソーム細胞ベースのアッセイツールを幅広く提供しています。THP-1 ヒト単球細胞は、NLRP3、ASC、プロカスペーゼ-1 を高レベルで発現するため、インフラマソーム研究に広く使用されています。カノニカルおよび非カノニカル応答における特定のインフラマソーム構成分子の役割評価に役立つよう、InvivoGen 社では、NLRP3、ASC、CASP-1、CASP-4、CASP-11、NLRC4、および GSDMD をコードする遺伝子をノックアウト (KO) またはノックダウン (def) した、THP1 由来または RAW264.7 由来の細胞を作製しました。さらに、これらの細胞は、新規治療薬のスクリーニングにおいて対照群として使用することができます。InvivoGen 社の細胞株は、HEK-Blue™ IL-1β センサー細胞株を使用して、生理活性型 IL-1β の放出をモニタリングすることにより、その機能が検証されています (p.17 参照)。

## Monitoring NLRP3-dependent responses

### THP1-KO-NLRP3 Cells

THP1-KO-NLRP3 細胞は、NLRP3 遺伝子の N 末端領域の KO を特徴としており、DNA シーケンシング、PCR、およびウエスタンブロット法によって検証されています。これらの細胞は、不活性な NLRP3 C 末端フラグメントを発現します。したがって、IL-1β 分泌とパイロトーシスは、ニゲリシンまたは水酸化アルミニウムとのインキュベーションで抑制されます (p.12 参照)。さらに、注目すべきことに、IL-1β 分泌は、Poly(dA:dT) による cGAS-STING-NLRP3 インフラマソーム活性化 (p.12 参照)、あるいは大腸菌外膜小胞 (OMVs) による CASP-4/5 インフラマソーム活性化 (p.13 参照) では著しく損なわれません。したがって、THP1-KO-NLRP3 細胞を使用することで、NLRP3 の活性化と他のインフラマソームセンサーの活性化を区別できます。



#### Functional characterization of THP1-KO-NLRP3 Cells.

THP1-KO-NLRP3 cells and their parental cell line, THP1-Null2, were primed with LPS-EK (1 μg/ml) then stimulated with Nigericin (5 μM), Alum Hydroxide (150 μg/ml), transfected Poly(dA:dT) (1 μg/ml), or E. coli OMVs (100 μg/ml). After overnight incubation, IL-1β secretion was assessed using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630 nm.

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-KO-NLRP3 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-konlrp3z
THP1-Null2 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-nullz

## KEY POINT

### NLRP3: AN ATTRACTIVE DRUG TARGET

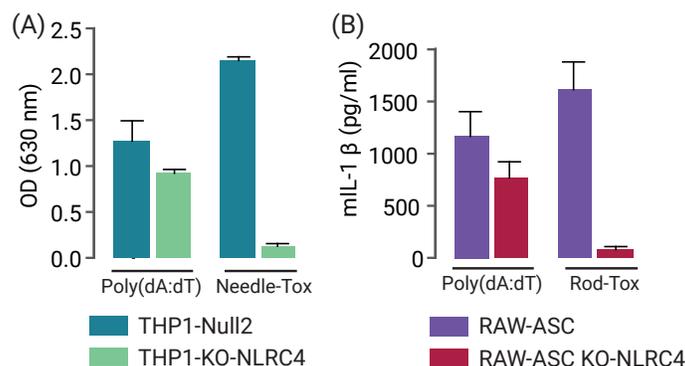
NLRP3 の活性化を媒介する刺激には、さまざまなものがあります。しかしながら、進化により得られたこの感染症と闘う上での利点は、不都合なものにもなり得ます。実際、NLRP3 は、2 型糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD)、痛風性関節炎、アルツハイマー病、がんなどのさまざまな疾患に関連していることから、魅力的な創薬標的になっています [34, 35]。

## Monitoring NLRC4-dependent responses

### THP1-KO-NLRC4 Cells & RAW-ASC KO-NLRC4 Cells

THP1-KO-NLRC4 細胞は、NLRC4 ヌクレオチド結合ドメイン (NDB) の KO により、インフラマソーム構築する NLRC4 タンパク質の重合ができなくなっています (p.9 参照)。

RAW-ASC KO-NLRC4 細胞は、マウス ASC 遺伝子を安定に発現させ (発現させない限り、ASC は RAW264.7 細胞に存在しない [36])、二対立遺伝子型の NLRC4 KO を特徴とします。NLRC4 の欠失は、両細胞株とも、DNA シーケンシング、PCR、およびウエスタンブロット法によって確認されています。THP1-KO-NLRC4 細胞と RAW-ASC KO-NLRC4 細胞は、それぞれ Needle-Tox と Rod-Tox とのインキュベーション時に、IL-1β 分泌とパイロトーシスは阻害されません (p.13 参照)。重要なこととしては、両 KO 細胞株の他のインフラマソーム誘導因子 (例: Poly(dA:dT)) に対する応答はわずかに影響を受けません。



#### Functional characterization of THP1-KO-NLRC4 and RAW-ASC KO-NLRC4 Cells.

(A) THP1-KO-NLRC4 cells and their parental cell line, THP1-Null2, were primed with LPS-EK (1 μg/ml). (B) RAW-ASC KO-NLRC4 cells and their parental cell line RAW-ASC, were primed with Pam3CSK4 (100 ng/ml). (A and B) After priming, the cells were stimulated with Poly(dA:dT) (1 μg/ml), Needle-Tox (4 ng/ml) or Rod-Tox (2 μg/ml). After overnight incubation, the secretion of human or mouse IL-1β was assessed using (A) the HEK-Blue™ IL-1β cell based assay or (B) an ELISA assay, respectively.

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-KO-NLRC4 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-konlrc4z
RAW-ASC KO-NLRC4 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	raw-konlrc4
RAW-ASC Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	raw-asc



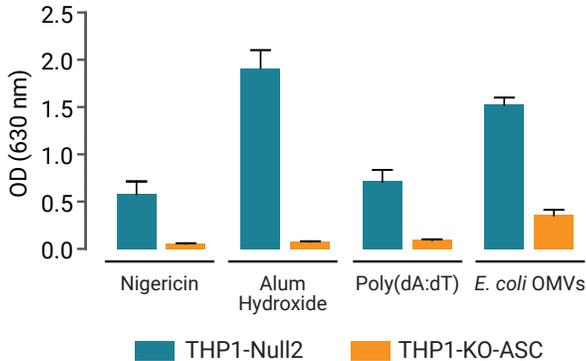
Sharma B. et al. 2019. Methods Mol. Biol. 1682:135-47. Assessing NLRP3 inflammasome activation by nanoparticles.

Jäger E. et al. 2020. Nat. Commun. 11(1):4243. Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome response to calciprotein particles drives inflammation in rheumatoid arthritis.

## Monitoring ASC-dependent responses

### THP1-KO-ASC Cells

THP1-KO-ASC 細胞は、ASC 遺伝子の二対立遺伝子型 KO を特徴としており、DNA シーケンシング、PCR、およびウエスタンブロット法によって確認されています。これらは、インフラマソームがその活性化に ASC を必要とするかどうかを決定する際に使用できます。特に、NLRP3 または CASP-4 誘導因子に対する応答は極めて低くなっています。



#### Functional characterization of THP1-KO-ASC Cells.

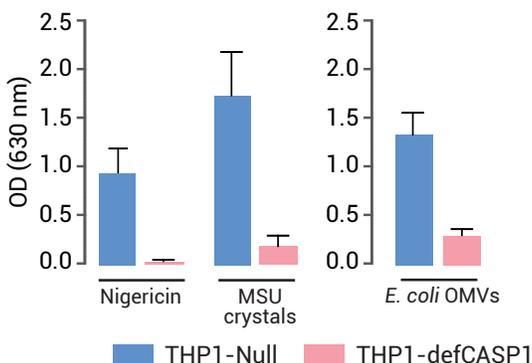
THP1-KO-ASC cells and their parental cell line, THP1-Null2, were primed with LPS-EK (1 µg/ml) and then stimulated with Nigericin (5 µM), Alum Hydroxide (150 µg/ml), transfected Poly(dA:dT) (1 µg/ml), or E. coli OMVs (100 µg/ml). After 24h activation, IL-1β secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630 nm.

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-KO-ASC Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-koascz

## Monitoring CASP-1-dependent responses

### THP1-defCASP1 Cells

THP1-def CASP1 細胞は、THP1-Null の親細胞株と比較して、カスパーゼ -1 の発現が約 1/7 倍に低下し、カスパーゼ -1 による活性が著しく低下します。これらの細胞は、新規のインフラマソーム誘導因子をスクリーニングするための有用なツールです。



#### Functional characterization of THP1-defCASP1 Cells.

THP1-defCASP1 cells and their parental cell line, THP1-Null, were primed with LPS-EK (1 µg/ml) prior to stimulation with Nigericin (5 µM), MSU crystals (250 µg/ml), or E. coli OMVs (100 µg/ml). After 24h activation, IL-1β secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630 nm.

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-defCASP1 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-dcasp1
THP1-Null Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-null

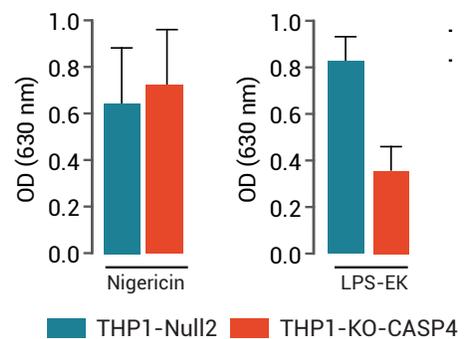
## STUDYING SPECIFIC INFLAMMASOME ACTORS

- ✓ 単球細胞とマクロファージは、免疫防御の最前線にある自然細胞であり、したがって、インフラマソームシグナル伝達の研究にも広く使用されている細胞タイプです。
- ✓ 骨髄由来マクロファージ(BMDMs)は、初代細胞の供給源であり、*in vitro* でさらに分化させることができます。
- ✓ THP-1 細胞株は、NLRP3、ASC、およびプロカスペーゼ -1 を高レベルで発現するヒト単球細胞株です [37]。
- ✓ ノックアウト (KO) とノックダウン (KD) は、特定の遺伝子機能の研究、および別の遺伝子でそれらを補完することが可能かどうかの検討に使用されます。
- ✓ 化学阻害剤は、KO/KD ツールを補完することができます。それらの小分子は、高分子複合体の形成には影響を及ぼさず、タンパク質の機能を遮断します。

## Monitoring CASP-4-dependent responses

### THP1-KO-CASP4 Cells

THP1-KO-CASP4 細胞は、CASP4 遺伝子の二対立遺伝子型 KO を特徴とし、DNA シーケンシング、PCR、およびウエスタンブロット法によって検証されています。期待される通り、NLRP3 誘導因子 (例: ニゲリシン) に対する応答は影響を受けませんが、CASP-4 誘導因子 (例: トランスフェクションした LPS) に対する応答を遮ります。これらの細胞は、CASP4 遺伝子が完全に KO されているにもかかわらず、LPS をトランスフェクションすることで、検出可能なレベルの IL-1β を分泌します。これは、CASP-5 による部分的な KO レスキューに起因する可能性があります。



#### Functional characterization of THP1-KO-CASP4 Cells.

THP1-KO-CASP4 cells and their parental cell line, THP1-Null2, were primed with LPS-EK (1 µg/ml) then stimulated with Nigericin (5 µM; canonical inducer) or transfected LPS-EK (5 µg/ml, non-canonical inducer). After 6h incubation, IL-1β secretion was assessed using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630 nm.

