InvivoGen insight

SUMMARY :

REVIEW

NLRP3: a sophisticated drug target

PRODUCTS

Inflammasome test cells

- THP1-KO-NLRP3 Cells
- THP1-KO-ASC Cells
- THP1-KO-CASP4 Cells
- RAW-ASC Cells
- RAW-ASC-KO-GSDMD Cells

***E. coli* Outer Membrane Vesicles**

Lipopolysaccharides

The good and the bad of LPS

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

OCTOBER 2019

NLRP3: a sophisticated drug target

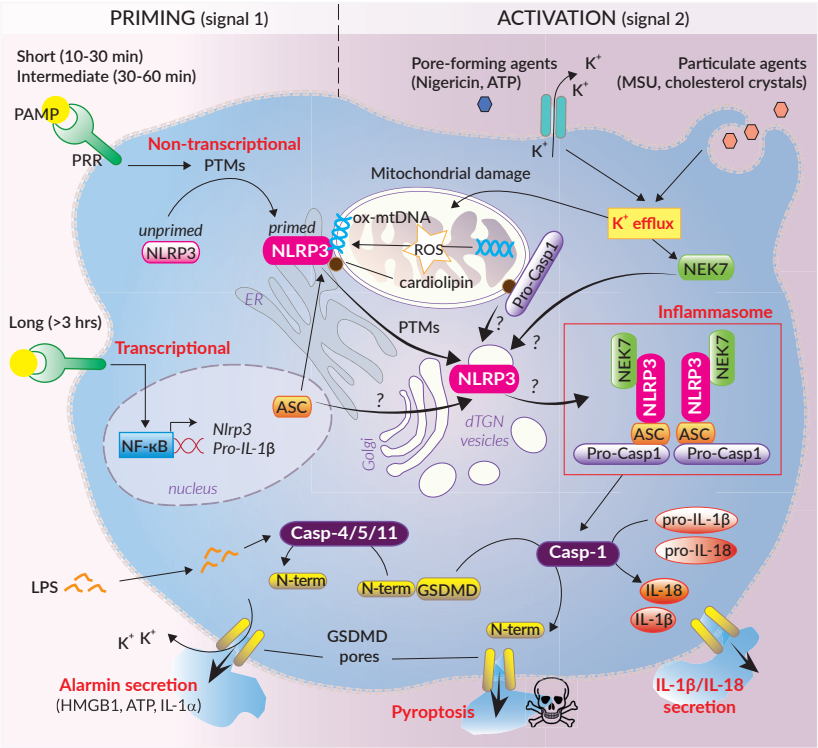
NLRP3（NOD-like 受容体ピリンドメイン含有タンパク質3、クリオピリンまたは NALP3）は、最も研究されているインフラマソームセンサーであり、魅力的な薬物標的です。NLRP3 は、マルチタンパク質インフラマソーム複合体を構築して、感染および細胞損傷に応答して IL-1β/IL-18 の分泌とパイロトーシスを誘導します [1,2]。しかし、NLRP3 インフラマソームの機能は、その異常な活性化または慢性的な活性化が、2 型糖尿病、痛風性関節炎、心血管疾患、アルツハイマー病などの病態、および CAPS（クリオピリン関連周期性症候群）などの稀な遺伝性疾患に関連することから、宿主に害を及ぼす可能性もあります [3]。NLRP3 インフラマソームの活性化と制御に関する理解のギャップを埋め、新規治療法を創出することを目指し、急速な研究が現在進められています。

