

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790334  
 研究課題名 (和文) 宿主細胞カスパーゼ活性の制御を介した結核菌のマクロファージ内生存の分子機構  
 研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of intracellular survival of *M. tuberculosis* inside host macrophages via regulation of caspases activation.  
 研究代表者  
 内山 良介 (UCHIYAMA RYOSUKE)  
 兵庫医科大学 医学部 助教  
 研究者番号：20456891

## 研究成果の概要 (和文)：

結核菌をはじめとする細胞内寄生性細菌に対する、宿主マクロファージのカスパーゼ活性制御を介した感染防御機構および細胞内生存機構について解析を行い、以下の点を明らかにした。結核菌の感染により、宿主マクロファージのカスパーゼ1活性化が誘導され、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  や IL-18 が産生されることがわかった。さらにこの現象には、結核菌の病原性候補遺伝子領域 RD1 が関与することが明らかとなった。結核菌と同じ抗酸菌である BCG と、代表的な細胞内寄生菌であるリステリアの感染により、FasL/Fas シグナル系を介してカスパーゼが活性化され、これが炎症性サイトカイン産生に関与していることが明らかとなった。

## 研究成果の概要 (英文)：

On the basis of regulation of caspase(s) in host macrophages infected with *M. tuberculosis* (MTB) and the typical intracellular bacteria *L. monocytogenes* (LM), we have shown that caspase-1 activation was induced in macrophages infected with MTB, which leads to the production of functional inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. We also found that the virulence factor RD1 of MTB involved in the activation of caspase-1 in macrophages. FasL/Fas signaling pathway is an important systems for caspase(s) activation. We have unveiled the involvement of Fas signaling pathway for IL-18 production in mice infected with BCG or LM.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病原性

キーワード：結核菌、マクロファージ、カスパーゼ、IL-18、FasL/Fas シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

宿主体内に侵入した結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、主としてマクロファージに食食される。しかし、結核菌はその細胞内殺菌機構に抵抗して細胞内で生存増殖することが可能であり、この殺菌抵抗性は、菌がファゴソームとリソソームの融合を阻害することにより発揮されることが明らかにされている。加えて近年、結核菌強毒株は感染マクロファージのアポトーシスを抑制し、感染細胞内での生存増殖を可能にするとの報告がある (Riendeau C. J., and Kornfeld H., *Infect. Immun.* 71(1):254-259, 2003.)。マクロファージは結核菌の主要な宿主細胞となることから、感染マクロファージの細胞死抑制は感染の成立維持に重要な意味を有すると考えられるが、一方で、結核菌強毒株はマクロファージにネクローシスを誘導する能力が高いことも示されている (Chen M., et al., *J Immunol.* 176(6):3707-3716, 2006.)。これらの結核菌強毒株による細胞死の誘導やその制御は、結核菌の病原性を理解する上で極めて重要な知見であるが、これらの知見から菌の病原性発現機序を明確に説明するには矛盾点も多い。

これまでの研究で、結核菌による細胞死制御の機序について解析した結果、結核菌強毒株は、宿主細胞のアポトーシス誘導に重要なカスパーゼ9の活性化を強く誘導することを明らかとした (Uchiyama R., et al., *Infect. Immun.* 75(6):2894-2902, 2007.)。この誘導活性は結核菌強毒株には強く認められたが、弱毒株や強毒株の死菌には認められなかった。さらに、結核菌強毒株を感染させたマクロファージのカスパーゼ9活性を阻害するとネクローシスが強く誘導されたことから、カスパーゼ9は感染細胞のネクローシスの抑制に関与することが示された。結核菌強毒株による感染細胞のネクローシス誘導機序を解析したところ、この誘導過程には、結核菌の病原性候補遺伝子領域であるRD1領域が関与することが明らかとなった (Kaku T, Kawamura I, Uchiyama R, Kurenuma T, and Mitsuyama M. *FEMS Microbiology Letters.* 274(2):189-195, 2007.)。以上のように、これまでの研究から、ネクローシスの誘導と、特定のカスパーゼ活性化を介したその制御が、結核菌の病原性に関連して作用しているという可能性が浮かび上がってきた。さらにこの活性化したカスパーゼは、宿主細胞のアポトーシス誘導という従来の役割とは異なる機序で宿主及び結核菌の感染制御に関与している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

