

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03484

研究課題名（和文）パイロトーシス細胞が放出するリステリア増殖抑制因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of the intracellular Listeria growth suppression factor released from pyroptotic cells.

研究代表者

須田 貴司（Suda, Takashi）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：70250090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：炎症誘導性プログラム細胞死パイロトーシスを誘導した細胞の培養上清中にリステリア菌の細胞内増殖を抑制する活性（ICLGS）を見出し、その責任分子としてスペルミジンを見出した。また、スペルミンやN1アセチルスペルミジンもICLGS活性を示した。スペルミジンやスペルミンはサルモネラ菌やA群連鎖球菌の細胞内増殖も抑制した。スペルミジンはゼノファジーを誘導することにより細胞内リステリアの排除を促進することが示唆された。さらに、動物モデルでもスペルミジンのリステリア増殖抑制作用が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでパイロトーシス細胞がスペルミジンを放出することも、スペルミジンがゼノファジーを誘導することでリステリアなどの細胞内寄生細菌の細胞内増殖を抑制する作用を持つことも全く報告されておらず、新規性の高い学術的成果である。スペルミジンは食品からも摂取可能な比較的安全な化合物であり、本研究の成果は細菌感染症の予防や治療にも寄与する可能性があり、医療分野への波及効果などの社会的意義が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We discovered the intracellular Listeria growth suppression (ICLGS) activity in the culture supernatant of cells killed by pyroptosis. We identified spermidine as a responsible molecule for the ICLGS activity. Additionally, spermine and N1-acetylspermidine also exhibited ICLGS activity. Spermidine and spermine inhibited the intracellular growth of Salmonella and Group A Streptococcus. Spermidine enhanced the elimination of intracellular Listeria by inducing xenophagy. Furthermore, the inhibitory effect of spermidine on Listeria growth was demonstrated in an animal model.

研究分野：免疫学、プログラム細胞死

キーワード：パイロトーシス ポリアミン リステリア ゼノファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パイロトーシスは、細菌感染によりマクロファージが引き起こすカスパーゼ1依存性のネクローシス様プログラム細胞死として発見された。パイロトーシスを起こした細胞からは、IL-1 β やIL-18などの炎症性サイトカインに加え、Danger-associated molecular patterns (DAMPs)と総称される細胞内物質が放出され、周囲の組織に炎症を惹起する。したがって、パイロトーシス細胞から放出される細胞内物質のレパートリーや、それらの生理活性を理解することがアポトーシスと異なるパイロトーシスの役割を理解する上で極めて重要である。我々は、Caspase-1強制重合化によりパイロトーシスを誘導した細胞の培養上清とCaspase-8またはCaspase-9の強制重合化によりアポトーシスを誘導した細胞の培養上清のメタボローム解析を行い、後者に比べ前者にはスペルミジンが多く含まれることを見出した。さらに、パイロトーシスを起こした細胞の培養上清中にマクロファージに感染したリステリア (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) の増殖を抑制する活性を見出した。

2. 研究の目的

スペルミジンはオートファジーを誘導すること、またリステリアなどの細胞内寄生細菌がオートファジー(ゼノファジー)の標的となることが知られている。リステリアはゼノファジーに対抗するメカニズムを有するが、オートファジー機構が亢進すればリステリアの細胞内増殖抑制に働く可能性は十分にある。これらの事から、我々は、パイロトーシス細胞がスペルミジンを放出し、周囲のマクロファージに働きかけ、ゼノファジーを促進することでリステリアの細胞内増殖を抑制するのではないかと考えた。そこで、本研究では、パイロトーシス細胞が産生する細胞内リステリア増殖抑制(ICLGS)因子とその作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 細菌の細胞内増殖抑制活性の検出法: 細胞培養上清やポリアミンの存在下でRaw264.3マウスマクロファージ様細胞株に*Lm*をmoi=5で感染させ、30分後に10ug/mlのゲンタマイシンを添加して細胞外の*Lm*を殺した。感染1時間後および6時間後に細胞溶解液中の*Lm*の菌数をコロニー法で測定した。サルモネラ(*Salmonella* Typhimurium, moi=100)およびA群連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*, moi=5)はHeLa細胞に感染させ、同様にゲンタマイシン処理し、感染1時間後および3時間後に細胞溶解液中の菌数を測定した。

2) ゼノファジーの検出法: Raw264.3細胞に*Lm*をmoi=5で感染させ、30分後に10ug/mlのゲンタマイシンを添加し、感染3時間後にDAPI(*Lm*)とanti-LC3抗体(オートファゴゾームマーカー)およびanti-Lamp1抗体(リソソームマーカー)の3重染色を行い、蛍光顕微鏡でLC3やLamp3と共局在する*Lm*の割合を計測した。

