

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790422

研究課題名(和文) インターフェロン が活性化するマクロファージの細菌認識メカニズムの解析

研究課題名(英文) The analysis of macrophage recognition mechanisms to bacteria in the interferon gamma activated macrophages

研究代表者

松澤 健志 (Matsuzawa, Takeshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：80370154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは自然免疫の一端を担う細胞であり、インターフェロン はマクロファージを強力に活性化する。これまでに我々は、宿主細胞の分解システムであるオートファジーが、インターフェロン 誘導性自然免疫に関与する事を明らかにしている。本研究において、オートファジーマーカーであるLC3のリステリア感染部位への集積が、インターフェロン 刺激により顕著に上昇する事を観察し、インターフェロン が単に基底レベルのオートファジーを活性化するだけでなく、細菌特異的な選択的オートファジーの能力を上昇させる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are involved in many essential immune functions, and their role in innate immunity is reinforced by interferon- . We previously demonstrated that autophagy, a host degradation system, is mobilized for interferon- -mediated cell-autonomous innate immunity against intracellular bacteria. In this study, we found that the recruitment of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), an autophagic marker, to *Listeria monocytogenes* was increased in interferon- -stimulated macrophages compared with untreated macrophages, suggesting that *L. monocytogenes* was efficiently recognized by autophagy in the interferon- -activated macrophages. These results indicate that interferon- activates not only basal autophagy but also selective autophagy against intracellular bacteria.

研究分野：細菌感染学

キーワード：細胞内寄生菌 自然免疫 マクロファージ インターフェロン Cell autonomous immunity

1. 研究開始当初の背景

マクロファージに代表される食細胞は自然免疫の一端を担う細胞であり、外来の病原体を取り込み、細胞内で殺菌・分解を行う。しかし、細胞内寄生菌と呼ばれる一群の細菌はマクロファージの殺菌作用を回避し、マクロファージ内でも生存・増殖する。細胞内寄生菌はファゴソーム内で生存する細菌（ファゴソーム内寄生性細菌、*Salmonella enterica* serovar Typhimuriumや *Mycobacterium* 属細菌等）と、細胞質へ侵入する細菌（細胞質寄生性細菌、*Listeria monocytogenes* や *Shigella flexneri* 等）の大きく二つのグループに分けられる。細胞内寄生菌は宿主細胞の中に寄生することから、抗体や補体の作用を受けにくいと、細胞内寄生細菌に対する感染防御において、マクロファージ細胞自身による免疫機構 (Cell autonomous immunity) が重要である。

種々の細胞から分泌されるサイトカインのうち特にインターフェロンは強力にマクロファージを活性化し、インターフェロン活性化マクロファージは捕食した病原体に対する殺菌作用や、腫瘍細胞に対する破壊作用が強化される。インターフェロンによるマクロファージ活性化は自然免疫において重要なステップであり、細菌感染症学領域においては、特に細胞内寄生菌の感染防御には不可欠である。

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞内分解システムであり、細胞内タンパク質や小器官がそのターゲットとなる。細菌感染時にはオートファジーは細胞内に侵入した細菌を認識しリソソームまで輸送し、細菌を分解するため、感染症学・免疫学においても注目されているメカニズムである。

飢餓などのストレスで誘導されるオートファジーや、誘導刺激が無い通常状態で起きる基底レベルのオートファジーは特異性を持たず細胞質成分を無差別に分解する。一方、損傷したミトコンドリアや細胞内に侵入した病原体を排除するために形成されるオートファゴソームは特異性を持った選択的なオートファジーであり、ミトコンドリアに対するものはマイトファジー、病原体に対するものはゼノファジーと呼ばれる。日本の研究者を中心としたこれまでの研究によりオートファジーの基本的な分子メカニズムや生理機能が明らかにされているが、選択的オートファジーにおける標的認識メカニズムには不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

これまでに、我々の研究グループでは、インターフェロン刺激マクロファージで p38MAPK や IFN 誘導性 GTP 結合タンパク質の一つである (Irgm1) を介してタンパク質分解機構の一つであるオートファジーが活性化することを明らかにしている (Matsuzawa et al. Journal of Immunology, 189, p813-818, 2012)。さらに Irgm1 の *M. bovis* 含有ファゴソームへの集積が IFN- の免疫作用に重要であること (Tiwari, Matsuzawa et al. Nature Immunology, 10, p907-917, 2009) も明らかにしている。これらの結果から、インターフェロン活性化マクロファージではオートファジーを介した殺菌メカニズムが存在する事が示唆されている。そこで本研究ではインターフェロン誘導性オートファジーの詳細な分子メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) リステリア感染マクロファージにおける基底レベルのオートファジーの活性化状況の測定

