

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10233

研究課題名(和文) 真菌とウイルスによるサイトカインストームにおける非古典的インフラマソームの役割

研究課題名(英文) The role of noncanonical inflammasome in cytokine storms by fungi and viruses

研究代表者

玉井 利代子 (Tamai, Riyoko)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90367566

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)：カスパーゼ11を中心とした非古典的インフラマソーム(炎症反応と細胞死を引き起こす複合体)は、病原体に対する宿主防御に関与するが、相反する結果の報告があった。本研究では、パターン認識受容体を介したシグナル伝達経路におけるカスパーゼ11の役割と、カスパーゼ11発現を増強する窒素含有ビスフォスフォネート(アレンドロネート、ALN)の影響を検討した。その結果、カスパーゼ11欠損細胞においても野生株と同様の、病原体関連分子パターンとALNによる炎症性サイトカイン産生増加とMyD88発現増強がみられた。故に、非古典的インフラマソームが生体防御において重要な役割を果たしているが、必須ではないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、非古典的インフラマソームと病原体関連分子パターン受容体の相互作用について検討したが、カスパーゼ11欠損細胞でも、野生株と同様の反応がみられることが多かった。また、カスパーゼ11発現を増強する薬剤である窒素含有ビスフォスフォネートは、COVID-19を増悪させる可能性が考えられたが、実際は同薬剤を使用している人の方が、新型コロナウイルス感染症の経過が良好であるという報告が出た。上記の結果は、非古典的インフラマソームと病原体関連分子パターン受容体が媒介するシグナル伝達の複雑な調節機構や、新型コロナウイルス感染症の発症や重症化に関与する因子の解明に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Inflammasomes are multiprotein complexes that mediate inflammatory responses and cell death in response to various stimuli. The non-classical inflammasomes, such as the pyrin inflammasome and the caspase-11 inflammasome, have been implicated in host defense against pathogens. However, the role of these inflammasomes in innate immune signaling is not fully understood.

In this study, we investigated the role of caspase-11 and the effects of alendronate (ALN), a widely used nitrogen-containing bisphosphonate and pyrin inflammasome activator, on pattern recognition receptors-mediated signaling pathway. We found that pathogens-associated molecular patterns and ALN augmented proinflammatory cytokine production and MyD88 expression in RAW-ASC cells, which expresses both pyrin and ASC, and even caspase-11-deficient RAW-ASC cells.

These results suggest that while non-classical inflammasomes play an important role in biological defense, they are not necessarily essential.

研究分野：口腔微生物学および免疫学

キーワード：caspase-11 非古典的インフラマソーム Sタンパク ウイルス 真菌 Toll-like receptor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に感染すると、インターロイキン (IL)-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインの過剰産生によるサイトカインストームと播種性血管内凝固が起こり血栓形成のリスクが高くなる。さらに、SARS-CoV-2 は、ウイルスの増殖を抑えるインターフェロン (IFN)- α や IFN- β の産生を遅延させる (Merad and Martin. *Nat Rev Immunol* 2020)。一方、ウイルス感染細胞は、カスパーゼ 8 (caspase-8) 活性化によるアポトーシスを起こして死ぬことでウイルス増殖を抑える。そして、AIDS 等ウイルスに感染すると日和見感染症が増悪する。真菌の保有率は加齢と共に高くなるので、高齢者はウイルス感染によって真菌感染症の増悪が起こりやすい。

サイトカインストームに関わる分子であるインフラマソームは、IL-1 β の放出に重要なタンパク複合体で、細胞死 (ピロトーシス) を引き起こす。caspase-1 依存経路は古典的、caspase-11 (ヒトでは caspase-4) を含む経路は非古典的インフラマソームである。非古典的インフラマソームで重要な役割を担う caspase-11 の役割について、以下のように全く異なる報告があった。(1) 内毒素の受容体である caspase-11 が欠損したマウスは、生存率が高くなるので caspase-11 は致死性において重要である。