3) 動物モデルにおけるスペルミジンのリステリア増殖抑制作用の検討: 20mg/kgのスペルミジンあるいはコントロールとしてPBSを感染の前日から3日後まで毎日腹腔内投与したマウスに、 10^4 cfuの*Lm*を経静脈感染させ、感染4日後の脾臓および肝臓の菌数をコロニー法で計測した。また、20mg/kgのスペルミジンあるいはPBSを感染の前日から5日後まで毎日腹腔内投与したマウスに 10^6 cfuの*Lm*を経静脈感染させ、感染14日後までのマウスの生存率をモニターした。

4. 研究成果

1) パイロトーシス細胞とアポトーシス細胞の培養上清中のICLGS活性の検討
FKBPのF36V変異体(Fv)の直列三量体とカスパーゼ1、8、および9の融合蛋白を発現させたEG7マウス胸腺腫細胞株(各々EG7-C1、EG7-C8およびEG7-C9細胞と命名)をFvに結合する二価のリガンドであるAP20187で刺激すると、親株のEG7細胞は変化しないが、EG7-C1細胞はパイロトーシス、EG7-C8とC9細胞はアポトーシスを起こす。これらの培養上清の存在下で培養したRaw264.7マクロファージ様細胞株に*Lm*を感染させると、パイロトーシスを起こしたEG7-C1細胞の培養上清のみ、感染6時間後

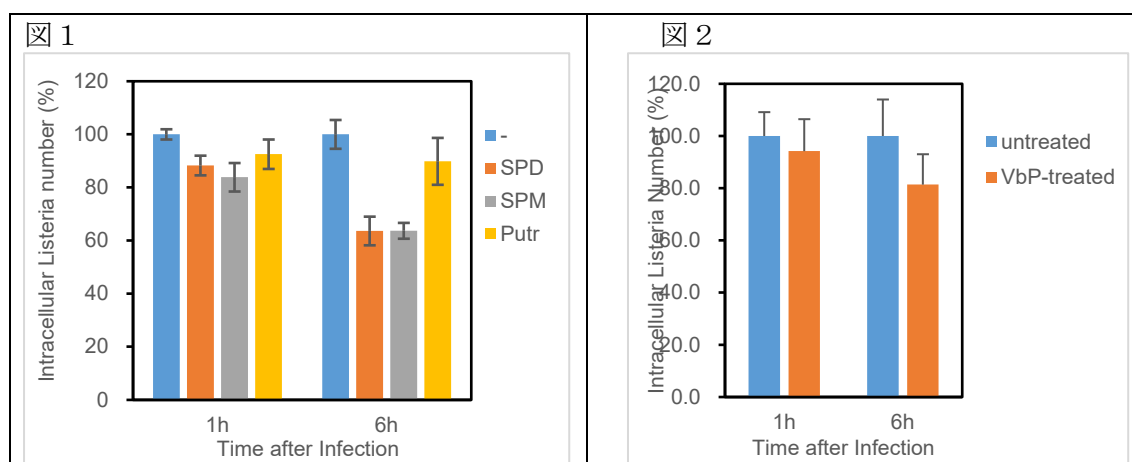
の細胞内 *Lm* 菌数を有意に減少させる効果を示した。一方、感染 1 時間後の細胞内 *Lm* 菌数には差が無かったため、パイロトーシス細胞の培養上清は *Lm* の細胞内への感染には影響せず、細胞内での *Lm* の増殖を抑制したと考えられる。

2) パイロトーシス細胞上清中の ICLGS 因子の物性の検討

パイロトーシスを誘導した EG7-C1 細胞の培養上清を分子量カットオフ 3 kD の限外濾過で分画し、ICLGS 活性を検討したところ、3kD 以下の分画中にも ICLGS 活性が検出された。また、パイロトーシスを誘導した EG7-C1 細胞の培養上清を 95°C で 10 分間熱処理し、ICLGS 活性を検討したところ、ICLGS 活性は変化しなかった。これらの結果から、ICLGS 因子は分子量 3kD 以下の非蛋白性の物質と考えられる。

3) ポリアミンの ICLGS 活性の検討

我々は以前、AP20187 刺激でパイロトーシスを誘導した EG7-C1 細胞とアポトーシスを誘導した EG7-C8 および EG7-C9 細胞の培養上清のメタボロール解析を行い、EG7-C1 細胞の培養上清のスペルミジン濃度が他の培養上清に比べ高いことを見出していた。上記 ICLGS 因子の物性から、スペルミジンが ICLGS 因子である可能性を検討した。その結果、スペルミジンは用量依存性に Raw264.3 細胞に感染させた *Lm* の細胞内増殖を抑制することが示された。さらに、スペルミジン以外のポリアミンであるスペルミンおよびプトレシンについても ICLGS 活性を検討したところ、スペルミンはスペルミジンと同様 ICLGS 活性を示したが、プトレシンの ICLGS 活性は弱いかほとんど認められなかった (図 1)。