InvivoGen 社は、RAW-ASC 細胞株から作製された RAW-ASC KO-CASP11 細胞も提供しています。これらの細胞は、CASP-11 遺伝子の二対立遺伝子 KO を特徴とし、トランスフェクションした LPS や大腸菌 OMVs などの非カノニカルなインフラマソーム誘導因子に対する応答を不完全なものとします。

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-KO-CASP4 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-kocasp4z
RAW-ASC KO-CASP11 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	raw-kocasp11

# INFLAMMASOME ACTIVATION AND ASSEMBLY



各インフラマソームはそれぞれ、独自のセンサーの活性化とプラットフォーム構築の機序を有しています。

インフラマソームは、「2段階」の活性化モデルに依存しています。しかし、センサーの活性化とプラットフォームの構築の機序は、それぞれのインフラマソームに固有です。センサーは、そのアゴニストに直接結合できる場合もあれば、別の分子に依存する場合もあります。ASCアダプターの存在が構築に必須のインフラマソームもあれば、ASCアダプターが存在しないものや任意的なものもあります。異なる構成分子間の相互作用は、保存された特定のドメインを介して起こります。その多様な活性化・構築戦略は、脅威の程度に釣り合ったタイムリーな応答を可能にするために進化してきたのかもしれない。

## A 'two-step' activation model

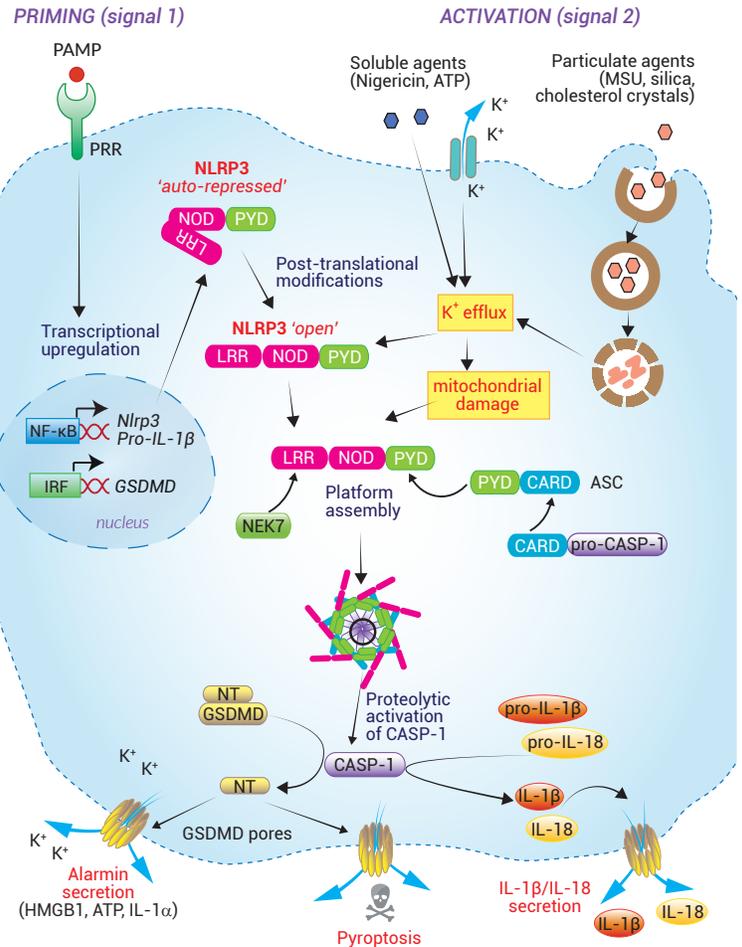
プライミングと活性化という2つのステップは、すべてのインフラマソームに必要です。1つ目のステップのプライミングは、望まない活性化を回避するために必要な制御の一形態と見なすことができます (p.15 参照)。このステップにより、インフラマソーム構築と下流シグナル伝達に必要なタンパク質の転写増強が可能になります。プライミングされると、センサーは、自己抑制を保持したままシグナルに感受的な状態になります。それらは、直接なりガンド結合または間接的な細胞内イベントのいずれかを介して、さまざまな PAMPs または DAMPs によって活性化されます。2つ目のステップである活性化は、プライミングされたセンサーの翻訳後修飾 (PTMs) を誘導し、それによって抑制が解除され、立体構造変化が起こります。これが、センサーのオリゴマー化とインフラマソームプラットフォーム構築の開始点になります。以下では、NLRP3、NLRC4、CASP-11/4/5 インフラマソームそれぞれについての固有の活性化および構築機序について詳しく説明します。

## NLRP3 inflammasome

NLRP3 インフラマソームは、特徴が最もよく解明された典型的なインフラマソームです。とはいうものの、NLRP3 活性化の根底にある正確なメカニズムは、今なお議論の対象となっています [5, 38]。NLRP3 は、構造的にも化学的にも無関係なさまざまな刺激によって活性化されます (p.12 参照)。そういった刺激には、非感染性 (例:尿酸結晶、β-アミロイドタンパク質、コレステロール結晶)、微生物性 (例:膜孔形成毒素、イオンチャネルの活性化因子)、あるいは環境性 (例:アスベスト、シリカ) のものがあります [5]。現在のパラダイムでは、NLRP3 はこれらの分子に直接結合しないと考えられています。むしろ、K<sup>+</sup> 流出 [5, 38]、外在化したミトコンドリア (mt) カルジオリピン、酸化された mtDNA などの下流の細胞質基質内ストレスシグナルを感知すると考えられており、後者2つは、いくつかの報告で「究極の」NLRP3 リガンドであると示唆されています [39-41]。

NLRP3 は、LRR ドメイン、NOD (または NATCH) ドメイン、PYD ドメインの3つのドメインで構成されたタンパク質です (p.4 参照)。NLRP3 は、NOD ドメインと LRR ドメインとの間の内部相互作用により、閉鎖型立体構造で自己抑制されています [42]。NLRP3 は、NOD ドメインでの ATP 結合と加水分解により、開放型立体構造に変化します [43]。さらに、異なる刺激によって、PTMs が各 NLRP3 ドメインの特定位置の残基に起こります [38, 44, 45]。例えば、LPS や Pam3CSK4 などの PRR アゴニストの刺激を受けると、NOD ドメインの S198 で JNK1 を介したリン酸化が起こり、それに続いて NLRP3 の脱ユビキチン化が起こります [44]。LRR ドメインが露出すると、NEK7 (NimA 関連タンパク質キナーゼ7) に結合します。NEK7 は、隣接する NLRP3 サブユニット間の隙間を埋めるために必要な酵素ですが、この相互作用のタイミングと場所については完全には解明されていません [25-27]。NLRP3 の活性化は、インフラマソーム構築を開始させます。NLRP3 の PYD ドメインは ASC を動員し、ASC はその CARD ドメインを介してプロカスペイン-1 に結合します。近接誘導による CASP-1 の自己消化活性化は、細胞表面での GSDMD 膜孔形成を導き、それによって IL-1β/IL-18 およびアラミンの分泌が可能となり、最終的にパイロトーシスを引き起こします [5, 46]。

オルガネラは、NLRP3 インフラマソーム構築で重要な役割を果たします [5, 47]。協調したプライミングと活性化のシグナルは、ミトコンドリア、小胞体 (ER)、およびゴルジ体への NLRP3 インフラマソーム成分の細胞



内局在化を統合します。複数のオルガネラ関連の機序が NLRP3 インフラマソーム構築を調節するかどうかについては、今なお検討が行われています [48]。

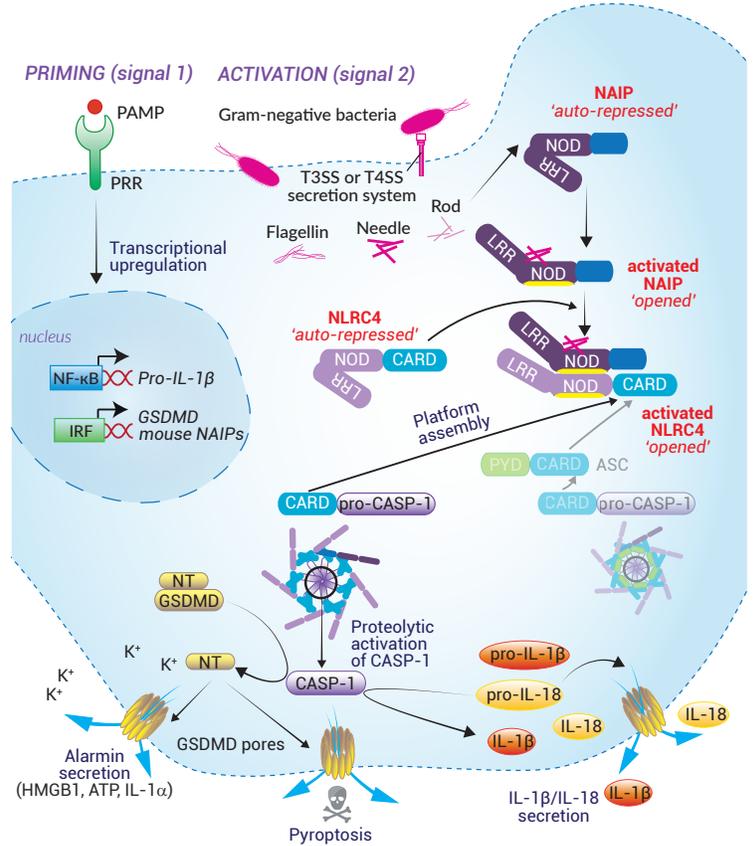
NLRP3 インフラマソームについては、異なるプライミングの機序が説明されています。長時間の TLR 刺激 (> 3 時間) により、新規の NLRP3 分子の NF-κB を介した転写が開始されます [44, 49]。より短い TLR 刺激 (< 1 時間) では、基底レベルで存在する NLRP3 タンパク質の、MyD88 または TRIF を介した PTM が開始される可能性が高くなります [44, 50]。NLRP3 の PTM を介したプライミングは、インフラマソームの即時応答を可能にするように進化したものかもしれません。転写を介したプライミングは、NLRP3 およびエフェクター分子の発現の増加を介して、インフラマソーム応答を強化します。これと一致して、少なくとも *in vitro* では、TLR を介したプライミングはヒト単球細胞における NLRP3 インフラマソーム活性化に不可欠ではないことが、最近の研究により示されました [51]。

重要なこととして、NLRP3 インフラマソームの活性化と構築は、非カノニカルな CASP-11/4/5 インフラマソーム応答によって開始される場合もあります (次頁に続く)。

## NLRC4/NAIP inflammasome

NLRC4 は、運動器由来のフラジェリンなどの細胞内バクテリア分子、あるいは、III型またはIV型バクテリア分泌系(T3SS または T4SS)由来のインナーロッドやニードルタンパク質を感知します(p.13 参照)。より具体的には、NLRC4 は、リガンドに直接結合する NAIP と結合します。ヒトとマウスの NAIP 発現には違いがあります。ヒトでは、単一の NAIP が NLRC4 の上流で作動し、上述の各活性化因子に結合します [7, 52]。このユニークな NAIP には 2 つのアイソフォームが特定されており、異なる親和性でフラジェリンおよび T3SS タンパク質を感知すると報告されています [52]。マウスは複数の NAIPs を発現し、それらは各リガンドに対して異なる親和性を示します。NAIP1 は T3SS ニードルに対して、NAIP2 は T3SS インナーロッドに対して、NAIP5 と NAIP6 はフラジェリンに対して、それぞれ高親和性を示します [8-11]。NAIPs および NLRC4 の転写調節については依然として報告が乏しいところですが、マウス NAIPs の基底発現は、少なくとも IRF8 に依存することが最近発見されました [53]。

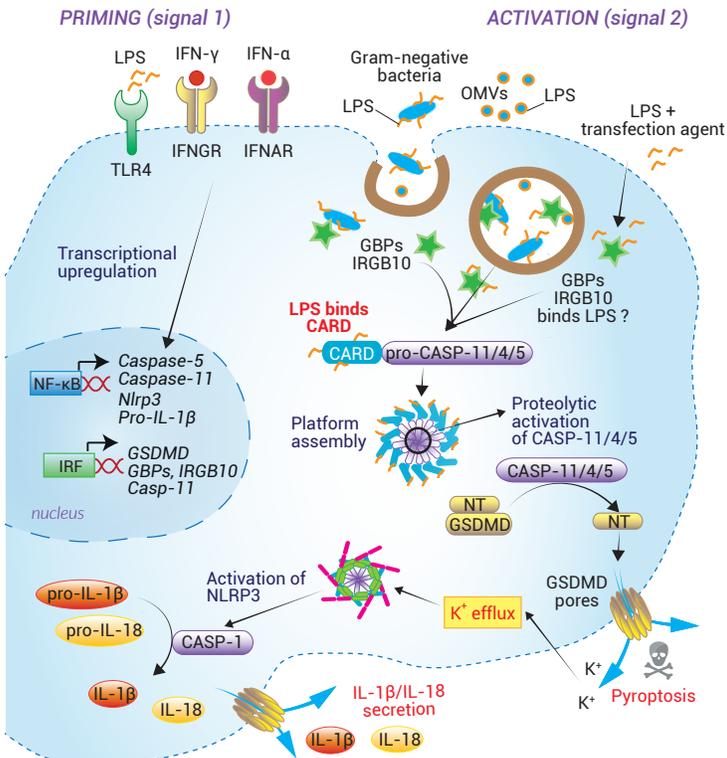
NAIPs と NLRC4 は、類似した LRR ドメインと NOD ドメインを共有しており、LRR は自己抑制状態に必要とされます [8, 54-56]。NLRC4 は、CARD ドメインも備えています(p.4 参照)。NOD 領域で NAIP にリガンドが結合すると、NAIP の自己抑制が解除され、NOD ドメインが露出されます [55]。そして、活性化された NAIP は、NOD-NOD 相互作用を介して NLRC4 プロトマー 1 つを動員し、NLRC4 を開放状態にさせます。活性化された NLRC4 は、新しく露出した NOD 表面を使用して、ドミノ式の反応で追加の NLRC4 分子と結合し、インフラマソームプラットフォームを構築します [56]。NLRC4 の重合反応は、NLRC4 の CARD ドメインのクラスター化から生じます。そして、NLRC4/NAIP 複合体は、CARD-CARD 直接相互作用を介して、あるいは ASC アダプターを介して、プロカスペーゼ-1 と結合します [15, 56]。



