

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659201

研究課題名(和文)細菌感染によって誘導される活性化カスパーゼ-1を可視化する

研究課題名(英文)Visualizing of caspase-1 activation upon bacterial infection

研究代表者

鈴木 敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10292848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カスパーゼ-1やサイトカインの活性化体を特異的に認識する抗体を開発することによって、カスパーゼ-1活性化等を可視化するシステムを構築し、病原体の感染時、あるいは慢性炎症発症時において、体内のどの細胞がカスパーゼ-1活性化を引き起こしているのか明らかにすることを目的とした。本研究では、活性化カスパーゼ-1、活性化IL-1 およびIL-18を特異的に認識する抗体の開発に着手した。カスパーゼ-1p20のC末端、p10のN末端、IL-18のN末端を認識できる抗体は取得できなかったが、IL-1 のN末端を特異的に認識できる抗体の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：The antibodies specifically reacting the cleaved caspase-1 and cytokines are useful tools for analysis of the activation of innate immune responses. However, only a few antibodies have been developed for using against human cells, and no antibody for mouse. We developed specific antibodies which are capable to specifically react mouse cleaved caspase-1, cleaved IL-1beta and cleaved IL-18. The successful developed antibodies can recognize the cleaved form but not inactive proform.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：炎症 カスパーゼ-1 イメージング

1. 研究開始当初の背景

さまざまな病原細菌の感染によって引き起こされる、カスパーゼ-1活性化を介した自然免疫誘導機構が明らかにされてきた。その中で、病原因子とされる細胞傷害毒素やⅢ型分泌装置がカスパーゼ-1活性化の引き金となり、その活性化にはそれぞれ異なる宿主 Nod 様受容体群が関与することが報告されている。現在まで、世界的に自然免疫系細胞の1つマクロファージを中心に解析がなされてきた。しかし生体内に目を向けると、腸管粘膜などの実際の感染局所で、カスパーゼ-1の活性化はどの細胞で誘導され、さらにそれが初期の炎症や免疫応答にどのようにコミットするのか全く明らかになっていない。

カスパーゼ-1活性化の制御機構や炎症における役割を解明するためには、各種遺伝子欠損マウスを用いた解析が必須である。そこで、マウス体内におけるカスパーゼ-1活性化を可視化できる方法が必要とされている。

2. 研究の目的

マウス生体内でのカスパーゼ-1活性化細胞を同定するために、まず活性化カスパーゼ-1、活性化 IL-1 β および IL-18 を特異的に認識する抗体を開発する。さらに、マウスを用いた腸管感染モデルを構築し、活性化細胞を免疫染色にて同定できる手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 活性化カスパーゼ-1、活性化 IL-1 β および IL-18 を特異的に認識する抗体を開発する。

- ① マウスカスパーゼ-1 が自己分解して生成される活性化体 p20、p10 断片と、IL-1 β および IL-18 前駆体が切断されて生成される活性化 IL-1 β 、IL-18 のペプチド末端部分を特異的に認識する抗体を作製する
- ② 抗体の特異性の解析

(2) マウスを用いた腸管感染モデルを構築し、カスパーゼ-1活性化細胞を免疫染色にて同定できる手法を確立する。

- ① 細胞レベルでの染色法を確立
- ② サルモネラ感染腸管の病理切片を用いた解析

4. 研究成果

これまで、活性化カスパーゼ-1、活性化 IL-1 β および IL-18 を特異的に認識する抗体の開発に着手した。マウスカスパーゼ-1 が自己分解して生成される活性化体 p20、p10 断片と、IL-1 β および IL-18 前駆体が切断されて生成される活性化 IL-1 β 、IL-18 のペプチド末端部分を特異的に認識する抗体を作製するため、合成ペプチドを抗原としてウサギに免疫した。

p20 の C 末端、p10 の N 末端、IL-18 の N 末端を認識できる抗体は取得できなかったが、IL-1 β の N 末端を特異的に認識できる抗体の

作製に成功した。この抗体は国内抗体メーカーと販売委託契約を締結し、市販されることとなった。しかし、ウェスタンブロット解析に利用できるが、組織・細胞に対して常法による免疫染色には適していないことがわかった。さらに染色可能な条件があるかどうか検討している。