4) Val-boroPro 誘導パイロトーシス細胞の培養上清の ICLGS 活性の検討

Raw264.3 マウスマクロファージ様細胞株を NLRP1 インフラマソームの活性化を誘導する Val-boroPro の存在下で培養したところ、パイロトーシスが誘導された。一方、カスパーゼ 1 欠損 Raw264.3 細胞は Val-boroPro 存在下で培養しても、細胞死が誘導されなかった。そこで、Val-boroPro の存在下でパイロトーシスを誘導した Raw264.3 細胞の培養上清、あるいは対照として Val-boroPro 非存在下で培養した Raw264.3 細胞の培養上清の存在下でカスパーゼ 1 欠損 Raw264.3 細胞に *Lm* を感染させ、1 時間後および 6 時間後の細胞内リステリアの菌数を計測した。その結果、パイロトーシスを誘導した培養上清を添加した場合に、コントロール培養上清を添加した場合に比べ、6 時間後の細胞内リステリア菌数が減少する傾向を示した (図 2)。一方、感染 1 時間後の細胞内リステリア菌数には差が無かった。

5) 培養上清中のスペルミジン濃度の定量

Val-boroPro 処理でパイロトーシスを誘導した Raw264.3 細胞の培養上清中のスペルミジンの濃度をポストカラ HPLC 法で定量したところ、1.5 μ M のスペルミジンと 4.2 μ M のスペルミンが検出された。しかし、スペルミジンが単独で有意な ICLGS 活性を示す濃度は 25 μ M 以上であるため、培養上清中にはスペルミジン以外にも ICLGS 活性を示す物質が存在すると考えられる。他のスペルミジン関連ポリアミンが ICLGS 活性を示す

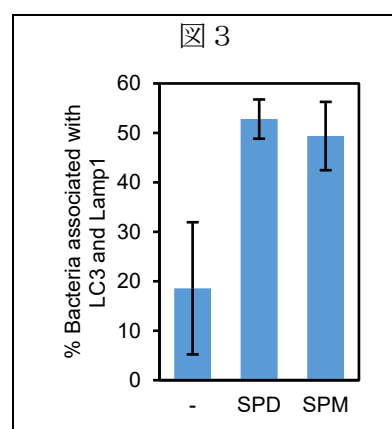
か検討したところ、N1 アセチルスペルミジンも ICLGS 活性を示すことが判明したことから、今後培養上清中の N1 アセチルスペルミジンの定量も必要である。

6) ポリアミンの ICLGS 活性に対するオートファジー阻害剤の効果

スペルミジンはオートファジー誘導作用を示し、寿命延長などに寄与することが報告されている(Eisenberg T. Nat Cell Biol, 2009)。また、リステリアに感染した細胞はオートファジーを誘導して細胞質に脱出したリステリアをオートファゴソームに取り込み、排除しようとする(Rich KA et al, CelLmicrobiol, 2003)。このメカニズムはゼノファジーと呼ばれている。これらのことから、我々は、パイロトーシス細胞から放出されたスペルミジンなどのポリアミンがゼノファジーを活性化することで細胞内 *Lm* の増殖を阻害するのではないかと考えた。そこで、まず、オートファジー阻害作用が知られる PI3K 阻害剤である LY294002 および 3-Methyladenine (3-MA)、ULK1 阻害剤 SBI-026965 がポリアミンの ICLGS 活性を阻害するか検討した。その結果、いずれの阻害剤もスペルミジンやスペルミンの ICLGS 活性を阻害することが示された。

7) ポリアミンのゼノファジーに対する効果の検討

ポリアミンの存在下あるいは非存在下で Raw264.3 細胞に *Lm* を感染させ、3 時間後に *Lm* とオートファゴソームマーカー LC3 とリソソームマーカー Lamp3 の 3 重染色を行い、蛍光顕微鏡で LC3 や Lamp3 と共局在する *Lm* の割合を計測した。その結果、スペルミジンのやスペルミンの存在下ではこれらのマーカーと共局在するリステリア菌の割合が有意に増加した(図 3)。したがって、これらのポリアミンはゼノファジーによる *Lm* の排除を促進することで *Lm* の細胞内増殖を抑制することが示唆された。