結核菌感染宿主には強いTH1型の細胞性免

疫応答が誘導され、病態や感染防御に関与する。宿主感染防御免疫の誘導には、感染初期で感染マクロファージが産生する炎症性サイトカインが重要である。我々は、マクロファージによるTh1型サイトカインの産生には細胞内での結核菌の代謝が不可欠で、感染細胞内で生菌により産生される何らかの因子がマクロファージからのIL-12やIL-18産生を誘導し、その結果IFN- $\gamma$ が産生される可能性を示した (Fukasawa Y, Kawamura I, Uchiyama R., et al., *Infect. Immun.* 73(10):7051-7055, 2005.)。特にIL-18の産生は、遺伝子の転写・翻訳の後、新たな刺激により活性化されたカスパーゼ1により成熟型(機能型)へと変換されて細胞外へ分泌される過程が重要である。これまでに細胞内寄生性細菌のサルモネラでは、菌の感染によりカスパーゼ1が活性化され、サイトカイン産生および細胞死が誘導されることが示されているが (Franchi, L., et al., *Nat. Imm.* 7:576-582, 2006.)、結核菌感染における宿主カスパーゼ1活性化と、そのサイトカイン産生および細胞死誘導への関与については未だ明らかではない。そこで、カスパーゼ1遺伝子欠損マウス由来のマクロファージを用い、病原性依存的なIL-18の産生誘導が宿主カスパーゼ1依存であることを証明するとともに、カスパーゼ1による宿主細胞の細胞死制御並びに宿主細胞の細胞死による細胞内寄生性細菌の細胞内増殖制御について検討を行う。

宿主のFasL/Fasシグナル系はアポトーシス誘導に働くカスパーゼ群の活性化に重要である。一方、結核菌の感染によりFasL及びFas遺伝子の発現誘導が認められるなど、結核感染とFasL/Fasシグナル系の関与が考えられるものの、その詳細な役割については不明である。さらに、FasL/Fasシグナル系を介して炎症性サイトカインIL-18やIL-1 $\beta$ が産生されることが示されているが (Miwa K., et al., *Nature.*, 4(11):1287-1292., 1998., Tsutsui H., et al., *Immunity.*, 11:359-367., 1999.)、実際の細菌感染におけるこれらの役割は不明である。そこで、アポトーシス誘導カスパーゼの活性化に重要なFasL/Fasシグナル系の、結核菌など細胞内寄生性細菌の感染における役割についても検討を行う。

## 3. 研究の方法

野生型およびカスパーゼ1遺伝子欠損マウス由来の腹腔滲出マクロファージに結核菌H37Rv株を感染させ、培養上清中のIL-18を経時的にELISAにより調べた。さらに、細胞のネクローシスは、培養上清中へ遊離する乳酸脱水素酵素(LDH, Lactate Dehydrogenase)を定量することで解析した。また、CFUアッセイにより細胞内菌数変化を

解析した。感染細胞のカスパーゼ1活性化は、活性型カスパーゼ1特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。さらに、これらの現象への結核菌病原性候補遺伝子領域 RD1 の関与を調べるため、結核菌野生株に加え、RD1 欠損株 ( $\Delta$ RD1 株) およびその欠損株に RD1 領域を再度相補した株 ( $\Delta$ RD1::RD1 株) を感染させ、種々の解析を行った。

野生型、FasL 機能欠損マウス (FasL<sup>gld/gld</sup>) および Fas 機能欠損マウス (FasL<sup>1pr/1pr</sup>) よりマクロファージを調整し、in vitro で感染実験を行った。その後、炎症性サイトカイン産生、細胞内菌数変化およびカスパーゼ活性化を調べ、FasL/Fas シグナル系の細菌感染防御への関与を解析した。さらにカスパーゼインヒビターにより、サイトカイン産生に関与するカスパーゼの特定を試みた。野生型、FasL<sup>gld/gld</sup> および FasL<sup>1pr/1pr</sup> マウスに尾静脈より結核菌を感染させ、各臓器の菌数、血中サイトカイン産生を調べた。