(2) Caspase-11 が欠損したマウスは、外来性のグラム陰性菌または真菌であるアスペルギルスに対する抵抗性が著しく低下するので、生体防御に不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス感染症と口腔カンジダ症などの内因感染症における caspase-11 の役割を明らかにして、caspase-11 の発現を増強または抑制する薬剤の、易感染性宿主における有用性を検討した。

ウイルスおよび常在微生物に対する免疫応答における非古典的インフラマソームの役割を解明することによって、高齢者社会における感染症に対する新たな予防法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

令和 3 年度では、易感染性宿主を想定した口腔カンジダ症マウスモデルに caspase-11 発現を増強または抑制する薬剤を投与後、ウイルスを感染させ、カンジダ菌数、サイトカイン産生および腸内細菌叢を薬剤不投与マウスと比較して、口腔カンジダ症における caspase-11 の役割を明らかにすることにより、易感染性宿主における上記薬剤の有用性を検討した。

令和 4 年度では、ウイルスまたは真菌を認識するシグナル伝達経路における caspase-11 の役割を、サイトカイン産生や細胞膜上または細胞内タンパク分子発現の増減などを指標にして探索した。

(1) *Candida* spp. の培養: *C. albicans*, *C. glabrata*, または *C. tropicalis* は、カンジダ GS 寒天培地または 1% 酵母エキス含有サブローデキストロース培地を用いて好氣的条件下で培養する。

(2) 動物実験: 雌 4 週齢の ICR マウスに免疫抑制剤プレドニゾロンを投与する。翌日 *Candida* spp. 菌液を綿棒で舌に接種する。接種 3 日後、舌または脾臓を採取した。実験群ごとに 5 匹のマウスを使用する。

臓器を採取して、生理食塩水中でほぐしたものをサンプルとして、インターフェロンと炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α) の産生を ELISA で定量する。

マウスの臓器または糞便を採取して、*Candida* spp. の菌数の増減を調べると共に組織標本を作製して PAS 染色を行い、臓器への侵入状態と白血球の浸潤像の所見を得る。

(3) ヒトおよびマウス細胞の培養: ヒト肺胞上皮細胞 A549, ヒト単球系細胞 THP-1 または U937, マウスマクロファージ様細胞 J774.1 は、10% ウシ血清含有 RPMI1640 培地で継代培養したものをを用いた。また、マウスマクロファージ様細胞 RAW264 細胞、RAW-ASC 細胞および caspase-11 欠損 RAW-ASC 細胞は、10% ウシ血清含有高濃度グルコース DMEM 培地で継代培養したものをを用いた。

(4) 各種病原体関連分子パターン認識受容体のシグナル伝達における caspase-11 の役割: caspase-11 欠損細胞に擬似新型コロナウイルスを感染、または病原体関連分子パターン合成品を含む培地で培養して、下記 1) ~ 4) について野生株細胞と比較した。

細胞表面または細胞内タンパク分子の発現変化: 病原体関連分子パターン認識受容体や関連分子の発現をフローサイトメトリーまたはウエスタンブロットで検討した。

サイトカイン産生: ウイルスが誘導する炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8 および TNF- α 等) またはインターフェロン (IFN- α または IFN- β) 産生増減を調べる。

転写因子: 活性化して核内に移行した NF- κ B, AP-1 等の活性化を ELISA またはウエスタンブロットで検討した。

4. 研究成果

<2021 年度>

- (1) Dectin-1 リガンドであるザイモザンまたはカードランによるマウスマクロファージ様細胞 J774.1 の前処理は、同細胞の poly(I:C) による IL-6, MCP-1, TNF- α およびインターフェロン (IFN)- β 産生を増加したが、イミキモドによる IFN- β 産生は抑制した。
- (2) SARS-CoV-2 の S タンパクを発現させた擬似新型コロナウイルスは、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 の IL-8, MCP-1, IFN- β 産生を誘導したが、J774.1 細胞による IL-6, MCP-1, TNF- α 産生は誘導しなかった。しかしながら、同ウイルスは、ザイモザンで前処理した J774.1 細胞の IL-6 産生は誘導した。また、ザイモザンによる前処理は、A549 細胞の擬似新型コロナウイルスによる IL-8 と MCP-1 産生を増加した。
- (3) 擬似新型コロナウイルスのデルタ株は Toll-like receptor (TLR) シグナル伝達を抑制する Dok3 分子の発現を増強した。
- (4) 1 μ g/ml ザイモザンは、J774.1 細胞の caspase-11, NLRP3, プラス鎖 RNA を認識する RIG-I の発現を増強した (図 A)。
- (5) ザイモザンまたはカードランは、J774.1 細胞の N4BP1 (RNA 分解酵素) を分解した (図 B)。