NLRP3 インフラマソームの活性化は、2 系統のシグナルモデルに依存しています。シグナル 1 は、微生物成分または内因性サイトカインによって供給され、NLRP3 をプライミングします。シグナル 2 は、過剰刺激によって誘発され、NLRP3 の活性化とインフラマソームの構築を促します。このモデルは、過去に考案されたものと比較して、はるかに高度です。実際に、刺激の性質と持続時間に依存するさまざまなプライミングメカニズムがこれまでに説明されています。短時間および中時間のプライミングは、基底レベルで発現した NLRP3 のリン酸化や（脱）ユビキチン化などの翻訳後修飾（PTM）を引き起こします。より長時間のプライミングは、NLRP3、プロカスパーゼ -1、およびプロ IL-1β の NF-κB 媒介性転写を誘発します。プライミングされた NLRP3 は、活性化されるまで自動制御の状態を維持します [2,4]。NLRP3 は、構造的にも化学的にも無関係なさまざまな刺激（例えば、膜孔形成毒素、イオンチャネルの活性化因子、尿酸結晶、β- アミロイドタンパク質など）によって活性化され得ることから、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。NLRP3 はどちらかと言えば、①イオンの不均衡（K^+ の流出など）、②外部化したミトコンドリア（mt）のカルジオリピン、③酸化した mtDNA など、下流のサイトゾル性ストレスシグナルを感知するものであり、このうち②と③が NLRP3 のリガンドであることが提唱されています [2-5]。とはいうものの、NRLP3 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 [4,6]。

主要な NLRP3 インフラマソーム応答として、古典的および非古典的経路の 2 つが研究されており、これらはカスパーゼ（Casp）の動員の点で異なります [1,2,6]。活性化が起こると、ASC アダプターとプロ Casp-1 を伴った NLRP3 の凝集によって古典的な応答が引き起こされます（Fig. 2 の内側）。自己切断型の活性 Casp-1 は、プロ IL-1β/ プロ IL-18 の成熟、ならびに膜孔形成ガスデルミン D（GSDMD）の切断を誘導し、IL-1β/IL-18 の分泌およびパイロトーシスを引き起こします [1,6]。非古典的な応答は、サイトゾル性リポポリサッカライド（LPS）の感知時の Casp-4/5（ヒト）または Casp-11（マウス）の活性化に依存します（Fig. 2 の内側）。Casp-4/5/11 は、プロ IL-1β/ プロ -IL-18 を切断できないものの、細胞膜での GSDMD 膜孔形成を介してストレスシグナルを誘発します。したがって、これは最終的に NLRP3 インフラマソームの構築と Casp-1 を介した IL-1β/IL-18 の成熟ならびに分泌を誘導します [1,6]。

オルガネラは NLRP3 インフラマソームの構築において重要な役割を果たします [2,4-6]。協調的なプライミングおよび活性化シグナルが、NLRP3 や他のタンパク質のミトコンドリア、小胞体（ER）、およびゴルジ体への輸送を調整していると考えられます。最近になって、NEK7（NIMA 関連プロテインキナーゼ 7）が NLRP3 インフラマソームの不可欠な成分として同定されましたが、それが NLRP3 と関連するタイミングと場所は、まだ十分に解明されていません。NLRP3 インフラマソーム構築の最初のステップがミトコンドリア関連 ER 膜（MAM）で発生することを示唆する研究もありますが、最近の報告によれば、活性化とインフラマソーム構築はむしろ、分散したトランスゴルジ網（dTGN）の小胞周囲で、ミトコンドリアへの輸送を伴わずに起こるとされています [7]。オルガネラに関連する複数のメカニズムが NLRP3 インフラマソームの構築を支配する可能性の有無については、さらなる研究が必要です。

NLRP3 インフラマソーム成分の PTM の複雑な活性化および阻害が、プライミングおよび活性化段階における重要な制御手段として浮上しました [2,4,6]。制御的な PTM の性質、タイミングおよび場所についての研究は、既存の NLRP3 阻害薬および IL-1β/IL-18 遮断戦略に取って代わるうえで、最小限の副作用できめ細やかな治療法の新規ターゲットを特定するのに寄与するでしょう [3,4]。



1. Broz P. and Dixit V.M., 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nat Rev Immunol. 16:407. **2. Groslambert M. & Py B. 2018.** Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. J. Inflamm. Res. 11:359. **3. Mangan M.S.J. *et al.*, 2018.** Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Nat. Rev. Drug. Discov. 17:558. **4. Swanson K.V. *et al.*, 2019.** The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat. Rev. Immunol. 19:477. **5. Hamilton C. & Anand P.K. 2019.** Right place, right time: localisation and assembly of the NLRP3 inflammasome. F1000Research. 8:676. **6. Yang Y., *et al.*, 2019.** Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. Cell Death Dis. 10:128. **7. Chen J. & Chen Z.J., 2018.** PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. Nature. 564:71.

