

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21490

研究課題名（和文）感染病態を増悪させる宿主炎症関連分子を阻害するシード化合物の設計

研究課題名（英文）Designing a seed compound to inhibit inflammation-related molecules exacerbating infectious diseases

研究代表者

原 英樹（Hara, Hideki）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30456892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：黄色ブドウ球菌など様々な病原菌の薬剤耐性化が医療問題となっており、新規治療法の立案が早急な課題となっている。われわれは自然免疫応答であるインフラマソームがグラム陽性菌の感染病態を重症化させることを見出した。そこで本研究では、インフラマソーム応答を阻害することで感染病態を改善できないか検討を行い、新規阻害シード化合物の設計を行った。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌をインフラマソーム不全マウスに感染させたところ、菌の生体内増殖が減少した。インフラマソームの活性化にはASCの凝集化が必須であることから阻害化合物を作製しマクロファージに導入したところインフラマソーム応答の阻害効果を観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質の頻用により黄色ブドウ球菌や結核菌などの薬剤耐性化が世界的な問題となっており、感染症に対する新規治療法の立案が早急な課題となっている。新規抗菌薬の開発も進められているが新たな耐性菌の出現が懸念されていることから、大きな治療方針の転換が求められている。われわれはグラム陽性菌感染においてインフラマソーム応答が負に働くことに着目し、感染治療に応用する挑戦的研究を立案した。その結果、インフラマソーム応答を阻害することで薬剤耐性黄色ブドウ球菌の感染病態を改善することができた。また、インフラマソームを標的とした新規阻害化合物の設計および合成も順調に進行していることから将来的な実用化が期待される。

研究成果の概要（英文）：The drug resistance of various pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, has become a significant medical problem, and the urgent development of new treatment methods is necessary. We found that the inflammasome, an innate immune system, exacerbates Gram-positive bacteria infection. Therefore, in this study, we investigated whether inhibiting the inflammasome response could improve the infection and designed a new inhibitory seed compound. When we infected inflammasome-deficient mice with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates, the bacterial growth in vivo decreased compared with wild-type mice. Since the aggregation of ASC is essential for the inflammasome activation, we designed an inhibiting compound and introduced it into macrophages, resulting in the observed inhibition of the inflammasome response.

研究分野：感染症学

キーワード：感染症 炎症 薬剤耐性菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質などに耐性を示す病原菌のサイレントパンデミックが世界的な問題となっており、感染症に対する新規治療法の立案が早急な課題となっている。細菌が感染するとわれわれの体は異物として認識し、様々な免疫応答を惹起させる。細胞内受容体を介した自然免疫の1つであるインフラマソーム応答が活性化すると、黄色ブドウ球菌やリステリアなどの感染病態が悪化することをわれわれは見出した。そこでこの知見を基に、細菌感染においてインフラマソームを介した炎症応答を抑制すれば感染症が改善するのではないかと考え、本研究課題を立案するに至った。病原体を標的とした薬剤は耐性菌の発現を誘発する可能性があるため、本案のような炎症応答に着目した治療法は新規モダリティの開発につながる事が期待される。

2. 研究の目的

病原菌が感染するとインフラマソーム応答が活性化し病態を悪化させることから、本研究ではインフラマソーム応答を阻害することで薬剤耐性菌を含む感染症の治療に応用できないか検討を行い、新規阻害化合物を設計することを目的とする。世界中でインフラマソーム阻害薬の開発は進められているが、いまだ実用化には至っていないため、既存化合物とは異なる作用機序でインフラマソーム応答を阻害することを目指す。

3. 研究の方法

・マクロファージの調整

初代マクロファージを回収するために、チオグリコレート培地をマウス腹腔に投与し、4日後に腹腔内を洗浄し腹腔マクロファージを回収した。骨髄由来マクロファージはマウスの骨髄細胞を分化誘導培地で5日間培養し接着細胞を回収した。マクロファージは24 well プレートに 0.5×10^6 cells/well で培養し付着させ、非付着性細胞は培地交換することで取り除いた。

・細胞感染

細胞培養プレートに付着させたマクロファージに菌液を添加して感染させた。菌数と細胞数の比率 (MOI) は、リステリアの場合は MOI=10、黄色ブドウ球菌の場合は MOI=50 として1時間感染させたのち、ゲンタマイシン含有培地を添加することで細胞外での菌の増殖を阻止し、さらに18時間培養を行った。培養上清および細胞懸濁液は、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) およびウエスタンブロット解析に用いた。

