

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590504

研究課題名(和文)細菌感染におけるインフラマソームの活性化機序と役割の解析

研究課題名(英文)Role of the inflammasome in bacterial infections

研究代表者

土屋 晃介(Tsuchiya, Kohsuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50437216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフラマソームはカスパーゼ1を活性化する自然免疫機構であり、病原体を含む様々な刺激に応じて形成され、炎症性サイトカインの産生やプログラム細胞死を誘導することで感染防御に関わる。本研究では、肺炎球菌が細胞内DNA受容体であるAIM2に認識されてインフラマソームの形成およびカスパーゼ1活性化を誘導することが明らかになった。また、肺炎球菌の肺炎モデルにおいてインフラマソームが防御的に働くことが示された。さらに、リステリアの致死性全身感染においてはインフラマソームが病態を増悪化させることがわかり、免疫抑制性応答へのインフラマソームの関与が初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Inflammasomes are innate immune mechanisms that activate caspase-1 in response to various stimuli, including microbial pathogens. Once activated, inflammasomes induce the production of pro-inflammatory cytokines and programmed cell death through caspase-1. Accumulating data have suggested inflammasomes play a protective role against microbial infections. In this study, we examined the mechanism and role of inflammasome formation in infection with two Gram-positive bacteria. We found that *Streptococcus pneumoniae* is recognized by the cytosolic DNA receptor AIM2, which in turn forms an inflammasome complex to activate caspase-1. It was also found that inflammasomes are critical for host defense against pneumococcal pneumonia. On the other hand, inflammasomes were detrimental to the host in lethal infection with *Listeria monocytogenes*. Our study revealed that inflammasomes can be upstream of an immunosuppressive response, which may explain the detrimental effect of inflammasomes.

研究分野：細菌学・免疫学・感染免疫

キーワード：インフラマソーム ASC NLRP3 細菌感染 リステリア 肺炎球菌

1. 研究開始当初の背景

インフラマソームはカスパーゼ 1 を活性化するタンパク複合体であり、細胞質内の受容体タンパク、アダプタータンパクおよびカスパーゼ 1 で構成される。インフラマソームはカスパーゼ 1 活性化を介して炎症性サイトカインの産生やプログラム細胞死を誘導する。また、病原体を含む様々な刺激に応じて形成され、感染防御、自己炎症疾患、成人病、癌抑制などの幅広い疾患・生命現象に関わる。

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) はグラム陽性の双球菌であり、肺炎、中耳炎といった局所感染から髄膜炎、敗血症などの全身性感染を引き起こす。近年、薬剤耐性肺炎球菌の増加が問題となっており、新規治療法の開発が望まれる。肺炎球菌による病態形成の機序を明らかにすることはそのために重要である。膜傷害毒素 pneumolysin (PLY) は肺炎球菌の重要な病原因子であり、本菌の宿主内での定着・生存・侵入に関わる。また、PLY は炎症応答の誘導にも関与している。我々は、肺炎球菌感染においてカスパーゼ 1 の活性化が PLY 依存的に誘導されることを報告したが (*Infect. Immun.* 2008. **76**:1547-1557)、その機序および感染における意義は不明であった。

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は幅広い環境から検出されるグラム陽性短桿菌であり、食品汚染の重大な問題である (5%)。リステリアは特に易感染性宿主に髄膜炎や敗血症を (妊婦では流産などを) 起こし、重症化した場合の致死率は極めて高い。リステリアは通性細胞内寄生細菌であり、マクロファージに貪食されても膜傷害毒素 listeriolysin O (LLO) を分泌することで殺菌機構を回避して細胞内で増殖する。一方、リステリア感染マクロファージでは LLO に依存してカスパーゼ 1 活性化が誘導される。我々は、この応答に細胞内 DNA を認識する AIM2 が関与することを報告した (*J. Immunol.* 2010. **185**:1186-1195)。しかしながら、個体レベルのリステリア感染におけるインフラマソームの役割は不明であった。