## CASP-11 & CASP-4/5 non-canonical inflammasomes

マウス CASP-11 およびヒト CASP-4/5 は、センサー分子とエフェクター分子の両方として機能するため、非カノニカルなインフラマソームを構築します。CASP-11 は、グラム陰性菌感染時、細胞表面 LPS 受容体である TLR4 とは無関係に、細胞内 LPS を感知することがマウスで最初に示されました [57, 58] (p.13 参照)。CASP-11 および CASP-4/5 は、GSDMD を介した細胞死および CASP-1 依存性の IL-1β/IL-18 分泌を促進します [22]。

CASP-11/4/5 の CARD ドメインは、LPS 認識と、自己触媒サブユニットの活性化に必要とされるカスパーゼオリゴマー化の両方を媒介します [29]。こうして活性化されたカスパーゼは GSDMD を切断し、最終的にパイロトーシスを誘導します。CASP-11/4/5 は、CASP-1 とは異なり、pro-IL-1β と pro-IL-18 を切断して成熟型にすることはありません [59]。原形質膜で GSDMD 膜孔が形成されると、ストレスシグナルとして作用する細胞質基質成分が放出されます。K<sup>+</sup> の流出は、NLRP3 インフラマソーム構築と、CASP-1 を介した IL-1β/IL-18 分泌を誘導します [38, 60]。CASP-11/4/5 活性化の根底にある正確なメカニズムの解明には、構造学的研究が求められます。



細胞外 LPS は、バクテリア OMVs の細胞内取込み (p.13 参照) または細胞内バクテリアの溶解を経て、細胞質基質へのアクセスを獲得します [57, 61]。後者のイベントには、グアニル酸結合タンパク質 (GBPs) およびインターフェロン応答遺伝子 B10 タンパク質 (IRGB10) が関わります。GBPs はファゴソーム膜に蓄積し、バクテリア産物 (DNA, LPS など) の細胞質基質内への放出を促進します [62]。それらは、IRGB10 を動員することによって、細胞内バクテリア膜透過に関与します [63]。GBPs は、CASP-11 と、LPS の疎水性リポド A 部分との相互作用を促進することも示唆されています [64]。

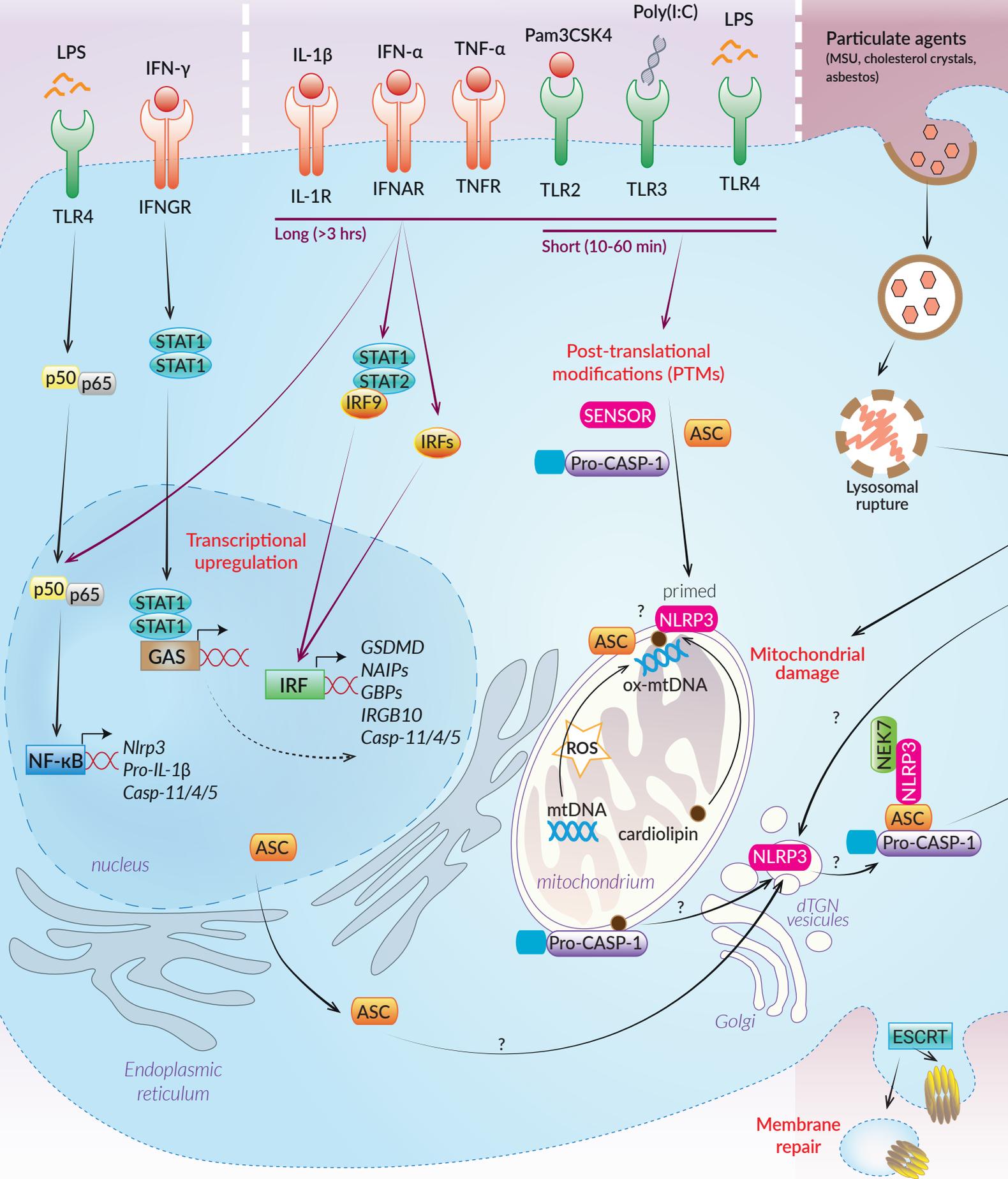
ヒト CASP-4/5 およびマウス CASP-11 の基底発現は細胞タイプによって異なり、さまざまな TLR アゴニスト (例: LPS, Pam3CSK4) やインターフェロン (IFN-β および IFN-γ) によるプレプライミング時に発現増加します [22, 65-67]。同様に、GBPs と IRGB10 は、インターフェロンによって転写調節されています [67]。

ヒトで CASP-11 様タンパク質が 2 種類存在することは、CASP-4 と CASP-5 も冗長化する機能を持っているのではないかと疑問を提起します。In vitro 実験により、CASP-5 は、トランスフェクションした LPS への応答に対してわざわざ必要とされるだけですが、ネズミチフ菌感染では必須であることが示唆されています [68]。In vivo でのバクテリア感染時の CASP-4 および CASP-5 の正確な寄与については、さらなる研究が必要です。

# INFLAMMASOME ACTIVATION & RESPONSES AT A GLANCE

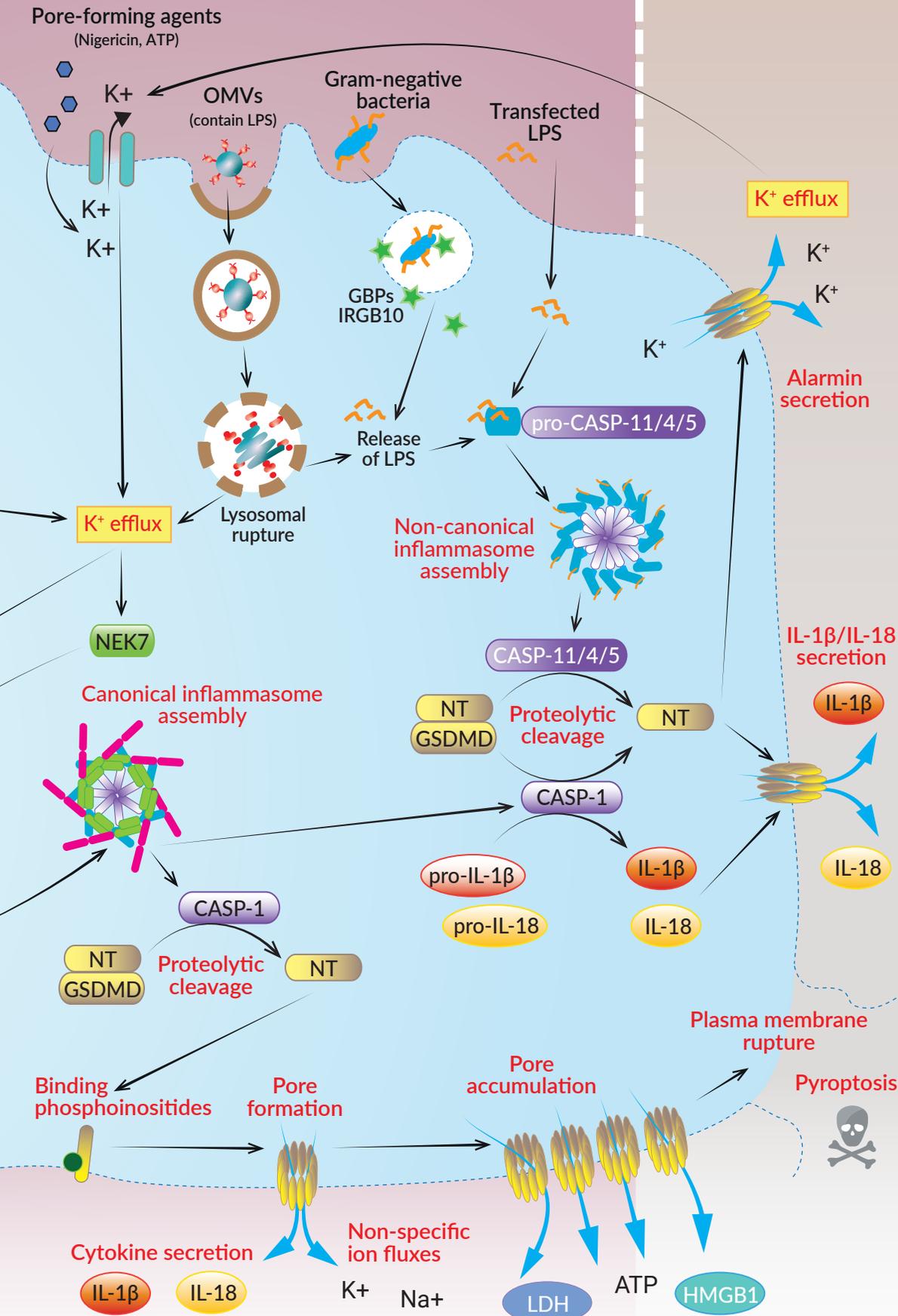
**PRE-PRIMING**  
(for non-canonical inflammasomes)

**PRIMING (signal 1)**

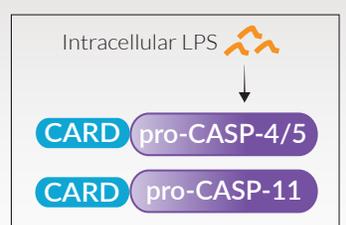
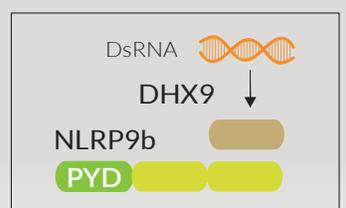
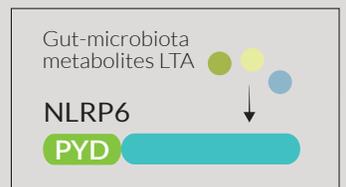
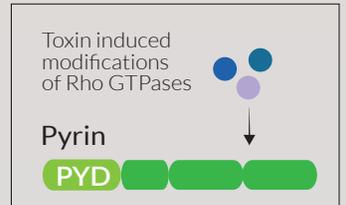
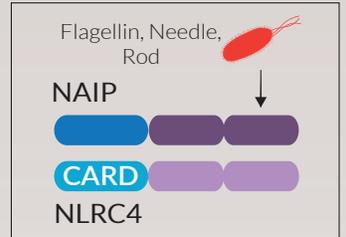
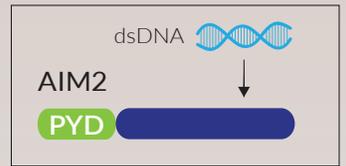
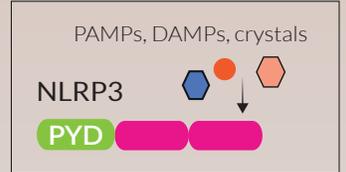
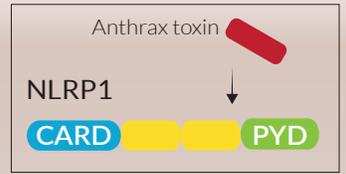