・リガンド刺激

NLRP3 インフラマソームを活性化するために、LPS でマクロファージを4時間プライミングしたのちに、nigericin で30~60分刺激を行った。AIM2 インフラマソームの活性化にはLPSで同様にマクロファージをプライミングしたのちに、poly (dA:dT) を Lipofectamine LTX でトランスフェクトし1~2時間培養した。

・マウス感染

$10^4 \sim 10^6$ colony forming unit (CFU) のリステリアを経静脈投与し、4日後に採血しサイトカイン濃度を測定した。回収した臓器はホモジナイズ後、寒天培地にプレーティングして生菌数をカウントした。黄色ブドウ球菌の場合は、 10^8 CFU を経静脈投与し、2日後に同様の操作で実験を行った。

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌が活性化するインフラマソームの特定

これまでの研究から、細胞内寄生菌であるリステリアは AIM2、NLRP3、NLRP6 といった複数のインフラマソームを活性化することを突き止めている。そこで黄色ブドウ球菌をマクロファージに感染させ同様に検討を行ったところ、これまで報告のあった NLRP3 だけでなく AIM2 も活性化していることが判明した (図1)。そこで黄色ブドウ球菌由来の DNA が細胞質内に曝露されているのか検討したところ、感染マクロファージの細胞質で黄色ブドウ球菌特異的な核酸が検出された。以上の結果から、マクロファージに感染した黄色ブドウ球菌は自身の DNA を介して細胞内 DNA 受容体である AIM2 を活性化させていることが明らかとなった。

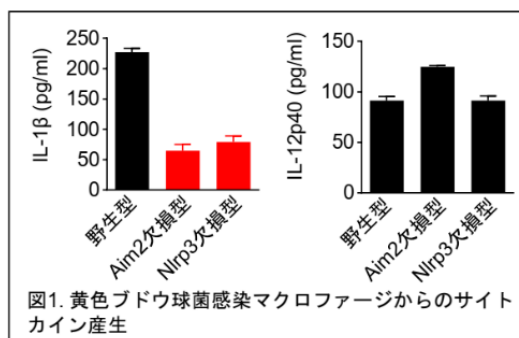


図1. 黄色ブドウ球菌感染マクロファージからのサイトカイン産生

(2) 薬剤耐性菌感染におけるインフラマソーム応答の影響

グラム陽性菌であるリステリアを用いた検討から、インフラマソームが活性化すると感染マウスにおける臓器内菌数が増加することを明らかにしている。そこで国内の薬剤耐性菌の検出件数が多い黄色ブドウ球菌におけるインフラマソーム応答の影響を検討した。インフラマソームの活性化にはアダプター分子 ASC が必要であることから ASC 欠損マウスにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を感染させたところ、野生型マウスと比較して臓器内菌数が低下することが判明した (図 2)。この結果から、薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染においてインフラマソームが活性化すると感染病態が悪化することが判明した。

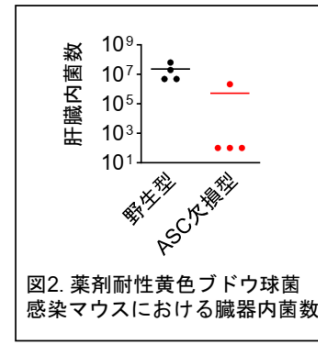


図2. 薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染マウスにおける臓器内菌数

(3) インフラマソーム応答により病原菌の生体内増殖が亢進する分子機序の解明

インフラマソームが活性化するとカスパーゼ 1 を介して炎症性サイトカインである IL-1 β および IL-18 が産生される。そこでこれらのサイトカイン産生が感染病態に影響しているのか検討を行った。これまでの研究から、リステリアを IL-18 欠損マウスに感染させると野生型マウスと比較して臓器内菌数が低下すること、一方で IL-1 β 欠損マウスでは野生型マウスと同程度の臓器内菌数が検出されることを突き止めている。しかしながら、黄色ブドウ球菌をこれらの遺伝子改変マウスに感染させたところ、IL-1 β および IL-18 どちらの欠損マウスにおいても臓器内菌数の減少が観察された (図 3)。これらの結果から、どのサイトカインが感染病態に影響するのかは病原体に依存することが判明した。この観点からも、サイトカインの中和や拮抗阻害は一定の効果は認められるが病原体によっては単一のサイトカインを標的としても治療効果が弱いことが示唆された。リステリア感染によるインフラマソーム活性化機序に関しては責任著者として Cell Reports 誌に投稿し受理された (引用文献)。