2. 研究の目的

肺炎球菌は PLY 依存的に宿主マクロファージのカスパーゼ 1 活性化を誘導するが、その機序は不明である。カスパーゼ 1 活性化に関わるインフラマソーム構成分子 (受容体分子) を同定すれば機序解明の有力な手掛かりとなる。また、肺炎球菌の肺感染モデルでは IL-1 β が宿主防御に重要であることが知られている。IL-1 β 産生に関わるカスパーゼ 1 や上流インフラマソーム分子の防御的役割を調べることで肺炎球菌に対する宿主防御応答をより詳細に理解できる。さらに、過剰な炎症や好中球浸潤は肺病態の悪化にもつながるため、病態形成におけるインフラマソームの役割を調べることで肺炎球菌の PLY 産生と肺炎発症の関連性について新たな知

見が得られる可能性がある。そこで、肺感染モデルにおけるインフラマソームの役割の解析を行った。

同様に、リステリアの全身感染におけるインフラマソームの役割は不明であったため、明らかにするために解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 肺炎球菌の感染におけるカスパーゼ 1 活性化がどのインフラマソーム (受容体) を介して誘導されるのか、マクロファージの培養系を用いた *in vitro* の実験で同定する。

<カスパーゼ 1 活性化の検出> チオグリコレート培地誘導マクロファージおよび骨髓由来マクロファージに肺炎球菌 (*S. pneumoniae* D39 株、NCTC から入手) を感染させ、24 時間後に培養上清と細胞溶解液を回収する。培養上清中のタンパク質をトリクロロ酢酸で濃縮し、上清中および溶解液中のカスパーゼ 1 をウエスタンブロットで検出する。分子量 10 kDa のカスパーゼ 1 断片を活性型とし、そのバンドの濃さでカスパーゼ 1 活性化を評価する。IL-1 β および IL-18 の産生はカスパーゼ 1 依存的に誘導されるため、培養上清中のこれらサイトカインを ELISA 法で測定する。

<インフラマソーム受容体の関与の検討> 各インフラマソーム構成分子の関与を調べる目的でカスパーゼ 1 欠損マウス、ASC 欠損マウス、NLRP3 欠損マウスおよび NLRC4 欠損マウスを用いる。これらのマウスおよび野生型マウスからマクロファージを回収し、肺炎球菌に対するカスパーゼ 1 活性化応答を比較する。AIM2 は siRNA を用いてノックダウンする。

(2) 肺炎球菌感染における各インフラマソーム構成分子の感染抵抗性への貢献、炎症、好中球浸潤、肺炎発症における役割を解析する。

<肺炎球菌肺炎モデル> 肺炎球菌をマウスに経鼻的に投与することで肺炎モデルを作製する。感染マウスの生死を観察して生存曲線を得る。また、肺などの臓器を回収し、CFU カウント法で臓器内菌数を測定する。

<生体内でのカスパーゼ 1 活性化およびカスパーゼ 1 依存的サイトカインの検出> マウスから肺胞洗浄液を回収し、ウエスタンブロットで活性型カスパーゼ 1 や成熟型 IL-1 β を検出する。

<好中球・マクロファージ浸潤の解析> 肺胞洗浄液を回収し、遠心して肺胞腔内の細胞を集める。肺胞細胞を蛍光標識抗 Gr-1 抗体および F4/80 抗体で二重染色し、フローサイトメーターで解析する。F4/80 陽性細胞をマクロファージ、F4/80 陰性 Gr-1 陽性細胞を好中球として各細胞の浸潤を評価する。

<インフラマソームの肺病態形成への関与> 肺を回収して組織切片を作製し、HE 染色および免疫染色で組織像を観察する。

(3) リステリア感染においてインフラマソームが宿主防御や病態形成に関わるか検討する。

〈リステリア全身感染モデル〉 リステリア (EGD 株) をマウスに経尾静脈感染させる。マウスの生死を観察して生存曲線を得る。また、脾臓および肝臓を回収し、CFU カウント法で臓器内菌数を測定する。