## ACTIVATION (signal 2)

## OUTCOMES



## OVERVIEW OF INFLAMMASOME SENSORS AND ACTIVATORS



# INFLAMMASOME INDUCERS



インフラマソームは、多様な微生物性または非感染性の危険シグナルによって活性化されます。微生物は、プライミングと活性化の両方のシグナルを提供する複数の PRRs によって感知される、多様な PAMPs の供給源です(例えば、グラム陰性菌は、LPS、dsDNA、フラジェリン、および毒素を運達できます)。非感染性の危険シグナルは、ATP や、痛風の原因となる MSU 結晶といった自己起源のシグナル、あるいはアルミニウム塩やアスベストなどの非自己起源のシグナルのいずれかが該当します。InvivoGen 社は、機能的に検証済みで、かつエンドトキシン試験済みのインフラマソーム誘導物質の豊富なコレクションを提供しています。

微生物性または非感染性のインフラマソーム誘導物質は、ワクチンアジュバントの開発において大きな関心を集めています。

## Canonical inflammasome inducers

### ATP

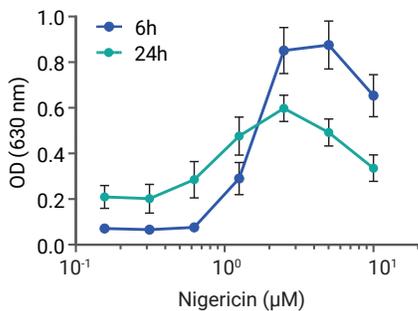
細胞外のアデノシン三リン酸(ATP)は、P2X7R プリン作動性受容体に結合すると、NLRP3 インフラマソームの活性化を開始させます。この ATP 依存性イオンチャンネルが急速に開放されると、細胞内 K<sup>+</sup> の流出が起こります。このことは、NLRP3 活性化の誘導に必要な最小限の細胞内イベントであると提案されています [2, 69-71] (p.8 参照)。

### Nigericin

ニゲリシンは、グラム陽性菌ストレプトミセス・ヒグロスコピクス (*S. hygroscopicus*) に由来する微生物毒素です。これは、NLRP3 インフラマソームの活性化に反応した IL-1 $\beta$  の放出を誘導します [2]。この毒素はおそらく、膜透過による細胞内 K<sup>+</sup> 流出を可能にするイオノフォア機能を介して、NLRP3 を活性化します [70]。ニゲリシン処理時の NLRP3 活性化において、非選択的パネキシン-1 の膜孔形成も寄与するかどうかについては、未だ不明です [34]。

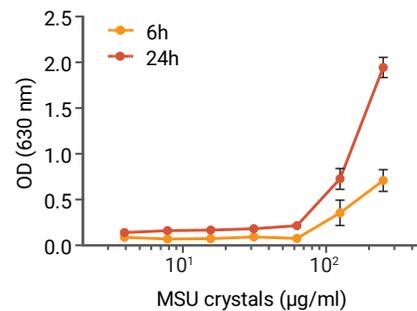
#### Induction of IL-1 $\beta$ secretion by monocytes upon treatment with Nigericin.

Human THP-1 monocytes were primed with LPS-EK (1  $\mu$ g/ml) prior to incubation with increasing concentrations of Nigericin. After 6h and 24h activation, IL-1 $\beta$  secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630nm.



### MSU & CPPD crystals

関節や関節周囲組織に沈着した MSU(尿酸-ナトリウム)および CPPD(ピロリン酸カルシウム二水和物)の結晶は、それぞれ痛風および偽痛風炎症状態を引き起こすことがあります。MSU および CPPD の結晶は、NLRP3 インフラマソームの非感染性内因性誘導因子であると説明されています [3]。粒子状物質の貪食後に起きるリソソーム破裂は、K<sup>+</sup> 流出を引き起こし、それに続いて NLRP3 が活性化されることが示されています [70]。



#### Induction of IL-1 $\beta$ secretion by monocytes upon treatment with MSU crystals.

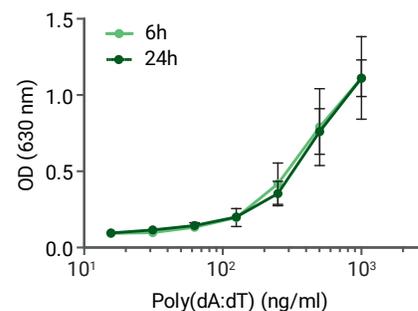
Human THP-1 monocytes were primed with LPS-EK (1  $\mu$ g/ml) prior to incubation with increasing concentrations of MSU crystals. After 6h and 24h activation, IL-1 $\beta$  secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630nm.

### Alum Hydroxide

水酸化 alum はアルミニウム塩(または Alum)の一種で、NLRP3 インフラマソームの強力な誘導剤です [38]。MSU および CPPD の結晶と同様に、水酸化 alum はリソソームの不安定化および K<sup>+</sup> 流出によって NLRP3 を活性化すると考えられています [70]。

### Poly(dA:dT)

Poly(dA:dT) は、poly(dA-dT):poly(dT-dA) の合成二本鎖反復 DNA シーケンスです。このマルチ PRR アゴニストは、マウスマクロファージにおいて AIM2 インフラマソームを誘導します [20]。ヒト骨髄系細胞では、AIM2 は細胞質基質内の dsDNA への応答において、cGAS-STING-NLRP3 経路と冗長的であるようです [21] (p.6 参照)。



#### Induction of IL-1 $\beta$ secretion by monocytes upon transfection with Poly(dA:dT).

Human THP-1 monocytes were primed with LPS-EK (1  $\mu$ g/ml) prior to transfection with increasing concentrations of Poly(dA:dT). After 6h and 24h activation, IL-1 $\beta$  secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630nm.

## TIPS

### INDUCING INFLAMMASOME ACTIVATION

MSU 結晶や水酸化 alum などの粒子状インフラマソーム誘導因子は凝集する傾向があります。この誘導因子を細胞上で均一に分布させるため、短時間の超音波処理(バス型またはプローブ型ソニケーターを使用)を施し、凝集体を解離させることをお勧めします。

最適な刺激時間は、誘導因子ごとに異なります。例えば、ニゲリシンと ATP は、1~6 時間以内にインフラマソーム活性化を強く誘導します。一方、粒子状刺激の多くおよび病原体は、細胞とのより長時間のインキュベーションが必要です。

IL-1 $\beta$  または細胞死を評価する際の最小刺激時間を特定するため、インフラマソーム誘導因子ごとに経時変化実験を行うことをお勧めします。

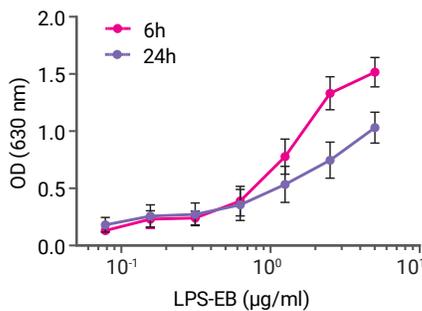
## LFn-Needle & LFn-Rod

細胞内バクテリアに由来する III 型または IV 型分泌系 (T3SS または T4SS) の成分は、**NLRC4/NAIP** インフラマソームの誘導因子です (p.9 参照)。InvivoGen 社は、それぞれバークホルデリア・タイランデンシス (*B. thailandensis*) とネズミチフス菌の T3SS から得たニードルおよびインナーロッド様タンパク質を提供しています。これらのタンパク質は、炭疽菌致死因子の N 末端ドメイン (LFn) に融合しています。炭疽菌防御抗原 (PA) を **LFn-Needle** または **LFn-Rod** と組み合わせさせたものは、それぞれ **Needle-Tox** または **Rod-Tox** と呼ばれます [10]。PA は、LFn-Needle および LFn-Rod の細胞質基質への移行を可能にします。

## Non-canonical inflammasome inducers

### LPS-EK & LPS-EB

グラム陰性菌由来のリポポリサッカライド (LPS) は、哺乳類細胞の細胞質基質に存在する場合、**CASP-11/4/5** インフラマソームの活性化を誘導します (p.9 参照)。LPS は、リピド A と言われる特定の炭水化物 - 脂質部分によってバクテリアの外膜に固定された多糖領域で構成されています (エンドトキシンとしても知られています)。CASP-11/4/5 の活性化に影響を与えるリピド A の脂肪アシル鎖の数は、バクテリア種ごとに異なっています。**LPS-EK** (R 型 LPS) および **LPS-EB** (S 型 LPS) は、大腸菌から産生され、トランスフェクション時にヒト CASP-4/5 およびマウス CASP-11 の両方を強力に活性化する、保存されたヘキサアシル型 (6 脂肪酸鎖) リピド A を特徴としています。



#### Induction of IL-1β secretion by monocytes upon transfection with LPS-EB.

Human THP-1 monocytes were primed with LPS-EK (1 μg/ml) prior to transfection with increasing concentrations of LPS-EB. After 6h and 24h activation, IL-1β secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells and the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 630 nm.



Tweedell R.E. *et al.*, 2020. Nat. Protocols. 15(10):3284-3333. A comprehensive guide to studying inflammasome activation and cell death.

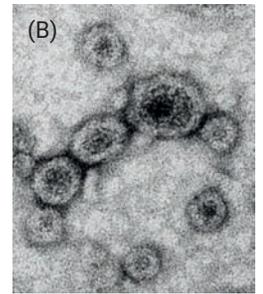
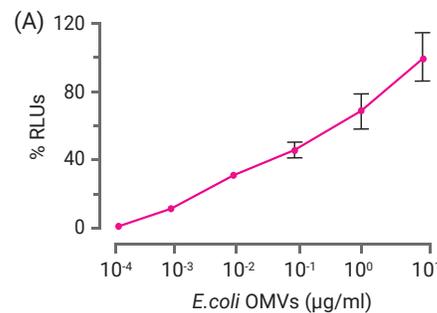
Jain A. *et al.*, 2020. Nat. Immunol. 21:65-74. T cells instruct myeloid cells to produce inflammasome-independent IL-1β and cause autoimmunity.

Zheng M. *et al.*, 2020. Cell. 181:674-687.e13. Caspase-6 Is a Key Regulator of Innate Immunity, Inflammasome Activation, and Host Defense.

Samir P. *et al.*, 2019. Nature. 573:590-594. DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome.

### E. coli outer membrane vesicles (OMVs)

外膜小胞 (OMVs) は、大腸菌などのグラム陰性菌によって産生される小型の免疫原性の球状の二層体です。これらは、LPS などの多くの PAMPs を含んでいます。大腸菌 OMVs は、哺乳類細胞によって自然にエンドサイトーシスされるため、トランスフェクション試薬を利用することなく LPS を細胞質基質に効果的に送達するために使用できます。これらは、**CASP-11/4/5** インフラマソームの構築を開始させます。InvivoGen 社の大腸菌 OMVs は、*E. coli* BL21 から産生されています。



#### (A) Functional characterization of E. coli OMVs.

THP1-HMGB1-Lucia™ cells (see page 16) were incubated with increasing concentrations of *E. coli* OMVs. After 24h activation, secretion of HMGB1 was assessed by measuring the Lucia luciferase activity in the culture supernatant using QUANTI-Luc™ detection reagent.

(B) Image of InvivoGen's *E. coli* OMVs by transmission electron microscopy (80 kV).

