

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19643

研究課題名（和文）栄養摂取と感染防御の関係をサイトカインIL-1beta発現の視点から読み解く

研究課題名（英文）Understanding the relationship between nutrient intake and host defense from the perspective of cytokine IL-1beta expression

研究代表者

齊藤 達哉（Saitoh, Tatsuya）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60456936

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）：病原体の感染から身を守るためには、栄養を十分に摂取する必要があることは古くから知られている。食生活が乱れた際に風邪をひいてしまった経験は、皆に共通のものだろう。しかしながら、病原体に対する免疫機構の働きを適量の栄養摂取が促進する理由については、不明な点が多く残されている。本研究では、病原体に対する防御応答において重要な役割を果たす自然免疫機構を介した炎症性サイトカインの産生に着目し、栄養摂取と感染防御の関係を解明することを目指して研究を行った。解析の結果、産生時における栄養素の要求性は炎症性サイトカインごとに大きく異なることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「栄養を十分に取らないとなぜ感染に弱くなるのか？」という古くから知られている、栄養学・健康科学研究分野における根源的な謎に対する答えを導き出すための分子基盤を整えるものである。本研究により、病原体成分を感知したパターン認識受容体を介した炎症性サイトカインの産生を特定のアミノ酸が促進する機序が明らかになれば、適量の栄養の摂取が感染症の予防に寄与するメカニズムの一端を説明することが出来るようになる。

研究成果の概要（英文）：It has long been known that adequate nutrition is necessary to protect against pathogen infection. We all share the experience of catching a cold when our diet is disrupted. However, it remains unclear why adequate nutritional intake promotes the function of the immune system against pathogens. In this study, we focused on the production of inflammatory cytokines via the innate immune system, which plays crucial roles in the defense response against pathogens, with the aim of elucidating the relationship between nutritional intake and infection defense. The analysis revealed that nutrient requirements during production varied greatly among inflammatory cytokines.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン 免疫 感染症 栄養素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原体の感染から身を守るためには、栄養を十分に摂取する必要があることは古くから知られている。食生活が乱れた際に風邪をひいてしまった経験は、皆に共通のものだろう。しかしながら、病原体に対する免疫機構の働きを適量の栄養摂取が促進する理由については、不明な点が多く残されている。

研究代表者は、自然免疫機構により誘導される感染防御応答の研究に一貫して取り組んでおり、病原体を感知して炎症性サイトカインやインターフェロンなどを介した防御応答を誘導する自然免疫機構の研究を推進している。特に、自然免疫機構である Toll-like receptor (TLR) や NLRP3 (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3) インフラマソームなどの制御機序、当該機構を標的とする治療薬の作用機序などに関する研究を行ってきた (Saitoh et al. *Nature* 2008, 456, 264-268; Saitoh et al. *Immunity* 2011, 34, 352-363; Misawa et al. *Nat Immunol* 2013, 14, 454-460; Misawa et al. *Int Immunol* 2015, 27, 425-434; Ikoma et al. *Int Immunol* 2022, 34, 493-504 など)。一連の研究の過程で、TLR および NLRP3 インフラマソームを介した炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-1 β の産生をアスパラギンが促進することを見出したことが、本研究のきっかけとなった。IL-1 β は、インフルエンザウイルス、ライノウイルスや B 群連鎖球菌などの病原体に対する感染防御を担う重要な炎症性サイトカインである (*Nat Immunol* 2013, 14, 246-253; *J Immunol* 2012, 188, 1953-60 など)。これまでに行った研究により、アミノ酸の一種であるアスパラギンが IL-1 β の放出を促進することを明らかにしている。当該アミノ酸は、これまでに同定されていない新たな機構を介して IL-1 β の転写活性化を促進し、感染防御応答を誘導すると考えられた。そこで、IL-1 β を介した感染防御応答に関わる新たな栄養素感知機構の解明を目指す本研究を実施した。また、IL-1 β 以外の炎症性サイトカインの産生について、アミノ酸要求性の観点から研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究は、「栄養を十分に取らないとなぜ感染に弱くなるのか？」という古くから知られている、栄養学・健康科学研究分野における根源的な謎に対する答えを導き出すための分子基盤を整えるものである。本研究によりアミノ酸が TLR を介した IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生を促進する機序が明らかになれば、感染症を予防するために栄養素の摂取が必須である理由を明確に説明することが出来るようになる。もう一つの意義は、既知の mTOR とは異なるアミノ酸感知機構を同定することにある。アミノ酸感知機構の研究は精力的に行われているが、そのほとんどが mTOR に関するものである。mTOR は様々な細胞応答・生体応答において極めて重要な役割を果たしているが、本研究で研究対象とする IL-1 β の発現を増強するアスパラギンはマクロファージにおいて mTOR の活性を制御していない (mTOR の基質である S6 キナーゼのリン酸化状態を変化させない)。mTOR とは異なる、自然免疫に関わる新たなアミノ酸感知機構に関する本研究は、高い学術性を有する挑戦的なものと考えている。

