

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17939

研究課題名（和文）レジオネラ感染による免疫抑制メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of Immunosuppressive Mechanisms Induced by Legionella Infection

研究代表者

梶原 千晶（KAJIWARA, Chiaki）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：80638883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：レジオネラがマクロファージに侵入し増殖すると同時に、宿主は本来の生体防御機能が低下している状態に陥ると考えられる。本研究は、レジオネラが宿主細胞内のAMPKの活性化を抑制する機序の解明、またAMPKの下流に存在する因子の中で、レジオネラの感染防御に関わる経路（オートファジー、アポトーシスなど）について調べることを目的として行った。その結果、細胞内増殖性が高いレジオネラ菌株を感染させたマクロファージは、AMPK活性がより強く抑制されること、そしてその下流因子であるオートファジー小胞の形成抑制にも関与していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制状態にある患者に発症する感染症、特に敗血症は、その予後の重篤さにおいて臨床上極めて重要である。この場合敗血症の起炎菌は、多くの場合生体内に定着した細菌叢からの内因性感染によるものと考えられており、この経路は動物実験モデルでも証明されている。また、レジオネラ肺炎患者の体内からは、腸内細菌や緑膿菌などが検出されるケースもあり、やはり内因性感染により敗血症を発症する可能性がある。本研究により、レジオネラがマクロファージのAMPKを介して、ミトコンドリア由来活性酸素種の産生や細菌などの排除に重要なオートファジー小胞の形成を抑制することがわかったことで、治療戦略の一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is believed that Legionella invades and proliferates within macrophages while concurrently causing a state of reduced host's innate defense functions. This study aimed to elucidate the mechanism by which Legionella inhibits the activation of AMPK within host cells and investigate the pathways involved in Legionella infection defense among the downstream factors of AMPK, such as autophagy and apoptosis. As a result, it was found that macrophages infected with highly intracellular replicative strains of Legionella exhibited stronger suppression of AMPK activity and were implicated in the inhibition of autophagosome formation, which is a downstream factor of AMPK.

研究分野：感染免疫

キーワード：レジオネラ

1. 研究開始当初の背景

レジオネラは、自然環境中では自由生活アメーバなどの細菌捕食性原生動物内で増殖し、また、ヒト体内では、単球・マクロファージ内で増殖する細胞内寄生菌である。宿主細胞内における *Legionella pneumophila* は、様々なタンパク質を分泌し、異物や一般細菌が取り込まれた際のエンドサイトーシス経路から逸脱し形成された異質な食胞 (*Legionella*-containing phagosome, LCP) 内で増殖する。LCP は、リソソームとの融合を回避することで酵素依存的な殺菌を免れることが知られていたが、NADPH オキシダーゼの触媒により産生される活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) による殺菌に対しては、オキシダーゼ自体の活性を低下させることで ROS 産生を抑制していることが報告された (1)。

これまでに、レジオネラ感染マウスにおいて、2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンを投与することで、生存率の改善と菌の増殖を抑制できることを報告した (2)。この効果発現メカニズムとして、メトホルミンが、マクロファージの代謝中枢因子 AMPK (AMP 活性化キナーゼ) を活性化すること、ミトコンドリア由来 ROS の産生を増強させることを示した。その一方で、レジオネラが宿主細胞内における AMPK の活性化 (リン酸化) とミトコンドリア由来 ROS 産生を抑制するという、新たな知見も見出した。つまり、レジオネラがマクロファージに侵入し増殖すると同時に、宿主は本来の生体防御機能が低下している状態に陥いるものと考えられる。

免疫抑制状態にある患者に発症する感染症、特に敗血症は、その予後の重篤さにおいて、臨床で極めて重要である。この場合の敗血症の起炎菌は、腸内グラム陰性桿菌や緑膿菌の占める頻度が高いこと、嚴重な低菌環境において患者を治療しても敗血症の発症頻度は変わらないことなどが報告されている (3)。このことから、多くの場合生体内に定着した細菌叢からの内因性感染、すなわち Bacterial translocation (BT) によって発症するものと考えられており、この経路は、動物実験モデルでも証明されている (4)。そこでこの内因性感染という現象が、生体防御能が低下したレジオネラ感染時にも起こり得るものと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、レジオネラが宿主細胞内の AMPK の活性化を抑制する機序の解明、また AMPK の下流に存在する因子の中で、レジオネラの感染防御に関わる経路 (オートファジー、アポトーシスなど) について調べることを目的として行った。

3. 研究の方法

本研究では、マウス骨髄由来マクロファージおよびレジオネラ肺炎マウスモデルを用いて AMPK 関連因子について解析を行った。野生型マウス (C57BL/6J) Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) 欠損マウスを用いて、レジオネラ感染防御における AIM の役割についても検討を行った。主な検討項目は以下の通りである。