## KEY POINT

### DIFFERENTIAL CASPASE 11/4/5 ACTIVATION BY VARIOUS LPS STRUCTURES

CASP-11 は、保存されたヘキサアシル型 (6 脂肪酸鎖) リピド A を持つ、ネズミチフス菌および大腸菌由来の LPS によって強力に活性化されますが、ピロリ菌およびロドバクター・スフェロイデス (*R. sphaeroides*) 由来のテトラアシル型 (4 脂肪酸鎖) LPS ではほとんど活性化されません [22, 23, 57]。

それに対し CASP-4 は、ヘキサアシル型 LPS に加えて、さまざまなバクテリア種由来の低アシル型リピド A を感知することが報告されており、マウス由来のものに比べて幅広い活性を示すと考えられます [71]。

(同じ種の) バクテリア株は、S 型 LPS または R 型 LPS のいずれかを示し、O 抗原が存在していれば S 型、存在していなければ R 型と区別されます。現在のところ、O 抗原が非カノニカルなインフラマソーム応答に影響を及ぼすというエビデンスはありません [72]。

PRODUCT	INFLAMMASOME	QTY	CAT. CODE
Alum Hydroxide	NLRP3	500 μl	tlrl-aloh
ATP		1 g	tlrl-atpl
MSU Crystals		5 mg	tlrl-msu
Nigericin		10 mg	tlrl-nig
Poly(dA:dT)	AIM2	200 μg	tlrl-patn
LFn-Needle	NLRC4	5 μg	tlrl-ndl
LFn-Rod		50 μg	tlrl-rod
LPS-EB Ultrapure ( <i>E. coli</i> O111:B4)	CASP-11/4/5	5 x 10 <sup>6</sup> EU	tlrl-3pelps
LPS-EK Ultrapure ( <i>E. coli</i> K12)		1 mg	tlrl-pek1ps
<i>E. coli</i> OMVs		100 μg	tlrl-omv-1

# PYROPTOSIS AND GASDERMIN D

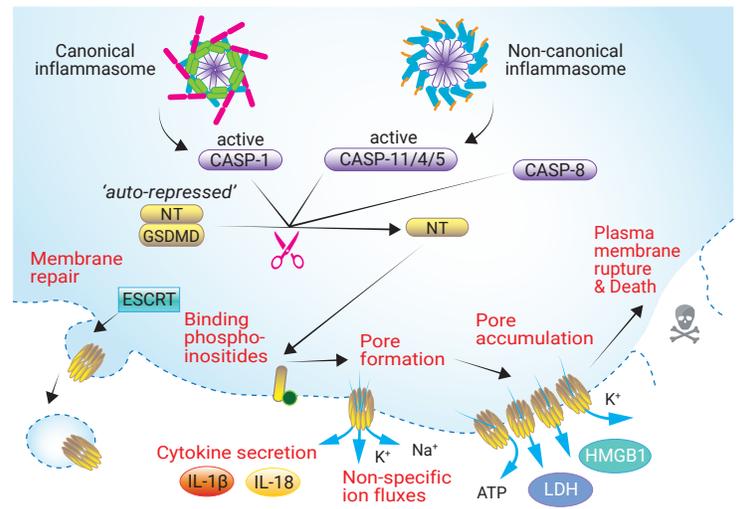
**ガ**スダーミン D (GSDMD) は、カノニカルおよび非カノニカルの両インフラマソームの重要な下流エフェクターです。GSDMD は CASP-1、CASP-4、CASP-5、および CASP-11 によって切断され、脂質膜に膜孔 (ポア) を形成する N 末端ドメインを放出し、最終的にはパイロトーシス細胞死を引き起こします。

GSDMD (別名: DFNA5L、FKSG10) は、ヒトでは 6 種類、マウスでは 10 種類のメンバーで構成される膜孔形成タンパク質ファミリーに属しています。これらには、GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD、GSDME、PJVK が含まれます [73]。GSDMD は、ヒト組織および種々の免疫細胞で広く発現します。この細胞質基質内タンパク質は、2 つの異なるドメインを持ち、中央部にリンカー領域を有します。C 末端ドメインは、N 末端ドメイン (GSDMD-NT) に結合することによって自己抑制機能を発揮します。活性化されたカノニカルまたは非カノニカルなインフラマソームに結合したカスペーゼが、リンカー内でタンパク質を分解切断することで、GSDMD-NT が放出されます [29, 59, 74]。この機能ドメインは原形質膜に移動し、オリゴマー化して内径約 18nm の膜孔を形成します [31]。これらの膜孔は、可溶性の細胞質基質成分 (IL-1β および IL-18 など) や、非特異的イオン (Na<sup>+</sup> 流入、K<sup>+</sup> 流出) の通過を可能にします [31, 59, 75]。

原形質膜で GSDMD 膜孔が蓄積すると、パイロトーシスと呼ばれる、特徴がよく明らかにされた形態の制御された細胞死を引き起こします。パイロトーシスを起こした細胞は、細胞の膨張や泡状のヘルニア形成などの特徴的な形態変化を示し、最終的には原形質膜破裂 (PMR) を引き起こします。PMR は、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH; PMR の標準マーカー) や HMGB1 (p.5 参照) などの大型の細胞質基質内分子を細胞外空間に放出することを可能にします [75]。

GSDMD の膜孔形成は、高度に制御されたプロセスです。事実、これは、病的炎症を引き起こす可能性のある不適切なあるいは過度のパイロトーシスを防ぐために極めて重要です。GSDMD の発現は静止状態では低く、プライミングの段階で転写調節されます [76]。GSDMD は、活性化型 CASP-1 または CASP-11/4/5 によって切断されるまで、自己抑制状態を維持しています [74]。興味深いことに、CASP-8 も GSDMD を切断して活性化することが示されている一方で [77]、CASP-3 は GSDMD-NT を不活性フラグメントに切断することで膜孔形成を制限できます [78]。GSDMD-NT は、原形質膜の内葉にのみ存在する脂質 (すなわち、ホスホイノシチド) を好んで標的とするため、細胞内からのみ細胞死を媒介することができます [31]。

通常、GSDMD の膜孔形成はパイロトーシスへと至りますが、複数の細胞型 (マクロファージ、樹状細胞、好中球など) は、生理活性のある IL-1



β を放出し、生存を維持できます [79, 80]。これらの細胞は、膜修復メカニズムを使用してパイロトーシスを予防または遅延させます。このメカニズムは、ESCRT (エンドソーム輸送選別複合体)-III 機構によって媒介され、損傷した膜を包含する小胞のエクソサイトーシスによって GSDMD の膜孔を取り除きます [80]。GSDMD の膜孔を解体または破壊できるメカニズムが他に存在するかどうかは、依然として不明です。

GSDMD は、ヒトの炎症性疾患治療に対する魅力的な標的になっています。GSDME や GSDMA3 などの他の GSDM ファミリーメンバーも、ヒトの疾患に関わっている可能性があります。これらのタンパク質の機序および調節についてより包括的に検討を進めることは、GSDM を標的とする治療法の開発に役立つことでしょう。

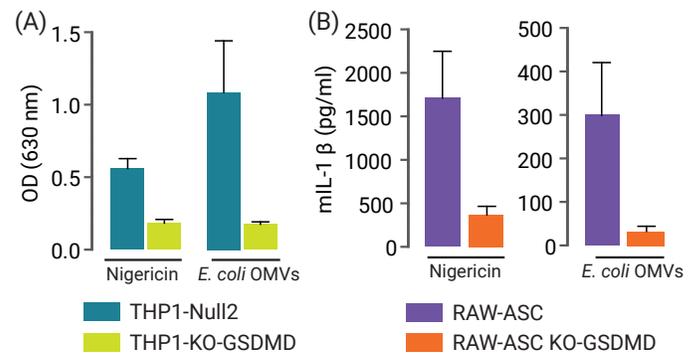
## GASDERMIN D CELLULAR ASSAY

### Monitoring GSDMD-dependent responses

#### THP1-KO-GSDMD Cells & RAW-ASC KO-GSDMD Cells

THP1-KO-GSDMD および RAW-ASC KO-GSDMD 細胞は、それぞれヒト単球細胞 THP-1 およびマウスマクロファージ RAW264.7 に由来し、安定した ASC 発現を示します。これらは、GSDMD 遺伝子の二対立遺伝子ノックアウトを特徴としています。これらの細胞は、カノニカル (例: ニゲリシン誘導) および非カノニカル (例: 細胞質基質 LPS (OMVs) 誘導) の初期のインフラマソーム活性化時に、IL-1β 分泌およびパイロトーシスの阻害を示します。

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-KO-GSDMD Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-kogsdmdz
RAW-ASC KO-GSDMD Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	raw-kogsdmd



**Functional characterization of THP1-KO-GSDMD and RAW-ASC KO-GSDMD Cells.** THP1-Null2 parental and THP1-KO-GSDMD cells (A) or RAW-ASC parental and RAW-ASC KO-GSDMD cells (B) were primed with LPS-EK or Pam3CSK4, prior to stimulation with Nigericin (5 μM) or E. coli outer membrane vesicles (OMVs) (100 μg/ml). After 6h activation, human IL-1β secretion was assessed in the culture supernatant using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells (see page 7) (A). Murine IL-1β secretion was assessed in the culture supernatant using an ELISA assay (B).

## INFLAMMASOME REGULATION

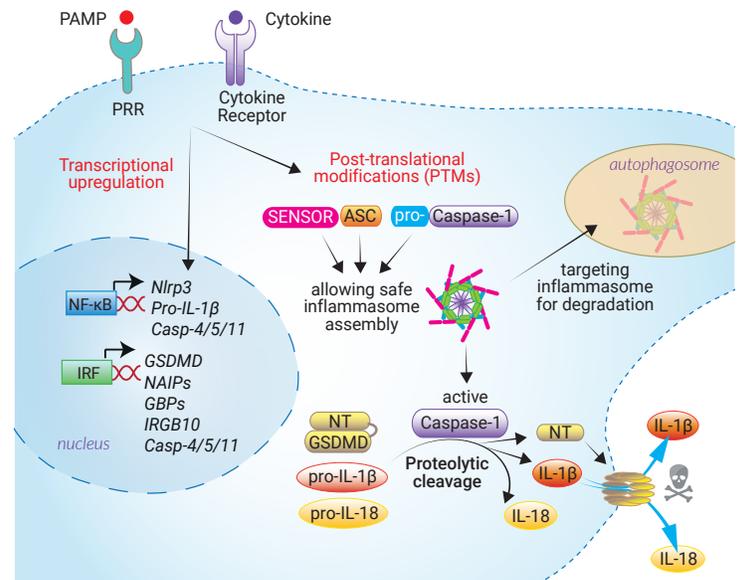
インフラマソームは、炎症性サイトカインおよびアラミンの放出、ならびにパイロトーシス細胞死を介して作用する迅速で強力な免疫防御を構成します。これらのイベントは、その後の獲得免疫応答を形成しながら、損傷の境界外に広がらないようにきめ細かく調整されなければいけません。したがって、インフラマソームを厳格に制御することは、望ましくない活性化を防ぎ、隣接する組織の付随的損傷を制限しながら、適切な免疫防御を保証することにつながります。インフラマソーム応答のすべてのステップには、多層の保護手段が存在しています。

インフラマソーム調節の複雑さは、主に、関与する分子の多様性にに基づいています。実際、インフラマソームは、センサー分子 (NLRP3、NLRC4、NAIPs など)、アダプターおよび足場タンパク質 (ASC、NEK7 など)、炎症性カスパーゼ (CASP-1 および CASP-11/4/5)、膜孔形成タンパク質 (GSDMD など)、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  および IL-18)、およびアラミン (IL-1 $\alpha$  など) に依存しています (p.4 ~ 5 参照)。各構成分子は、ゲノムレベルおよびタンパク質レベルで、さまざまな程度に制御されます。

プライミングのステップ (p.8 参照) により、基底発現の低いインフラマソーム成分およびエフェクターの転写増強が可能になります [4, 67]。PRR アゴニストは、転写因子、主に NF- $\kappa$ B とインターフェロン制御因子 (IRFs) の活性化を開始させる主要なプライミング剤です (以下参照) [67]。例えば、NLRP3 とピリンの発現は NF- $\kappa$ B によって媒介され、マウス NAIPs の発現は IRF8 に依存します。ASC アダプターと CASP-1 の転写調節は未だ十分に理解されておらず、さらなる研究が必要です。非カノニカルな炎症性 CASP-11/4/5 は、細胞の種類に応じて異なる発現の増加が示されます (p.9 参照)。膜孔形成性 GSDMD (p.14 参照)、ならびに膜透過性タンパク質 GBPs および IRGB10 (p.9 参照) の発現は、それぞれ IRF1/2 および IRF1 に依存します。IL-1 $\alpha$  アラミンと、サイトカインチモーゲン pro-IL-1 $\beta$  および pro-IL-18 サイトカインの誘導性発現は、複数の転写因子に依存しているようですが、詳細については未だ調査が続いています。ただし、pro-IL-1 $\beta$  については転写増強が必須であることが認識されています。