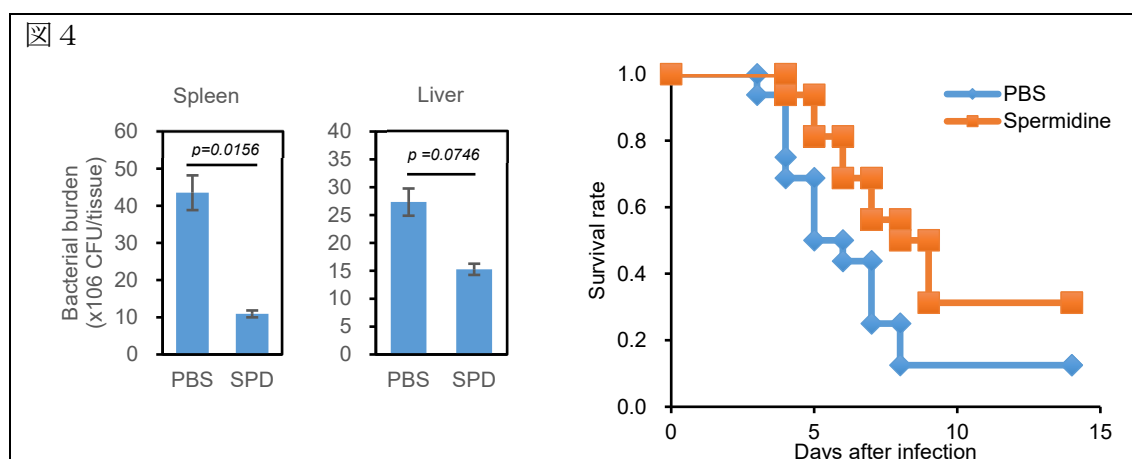


8) リステリア以外の細菌に対するポリアミンの作用の検討。

スペルミジンやスペルミンの存在下あるいは非存在下で培養した HeLa 細胞にサルモネラ菌や A 群連鎖球菌を感染させ、これらの細菌の細胞内増殖に対する効果を検討した。その結果、スペルミジンやスペルミンはサルモネラ菌や A 群連鎖球菌に対しても細胞内増殖抑制活性を示した。

9) 動物実験モデルにおけるスペルミジンのリステリア増殖抑制作用の検証

スペルミジンあるいは PBS を感染の前日から毎日投与したマウスに、*Lm* を感染させ、感染 4 日後の脾臓および肝臓の菌数および感染 14 日後までのマウスの生存率を比較することで、*Lm* 感染動物モデルにおけるスペルミジンの効果を検討した。その結果、スペルミジンの投与を行ったマウスでは PBS を投与した対照マウスに比べ、脾臓の菌数が有意に減少し、肝臓の菌数も減少する傾向を示した(図 4 左)。また、マウスの生存率もスペルミジンの投与により改善した(図 4 右)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuchiya Kohsuke, Hosojima Shoko, Hara Hideki, Kushiyama Hiroko, Mahib Mamunur Rashid, Kinoshita Takeshi, Suda Takashi	4. 巻 34
2. 論文標題 Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 downstream of inflammasomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108887 ~ 108887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108887	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kumrungsee Thanutchaporn, Peipei Zhang, Yanaka Noriyuki, Suda Takashi, Kato Norihisa	4. 巻 61
2. 論文標題 Emerging cardioprotective mechanisms of vitamin B6: a narrative review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 605 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00394-021-02665-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mahib Mamunur Rashid, Hosojima Shoko, Kushiyama Hiroko, Kinoshita Takeshi, Shiroishi Toshihiko, Suda Takashi, Tsuchiya Kohsuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Caspase 7 mediates caspase 1 induced apoptosis independently of Bid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 143 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saeki Ayumi, Tsuchiya Kohsuke, Suda Takashi, Into Takeshi, Hasebe Akira, Suzuki Toshihiko, Shibata Ken ichiro	4. 巻 161
2. 論文標題 Gasdermin D independent release of interleukin 1 by living macrophages in response to mycoplasmal lipoproteins and lipopeptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.13230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kinoshita T, Tsuchiya K, and Suda T
2. 発表標題 Kinesin molecular motor Eg5 functions during innate immune signaling
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuchiya K, and Suda T
2. 発表標題 Gasdermin D mediates the release and maturation of IL-1 alpha during inflammasome formation
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suda T
2. 発表標題 Switches between apoptosis and pyroptosis
3. 学会等名 The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kinoshita T, Tsuchiya K, and Suda T.
2. 発表標題 Kinesin molecular motor Eg5 functions during innate immune responses
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋晃介, 細島祥子, 須田貴司
2. 発表標題 パイロトーシスを誘導する新規カスパーゼの同定と活性化機序の解明
3. 学会等名 第33回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋晃介
2. 発表標題 パイロトーシスを誘導する新規カスパーゼの同定と活性化機序の解明
3. 学会等名 第3回 細胞死コロキウム
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	東 恭平 (Higashi Kyohei) (10463829)	東京理科大学・薬学部薬学科・准教授 (32660)	
研究分担者	土屋 晃介 (Tsuchiya Kohsuke) (50437216)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授 (13301)	

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
---------	---------