(1) 様々なレジオネラ菌株を用いた AMPK 活性抑制能の違いについての検討: SUZUKI 株 (実験株) JR32 株 (実験株) 血清型 1~6 の ATCC 株をマウス骨髄由来マクロファージに感染させ (マクロファージ: レジオネラ=10:1) 細胞内に取り込まれなかった菌を洗浄で除去した後、一晚培養した。感染細胞および未感染細胞を溶解してウェスタンブロット用のサンプルとし、抗リン酸化 AMPK を検出した。また、感染直後、1 時間後、24 時間後、48 時間後に細胞を溶解し、懸濁液の希釈系列を作製して寒天培地に塗布し菌数測定を行った。

(2) オートファジーについての検討: マウス骨髄由来マクロファージにレジオネラ (SUZUKI 株) を感染させ、4 時間後にオートファジー小胞形成を評価するための蛍光試薬で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) 腸管内緑膿菌のトランスロケーションマウスモデルを応用した、免疫抑制状態の誘導評価の検討: 緑膿菌 D-4 株 (マウス菌血症由来緑膿菌株) を給水ボトルでマウスに 3 日間与え、腸内に定着させた。その後レジオネラを経気道的に感染させ、経時的に各種臓器および血液を採取し、緑膿菌選択寒天培地 (NAC 寒天培地) に塗布して緑膿菌コロニーの検出を試みた。

(4) マクロファージのアポトーシスに対する AIM の関与についての検討: 野生型マウス骨髄由来マクロファージにレジオネラを感染させ、24 時間後の AIM の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR で評価した。また、AIM 欠損マウスを用いて解析を行った。AIM 欠損マウスおよび野生型マウスの骨髄由来マクロファージにレジオネラを感染させ、細胞内のレジオネラ菌数を経時的に測定し、マウス系統間の比較を行った。

4. 研究成果

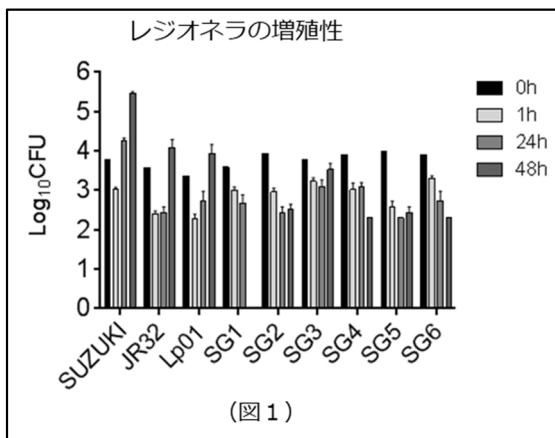
(1) マウスでは、A/J 系統のみが、*Legionella pneumophila* (ヒトに感染して重篤な肺炎を起こす菌種) に対して感受性で、他の多くの系統 (C57BL/6, BALB/c, 129, C3H/HeJ など) は抵抗性である。A/J マウス骨髄由来マクロファージ内での増殖性は菌株によって異なっており、急速に増殖する株もあれば徐々に菌数が減少する株も認められた。中でも SUZUKI 株が最も増殖性が高く、血清型 (SG) 6 が最も低かった (図 1)。また、感染 24 時間後の細胞を回収し、活性

型（リン酸化）AMPK 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、細胞内の増殖性が高い菌株において、リン酸化レベルが低下していることがわかった。このことから、レジオネラは自己増殖に都合のよい細胞内環境を作り出すために、宿主細胞の AMPK 活性化をダウンレギュレートする可能性が示唆された。

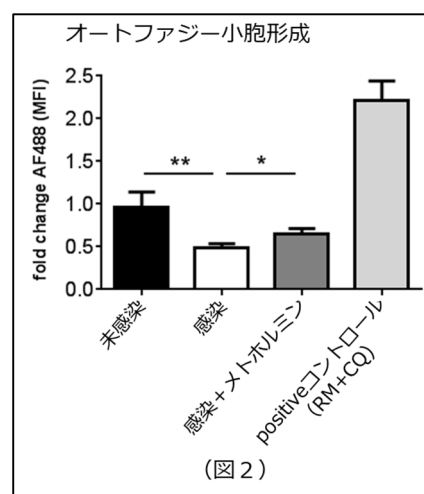
（２）これまでに様々な種の細菌が宿主細胞内に侵入して生存・増殖をすることが知られている。細胞内寄生細菌の細胞内への侵入は、多くの場合、宿主の殺菌機構であるファゴサイトーシスが利用されるが、ある種の細菌はファゴソーム・リソソーム系を介した殺菌から逃れるための様々な手段を有している。このような細胞内寄生細菌の戦略に対し、宿主側はオートファジーを用いることにより対抗しているが、レジオネラの場合は、宿主細胞内に侵入したレジオネラを含むファゴソーム膜にはオートファジー関連因子である ATG7、LC3 が集積するが、最終的にはオートファジーによるクリアランス効果は認められない、という見解が示されている。これを確認するため、まず、A/J マウス骨髄由来マクロファージにレジオネラを感染させ、宿主応答としてオートファジー誘導が起こるのかを確認した。感染 4 時間後の感染マクロファージのオートファジー小胞を選択的に蛍光染色できる試薬を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡でその蛍光強度を観察したところ、感染マクロファージは未感染マクロファージに比べて蛍光強度が減少していることがわかった。つまり、レジオネラ感染によってオートファジーは抑制されているものと考えられた。一方、感染後のマクロファージにメトホルミンを添加すると、有意にオートファジー小胞が増加したことから、メトホルミンによる AMPK 活性化がオートファジー小胞の形成を促進している可能性が示唆された（図 2）。