インフラマソーム構成分子は、リン酸化、ユビキチン化、脱ユビキチン化、およびタンパク質分解切断などの翻訳後修飾 (PTMs) によっても制御されます [44, 81]。PTMs は、異なる刺激 (PRR アゴニストやインフラマソームセンサー誘導因子など) によって開始され、同じ構成分子の特定の残基で起こり、異なる結果をもたらします。これは、NLRP3 について最も広範に説明されていますが、ASC、CASP-1、pro-IL-1 $\beta$  などの他の構成分子も PTMs の影響を受けます [44, 81]。特に、PTMs に依存した調節機能は、インフラマソームプラットフォームの構築に必要な、安全な立体構造変化を保証します。さらに、CASP-1 および CASP-11/4/5 の自己活性化、pro-IL-1 $\beta$ /IL-18 の生理活性型への変換、および

GSDMD の N 末端膜孔形成ドメインの放出には、タンパク質の分解切断が必要です。PTMs による他の調節機能は、応答の終了 (例えば、構築されたインフラマソームのオートファゴソームへの送達誘導) について説明されています [45, 84, 85]。PTMs はインフラマソーム応答の複数のステップを支配し、酵素活性に依存しているため、炎症性病理に関与するインフラマソームの調節に対する魅力的な治療標的として注目されるようになってきました。



## PRIMING AGENTS

### LPS

リポポリサッカライド (LPS) は、大腸菌などのグラム陰性菌の外膜の主成分であり、自然免疫系の強力な誘導因子です。これは、CD14 および MD-2 と複合体を形成する TLR4 によって細胞表面で認識され、NF- $\kappa$ B および IRF3 転写因子の活性化 [83]、ならびに炎症誘発性サイトカインおよび I 型インターフェロンの産生にそれぞれつながるシグナル伝達カスケードを開始させます。ホルボール 12- ミリスレート 13- アセテート (PMA) を用いて分化させたマクロファージを、PMA 処理後約 1 週間 LPS でプライミングすると、高いバックグラウンド応答を回避できます。

### Poly(I:C)

ポリイノシン - ポリシチジル酸 (Poly(I:C)) は、ウイルス感染に関連する PAMP である二本鎖 RNA (dsRNA) の合成類似体です。Poly(I:C) は TLR3 だけでなく、RIG-I/MDA5 および PKR も活性化し、それによって炎症性 NF- $\kappa$ B および IRF 経路を介したシグナル伝達を誘導します [84, 85]。

### Pam3CSK4

Pam3CSK4 (または Pam3CysSerLys4) は、細菌の細胞壁に見られるリポペプチドのアシル化アミノ末端の合成模倣物です。Pam3CSK4 は TLR2 の強力な活性化因子であり、TLR2 は TLR1 と協同して NF- $\kappa$ B の活性化を誘導します [86]。高いバックグラウンド応答を回避するため、RAW264.7 由来のマクロファージのプライミングには Pam3CSK4 を使用することをお勧めします。

ヒト CASP-4/5 およびマウス CASP-11 の非カノニカルインフラマソームの発現を誘導するには、インターフェロン- $\gamma$  によるプレプライミングを強くお勧めします (p.9 参照)。

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
LPS-EK Ultrapure ( <i>E.coli</i> K12)	5 mg	tlrl-peklps
Pam3CSK4	1 mg	tlrl-pms
Poly(I:C) HMW	10 mg	tlrl-pic

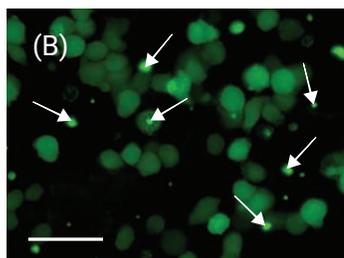
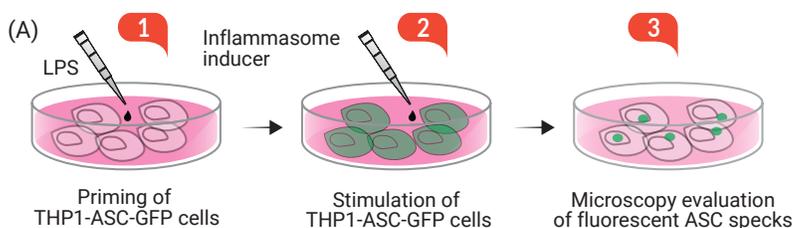
# ASSESSING INFLAMMASOME ACTIVATION

インフラマソームの活性化は、ASC スペック形成、パイロトーシス細胞死の誘導、および生理活性型 IL-1 $\beta$ /18 サイトカインやアラミン HMGB1 の分泌など、特徴的なイベントを引き起こします。これらの重要なイベントを評価するため、InvivoGen 社は、インフラマソーム活性化の *in vitro* 研究で最も汎用されるモデルであるヒト THP-1 単球細胞株、およびレポーターシステムに広く使用されているヒト HEK293 胎児腎細胞株に由来する細胞ツールを開発しました。

## Monitoring ASC-specks in real-time

### THP1-ASC-GFP Cells

THP1-ASC-GFP 細胞では、生細胞の ASC スペック形成を蛍光顕微鏡によって可視化できます。この細胞は、NF- $\kappa$ B 依存的に ASC::GFP 融合タンパク質を安定に発現します。Poly(dA:dT) などの誘導因子による刺激時のインフラマソーム活性化は、蛍光 ASC スペックの凝集を追跡することによって解析することが可能で、この際インフラマソーム応答は影響を受けません。



Visualization of ASC speck formation by fluorescence microscopy.

A. Procedure for inducing ASC::GFP expression in THP1-ASC-GFP cells. B. ASC speck visualization in THP1-ASC-GFP cells after priming with 1  $\mu$ g/ml LPS-EK for 3 h, and activation with 250 ng/ml Poly(dA:dT) for 1 to 3 h. In most cells, only one speck forms upon inflammasome activation (arrows). Scale bar: 50  $\mu$ m.

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-ASC-GFP Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-ascgfp

## TIPS

### EVALUATION OF INFLAMMASOME ACTIVATION

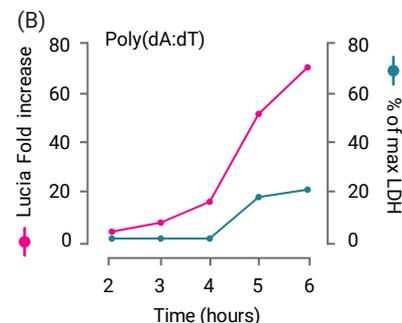
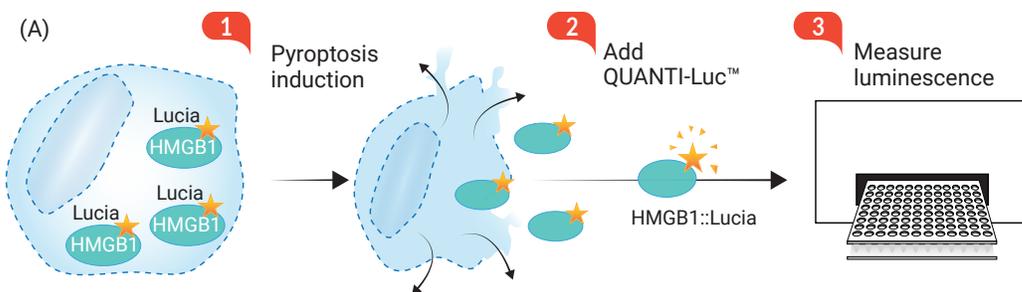
- ✓ RT-qPCR 法を用いて、プライミング時の pro-IL-1 $\beta$  および NLRP3 の NF- $\kappa$ B 誘導性の発現増加を測定
- ✓ 蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリー法を用いて、改変細胞株での ASC スペック形成を観察
- ✓ ウェスタンブロット法を用いて、カスパーゼ -1 切断または pro-IL-1 $\beta$ /IL-18 の成熟を測定
- ✓ ELISA 法を用いて、IL-1 $\beta$ 、IL-18、または HMGB1 の放出を評価
- ✓ 乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイまたはヨウ化プロピジウム染色法を用いて、パイロトーシス細胞死を測定
- ✓ レポーター細胞株を用いて、IL-1 $\beta$  または IL-18 分泌を検出

これらの解析法にはそれぞれ長所と短所があります。したがって、インフラマソームの活性化を適切に評価するには、これらの方法を組み合わせて使用することをお勧めします。

## Monitoring pyroptotic cell death

### THP1-HMGB1-Lucia™ Cells

THP1-HMGB1-Lucia™ 細胞は、パイロトーシスを定量するための頑健かつ簡便なツールであり、従来の LDH アッセイの代替手段となります。これは、発光レポーター Lucia ルシフェラーゼに融合した HMGB1 アラーミンが細胞溶解によって放出されるのを測定することに依るものです。THP1-HMGB1-Lucia™ 細胞は、LPS でプライミングし、Poly(dA:dT) などのインフラマソーム誘導物質で処理すると、パイロトーシスを起こして HMGB1::Lucia を細胞外環境に放出します。上清中の HMGB1::Lucia のレベルは、QUANTI-Luc™ 検出試薬を用いて生成された光信号を測定することによって容易に監視できます。



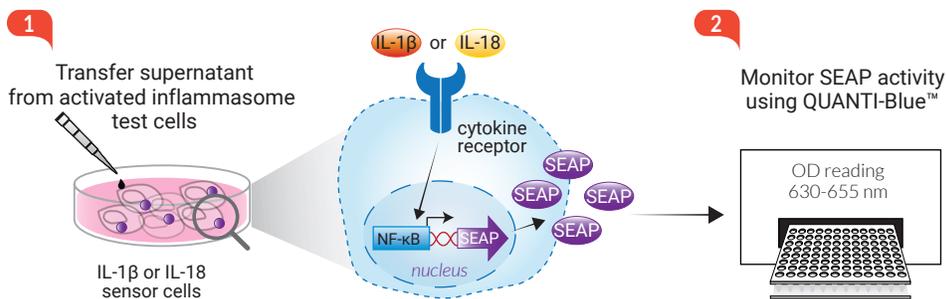
Luminescent quantification of inflammasome-induced pyroptosis.

A. Assay principle for THP1-HMGB1-Lucia™ cells. B. THP1-HMGB1-Lucia™ cells were primed with LPS-EK (1  $\mu$ g/ml) for 3 h and then incubated with the inflammasome inducer Poly(dA:dT) (0.5  $\mu$ g/ml). Lucia luciferase activity (pink curve, left axis) and LDH release (blue curve, right axis) in the supernatant were quantified at 2, 3, 4, 5 and 6 h post-induction.

PRODUCT	QTY	CAT. CODE
THP1-HMGB1-Lucia™ Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	thp-gb1lc

# Monitoring IL-1 $\beta$ and IL-18 secretion

InvivoGen 社は、ヒト (h) またはマウス (m) の生理活性型 IL-1 $\beta$  および IL-18 を、簡単・迅速かつ信頼性の高い方法で検出および定量するためのレポーター細胞株を開発しました。これらの細胞は、ヒト胎児腎 HEK293 細胞株に由来します。これらは、サイトカインシグナル伝達経路が活性化されると、NF- $\kappa$ B/AP-1 によって誘導される分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーターを発現します。上清中の SEAP レベルは、QUANTI-Blue™ Solution 検出試薬を使用して容易に監視できます。



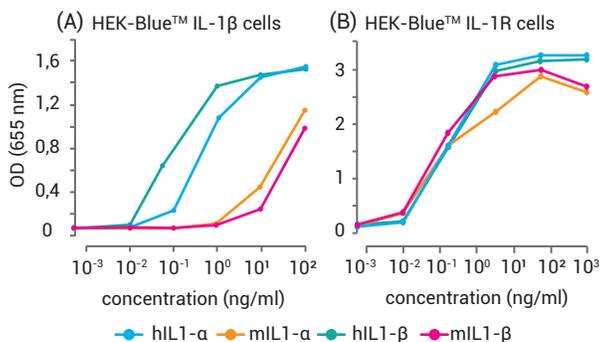
## HEK-Blue™ IL-1 $\beta$ Cells & HEK-Blue™ IL-1R Cells

これらの細胞を利用すると、サンプル内の hIL-1 $\alpha/\beta$  および mL-1 $\alpha/\beta$  をモニタリングできます。どちらの細胞株も、内在性のヒト IL-1 受容体 (IL-1R) を発現します。

HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  細胞は、マウスの IL-1 アイソフォームよりもヒトの IL-1 アイソフォームに対して高い感受性を示します。ヒトインフラマソーム細胞アッセイ (THP1 由来のアッセイなど; p6 ~ 7 参照) から得た上清を検査する際に、この細胞株を使用することをお勧めします。

HEK-Blue™ IL-1R 細胞は、さらに mL-1R も発現するよう安定的にトランスフェクションされており、mL-1 $\beta$  に対してより高い感受性を示します。したがって、この細胞株は、マウスの細胞上清や血清などのサンプルから IL-1 $\beta$  を検出するのに適しています。ただし、感度が高いため、RAW264.7 由来の細胞などの一部の細胞では、高いバックグラウンドを示す可能性があります。

注目すべきこととして、どちらの細胞株もサンプル内の IL-1 $\alpha$  アラーミン濃度の評価に使用できます。一方のアイソフォームを検出するための HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  と HEK-Blue™ IL-1R 細胞の特異性は、アッセイに他のアイソフォームに対する中和抗体を含めることによって評価します。



**Dose response of HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  and HEK-Blue™ IL-1R cells to human and murine IL-1.** (A) HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  and (B) HEK-Blue™ IL-1R cells were incubated with increasing concentrations of recombinant hIL-1 $\alpha$ , hIL-1 $\beta$ , mL-1 $\alpha$ , or mL-1 $\beta$ . After overnight incubation, SEAP activity was measured in the supernatant using QUANTI-Blue™ Solution.