Inflammasome test cells

InvivoGen 社では、インフラマソームシグナル伝達の研究用にヒト単球およびマウスマクロファージ細胞株シリーズを提供しています。InvivoGen 社の新商品であるインフラマソームテスト細胞は、古典的および非古典的な NLRP3 インフラマソーム応答における特定物質の役割を評価するように改変されています。これらの細胞は、NLRP3、ASC、カスパーゼ -4（CASP4）、またはガスデルミン D（GSDMD）をコードする遺伝子を標的とするノックアウト（KO）細胞です。InvivoGen 社のインフラマソームテスト細胞は、生物活性 IL-1β の放出のモニタリングとウェスタンブロットにより、その有効性が検証されています。

Human monocyte-derived cell lines

- THP1-KO-NLRP3 Cells NEW
- THP1-KO-ASC Cells NEW
- THP1-KO-CASP4 Cells NEW

THP1-KO-NLRP3、THP1-KO-ASC、および THP1-KO-CASP4 細胞はヒト単球 THP1（WT）細胞株に由来し、これらは NLRP3、ASC、およびプロカスパーゼ -1 を高発現することから、インフラマソーム研究で広く使用されています [1]。

THP1-KO-NLRP3、THP1-KO-ASC、および THP1-KO-CASP4 細胞は、それぞれ NLRP3、ASC、および CASP-4 遺伝子がノックアウト（KO）されています。
これらの KO 状態は、PCR、シーケンシング、ウェスタンブロット（Fig. 1A）、および機能アッセイ（Fig. 1B）によって確認されています。

想定したとおり、THP1-KO-NLRP3 および THP1-KO-ASC 細胞は、MSU 結晶ならびに大腸菌 OMV（OMV の説明については次ページを参照）と共にインキュベートした場合に成熟型 IL-1β が分泌されません。THP1-KO-CASP-4 では、IL-1β 分泌は大幅に減少しますが、完全には阻害されません。これは、Casp-5 の残存活性によって部分的に説明されます。

InvivoGen社では、THP1由来のインフラマソームレポーター細胞も提供しています。THP1-HMGB1-Lucia細胞は、パイロトーシスの生物発光のモニタリングを可能にし、THP1-ASC-GFP細胞は、インフラマソーム活性化時の蛍光ASCスペック形成の可視化を可能にします。
詳細については、InvivoGen社のウェブサイトをご覧ください。

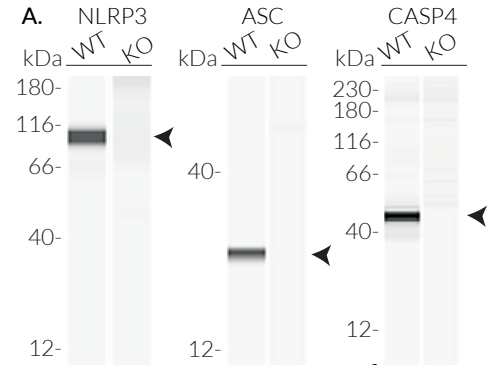
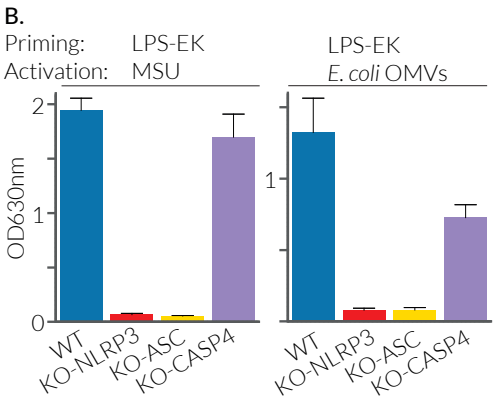


Figure 1: Validation of THP1-KO-NLRP3, -KO-ASC, and -KO-CASP4 cells.