〈炎症応答の解析〉 血清中の炎症性サイトカイン量 (IL-1 β 、IL-18、TNF α 、IL-6 など) を ELISA で測定する。

4. 研究成果

インフラマソームを介してカスパーゼ 1 活性化を誘導する。

PLY 産生性の肺炎球菌がカスパーゼ 1 の活性化を誘導する機序を解明するため、この応答に関わる宿主側の因子の同定を試みた。PLYはTLR4に認識されることが以前に報告されていた。そこで、点突然変異により機能的なTLR4を欠くC3H/HeJマウスからマクロファージを回収し、それらに肺炎球菌(D39株)を感染させたところ、正常なTLR4を持つC3H/HeN由来マクロファージのものと同程度のカスパーゼ1活性化が観察された。この結果から、TLR4はカスパーゼ1活性化の誘導には関与しないと考えられた。また、NLRP3またはASCを欠損するマクロファージに肺炎球菌を感染させたところ、ASC欠損マクロファージではカスパーゼ1活性化が殆どみとめられなかったのに対し、NLRP3欠損マクロファージのカスパーゼ1応答は野生型マクロファージのものよりわずかに減弱したのみであった。この結果は、肺炎球菌がNLRP3を含む複数のインフラマソーム構成受容体に認識され、アダプターであるASCを介してカスパーゼ1活性化を誘導することを示唆している。そこで、他のインフラマソーム構成受容体AIM2に着目した。AIM2をノックダウンしたまたは欠損するマクロファージでは肺炎球菌で誘導されるカスパーゼ1活性化が著明に減弱していた(図1)。このことから、AIM2インフラマソームが肺炎球菌に対するカスパーゼ1応答に重要な役割を果たすことがわかった。AIM2は細胞質内で二本鎖DNAを認識することが知られている。肺炎球菌によるカスパーゼ1活性化の誘導にPLYが必須であること、マクロファージによる菌の貪食も必要であること、さらに肺炎球菌は自己分解を起こし易く、自己分解後に自身のDNAやPLYを放出することなどを合わせ考えると、マクロファージに貪食された肺炎球菌が食胞内で自己分解を起こし、その際に放出されたDNAがPLYの作用で細胞質に到達してAIM2に認識され、結果的にAIM2インフラマソームの形成を介したカスパーゼ1活性化が誘導されると考えられる。(J. Immunol. 2011. 187:4890-4899)

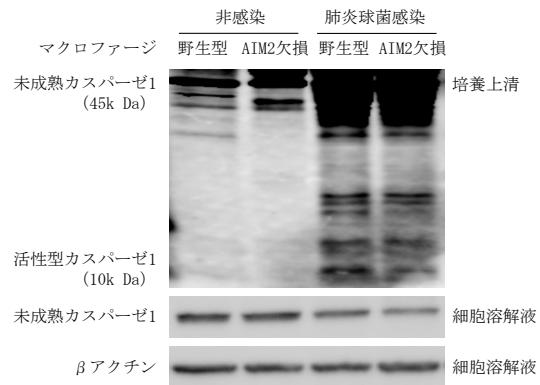


図1 肺炎球菌によるカスパーゼ1活性化の誘導とAIM2の重要性(各マクロファージの培養上清および細胞溶解液中のカスパーゼ1をウエスタンブロット法で検出した。)

(2)インフラマソームは肺炎球菌の肺炎モデルにおいて防御的に働く。

ASC欠損マウスに肺炎球菌を経鼻感染させると野生型マウスと比べて高い感受性を示したことから、この感染モデルにおける感染抵抗性にインフラマソームが重要な役割を果たすことがわかった(図2)。一方、ASC欠損による感受性亢進はPLY欠損株の感染ではみられなかったため、インフラマソームを介した防御機構はPLY陽性の高病原性肺炎球菌株に対してのみ発揮されると考えられる。ASC欠損マウスではIL-1 β やIL-18の産生が低下していたことから、これらのサイトカインの減少が抵抗性の低下と関係があると考察できる。一方、肺胞腔への好中球やマクロファージの浸潤はASC欠損の影響を受けなかったため、インフラマソームは必須でないことがわかった。興味深いことに、*in vitro*においてはカスパーゼ1活性化への貢献が低かったNLRP3も肺炎モデルでは防御的に働くことがわかった。NLRP3欠損マウスではIL-1 β およびIL-18の産生はほぼ正常にみられ、好中球やマクロファージの浸潤も影響を受けなかった。すなわち、NLRP3はインフラマソーム以外の未知経路を介して肺炎球菌への防御を担う可能性が示唆された。(J. Immunol. 2011. 187:4890-4899)

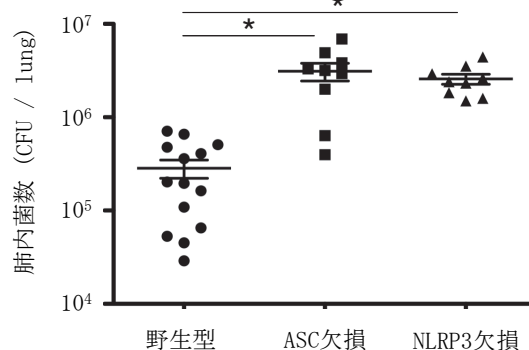


図2 肺炎モデルにおけるASCおよびNLRP3の防御的役割(各マウスに 5×10^7 cfuの肺炎球菌を経鼻感染させ48時間後に肺内の菌数を測定した。)