本研究は、感染予防法・感染リスク診断法の開発への展開が見込まれるため、臨床的意義も有している。本研究から得られる成果は、老化に伴う食欲減退や過度の食事制限による栄養不足に起因する免疫不全のリスクを判断する基準、食事により摂取すべき最低限の栄養水準の策定などに将来的に貢献するものと考えられる。また、今後、アスパラギンを感知するセンサーや当該アミノ酸に応答する転写因子などを同定することが出来れば、TLR および NLRP3 インフラマソームを介した自然免疫応答を適切なタイミングで促進する新たな感染症予防薬 (ワクチンなど) の開発にもつながる。さらに、センサーや転写因子の遺伝子を欠損させることで栄養不足による免疫不全を模倣するモデルマウスを作製することが出来れば、風邪、インフルエンザ、COVID-19 といった日常に潜む感染症の発症機序の解明や新たな感染症治療薬・予防薬スクリーニング系の開発につながる。

3. 研究の方法

【マウスおよび細胞】

本研究では、野生型マウスとして C57BL/6 マウスを用いて実験を行った。当該マウスの腹腔にチオグリコレートを投与した後、腹腔内に遊走してきた細胞の中から培養プレートに接着する細胞を単離し、マウス腹腔マクロファージとした。

【試薬】

Mouse IL-1 β ELISA kit, mouse IL-1 α ELISA kit, mouse Tumor Necrosis Factor (TNF) ELISA kit は Biologend 社より購入した。各種 TLR リガンドやアルミニウムアジュバントは Invivogen 社より購入した。

【ELISA】

マウス腹腔マクロファージを TLR リガンド、アルミニウムアジュバント、Lipopolysaccharide (LPS) トランスフェクションなどで刺激し、培養上清を回収した。培養上清中の炎症性サイトカインの濃度を、ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸が IL-1 β の産生に与える影響

IL-1 β の発現レベルは通常は低く保たれているが、パターン認識受容体である TLR が病原体を感知すると IL-1 β の転写が強く誘導される。一方で、NLRP3 インフラマソームは NLRP3 (パターン認識受容体)、ASC (アダプター)、Caspase-1 (プロテアーゼ) からなる複合体であり、IL-1 β の成熟と産生を誘導する。すなわち、TLR による発現誘導、それに続く NLRP3 インフラマソームによる成熟を経て、活性を有する IL-1 β は産生される。研究代表者は、先行研究においてアスパラギンを Dulbecco's Modified Eagle 培地に RPMI 培地と同等レベルまで加えることにより、TLR および NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 β の産生が促進されることを確認していた。本研究では、マウス腹腔マクロファージを通常の RPMI 培地もしくはアスパラギンを欠損した RPMI 培地で培養し、TLR 刺激、続いてアルミニウムアジュバントや LPS トランスフェクションによる NLRP3 インフラマソーム刺激を行った。培地上清中に放出された IL-1 β の濃度を測定したところ、RPMI 培地からアスパラギンを除去するだけで IL-1 β の産生が大幅に低下していた(図 1)。以上から、TLR および NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 β の産生には培地中のアスパラギンが必須であることが明らかになった。