(A) Western-Blot by WES™. Anti-human NLRP3, anti-human ASC, and anti-human caspase-4 antibodies were used on lysates from THP1-WT, -KO-NLRP3, -KO-ASC, and -KO-CASP4 cells. Arrows indicate the expected size (kDa) for the proteins tested: NLRP3 (110 kDa), ASC (27 kDa), Casp-4 (48 kDa).



(B) Mature IL-1β secretion upon NLRP3 inflammasome activation. Cells were primed with LPS-EK (1 µg/ml) for 3 h at 37°C, before the addition of MSU crystals (250 µg/ml) or *E. coli* OMVs (100 µg/ml). After 6 or 24h incubation, the secretion of IL-1β was assessed in the supernatants using HEK-Blue™ IL-1β sensor cells which express an NF-κB SEAP reporter gene. QUANTI-Blue™ Solution was used to measure SEAP activity. Optical density was read at 630 nm.

1. Schmid-Burgk, J.L. *et al.* 2015. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. Eur. J. Immunol. 45:2911.

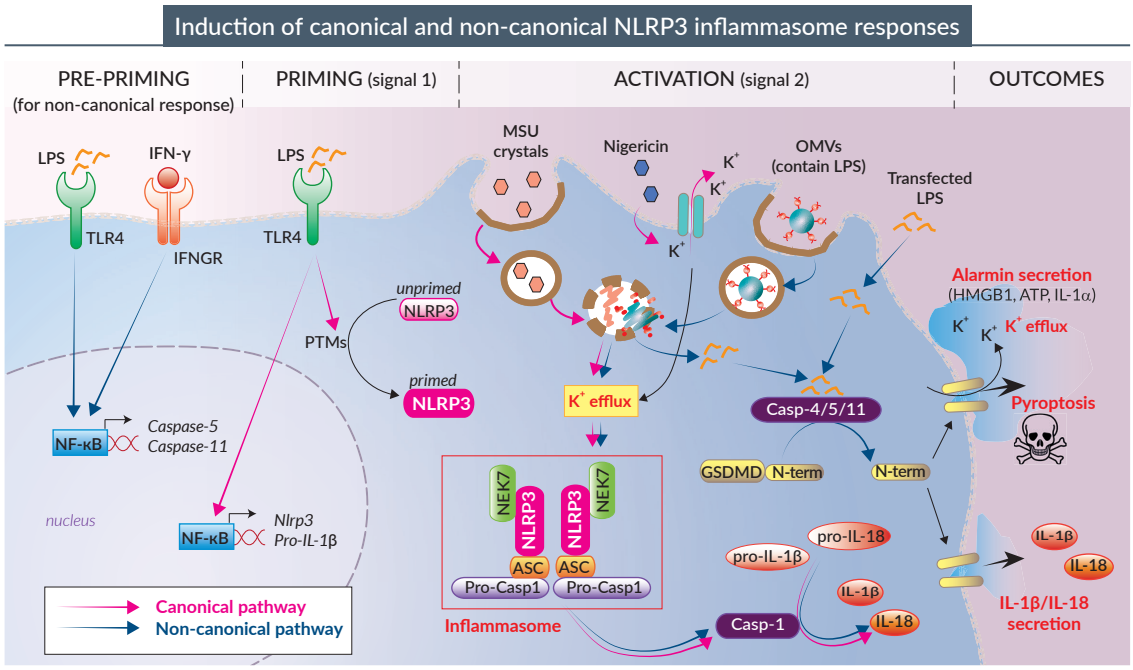


Figure 2: Canonical and non-canonical NLRP3 inflammasome pathways require a priming step (signal 1) inducing post-translational modifications (PTMs) of pre-existing cytosolic NLRP3, and *de novo* NLRP3 expression. Canonical NLRP3 activation is triggered by stress signals downstream of pore-forming toxins, or lysosomal rupture. These stress signals include cytosolic ion imbalances such as decreased K^+ concentration after K^+ efflux. Non-canonical NLRP3 activation relies on the sensing of intracellular LPS by Casp-4/5 (human) and Casp-11 (mice) which trigger GSDMD pore formation at the plasma membrane. The resulting K^+ efflux and ATP release activate the NLRP3 inflammasome. Of note, a pre-priming step is required to induce the expression of Casp-5 and Casp-11. Casp-4 is constitutively expressed in many cell types[1].