(3) インフラマソームは致死性のリステリア全身感染において病態を悪化させる。

ASC 欠損マウスと野生型マウスに 10^5 cfu (野生型マウスのLD50に相当) または 10^3 cfu (LD50 以下) のリステリアを尾静脈から感染させると、両系統間の臓器内菌数および生存曲線に有意な差がみられなかった。一方、 10^6 cfu (LD50 以上) のリステリアを感染させた場合には野生型マウスが短期間で全例死亡したのに対してASC欠損マウスは有意に長く生存し、肝臓内の菌数も野生型マウスと比べてASC欠損マウスでは減少していた(図3)。この結果から、インフラマソームはリステリア全身感染においては防御的に働かず、むしろ致死性感染を増悪化させることが示唆された。致死性リステリア全身感染では血清中のIL-18濃度が著明に上昇していたがIL-1 β 濃度の上昇はほとんどみられなかった。また、ASC欠損マウスでは血清中IL-18濃度が低く、IL-18がインフラマソームに依存して産生されたことがわかった。そこで、IL-18の役割を調べるためにIL-18欠損マウスに 10^6 cfuのリステリアを感染させたところ、ASC欠損マウスと同様に野生型マウスより高い抵抗性を示したことから、ASC依存的なIL-18産生が致死性感染を増悪化に関与することがわかった。また、ASCとIL-18は免疫抑制性サイトカインであるIL-10の血清濃度上昇に関わることがわかった。IL-10受容体を抗体で中和すると致死性感染が改善されることから、インフラマソームの下流でIL-10産生が亢進することが増悪化の原因であると考えられた。さらに、NK細胞がIL-18依存的にIL-10産生に関与することがわかった。重篤な細菌感染では炎症応答の亢進と同時にIL-10の過剰産生によるimmunoparalysis(感染防御機能の低下)が問題となるが、インフラマソーム、IL-18、NK細胞などがその治療標的である可能性が示された。(Eur. J. Immunol. 2014. 44:3696-3707)

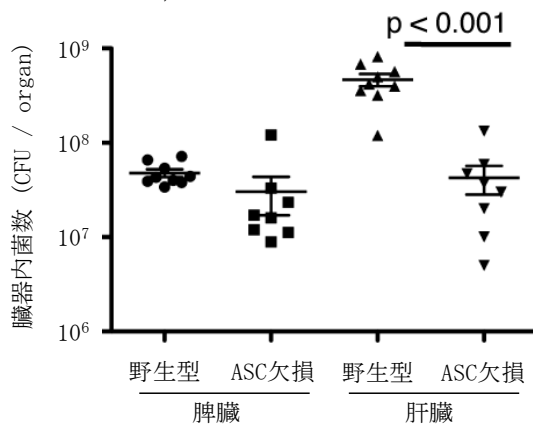


図3 ASCによる致死性リステリア感染の増悪化(各マウスに 10^6 cfuのリステリア経静脈感染させ48時間後に臓器内菌数を測定した。)

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 6件)

1. Tsuchiya K., Hara H., Fang R., Hernandez-Cuellar E., Sakai S., Daim S., Chen X., Dewamitta S. R., Qu H., Mitsuyama M., Kawamura I. The adaptor ASC exacerbates lethal *Listeria monocytogenes* infection by mediating IL-18 production in an inflammasome-dependent and -independent manner. *European Journal of Immunology*. 査読有 2014年 第44巻 3696-3707項.
2. Fang R, Hara H., Sakai S., Hernandez-Cuellar E., Mitsuyama M., Kawamura I., Tsuchiya K. Type I interferon signaling regulates the activation of the absent in melanoma 2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*. 査読有 2014年 第82巻 2310-2317項.
3. Tsuchiya K., and Hara H. Inflammasome and its regulation. *Critical Reviews in Immunology*. 査読有 2014年 第34巻 41-80項.
4. Hara H., Tsuchiya K., Kawamura I., Fang R., Hernandez-Cuellar E., Shen Y., Mizuguchi J., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Mitsuyama M. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature Immunology*. 査読有 2013年 第14巻 1247-1255項.
5. Hernandez-Cuellar E., Tsuchiya K., Hara H., Fang R., Sakai S., Kawamura I., Akira S., Mitsuyama M. Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *The Journal of Immunology*. 査読有 2012年 第189巻 5113-5117項.
6. Fang R., Tsuchiya K., Kawamura I., Shen Y., Hara H., Sakai S., Yamamoto T., Fernandes-Alnemri T., Yang R., Hernandez-Cuellar E., Dewamitta S. R., Xu Y., Qu H., Alnemri E. S., Mitsuyama M. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *The Journal of Immunology*. 査読有 2011年 第187巻 4890-4899項.