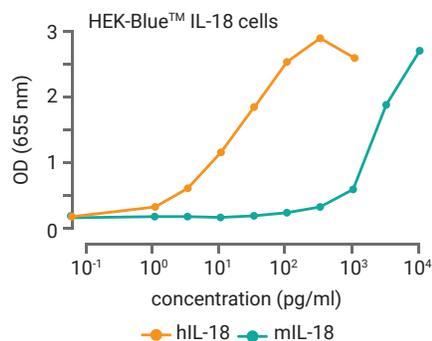
## ADVANTAGES

### USING INVIVOGEN'S CYTOKINE SENSOR CELLS

- 生理活性型サイトカインの検出
- 優れたコスト効率
- 実験に要する作業時間の短縮
- 肉眼での可視化
- 高感度・広いダイナミックレンジ
- 薬剤スクリーニングに適している (通常または HTS、速度論)

## HEK-Blue™ IL-18 Cells

これらの細胞は、サンプル内のヒトおよびマウス IL-18 濃度をモニタリングするための頑健な細胞アッセイを提供します。HEK-Blue™ IL-18 細胞は、ヒト IL-18 受容体を発現するよう安定的にトランスフェクションされています。この細胞は、mIL-18 よりも hIL-18 に対して高い感受性を示します。



**Dose response of HEK-Blue™ IL-18 cells to human and murine IL-18.** HEK-Blue™ IL-18 cells were incubated with increasing concentrations of recombinant human or murine IL-18. After overnight incubation, levels of NF- $\kappa$ B/AP1-induced SEAP in the supernatant were determined using the SEAP detection reagent QUANTI-Blue™ Solution. The optical density (OD) was read at 655 nm.



PRODUCT	QTY	CAT. CODE
HEK-Blue™ IL-1 $\beta$ Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-il1bv2
HEK-Blue™ IL-1R Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-il1r
HEK-Blue™ IL-18 Cells	3-7 x 10 <sup>6</sup> cells	hkb-hmil18

Martine P. et al. 2019. Cell Death Dis. doi: 10.1038/s41419-019-1491-7. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation.

Metho S. et al. 2019. Mol. Cell. doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.08. The Crohn's disease risk factor IRGM limits NLRP3 inflammasome activation by impeding its assembly and by mediating its selective autophagy.

# INFLAMMASOME INHIBITORS

インフラマソームシグナル伝達は、さまざまなレベルで薬理的な阻害が可能です。InvivoGen 社は、インフラマソームによって誘導される応答を遮断する多数の阻害剤を提供しています。これらには、特定のセンサーまたは炎症性カスパーゼ、あるいは複数の構成分子 (例えば NF- $\kappa$ B とセンサー) を標的とする小分子化合物が含まれます。InvivoGen 社の阻害剤は、すべてバクテリア汚染がないことを確認する試験が実施されているため、実験バイアスを回避できます。

## Caspase inhibitors

### Ac-YVAD-cmk

Ac-YVAD-cmk は、**CASP-1** の細胞透過性・選択的・不可逆的阻害剤であり、**CASP-4/5** に対する活性はほとんどありません。この小分子ペプチドシーケンスは、pro-IL-1 $\beta$  の CASP-1 標的のシーケンスに基づいています [87]。

### Z-VAD-FMK

Z-VAD-FMK は、カスパーゼプロテアーゼの触媒部位に不可逆的に結合する、細胞透過性の汎カスパーゼ阻害剤です。これは、NLRP3 の活性化時における細胞内の CASP-1 活性化に対する強力な阻害剤であることが示されています [87, 88]。

### VX-765

VX-765 は、血漿エステラーゼによって VRT-043198 ペプチド模倣代謝物に変換されるプロドラッグであり、代謝物は **CASP-1** および **CASP-4** を強力に阻害します。これは、カスパーゼの触媒システインを共有結合修飾することによって作用します [89, 90]。

## Multi-target inhibitors

### Parthenolide

パルテノリドは、NF- $\kappa$ B、インフラマソームセンサー、**CASP-1** など、複数の標的に働きます。この薬剤は、**NLRP1**、**NLRP3**、**NLRC4** を含む複数のインフラマソームの活性を阻害しますが、AIM2 は阻害されません [91-93]。機能的には、NF- $\kappa$ B の活性化に必要な I $\kappa$ B キナーゼ機能を阻害し [94]、CASP-1 のシステイン残基と NLRP3 の ATPase ドメインをアルキル化する [93] ことが報告されています。

### BAY11-7082

BAY11-7082 は NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤であり [96]、**NLRP3** の ATPase 活性を遮断することによって、このセンサーに対する直接阻害機能も示します [91]。この化合物は NLRP1 の活性化に影響を与えず、また、サルモネラ菌誘導型の **NLRC4** インフラマソームを部分的に阻害する可能性があります。この作用はバクテリア自体の毒性効果に起因する可能性があります [91]。

### Isoliquiritigenin

イソリキリチゲニンには複数の効果を持ちます。この分子は、I $\kappa$ B キナーゼ活性を遮断することにより、TNF- $\alpha$  誘導型の NF- $\kappa$ B 活性化を阻害します [97]。また、**NLRP3-ASC** のオリゴマー化も阻害します [93]。注目すべきことに、イソリキリチゲニンは、パルテノリドやグリベンクラミドよりも強力な **NLRP3** 阻害剤であり、また、AIM2 インフラマソームに影響を及ぼさないことが報告されています [93]。

### ODN TTAGGG (A151)

A151 は、合成オリゴヌクレオチドの TLR9 アンタゴニストであり、cGAS および AIM2 インフラマソームと二本鎖 DNA との結合の強力な競合阻害剤です [98]。



They trust **InvivoGen**

Hafner-Bratkovič I. et al., 2018 Nat. Commun. 59:5182. NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway.  
Irmischer S. et al., 2019 Nat. Commun. 10:2961. Serum FHR1 binding to necrotic-type cells activates monocyctic inflammasome and marks necrotic sites in vasculopathies.  
da Costa L.S. et al., 2019 Cell Death Dis. 10:346. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through cytopathogenic effect-induced potassium efflux.

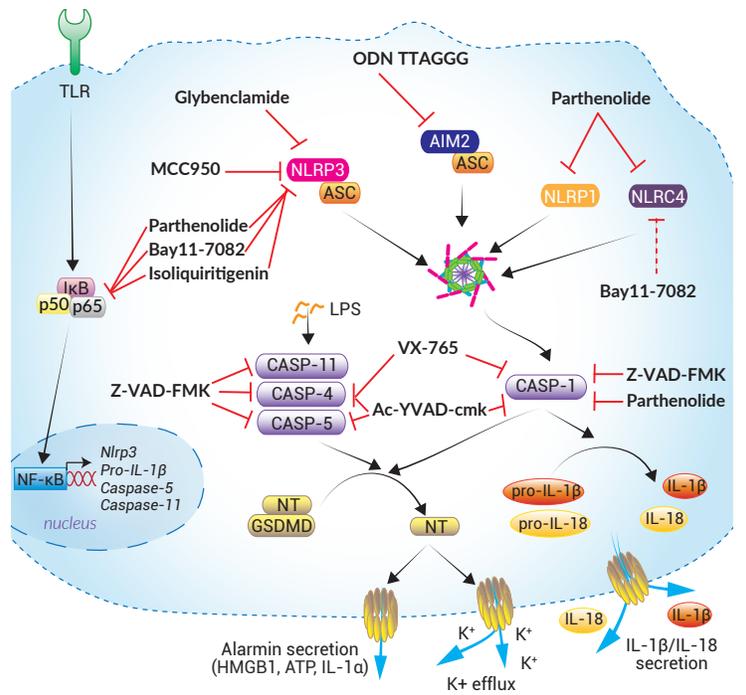
## NLRP3 inhibitors

### MCC950

MCC950 (別名: CRID3、CP-456,773) は、**NLRP3** インフラマソームの構築を阻止する、強力で可逆的かつ特異的な **NLRP3** 阻害剤であり、AIM2、NLRC4、または NLRP1 インフラマソームには影響を与えません。これは、NLRP3 の NATCH ドメインを直接標的とし、NLRP3 の立体構造変化とオリゴマー化に必要な ATP 加水分解を妨害します [99, 100]。

### Glybenclamide

グリベンクラミド (またはグリブリド) は、ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネルを閉鎖させて細胞内 K<sup>+</sup> 濃度を上昇させることにより、**NLRP3** インフラマソームの活性化を間接的に阻害します。この薬剤は、ATP 受容体 P2X7 の下流、および NLRP3 の上流で機能します [101]。グリベンクラミドは、NLRC4 および NLRP1 を介した応答への影響が検出されていないため、NLRP3 の特異的阻害剤であると考えられます [101]。



PRODUCT	QTY	CAT. CODE
Ac-YVAD-cmk	5 mg	inh-yvad
Z-VAD-FMK	1 mg	tlr1-vad
VX-765	10 mg	inh-vx765i-1
Parthenolide	50 mg	inh-ptd
BAY11-7082	10 mg	tlr1-b82
Isoliquiritigenin	10 mg	inh-ilg
ODN TTAGGG (A151)	200 $\mu$ g	tlr1-ttag151
MCC950	10 mg	inh-mcc
Glybenclamide	1 g	tlr1-gly

# INFLAMMASOMES IN DISEASES

この1世紀の間に西洋の産業化社会では、死因が感染性のもから非感染性のものへと著しく変化しました。それらのほとんどがインフラマソームに関連しており、多くの病理にNLRP3の関連が示唆されます。インフラマソーム関連疾患が公衆衛生に及ぼす多大な影響を克服するため、臨床現場では、それぞれに異なったアプローチが用いられています。

## Non-infectious diseases

クリオピリン関連周期性症候群(CAPS)は、**NLRP3**の機能獲得型変異が病因となる好例です。2型糖尿病、痛風性関節炎、がん、心血管疾患、およびアルツハイマー病などの他の炎症状態は、非感染性危険シグナルの組織内蓄積に続発する、**NLRP3**を介した慢性炎症に関連付けられています [35]。白斑、アジソン病、1型糖尿病などの自己免疫疾患は、**NLRP1**の一塩基多型に関連付けられています [46]。家族性寒冷自己炎症症候群 (FCAS)、腸炎、および再発性のマクロファージ活性化症候群 (MAS) は、**NLRCA4**の突然変異に関連しています [15]。家族性地中海熱 (FMF) は、**ピリン**をコードする遺伝子の機能獲得型変異に関連付けられています [15]。

## The cytokine storm

この炎症性サイトカインの過剰分泌は、臓器不全やそれに関連した死亡の原因となる可能性があります。NLRP3 誘発型炎症応答の調節不全は、レンサ球菌毒素性ショック様症候群 (STSLs) [102] などの**毒素性ショック様症候群**、および SARS-CoV-2 ウイルス感染によって引き起こされる**新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) などの急性呼吸窮迫症候群** [103] と関連しています。