1. Man S.M & Kanneganti T.D. 2015. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 16:7.

Mouse macrophage-derived cell lines

- RAW-ASC Cells NEW
- RAW-ASC-KO-GSDMD Cells NEW

RAW-ASC および RAW-ASC-KO-GSDMD 細胞は、ASC を発現しないマウスマクロファージ RAW 264.7 細胞株に由来します [1]。InvivoGen 社では、RAW 細胞での ASC 依存インフラマソーム [2] の研究を可能にするために、マウス ASC 遺伝子の安定なトランスフェクションにより RAW-ASC 細胞を作製しました。その後、GSDMD 遺伝子のノックアウトにより RAW-ASC- KO-GSDMD 細胞を改変しました。これらの細胞株での安定な ASC 発現および KO 状態は、PCR、ウェスタンブロット（WES ™）（Fig. 3A）、および機能アッセイ（Fig. 3B）によって確認されています。RAW-ASC および RAW-ASC-KO-GSDMD 細胞は、ブラストサイジンに対する耐性があります。

想定したとおり、RAW-ASC 細胞と比較した場合、Nigericin および大腸菌 OMV のそれぞれによる古典的および非古典的経路での NLRP3 インフラマソーム活性化は、RAW-ASC-KO-GSDMD 細胞での成熟型 IL-1β の分泌を阻害します。注意すべきは、Nigericin は細胞毒性であり、損傷／壊死した RAW-ASC-KO-GSDMD 細胞がいくらかの IL-1β を放出する点です。

1. Pelegrin P. *et al.* 2008. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1β in mouse macrophage. J. Immunol. 180:7147. **2. Hoss F. *et al.*, 2017.** Assembly and regulation of ASC specks. Cell. Mol. Life Sci. 74:1211.

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
THP1-KO-NLRP3 Cells	3-7 x 10^6 cells	thp-konlrp3
THP1-KO-ASC Cells	3-7 x 10^6 cells	thp-koasc
THP1-KO-CASP4 Cells	3-7 x 10^6 cells	thp-kocasp4
RAW-ASC Cells	3-7 x 10^6 cells	raw-asc
RAW-ASC-KO-GSDMD Cells	3-7 x 10^6 cells	raw-kogsdmd

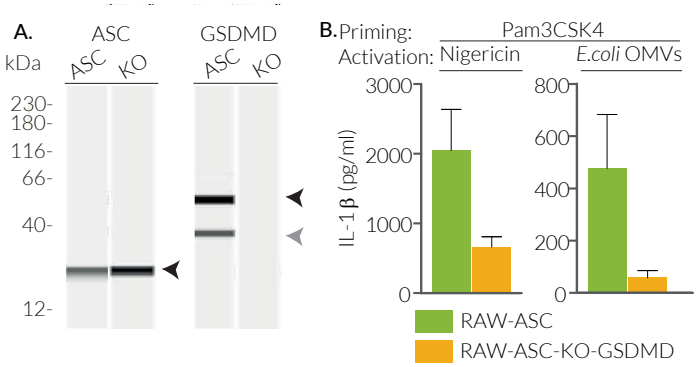


Figure 3: Validation of the RAW-ASC and RAW-ASC-KO-GSDMD cells.