(2) アミノ酸が IL-1 α の産生に与える影響

IL-1 α は、IL-1 β と同様に、IL-1 受容体を刺激する炎症性サイトカインである。IL-1 α の発現レベルは IL-1 β と同様に通常は低く保たれているが、パターン認識受容体である TLR が病原体を感知すると IL-1 α の転写が強く誘導される。一方で、LPS トランスフェクションにより活性化した NLRP3 インフラマソームは IL-1 α の成熟と産生を誘導する。また、アルミニウムアジュバントは、ファゴリソーム膜の損傷を介して、NLRP3 インフラマソーム非依存的に IL-1 α の産生を誘導する。そこで、マウス腹腔マクロファージを通常の RPMI 培地もしくはアスパラギンを欠損した RPMI 培地で培養し、TLR 刺激、続いてアルミニウムアジュバント (Alum) や LPS トランスフェクションによる刺激を行った。培地上清中に放出された IL-1 α の濃度を測定したところ、RPMI 培地からアスパラギンを除去することで IL-1 α の産生が限定的ではあるが有意に低下していた(図 1)。以上から、TLR 刺激の後に NLRP3 インフラマソーム依存的・非依存的経路を介して誘導される IL-1 α の産生には培地中のアスパラギンが関わるということが明らかになった。

(3) IL-1 α ・IL-1 β の産生に対するアスパラギナーゼの効果

アスパラギンが IL-1 α ・IL-1 β の産生に与える影響を個体レベルで解析するためには、アスパラギンを分解する、もしくはアスパラギンの効果を阻害する手法を確立する必要がある。本研究では、将来の個体レベルの解析に備えて、アスパラギンを分解する酵素であり、急性白血病や悪性リン

パ腫の治療に用いられているアスパラギナーゼの効果を細胞レベルで確認した。マウス腹腔マクロファージを、RPMI 培地を用いて、アスパラギナーゼ存在下・非存在下で培養し、TLR 刺激、続いてアルミニウムアジュバントや LPS トランスフェクションによる刺激を行った。培地上清中に放出された IL-1 α および IL-1 β の濃度を測定したところ、アスパラギナーゼで処理することにより IL-1 α および IL-1 β の産生が大幅に低下していた（図 2）。アスパラギナーゼが IL-1 β の産生を強力に阻害することは予想通りであったが、IL-1 α の産生も強力に阻害することは予想していなかった。これは、アスパラギナーゼがアスパラギンに加えてグルタミンの分解を誘導することに起因すると考えており、今後、通常の RPMI 培地とアスパラギン・グルタミンを二重欠損した RPMI 培地を用いた場合の IL-1 α の産生を比較・解析することで当該仮説の正誤を検証する予定である。

（４）TNF の産生に対するアスパラギナーゼの効果

TNF は代表的な炎症性サイトカインの一つであり、その発現レベルは IL-1 α ・IL-1 β と同様に通常は低く保たれているが、パターン認識受容体である TLR が病原体を感知すると TNF の転写・翻訳および産生が強く誘導される。マウス腹腔マクロファージを、RPMI 培地を用いて、アスパラギナーゼ存在下・非存在下で培養し、TLR 刺激を行った。培地上清中に放出された TNF の濃度を測定したところ、アスパラギナーゼで処理をしても TNF の産生は影響を受けなかった（図 3）。アスパラギナーゼにより顕著に阻害される IL-1 α ・IL-1 β の産生とは大きく異なる。以上の結果から、TNF の産生には培地中のアスパラギンおよびグルタミンが必須ではないことが明らかになった。

（５）研究成果のまとめおよび今後の計画

本研究で得られた結果から、炎症性サイトカインである IL-1 α 、IL-1 β 、TNF の産生において、培地中のアスパラギンやグルタミンの要求性が大きく異なることが明らかになった。今後は、どのようなセンサー分子がこれらのアミノ酸を感知し、TLR をはじめとする自然免疫機構を介した IL-1 α ・IL-1 β の産生を促進しているのかを解明していきたい。また、細胞レベルではアスパラギナーゼが IL-1 α ・IL-1 β の産生を阻害することを確認できたため、今後は当該酵素を用いてアスパラギンやグルタミンがマウス個体レベルにおける IL-1 α ・IL-1 β の産生に関わっているか否かを検証していきたい。