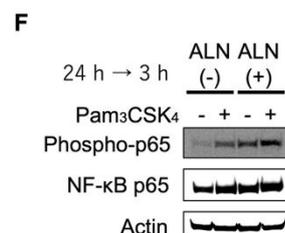
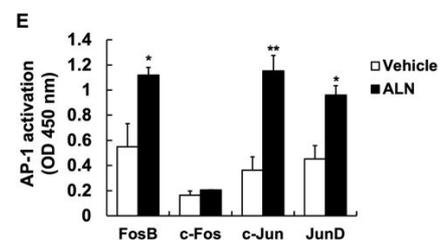
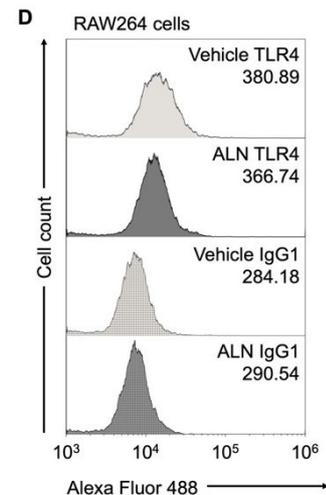
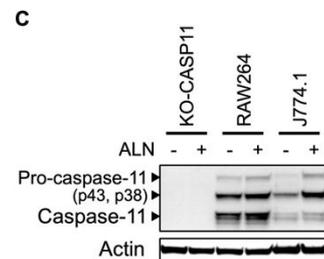
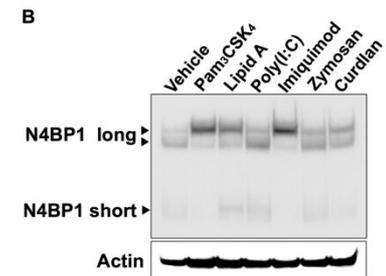
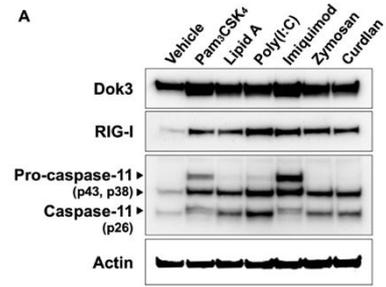
<2022 年度>

- (1) J774.1 細胞の caspase-11 発現を増強した薬剤である窒素含有ビスフォスフォネート (アレンドロネート, ALN) は、ASC 欠損マウスマクロファージ様細胞 RAW264 の、IL-1 β 放出をわずかに誘導した。さらに、ALN による前処理は、同細胞の、TLR4 リガンドが誘導する IL-1 β 放出を有意に増加した。しかしながら、TLR4 リガンドが誘導する IL-1 α , IL-6, および TNF- α 産生は増加しなかった。
- (2) ALN は、RAW264 の caspase-11 発現と TLR4 発現を増強しなかった (図 C, D)。
- (3) さらに、caspase-11 欠損 RAW-ASC 細胞の、TLR4 リガンドが誘導する IL-1 β 放出も未処理の細胞と比較して増加した。
- (4) ALN 含有培地での 24 時間培養は、RAW264 細胞の AP-1 活性化を誘導した (図 E)。