（３）BT は腸内に生息する生菌が腸管上皮を通過して腸管以外の臓器に移行する現象を指す。BT は種々の要因により誘発されるが、その一つに腸管内に通常低い菌数で生息する大腸菌、緑膿菌などの菌が異常増殖した場合が挙げられる。過去に構築された BT マウスモデルを再現し、免疫抑制剤を投与する代わりに、レジオネラ感染でも BT が誘導されるのかを確認した。緑膿菌 D-4 株を含んだ飲料水を投与する前の A/J マウスから便を採取し、その懸濁液を NAC 寒天培地に塗布したが、コロニー形成は認められなかったため腸管内に緑膿菌は定着していないことを確認した。緑膿菌 D-4 株を 3 日間与えた後通常の飲料水に戻し、数日から 4 週間程度飼育し、その後採取した便で確認したところ、いずれのマウスにおいても NAC 寒天培地上にコロニー形成を認めたため、腸管内に緑膿菌が定着したものと判断した（ $n=4\sim5$ ）。このマウスにレジオネラを致死量より少ない菌量（ 10^5 CFU）で経気道感染した。レジオネラ感染 4 日後に解剖し、肺、脾臓、肝臓、腎臓への腸管内からの緑膿菌 D-4 株の播種を NAC 寒天培地で確認したが、安定的なデータを得ることが出来なかった。緑膿菌 D-4 株を腸管内に定着させる際、他のマウス系統やアンピシリンを投与するなど試みたが、レジオネラ感染刺激で BT を誘導する、という結果には至らなかった。肝臓サンプルから緑膿菌が検出されたが、再現が難しく、実験系の見直しが必要であると考えられた。

（４）レジオネラが誘導するマクロファージのアポトーシスは、細胞内寄生菌であるレジオネラが感染の場を失うことで増殖を防ぐ効果があると考えられているが、一方で菌の拡散に寄与するとの見方もある。マクロファージが特異的に産生する分泌タンパク質である AIM（apoptosis inhibitor of macrophages）は、アポトーシスを抑制する機能を持ち、様々な疾患との関連が報告されている。今回、レジオネラがマクロファージに誘導するアポトーシスに AIM が関与しているのかについて、AIM 欠損マウスを用いて解析を行った。感染直後のマクロファージ（感染後 0 時間）では、野生型マクロファージと AIM 欠損マクロファージの間で菌数の差はなかったことから、菌の取り込みに差はないことがわかった。感染後 16 時間、24 時間、48 時間後においては、AIM 欠損マウス由来マクロファージにおいて菌数が減少していた。このときマクロファージの細胞増殖性、代謝活性を評価するために MTT アッセイを行った。感染前のマクロファージ数は野生型マウス、AIM 欠損マウスで差はなく、感染後 16 時間、24 時間、48 時間後において、AIM 欠損マウス由来マクロファージの方が有意に高値であった。この結果は予想に反していたため、再現性の確認を取る必要があると考えている。



（図 1）



（図 2）

<引用文献>

- (1) Harada T, Miyake M, Imai Y. 2007. Evasion of *Legionella pneumophila* from the bactericidal system by reactive oxygen species (ROS) in macrophages. Microbiol Immunol 51: 1161-1170.
- (2) Kajiwara C, Kusaka Y, Kimura S, Yamaguchi T, Nanjo Y, Ishii Y, Uono H, Standiford TJ, Tateda K. 2018. Metformin Mediates Protection against Legionella Pneumonia through Activation of AMPK and Mitochondrial Reactive Oxygen Species.
- (3) Ueda T, Shibata H, Nakamura H, Takubo T, Kubota Y, Ogawa S, Tani Y, Masaoka T, Nagano T, Takeo H, Hasegawa H. & Moriyama Y. 1983. Efficacy of laminar air flow room with or without clean nursing for preventing infection in patients with acute leukemia. Jap. J. Clin. Oncol., 13(Suppl.): 151-158,1983.
- (4) Matsumoto T, Furuya N, Tateda K, Miyazaki S, Ohno A, Ishii Y, Hirakata Y, Yamaguchi K. 1999. Effect of passive immunotherapy on murine gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. 48(8):765-770.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------