#### 4. 研究成果

TH1 型防御免疫の誘導には、感染により産生誘導される IL-12 や IL-18 などの炎症性サイトカインが重要である。IL-18 は IL-1 $\beta$  と同様に前駆体として細胞質内に産生された後、種々の刺激により活性化されたカスパーゼにより切断され、機能的なサイトカインとして分泌される。まず、結核菌感染と炎症性サイトカイン IL-18 や IL-1 $\beta$  産生に関わる制御について解析を行った。マウス腹腔よりチオグリコレート培地で誘導した腹腔細胞を採取し、マクロファージを調整した後、結核菌を in vitro で感染させ、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。その結果、結核菌の感染 4 時間後から、IL-18 および IL-1 $\beta$  産生が認められ、24 時間後まで産生量が上昇した。一方、RD1 領域の関与を調べるため、結核菌 RD1 欠損株およびその株に RD1 領域を相補した株 ( $\Delta$ RD1::RD1 株) を感染させたところ、野生株に比べ RD1 欠損株でサイトカイン産生量が有意に低く、さらに  $\Delta$ RD1::RD1 株では産生が野生株と同等に認められた。これに対して、TNF- $\alpha$  や IL-6 は各株の間で差は認められなかった。以上の結果より、炎症性サイトカイン IL-18 や IL-1 $\beta$  産生には結核菌の RD1 遺伝子領域が関与している可能性が示唆された。次に、結核菌感染で産生される IL-18 や IL-1 $\beta$  の産生機序を詳細に解析する目的で、結核菌感染による宿主マクロファージのカスパーゼ1活性化について調べた。感染後、細胞破碎液を調整し、そのカスパーゼ1活性化をウェスタンブロット法で調べたところ、結核菌野生株および  $\Delta$ RD1::RD1 株の感染において、活性型カスパーゼ1活性化が認められ、RD1 欠損株の感染

では認められなかった。さらに、カスパーゼ1 遺伝子欠損マウス由来マクロファージを用いて実験を行った結果、カスパーゼ1 欠損マクロファージにおいては IL-18 および IL-1 $\beta$  産生が結核菌の感染では確認されず、これらがカスパーゼ1 依存的な現象であることが明らかとなった。一方、結核菌の感染では宿主マクロファージの細胞死が誘導され、これが菌の病原性と関連していることを明らかとしている。そこでカスパーゼ1 欠損マクロファージに結核菌を感染させ、ネクローシス誘導について評価したところ、カスパーゼ1 欠損マクロファージにおいても野生型マウス由来マクロファージと同等の細胞死を認めた。また、結核菌の細胞内増殖について、野生株、RD1 欠損株および  $\Delta$ RD1::RD1 株で比較したところ、三者で差は認められなかった。以上の結果より、結核菌の感染によりマクロファージのカスパーゼ1 活性化が誘導され、IL-18 や IL-1 $\beta$  産生が誘導され、これらは結核菌の病原性候補遺伝子領域 RD1 に依存することがわかった。しかし、宿主マクロファージ内での菌数変化に差は認められなかったことから、細胞内寄生については RD1 には依存せず、さらに宿主マクロファージの細胞死誘導についてもカスパーゼ活性は関与しないことが明らかとなった。

FasL/Fas シグナル系の細菌感染防御における役割について検討するため、野生型および FasL<sup>gld/gld</sup> マウスにリステリアを感染させ、臓器内 cfu 変化および血中 IL-18 濃度を測定した。その結果、野生型に比べて FasL<sup>gld/gld</sup> マウスでは血中 IL-18 濃度が有意に低く、さらに肝臓における菌の排除能が低下していた。これらの結果は FasL/Fas シグナル系が IL-18 産生を介して細菌感染防御に関与する可能性を示唆するものである。そこで、さらに詳細に解析する目的で、各マウスから腹腔細胞を調整し、in vitro でリステリアを感染させた後、培養上清中のサイトカインを測定した結果、野生型に比べ FasL<sup>gld/gld</sup> マウス由来腹腔細胞で IL-18、IL-1 $\beta$  および IFN- $\gamma$  産生量が有意に低かった。一方、TNF- $\alpha$  や IL-6 は変化が認められなかった。さらに野生型マウスの腹腔細胞に in vitro で FasL 中和抗体存在下でリステリアを感染させた後、サイトカインを測定すると、FasL 中和により IL-18、IL-1 $\beta$  および IFN- $\gamma$  産生量が有意に低下した。IL-18 や IL-1 $\beta$  の遺伝子発現に差は認められなかった。以上の結果から、リステリア感染により、FasL/Fas シグナル系を介した IL-18 や IL-1 $\beta$  産生機構が存在することが示された。腹腔細胞の細胞集団をギムザ染色で観察すると、単球およびリンパ球の存在が認められた。そこでプレートへの付着能の違いでリンパ球を除去し、リステリアを感染させ、サイトカイン産生を調べたところ、TNF- $\alpha$  や