<2023 年度>

- (1) Caspase-11 の発現を増強する薬剤である窒素含有ビスフォスフォネート (アレンドロネート, ALN) による前処理は、マウスマクロファージ様 RAW-ASC 細胞の、TLR2 リガンドが誘導する IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 産生を増加した。
- (2) ALN は、SARS-CoV-2 の S タンパクが誘導する同細胞の IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 産生を増加した。
- (3) 非古典的インフラマソームの中心である caspase-11 のウイルスおよび常在微生物に対する免疫応答における役割を明らかにするために、ALN で前処理した caspase-11 欠損 RAW-ASC 細胞を用いて 1. と同様の実験を行ったが、caspase-11 欠損細胞においても TLR2 リガンドが誘導する IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 産生が未処理の細胞と比較して増加した。
- (4) ALN 含有培地での 24 時間培養は、RAW-ASC 細胞と caspase-11 欠損 RAW-ASC 細胞の MyD88 発現を増強した。
- (5) ALN 前処理は、RAW-ASC 細胞の、TLR2 リガンドが誘導する NF- κ B 活性化を増強した (図 F)。

以上の結果と最近の知見から、非古典的インフラマソームは生体防御において重要な役割を担う一方で、必ずしも不可欠ではないことが考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 井ノ上靖尊、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 50
2. 論文標題 全身性の <i>Candida albicans</i> 感染に対する宿主の免疫応答	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 9-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 中野尊覚、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 50
2. 論文標題 Non-albicans <i>Candida</i> spp. 感染における宿主の炎症性サイトカインの産生動態	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 19-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 伊波良将、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 50
2. 論文標題 マウスカンジダ症モデルを用いた <i>Candida glabrata</i> の病原性の解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Watanabe Noriyuki, Tamai Riyoko, Kiyoura Yusuke	4. 巻 26
2. 論文標題 Alendronate augments lipid A-induced IL-1 release by ASC-deficient RAW264 cells via AP-1 activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2023.12276	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 Akaho Reiko, Kiyoura Yusuke, Tamai Riyoko	4. 巻 66
2. 論文標題 Synergistic effect of Toll-like receptor 2 ligands and alendronate on proinflammatory cytokine production in mouse macrophage-like RAW-ASC cells is accompanied by upregulation of MyD88 expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 412-419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2024.04.003	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Riyoko Tamai, Yusuke Kiyoura
2. 発表標題 Pretreatment with zymosan modulates double-stranded RNA or Toll-like receptor 7 ligand-induced production of proinflammatory cytokines and interferon-
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies 2022 Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本一野, 玉井利代子, 清浦有祐
2. 発表標題 Candida tropicalis 感染に対する宿主の免疫応答
3. 学会等名 第72回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島和美, 玉井利代子, 清浦有祐
2. 発表標題 Candida glabrata の免疫不全宿主に対する病原性
3. 学会等名 第72回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 イミキモドが誘導する炎症性サイトカインおよびインターフェロン (IFN-) 産生におけるザイモザンのプライミング効果
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 二本鎖RNAが誘導する炎症性サイトカインとIFN- 産生における酵母細胞壁抽出物のプライミング効果
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 Riyoko Tamai, Yusuke Kiyoura
2. 発表標題 Alendronate augments lipid A-induced release of IL-1 and IL-1 via activation of ASC but not caspase-11
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 26th Japanese Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井ノ上靖尊、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 全身性のカンジダ症における宿主の免疫応答
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野貴覚、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 Non-albicans Candida spp. 感染における宿主の炎症性サイトカインの産生動態
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊波良将、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 マウスカンジダ症モデルを用いた Candida glabrata の病原性の解析
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 二本鎖 RNA が誘導する炎症性サイトカインと IFN- γ 産生における dectin-1 リガンドのプライミング効果と caspase-11 の役割
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 Priming effects of dectin-1 ligands on poly(I:C)-induced production of proinflammatory cytokines and interferon (IFN)- γ
3. 学会等名 第71回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会
4. 発表年 2023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
研究協力者	清浦 有祐 (Kiyoura Yusuke) (90194951)	奥羽大学・歯学部・教授 (31602)	

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