(A) Western-Blot by WES™. Anti-mouse ASC and anti-mouse GSDMD were used on lysates from RAW-ASC and -KO-GSDMD cells. Arrows indicate the expected size (kDa) for the proteins tested: ASC (27 kDa), GSDMD (black arrow: full-length, 53 kDa, grey arrow: N-term cleaved region, 33 kDa). **(B) Mature IL-1β secretion upon NLRP3 inflammasome activation.** Cells were primed for 3 h at 37°C with Pam3CSK4 (100 ng/ml), and then incubated with Nigericin (10 µM) or *E. coli* OMVs (20 µg/ml) for 6h at 37°C. The secretion of IL-1β was assessed by ELISA. For non-canonical inflammasome activation with *E. coli* OMVs, cells were pre-primed (see Fig. 2) with murine recombinant IFN-γ (10 ng/ml) overnight at 37°C before the priming step.

RELATED PRODUCTS

- **Blasticidin:** Selection antibiotic (# ant-bl-05)
- **HEK-Blue™ IL-1β Cells:** Human IL-1β sensor cells (# hkb-il1b)
- **MSU Crystals:** Monosodium Urate Crystals (# tlrl-msu)
- **Nigericin:** Potassium ionophore (# tlrl-nig)
- **Pam3CSK4:** TLR1/2 synthetic agonist (# tlrl-pms)
- **QUANTI-Blue™:** SEAP detection reagent (# rep-qbs)

www.invivogen.com/inflammasomes

E. coli outer membrane vesicles (OMVs) NEW

Caspase 11-4/5 inflammasome activator

- 優れたコストパフォーマンス：トランスフェクションした LPS よりも強力な活性化能
- 確実性：再現可能な結果

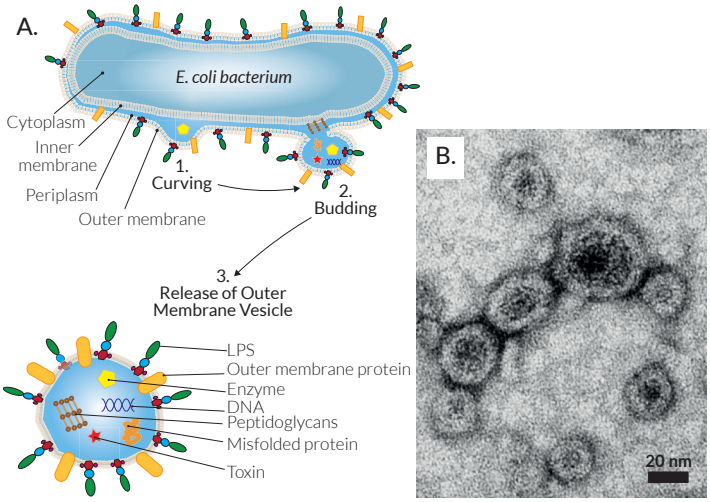
外膜小胞（OMV）は、グラム陰性菌によって産生される免疫原性二層小球体です。それらには、親株の細菌外膜に由来するリポポリサッカライド（LPS）など、多くの病原体関連分子パターン（PAMP）が含まれています。OMV は、Toll-like 受容体（TLR）[1] を介した無数の免疫応答ならびにカスパーゼ 11-4/5 インフラマソームの細胞内活性化 [2] を開始します。OMV は自然にエンドサイトーシスされるため、トランスフェクション試薬が不要で、宿主の細胞膜全体およびサイトゾル内への LPS の効果的送達における媒体として機能します [2]。

InvivoGen 社の OMV は、*Escherichia coli* BL21 から精製され、十分に特徴付けられており、機能的に検証されています。InvivoGen 社では、標準グレードならびに滅菌 InvivoFit ™グレード（*in vivo* 研究に推奨）の大腸菌 OMV を提供しています。

1. Kaparakis-Liaskos, M. & Ferrero, R.L., 2015. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. Nat. Rev. Immunol. 15:375. **2. Russo, A.J. *et al*, 2018.** Emerging insights into non-canonical inflammasome recognition of microbes. J. Mol. Biol. 430:207.