Raw 264.7 マクロファージ様細胞をマウスインターフェロン刺激 (200 U/mL, 24 時間) し、リステリア (*Listeria monocytogenes* EGD strain) を細胞培養液に加えて 1 時間培養することでマクロファージ内にリステリアを侵入させた後、PBS で細胞を洗浄した。ゲンタマイシン添加細胞培養液を加え、0 から 8 時間まで培養し、細胞を細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100) 中で溶解し、遠心上清を細胞抽出液として、SDS-PAGE で展開後、タンパク質を PVDF 膜にトランスファーした後、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、活性型もしくは不活性型 LC3 を検出した。

(2) リステリア感染マクロファージにおける細菌特異的オートファジーの活性化状況

GFP-LC3 発現 Raw 264.7 マクロファージ様細胞をマウスインターフェロン刺激 (200 U/mL, 24 時間) し、リステリア (*Listeria monocytogenes* EGD strain) を細胞培養液に加えて 1 時間培養することでマクロファージ内にリステリアを侵入させた後、PBS で細胞を洗浄した。ゲンタマイシン添加細胞培養液を加え、0 から 8 時間まで培養し、PBS で洗浄後、4% Paraformaldehyde-PBS で固定後、抗リステリア抗体を用いた蛍光免疫染色法にてリステリアを染色した。

4. 研究成果

(1) リステリア感染マクロファージにおける基底レベルのオートファジーの活性化状況

未処理もしくはインターフェロン前処理したマクロファージにリステリアを感染させ、各時点でのオートファジーの活性化状況を抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロッティングで調べた (図 1)。未処理もしくはインターフェロン 処理マクロファージで同様なオートファジーの活性化が観察されたことから、インターフェロン 刺激は感染によるオートファジーの活性化には影響しないと考えられた。

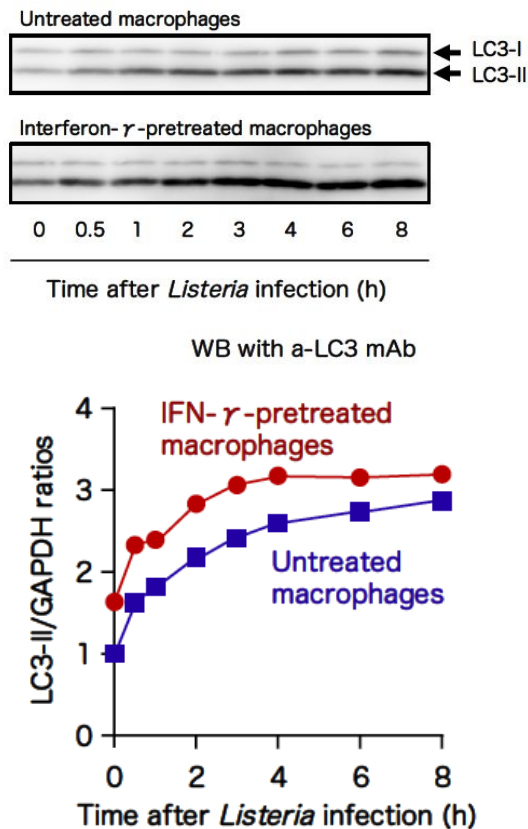


図 1 ; 未処理もしくはインターフェロン 処理マクロファージでのリステリア 感染によるオートファジーの活性化。

(2) リステリア感染マクロファージにおける細菌特異的オートファジーの活性化状況

インターフェロン 前処理したマクロファージに リステリアを感染させ、各時点でのオートファゴソームへの細菌の取込を調べたところ (図 2)、インターフェロン 処理マクロファージで