IL-6 産生量は変化しなかったが、リンパ球細胞除去群において IL-18 および IL-1 $\beta$  が有意に低下していた。このことから Fas シグナル系を介した IL-18 産生にリンパ球の関与が示唆されたことから、リンパ球を回収し、FACS で解析したところ、NK1.1 陽性 NK 細胞の存在が認められた。さらに感染細胞から調整したマクロファージおよびリンパ球において、それぞれ Fas および FasL 遺伝子発現が認められた。そこで、抗アシアロ GM1 抗体を用いて NK 細胞を除去し、リステリアを感染させ、サイトカイン産生を調べたところ、IL-18 および IL-1 $\beta$  産生が有意に低下していた。さらに *in vivo* でマウスに抗アシアロ GM1 抗体を投与し、リステリアを感染させたところ、血中 IL-18 濃度が有意に低下した。これらの結果から、リステリア感染では、マクロファージにおいて Fas が、また NK 細胞の FasL 発現が誘導され、NK 細胞からの FasL 刺激を介して IL-18 および IL-1 $\beta$  産生が誘導されることが明らかとなった。この FasL/Fas シグナル系の詳細なメカニズムを解明する目的で、LPS で刺激し Fas 遺伝子発現を誘導したマクロファージをマウス FasL 発現細胞株および control T 細胞株で刺激し、培養上清中の IL-18 および IL-1 $\beta$  を ELISA で測定した。その結果、FasL 発現 T 細胞株で刺激した場合のみ IL-18 および IL-1 $\beta$  産生が認められ、これらは control T 細胞株で刺激した場合には認められなかった。さらに FasL 中和抗体存在下で産生が抑制されたことから、FasL/Fas シグナル系を介したサイトカイン産生機構を観察していることがわかった。そこで、各種遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージを調整し、LPS で Fas 遺伝子発現を誘導した後、FasL 発現 T 細胞株で刺激してサイトカイン産生を野生型マクロファージと比較した。その結果、カスパーゼ 1 欠損マクロファージでは変化は認められなかったものの、アダプター分子である ASC 欠損マクロファージでは IL-18 および IL-1 $\beta$  産生量が有意に低下していた。さらに、カスパーゼ阻害剤存在下で FasL 発現 T 細胞株で刺激した場合、サイトカイン産生が抑制されたことから、何らかのカスパーゼ活性が関与していることがわかった。近年の研究により、炎症性サイトカインの産生にはマクロファージ内の活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) シグナル系が重要であることが明らかとされている。そこで今回の現象における ROS シグナル系の関与を検討した。まず、FasL 刺激における ROS 産生を ROS 特異的プローブを用いて解析を行ったところ、FasL 発現細胞株で刺激した場合のみ ROS の産生が認められた。この ROS のサイトカイン産生への関与を調べるため、ROS 除去剤である N-acetyl-L-cysteine (Nac) で細胞を処理し、FasL 刺激により産

生される ROS を除去したところ、IL-18 および IL-1 $\beta$  産生が抑制された。さらに ASC 欠損マウス由来マクロファージの ROS 産生を検討すると、野生型マクロファージに比較して、FasL 刺激で産生される ROS が有意に低かった。これらの結果から、FasL/Fas シグナル系は ASC を介して ROS を産生し、これらが IL-18 産生にいたるものと考えられた。

以上の様に、結核菌をはじめとする細胞内寄生性細菌に対する、宿主マクロファージのカスパーゼ活性制御を介した感染防御機構および細胞内生存機構について新たな知見を得ることができた。今後はこの新たな感染制御メカニズムの、他の病原体感染への関与を解析することで、普遍的な感染制御メカニズムの解明に寄与することができると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kurenuma T, Kawamura I, Hara H, Uchiyama R, Daim S, Dewamitta SR, Sakai S, Tsuchiya K, Nomura T, Mitsuyama M., The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages., *Infect. Immun.*, 査読有り, 77(9):3992-4001., 2009.

[学会発表] (計 3 件)

① 内山良介、細菌感染における Fas シグナル系を介した IL-18 産生機構、第 83 回日本細菌学会総会、平成 22 年 3 月 28 日、横浜 (パシフィコ横浜)

② Dewamitta SR., Kawamura I., Hara H., Uchiyama R., Daim S., Sakai S., Tsuchiya K., Nomura T and Mitsuyama M., RD1 locus in *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the activation of caspase-1 via induction of potassium efflux in infected macrophages., 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 21 年 12 月 3 日、大阪 (国際会議場)

③ 内山良介、細菌感染における Fas/FasL シグナルを介した IL-18 産生機序の解析、第 82 回日本細菌学総会、平成 21 年 3 月 13 日、名古屋 (名古屋国際会議場)

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/micro/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内山 良介 (UCHIYAMA RYOSUKE)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：20456891