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
E. coli OMVs	100 µg	tlrl-omv-1
E. coli OMVs InvivoFit™	500 µg	tlrl-omv

Characteristics of Outer Membrane Vesicles



(A) OMVs derive from the membrane of the parent bacterium and encapsulate a number of PAMPs including DNA, RNA, proteins, toxins, and LPS.
(B) Image of InvivoGen's *E. coli* OMVs by transmission electron microscope (80 kV).

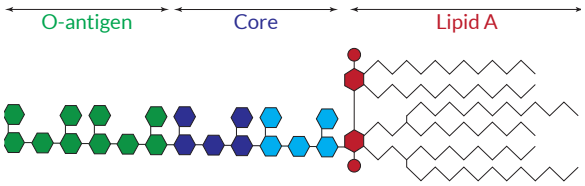
www.invivogen.com/ecoli-omvs

The good and the bad of LPS

リポポリサッカライド(LPS)はグラム陰性菌外膜の主要成分であり、Toll-like 受容体 4(TLR4)を介して強力な自然免疫応答を誘発します。その結果として生じるシグナル伝達は、炎症性サイトカインの放出を引き起こすため、急性および慢性の炎症性疾患につながる可能性があります。しかし、バランスが重要であり、管理された少量の LPS は防御効果が期待され、管理されていない多量の LPS は、敗血症性ショックなどの悲惨な結果を招く恐れがあります[1]。LPS は、その炎症性が高い一方で、治療への顕著な可能性を有しています。

Activity of LPS? It's all in the structure.

LPSは、O抗原、それに連結するコアオリゴ糖、およびテール部のリピドAという3つの異なる領域で構成されています[2]。



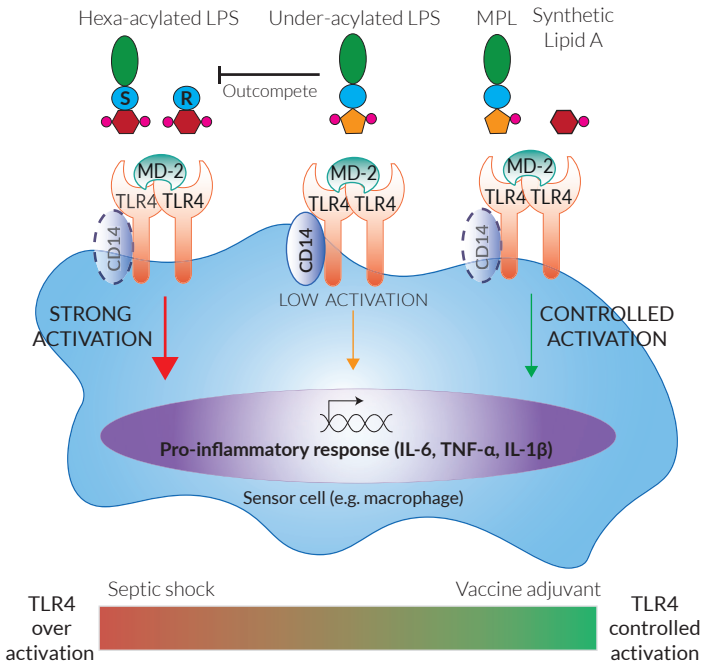
● O 抗原は LPS の最も外側の領域であり、その組成は系統間で大きく異なります。LPS は、O 抗原の有無に基づいて、それぞれ平滑型(S 型)または粗面型(R 型)のいずれかの化学種を持ちます[2]。
TLR4 シグナル伝達共受容体による認識の違いにより、生物学的効果が異なるという明確なエビデンスがあります。例えば、CD14 は S-LPS シグナル伝達に必要ですが、R-LPS シグナル伝達には不要です[3]。