のみオートファゴソームの細菌の取込作用が上昇していた (矢頭)。この結果からインターフェロン は選択的オートファジーの機能を亢進する作用があることが考えられた。

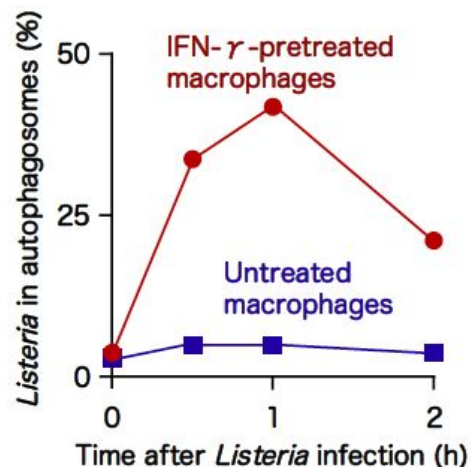
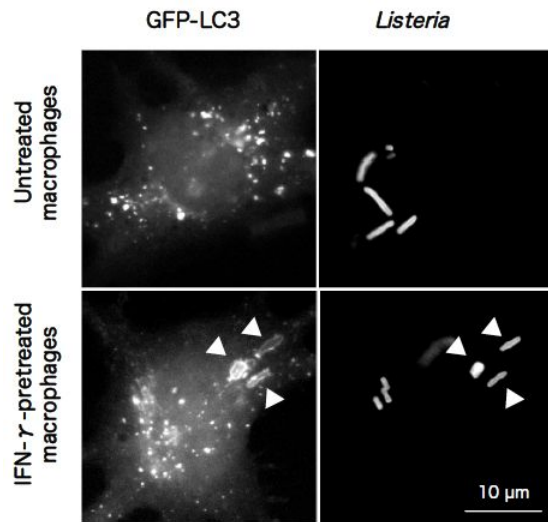


図 2 ; インターフェロン による細菌特異的オートファジーの活性化。

以上の結果より、本研究において、オートファジーマーカーである LC3 のリステリア感染部位への集積が、インターフェロン 刺激により顕著に上昇する事を観察し、インターフェロン が単に基底レベルのオートファジーを活性化するだけではなく、細菌特異的な選択的オートファジーの能力を上昇させる事を明らかにした。インターフェロン により活性化したマクロファージは病原体の排除のみならず、腫瘍細胞に対するマクロファージの作用も増強するため、マクロファージの活性化メカニズムは感染症学のみではなく広く免疫学領域においても重要である。以上のことより、本研究により細菌感染学領域及び免疫学領域における価値ある知見が得られたと考えられる。

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2件)

Takeshi Matsuzawa, Eri Fujiwara, and Yui Washi, Autophagy activation by interferon- via the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway is involved in macrophage bactericidal activity, Immunology, 査読有り、141、p61-69、2014
DOI:10.1111/imm.12168

Eri Fujiwara, Yui Washi, and Takeshi Matsuzawa, Observation of autophagosome maturation in the interferon- -primed and lipopolysaccharide-activated macrophages using a tandem fluorescent tagged LC3, Journal of Immunological Methods, 査読有り、394、p100-106、2013
DOI:10.1016/j.jim.2013.05.009

[学会発表](計10件)

松澤健志、Interferon gamma activates autophagy against intracellular bacteria、第88回日本細菌学会総会、2015年3月26-28日、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

松澤健志、インターフェロンによるオートファジーを介した自然免疫メカニズム、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9-12、北海道大学高等教育推進機構(北海道・札幌市)

Takeshi Matsuzawa, Eri Fujiwara, Yui Washi, Autophagy activation by interferon- via the p38 MAPK signaling pathway is involved in macrophage bactericidal activity, The 12th Awaji international forum on infection and immunity, 2013 September 10-13, Awaji Yumebutai International Conference Center (Hyogo・Awaji)

Eri Fujiwara, Yui Washi, Takeshi Matsuzawa, Observation of autophagosome maturation in the interferon- -primed and lipopolysaccharide-activated macrophages, The 12th Awaji international forum on infection and immunity, 2013 September 10-13, Awaji Yumebutai

International Conference Center
(Hyogo・Awaji)

松澤健志、藤原絵梨、鷲ゆい、インターフェロンはp38 mitogen-activated protein kinase シグナル伝達経路を介してオートファジーを活性化する、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

藤原絵梨、鷲ゆい、松澤健志、インターフェロンによるオートリソソーム形成促進作用の解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

鷲ゆい、藤原絵梨、松澤健志、炎症性腸疾患の発症メカニズム解明に向けたゼノファジーの観察、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

藤原絵梨、鷲ゆい、松澤健志、インターフェロンのオートファジー活性化機構の解析、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14-16日、岩手大学(岩手県・盛岡市)

鷲ゆい、藤原絵梨、松澤健志、炎症性腸疾患の発症メカニズム解明に向けたゼノファジーの観察、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14-16日、岩手大学(岩手県・盛岡市)

Takeshi Matsuzawa, John D. MacMicking, Interferon- elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway, The 11th Awaji international forum on infection and immunity, 2012 September 11-14, Awaji Yumebutai International Conference Center (Hyogo・Awaji)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松澤 健志 (MATSUZAWA TAKESHI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号: 80370154