[学会発表](計 13件)

1. 土屋晃介(筆頭演者)ほか, 細菌感染に

- におけるインフラマソーム構成タンパクの新たな防御的役割, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, 岐阜県・岐阜市
2. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, NLRP3 and ASC contribute to host defense against pneumococcal pneumonia in an inflammasome-independent manner, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10-12 日, 京都府・京都市
 3. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, 自然免疫機構による細胞内の監視と細胞内寄生菌の感染戦略, 第 25 回日本生体防御学会学術総会, 2014 年 7 月 9-11 日, 宮城県・仙台市
 4. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, NLRP3 and ASC contribute to host defense against pneumococcal pneumonia, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26-28 日, 東京・船堀
 5. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, An inflammasome-independent role of NLRP3 and ASC in host defense against *Streptococcus pneumoniae*, 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 11-13 日, 千葉県・幕張
 6. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, 一酸化窒素による NLRP3 インフラマソームの抑制, 第 24 回日本生体防御学会学術総会, 2013 年 7 月 10-12 日, 熊本県・熊本市
 7. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome, IMMUNOLOGY 2013, 2013 年 5 月 3-7 日, 米国・ハワイ・ホノルル
 8. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, 肺炎球菌感染における NLRP3 と ASC の防御的役割, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18-20 日, 千葉県・幕張
 9. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, The inflammasome adaptor ASC plays a host-detrimental role in lethal infection with *Listeria monocytogenes*, 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 5-7 日, 千葉県・幕張
 10. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, 病原細菌による宿主細胞のインフラマソーム形成誘導機序と病原因子の関与の解析, 第 23 回日本生体防御学会学術総会, 2012 年 7 月 9-11 日, 東京・品川
 11. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, The role of inflammasome in bacterial infections, 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 27-29 日, 千葉県・幕張
 12. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, 致死性リステリア感染モデルにおける ASC の役割の解析, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 27-29 日, 兵庫県・神戸市
 13. 土屋晃介 (筆頭演者) ほか, A host-detrimental role of ASC in a lethal infection with *Listeria*

monocytogenes, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月 6-10 日, 北海道・札幌

〔図書〕 (計 6 件)

1. インフラマソーム/ASC スペック-最新の知見. 土屋晃介. 医学のあゆみ: 医歯薬出版株式会社 第 251 巻 12/13 号. (2014 年)
2. リステリアによるインフラマソームの活性化. 土屋晃介. 臨床免疫・アレルギー科: 科学評論社 第 62 巻 第 1 号. (2014 年)
3. リステリア感染におけるインフラマソーム形成機構とその役割. 原英樹, 土屋晃介. 感染・炎症・免疫: 医薬の門社/鳥居薬品株式会社 第 44 巻 第 1 号. (2014 年)
4. NO による NLRP3 インフラマソームの抑制. 土屋晃介, 光山正雄. 臨床免疫・アレルギー科: 科学評論社 第 60 巻 第 6 号. (2013 年)
5. 細胞質内リステリアの認識に関わる新規分子 AIM2. 土屋晃介. 感染・炎症・免疫: 医薬の門社/鳥居薬品株式会社 第 41 巻 第 2 号. (2011 年)
6. AIM2 (absent in melanoma 2) はインフラマソームの活性化に関与する. 土屋晃介, 光山正雄. 生体の科学: (財) 金原一朗記念医学医療振興財団/医学書院 第 62 巻 第 3 号. (2011 年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋晃介 (TSUCHIYA, Kohsuke)
 京都大学大学院・医学研究科・助教
 研究者番号: 50437216