## Therapeutic approaches

臨床的に承認された戦略のほとんどは、**炎症性 IL-1 $\beta$ /IL-1R シグナル伝達の遮断**を目的としています。組換えヒト IL-1R アンタゴニストであるアナキナ、モノクローナル抗 IL-1 $\beta$  抗体であるカナキマブ、およびヒト IL-1R-Fc 融合タンパク質であるリロナセプトは、CAPS の治療に有効なことが証明されています。さらに、これらの薬剤は代謝性および神経変性性のインフラマソーム関連病理に重要かもしれません [36]。IL-1 遮断薬と同様に、タデキニグアルファおよび GSK1070806 は、IL-18 シグナル伝達を標的とし、臨床試験が始まりました [36]。しかし、これらの薬剤における懸念は、特異的な標的がないこと、および感染リスクが高まることです。もう1つの有望なアプローチは、**特定のインフラマソームセンサーに対する薬理的阻害剤**を使用することです。その重要な例の1つとして、特異的 NLRP3 阻害剤である MCC950 が挙げられます [99, 100]。その有効性はマウスの炎症性疾患モデルで明らかにされ、関節リウマチに対する第II相臨床試験で評価が行われました。MCC950 は肝毒性を起すことが分かっていますが [35, 36]、より強力な安全な分子の設計に道を開きました。重要なこととして、慢性炎症はがんにつながる場合があります。しかし、多くの場合、腫瘍は一度定着すると、抑制的な環境で免疫応答を逃れ、増殖します。その場合、**パイロトーシスを誘導する化合物は、がん細胞を殺し、さらに、抗腫瘍 T 細胞応答を改善する可能性を秘めています** [104]。

## REFERENCES

- Agostini, L., et al., *Immunity*, 2004, 20(3): p. 319-325.
- Mariathasan, S., et al., *Nature*, 2006, 440(7081): p. 228-232.
- Martinon, F., et al., *Nature*, 2006, 440(7081): p. 237-241.
- Kanneganti, T.-D., et al., *Nature*, 2006, 440(7081): p. 233-236.
- Swanson, K.V., M. Deng, and J.P.Y. Ting, *Nature Reviews Immunology*, 2019.
- Mariathasan, S., et al., *Nature*, 2004, 430(6996): p. 213-218.
- Yang, J., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(35): p. 14408-14413.
- Kofoed, E.M. and R.E. Vance, *Nature*, 2011, 477(7366): p. 592-595.
- Zhao, Y., et al., *Nature*, 2011, 477(7366): p. 596-600.
- Rauch, I., et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(5): p. 657-665.
- Zhao, Y., et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(5): p. 647-656.
- Bauer, R. and I. Rauch, *Molecular Aspects of Medicine*, 2020(76): p. 100863.
- Martinon, F., K. Hofmann, and J. Tschopp, *Current Biology*, 2001, 11(4): p. R118-R120.
- Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *Molecular Cell*, 2002, 10(2): p. 417-426.
- Xue, Y., et al., *Trends in Immunology*, 2019, 40(11): p. 1035-1052.
- Taabazuing, C.Y., A.R. Griswold, and D.A. Bachovchin, *Immunological Reviews*, 2020, 297(1): p. 13-25.
- Hornung, V., et al., *Nature*, 2009, 458: p. 514.
- Fernandes-Alnemri, T., et al., *Nature*, 2009, 458(7237): p. 509-513.
- Hayward, J.A., et al., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2018, 82(4): p. e00015-18.
- Jones, J.W., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(21): p. 9771-9776.
- Gaidt, M.M., et al., *Cell*, 2017, 171(5): p. 1110-1124.e18.
- Kayagaki, N., et al., *Nature*, 2011, 479(7371): p. 117-121.
- Shi, J., et al., *Nature*, 2014, 514: p. 187.
- Hoss, F., J.F. Rodriguez-Alcazar, and E. Latz, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(7): p. 1211-1229.
- He, Y., et al., *Nature*, 2016, 530: p. 354.
- Sharif, H., et al., *Nature*, 2019, 570(7761): p. 338-343.
- Thornberry, N.A., et al., *Nature*, 1992, 356(6372): p. 768-774.
- Shi, J., et al., *Nature*, 2015, 526: p. 660.
- Man, S.M. and T.-D. Kanneganti, *Nature Reviews Immunology*, 2015, 16(1): p. 7-21.
- Ding, J., et al., *Nature*, 2016, 535(7610): p. 111-116.
- Dinareello, C.A., *Immunological Reviews*, 2018, 281(1): p. 8-27.
- Di Paolo, N.C. and D.M. Shayakhmetov, *Nature Immunology*, 2016, 17(8): p. 906-913.
- Kang, R., et al., *Molecular Aspects of Medicine*, 2014, 40: p. 1-116.
- Pelegri, P. and A. Surprenant, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(4): p. 2386-2394.
- Mangan, M.S.J., et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17: p. 588.
- Chaudh, D., L. Vande Walle, and M. Lamkanfi, *Immunol Rev*, 2020, 297(1): p. 123-138.
- Schmid-Burgk, J.L., et al., *European Journal of Immunology*, 2015, 45(10): p. 2911-2917.
- Yang, Y., et al., *Cell Death & Disease*, 2019, 10(2): p. 128.
- Iyer, S.S., et al., *Immunity*, 2013, 39(2): p. 311-323.
- Elliott, E.J., et al., *The Journal of Immunology*, 2018, 200(9): p. 3047-3052.
- Zhong, Z., et al., *Nature*, 2018, 560(7717): p. 198-203.
- Tschopp, J. and K. Schroder, *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(3): p. 210-215.
- Duncan, J.A., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(19): p. 8041-8046.
- Gros Lambert, M. and B.F. Py, *J Inflamm Res*, 2018, 11: p. 359-374.
- Kelley, N., et al., *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): p. 3328.
- Platnich, J. and D. Muruve, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 670.
- Hamilton, C. and P. Anand, *F1000Research*, 2019, 8(676).
- Chen, J. and Z.J. Chen, *Nature*, 2018, 564(7734): p. 71-76.
- Bauermeind, F.G., et al., *The Journal of Immunology*, 2009, 183(2): p. 787-791.
- Lin, K.-M., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(2): p. 775-780.
- Gritsenko, A., et al., *Frontiers in Immunology*, 2020, 11(2573).
- Kortmann, J., S.W. Brubaker, and D.M. Monack, *The Journal of Immunology*, 2015, 195(3): p. 815-819.
- Karki, R., et al., *Cell*, 2018, 173(4): p. 920-933.e13.
- Hu, Z., et al., *Science*, 2013, 341(6142): p. 172-175.
- Tenthorey, Jeannette L., et al., *Molecular Cell*, 2014, 54(1): p. 17-29.
- Zhang, L., et al., *Science*, 2015, 350(6259): p. 404-409.
- Kayagaki, N., et al., *Science*, 2013, 341(6151): p. 1246-1249.
- Hagar, J.A., et al., *Science*, 2013, 341(6151): p. 1250-1253.
- Kayagaki, N., et al., *Nature*, 2015, 526: p. 666.
- Broz, P. and V.M. Dixit, *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16: p. 407.
- Kaparakis-Liaskos, M. and R.L. Ferrero, *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15: p. 375.
- Meunier, E., et al., *Nature*, 2014, 509(7500): p. 366-370.
- Man, S.M., et al., *Cell*, 2016, 167(2): p. 382-396.e17.
- Santos, J.C., et al., *The EMBO journal*, 2018, 37(6): p. e98089.
- Bian, Z.-M., et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2011, 52(12): p. 8646-8656.
- Rathinam, Vijay A.K., et al., *Cell*, 2012, 150(3): p. 606-619.
- Christgen, S., D.E. Place, and T.-D. Kanneganti, *Cell Research*, 2020.
- Baker, P.J., et al., *European Journal of Immunology*, 2015, 45(10): p. 2918-2926.
- Yan, Z., et al., *The Journal of general physiology*, 2008, 132(5): p. 563-573.
- Muñoz-Planillo, R., et al., *Immunity*, 2013, 38(6): p. 1142-1153.
- Lagrange, B., et al., *Nature Communications*, 2018, 9(1): p. 242.
- Santos, J.C. and P. Broz, *Journal of Leukocyte Biology*, 2018, 104(4): p. 729-735.
- Broz, P., P. Pelegri, and F. Shao, *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(3): p. 143-157.
- Wang, K., et al., *Cell*, 2020.
- Kovacs, S.B. and E.A. Miao, *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(9): p. 673-684.
- Kayagaki, N., et al., *Science Signaling*, 2019, 12(582): p. eaax4917.
- Schneider, K.S., et al., *Cell Rep*, 2017, 21(13): p. 3846-3859.
- Sarhan, J., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(46): p. E10888.
- Evavold, C.L., et al., *Immunity*, 2018, 48(1): p. 35-44.e6.
- Rühl, S., et al., *Science*, 2018, 362(6417): p. 956-960.
- Yang, J., Z. Liu, and T.S. Xiao, *Cellular & molecular immunology*, 2017, 14(1): p. 65-79.
- Shi, C.-S., et al., *Nature immunology*, 2012, 13(3): p. 255-263.
- Kuzmich, N.N., et al., *Vaccines*, 2017, 5(4): p. 34.
- Alexopoulos, L., et al., *Nature*, 2001, 413(6857): p. 732-738.
- Kawai, T. and S. Akira, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1143(1): p. 1-20.
- Aliprantis, A.O., et al., *Science*, 1999, 285(5428): p. 736-739.
- García-Calvo, M., et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(49): p. 32608-32613.
- Dostert, C., et al., *PLoS one*, 2009, 4(8): p. e6510-e6510.
- Wannamaker, W., et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007, 321(2): p. 509-516.
- Boxer, M.B., et al., *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, 2010: Bethesda (MD).
- Juliana, C., et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): p. 9792-9802.
- Coll, R.C. and L.A.J. O'Neill, *PLOS ONE*, 2011, 6(12): p. e29539.
- Honda, H., et al., *Journal of Leukocyte Biology*, 2014, 96(6): p. 1087-1100.
- Saadane, A., et al., *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, 36(6): p. 728-736.
- Pierce, J.W., et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(34): p. 21096-21103.
- Kumar, S., et al., *Biochemical Pharmacology*, 2007, 73(10): p. 1602-1612.
- Kaminski, J.J., et al., *The Journal of Immunology*, 2013, 191(7): p. 3876-3883.
- Tapia-Abellán, A., et al., *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(6): p. 560-564.
- Coll, R.C., et al., *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(6): p. 556-559.
- Lamkanfi, M., et al., *The Journal of cell biology*, 2009, 187(1): p. 61-70.
- Guo, H., J.B. Callaway, and J.P.Y. Ting, *Nature Medicine*, 2015, 21: p. 677.
- Lin, L., et al., *PLOS Pathogens*, 2019, 15(6): p. e1007795.
- Freeman, T.L. and T.H. Swartz, *Frontiers in Immunology*, 2020, 11(1518).
- Zheng, Z. and G. Li, *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4).

インフラマソームは細胞質に存在するタンパク質複合体であり、微生物性および非感染性の攻撃に対する迅速な防御を提供しています。それらは、炎症性サイトカインの成熟および分泌を誘導するシグナル伝達のハブとして機能し、最終的に溶解性免疫原性の細胞死であるパイロトーシスを引き起こします。

この20年の間、免疫細胞および非免疫細胞の双方において、複数のインフラマソームセンサーが同定されました。これは、注目に値する監視システムであり、その活性化は病原体の排除に有益に働きます。その一方で、痛風性関節炎、アルツハイマー病、2型糖尿病などの、自己炎症性疾患、神経変性疾患、および代謝疾患に関連する非感染性炎症の一因となる場合もあります。さらに、インフラマソームは、がんにおいて、宿主の防御、あるいは腫瘍増殖の助長という対照的な2つの機能を持っています。

NLRP3 インフラマソームは、典型的で、際立っており、特徴が最もよく明らかになっているインフラマソームとして多数の疾患や病理に関連付けられています。NLRP3 活性化の正確なメカニズムについては未だ議論が尽きないものの、NLRP3 は、インフラマソームモジュレーターを開発するバイオテクノロジー企業が最も標的としているセンサーです。Inflazome、IFM Therapeutics、Nodthera、Jecureなどの企業は、NLRP3 の低分子のアンタゴニストに注目して開発を行っています。そういった阻害剤は、産業化社会における死亡率の高い疾患を治療する上で、極めて有望なものかもしれません。

インフラマソーム自体と、健康および疾患に対するその意義についての理解は著しく進歩しましたが、なおいくつかの疑問が残っています。例えば、種々のインフラマソームセンサーは、自然免疫防御にどの程度関与しているのか？インフラマソームは特定の脅威にのみ対応するのか、それとも協調して機能することができるのか？といった疑問です。多くの研究がインフラマソーム調節の複雑さを既に指摘しており、治療的介入に新しい道を切り開いています。

インフラマソームの黄金時代は、まだ始まったばかりです ...