● リピド A は、エンドトキシンとしても知られ、LPS を細菌膜に固定する炭水化物付属性の脂質部分であり、重要なことに、免疫活性化を規定します。リピド A の脂肪性アシル鎖の数は、LPS の生物活性に大きな違いをもたらす原因となります[1]。大腸菌(*Escherichia coli*)やサルモネラ属(*Salmonella spp*)などの病原性バクテリアによく見られるヘキサアシル化(6 鎖)リピド A は、TLR4 の非常に強力なアゴニストです。*Porphyromonas gingivalis* や *Rhodobacter sphaeroides* などのバクテリア由来の低アシル化(4 ～ 5 鎖)リピド A は、一般的に、低度の反応または拮抗反応を誘発します。これは、強力な炎症誘発性シグナル伝達に必要な TLR4 二量体化を阻害するリピド A の構造的な違いによるものです[2]。

Are there really benefits to using LPS?

現在、数多くの有益な LPS の応用研究が行われています。低アシル化リピド A は、強力なヘキサアシル化リピド A を用量依存的に駆逐するため、バクテリア誘発性敗血症性ショックの有望な拮抗治療薬になります。しかしながら、これまでのところ臨床的な成功はほとんど報告されていません[4]。LPS は、効果的なワクチンアジュバントに求められる多くの特徴を備えています。ただし、LPS は非常に有毒性があり、深刻な疾患を引き起こす可能性もあります。天然の LPS 誘導体であるモノリン酸化リピド A(MPLA)は、TLR4 免疫刺激活性を維持しつつ、低毒性を示します。*Salmonella minnesota* の化学誘導体(MPL®)MPLA は、ヒトワクチンアジュバント AS04 に臨床的に使用された最初の TLR リガンドであり、最近では AS015 でも使われています[5]。これを土台に、リピド A ベースのアジュバント作製における継続的な取り組みが行われています。

Balanced activation of TLR4 by different LPS types



1. Steimle, A. *et al.* 2016. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. Int J Med Microbiol 306, 290-301. **2. Cochet, F. & Peri, F. 2017.** The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. Int J Mol Sci 18. **3. Biedron, R. *et al.* 2016.** CD36 Differently Regulates Macrophage Responses to Smooth and Rough Lipopolysaccharide. PLoS One 11, e0153558. **4. Nijland, R. *et al.* 2014.** Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. Mar Drugs 12, 4260-4273. **5. Del Giudice, G. *et al.* 2018.** Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. Semin Immunol 39, 14-21.

Are sterile reagents LPS-free?

バクテリアと同様に、LPSは環境のあらゆる場所に存在します。LPSによる汚染は、学術界においても産業界においても大きな脅威であり、研究結果の誤った解釈を招いたり、ヒトや動物に使用する注射薬剤の生産に打撃を与えたりすることがあります。「無菌」とみなされる試薬や製品は、ろ過などの手順の後でもエンドトキシンを含有する可能性があるため、それを正確に検出することが極めて重要です。
https://www.invivogen.com/hek-blue-lps-detection-kit

PRODUCT	ORGANISM	QTY	CAT. CODE
TLR4 agonists			
LPS-B5 UP* (S)	*E. coli* 055/B5	5 mg	tlrl-pb5lps
LPS-EK UP* (R)	*E. coli* K12	1 mg	tlrl-peklps
LPS-PG UP* (S)	*P. gingivalis*	5 mg	tlrl-ppglps
MPLA-SM (R)	*S. minnesota*	1 mg	tlrl-mpla
MPLA Synthetic	Synthetic	1 mg	tlrl-mpls
CRX-527	Synthetic	1 mg	tlrl-crx527
TLR4 antagonist			
LPS-RS UP* (S)	*R. sphaeroides*	1 mg	tlrl-prslps

*UP - Ultrapure

www.invivogen.com/tlr4-ligands

InvivoGen

USA Tel: +1 888 457 5873 Fax: +1 858 457 5843 info@invivogen.com
Europe Tel: +33 562 71 69 39 Fax: +33 562 71 69 30 info.eu@invivogen.com
Asia Tel: +852 3622 3480 Fax: +852 3622 3483 info.hk@invivogen.com