图1

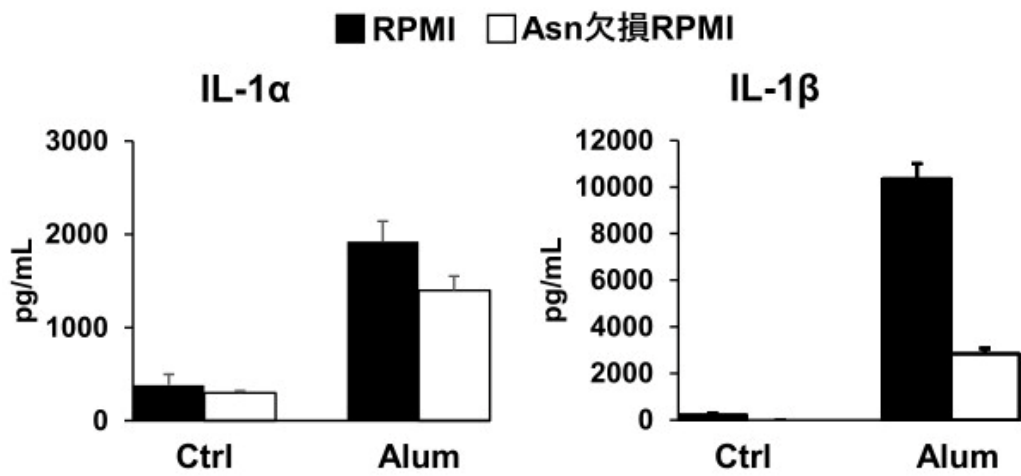


图2

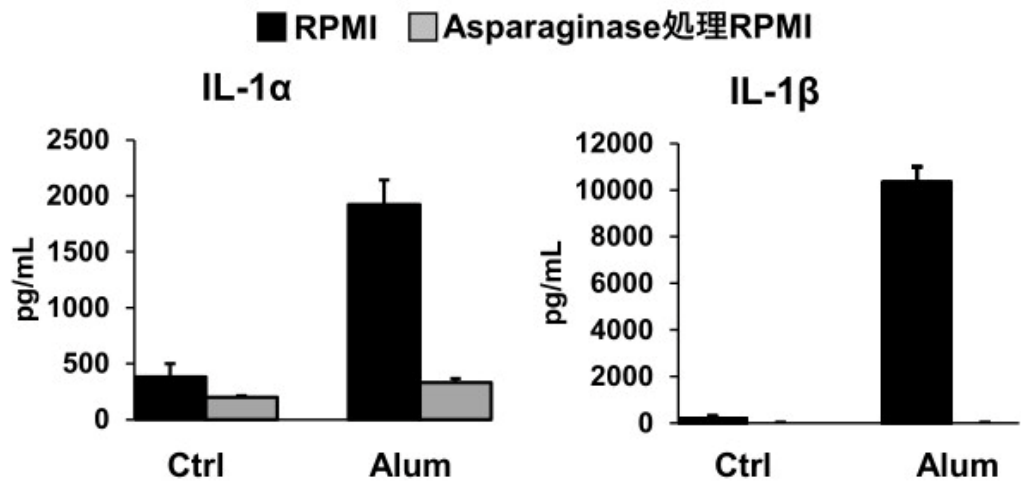
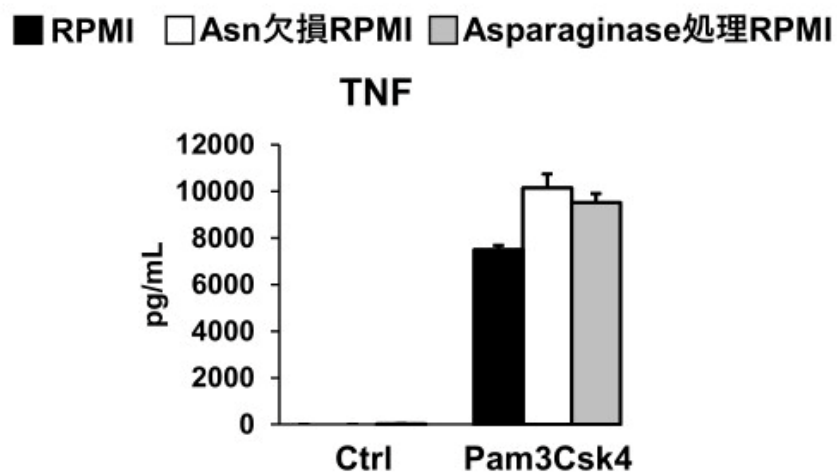