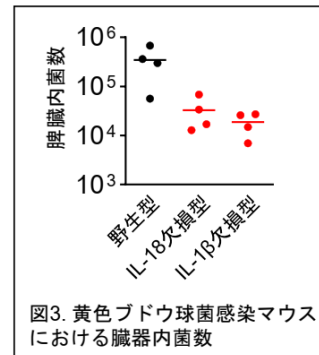


図3. 黄色ブドウ球菌感染マウスにおける臓器内菌数

(4) インフラマソーム応答を阻害する化合物のデザインと阻害効果の検証

インフラマソームは細胞内受容体、アダプター分子 ASC、タンパク分解酵素カスパーゼ 1 から構成されており、活性化には ASC の凝集化が重要となる。そこで、ASC の凝集化を抑制するペプチド化合物をデザインしリポフェクションでマクロファージ内に導入した。マクロファージを LPS でプライミングし NLRP3 インフラマソームを活性化させる nigericin で刺激したところ、コントロール群と比較してペプチド化合物処理した群ではインフラマソーム依存的な IL-1 β の産生が低下した。一方で、インフラマソーム非依存的な TNF α の産生には影響がなかったことから、デザインした化合物がインフラマソーム応答を特異的に抑制していることが判明した。また、オリジナル化合物から阻害活性に必要な領域を絞り込み、膜透過修飾を付与することで有効濃度を抑えることができた (図 4)。化合物 1 は最も短鎖でありインフラマソーム阻害効果が認められなかったが、中鎖、長鎖である化合物 2 および 3 では阻害効果が観察されたことから、阻害効果を十分に得るためには化合物 2 の構造が最適であることが判明した。今後、in vivo でも使用できるように改良を重ねていく計画である。

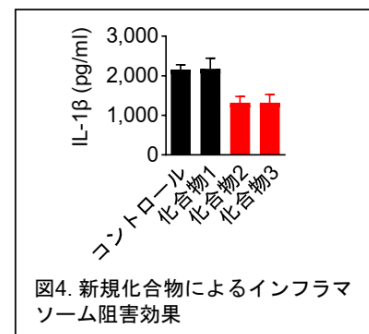


図4. 新規化合物によるインフラマソーム阻害効果

<引用文献>

Tanishita Y, Sekiya H, Inohara N, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Núñez G, Hara H. Listeria Toxin Promotes Phosphorylation of the Inflammasome Adaptor ASC through Lyn and Syk to Exacerbate Pathogen Expansion. *Cell Rep.* 38, 110414, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanishita Y, Sekiya H, Inohara N, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Gabriel Nunez, Hara H	4. 巻 38
2. 論文標題 Listeria Toxin Promotes Phosphorylation of the Inflammasome Adaptor ASC through Lyn and Syk to Exacerbate Pathogen Expansion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110414.	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 該当する

1. 著者名 Tsuchiya K, Hosojima S, Hara H, Kushiya H, Mahib M. R., Kinoshita T, Suda T	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 Rep.	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hideki Hara, Gabriel Nunez, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Recognition of Gram-positive bacteria infection in macrophages through NLRP6 inflammasome
3. 学会等名 The 27th international symposium on molecular cell biology of macrophages（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideki Hara, Yuko Tanishita, Hisateru Sekiya, Gabriel Nunez, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Molecular mechanism of inflammasome activation induced by Gram-positive bacteria infection
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 Hideki Hara, Gabriel Nunez, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Lyn kinase signaling promotes inflammasome activation in macrophages infected with <i>Listeria monocytogenes</i>
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Tanishita, Hisateru Sekiya, Gabriel Nunez, Akihiko Yoshimura, Hideki Hara
2. 発表標題 LLO promotes phosphorylation of the inflammasome adaptor ASC through Lyn to exacerbate infection
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideki Hara, Gabriel Nunez, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Analysis of the mechanism by which Gram-positive bacteria activates NLRP6 inflammasome
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hara H, Yoshimura A, Nunez G
2. 発表標題 Activation of inflammasomes exacerbates Gram-positive bacteria infection through IL-18 production
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 英樹、吉村 昭彦、Nunez Gabriel
2. 発表標題 インフラマソーム応答を介した感染重症化機構
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara H
2. 発表標題 Inflammasome-mediated exacerbation of infectious diseases and its application
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara H
2. 発表標題 Advances in research of innate immune sensors and diseases
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 原 英樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 110
3. 書名 新型コロナウイルスの感染とインフラマソーム	

1. 著者名 原 英樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 120
3. 書名 尿酸結晶とインフラマソーム	

〔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
研究協力者	ニュネッツ ガブリエル (Nunez Gabriel)		

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			
米国	ミシガン大学			