また、カスパーゼ-1活性化に際して、インフラマゾーム構成タンパクの ASC のリン酸化が活性化の指標となる可能性を考え、特異的リン酸化抗体の作成に着手している。

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 Toma C, Murray GL, Nohara T, Mizuyama M, Koizumi N, Adler B, Suzuki T. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. *Cell Microbiol* 印刷中、査読有 [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1462-5822](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1462-5822)
- ② Suzuki S, Franchi L, He Y, Muñoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, Sasakawa C, Núñez G. (2014) *Shigella* Type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkc δ . *PLoS Pathog* 10: e1003926. 査読有 doi:10.1371/journal.ppat.1003926.
- ③ King AM, Pretre G, Bartpho T, Sermswam RW, Toma C, Suzuki T, Eshghi A, Picardeau M, Adler B, Murray GL. (2014) High temperature protein G (HtpG) is an essential virulence factor of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 82: 1123-1131. 査読有 doi:10.1128/IAI.01546-13.
- ④ Higa N, Toma C, Koizumi Y, Nakasone N, Nohara T, Masumoto J, Kodama T, Iida T, Suzuki T. (2013) *Vibrio parahaemolyticus* effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling. *PLoS Pathog* 9: e1003142. 査読有 doi:10.1371/journal.ppat.1003142
- ⑤ Higa N, Toma C, Nohara T, Nakasone N, Takaesu G, Suzuki T. (2013) Lose the battle to win the war: bacterial strategies for evading host inflammasome activation. *Trends Microbiol* 21: 342-349. 査読有 doi:10.1016/j.tim.2013.04.005.
- ⑥ Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T, Nakasone N, Suzuki T. (2012) Inflammasome activation via

intracellular NLRs triggered by bacterial infection. *Cell Microbiol* 14: 149-154. 査読有
doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01707.x

[学会発表] (計 12 件)

- ① 鈴木志穂、Luigi Franchi, Yuan He, Raul Munoz-Planillo, 三室仁美, 鈴木敏彦, Naip2は赤痢菌MxiIを認識しNlrc4 inflammasomeを活性化する、第87回日本細菌学会総会、2014年03月26日～2014年3月28日、東京
- ② 仲宗根昇、比嘉直美、Claudia Toma、高江洲義一、野原敏次、鈴木敏彦、沖縄近海からとれた海洋産物による細菌のIII型分泌機構阻害、第87回日本細菌学会総会、2014年03月26日～2014年3月28日、東京
- ③ Claudia Toma, Gerald L. Murray, Naomi Higa, Noboru Nakasone, Toshitsugu Nohara, Giichi Takaesu, Nobuo Koizumi, Ben Adler, Toshihiko Suzuki, Analysis of the bacterial factors involved in *Leptospira interrogans* -macrophage interactions, 8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, 2013年10月08日～2013年10月11日、福岡
- ④ Amy M. King, Gabriela Pretre, Thanatchaporn Bartpho, Rasana W. Sermswan, Claudia Toma, Toshihiko Suzuki, Mathieu Picardeau, Ben Adler, Gerald L. Murray, High temperature protein G (HtpG) is essential for acute leptospirosis in hamsters, 8th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, 2013年10月08日～2013年10月11日、福岡
- ⑤ 仲宗根昇、比嘉直美、トーマ・クラウディア、高江洲義一、野原敏次、鈴木敏彦、細菌のIII型分泌機構を阻害する沖縄県海域に生息する海産物の調査、第66回日

本細菌学会九州支部総会、2013年9月6日～2013年9月7日

- ⑥ 鈴木敏彦、病原体感染におけるインフラマゾーム活性化、沖縄感染免疫シンポジウム (招待講演)、2013年07月31日～2013年07月31日、沖縄
- ⑦ 鈴木敏彦、インフラマゾーム活性化と慢性炎症疾患との接点、第3回糖尿病治療の新時代～基礎と臨床を学ぶ～ (招待講演) 2013年7月5日、大阪
- ⑧ 鈴木敏彦、細菌感染とNod-like receptor、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～2013年3月20日、千葉
- ⑨ クラウディア・トーマ、比嘉直美、仲宗根昇、野原敏次、小泉信夫、鈴木敏彦、*Leptospira interrogans*とマクロファージの相互作用に関与している病原因子の解析、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～2013年3月20日、千葉
- ⑩ 仲宗根昇、比嘉直美、高江洲義一、野原敏次、トーマ・クラウディア、鈴木敏彦、下痢原性大腸菌の3型分泌装置を阻害する植物抽出物の発見、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～2013年3月20日、千葉
- ⑪ 比嘉直美、クラウディア・トーマ、仲宗根昇、鈴木敏彦、Effector proteins secreted via T3SS1 of *Vibrio parahaemolyticus* interfere with inflammasome activation、第42回日本免疫学会学術総会、2012年12月5日～2012年12月7日、神戸
- ⑫ 鈴木敏彦、NLR活性化と病原体感染とのかかわり、第40回日本臨床免疫学会 (招待講演)、2012年9月27日～2012年9月29日、東京

[図書] (計 3 件)

- ① 中込治、神谷茂編集 (鈴木敏彦、他執筆)、医学書院、標準微生物学、2014、印刷中
- ② 鈴木敏彦、羊土社、実験医学 7月号特集「インフラマゾーム」、2012、1070-1735

- ③ 小泉由起子、鈴木敏彦 医学の門社、細菌感染による NLRP3 および NLRC4 を介したインフラマソーム活性化、感染・炎症・免疫、2012、332-334

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/bacteriology>

2013年2月5日にプレス発表

翌2月6日に琉球新報、沖縄タイムスに掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 敏彦 (SUZUKI, Toshihiko)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10292848

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：