图3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wang J, Takemura N, Saitoh T.	4. 巻 44(5)
2. 論文標題 Macrophage Response Driven by Extracellular ATP.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 599-604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00831.	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 田浦学, 武村直紀, 齊藤達哉	4. 巻 76(6)
2. 論文標題 PRRを介した炎症反応における細胞骨格の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 614-621
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 無
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 齊藤達哉	4. 巻 74(2)
2. 論文標題 免疫制御を基盤とする治療薬開発を目指して	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 82-84
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 無
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 Ikoma K, Takahama M, Kimishima A, Pan Y, Taura M, Nakayama A, Arai M, Takemura N, Saitoh T.	4. 巻 34(10)
2. 論文標題 Oridonin suppresses particulate-induced NLRP3-independent IL-1 release to prevent crystallopathy in the lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 493-504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac018.	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 Matsui Y, Takemura N, Shirasaki Y, Takahama M, Noguchi Y, Ikoma K, Pan Y, Nishida S, Taura M, Nakayama A, Funatsu T, Misawa T, Harada Y, Sunazuka T, Saitoh T.	4. 巻 34(10)
2. 論文標題 Nanaomycin E inhibits NLRP3 inflammasome activation by preventing mitochondrial dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 505-518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac028.	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 Fukunaka A, Shimura M, Ichinose T, Pereye OB, Nakagawa Y, Tamura Y, Mizutani W, Inoue R, Inoue T, Tanaka Y, Sato T, Saitoh T, Fukada T, Nishida Y, Miyatsuka T, Shirakawa J, Watada H, Matsuyama S, Fujitani Y.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Zinc and iron dynamics in human islet amyloid polypeptide-induced diabetes mouse model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30498-y.	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15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 東優一, 森田明典, 西山祐一, 村田貴嗣, 酒井杏樹, 金井昭教, 谷本大河, 坂井卓磨, 中田健也, 武村直紀, 齊藤達哉, 稲葉俊哉, 椎名勇
2. 発表標題 抗炎症作用を有する新規化合物の腸炎制御剤としての活性評価
3. 学会等名 日本Cell Death学会第29回学術集会, 一般学術発表 (口頭)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本大河, 森田明典, 西山祐一, 村田貴嗣, 酒井杏樹, 金井昭教, 東優一, 國井大誓, 坂井卓磨, 貞富凌, 王冰, 下川卓志, 中田健也, 武村直紀, 齊藤達哉, 稲葉俊哉, 椎名勇
2. 発表標題 免疫調節作用を有する新規化合物は亜全身照射による腸死を防ぐ
3. 学会等名 日本放射線影響学会第 64 回大会, 一般学術発表 (ポスター)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田周平, 武村直紀, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 インフラマソームの活性化を阻害するプロスタグランジン類の解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会, 一般学術発表 (ポスター)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 小迫英尊, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子により誘導される細胞死の解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会, 一般学術発表 (口頭)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 潘逸羲, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 極小微粒子により誘導される炎症応答を阻害する化合物の探索
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会, 一般学術発表 (口頭)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武村直紀, 松井裕大, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 Nanaomycin類化合物はイミキモド誘導性乾癬を抑制する
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会, 一般学術発表 (口頭)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Takemura, Manabu Taura, Tatsuya Saitoh
2. 発表標題 Oridonin as a potential therapeutic agent for microparticle-induced inflammatory diseases
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会，一般学術発表（ポスター）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Saitoh
2. 発表標題 Understanding and chemical controlling pyroptosis induced by irritating particulates
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会，テクニカルセミナー招待講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 オルガネラ・ゾーンを介する自然免疫応答の理解と化合物による制御
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会，シンポジウム招待講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生駒健太，武村直紀，田浦学，君嶋敦，荒井雅吉，齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による炎症応答を阻害する生薬由来化合物の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会，一般学術発表（口頭）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武村直紀, 西田周平, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 インフラマソームの活性化を阻害するプロスタグランジン類の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会, 一般学術発表(口頭)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井裕大, 武村 直紀, 田浦 学, 齊藤 達哉
2. 発表標題 Nanaomycin類化合物はイミキモド誘導性乾癬を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会, 一般学術発表(口頭)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 オルガネラ損傷により誘導される細胞死に伴う炎症応答の理解と制御
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会, シンポジウム招待講演(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Takemura, Tatsuya Saitoh
2. 発表標題 Nanaomycin E inhibits NLRP3 inflammasome activation by preventing mitochondrial dysfunction
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会, 一般学術発表(ポスター)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による免疫毒性の理解とその制御
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会, シンポジウム招待講演(招待講演)
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

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	シカゴ大学			
中国	上海交通大学			