

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860824

研究課題名(和文)肺炎クラミジアとカーボンナノ粒子による相乗的な気管支喘息の増悪化機序

研究課題名(英文) Synergistic effects of carbon nanoparticles on Chlamydia pneumoniae infection

研究代表者

松尾 淳司 (Matsuo, Junji)

北海道大学・大学院保健科学研究所・講師

研究者番号：50359486

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)：肺炎クラミジアとカーボンナノ粒子の共刺激により、マクロファージからIL-1 β の分泌が促進されるか検討した。その結果、肺炎クラミジア刺激により分泌されたIL-1 β が、カーボンナノチューブにより分泌が促進した。透過型電子顕微鏡観察では、同一マクロファージ内に肺炎クラミジアとカーボンナノチューブが観察された。一方、カーボンナノチューブ刺激はIL-1 β 遺伝子発現を誘導しなかった。またアクチン重合阻害剤やカスパーゼ阻害剤はIL-1 β の分泌を抑制した。さらにNLRP3ノックダウン細胞からのIL-1 β の分泌も減少した。このように、カーボンナノ粒子は肺炎クラミジア感染の病態悪化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether Chlamydia pneumoniae stimulation with carbon nanoparticles synergistically enhance proinflammatory cytokine IL-1 β from macrophages. Carbon nanotubes were used as carbon nanoparticles. As a result, although mature IL-1 β was detected in the supernatants of C. pneumoniae-stimulated macrophages, the synergistic stimulation of the cells by C. pneumoniae and carbon nanotubes clearly increased the IL-1 β secretion. TEM observation revealed co-localization of C. pneumoniae and carbon nanotubes in a macrophage. Carbon nanotube stimulation did not induce the IL-1 β mRNA expression. Actin polymerization inhibitor and caspase inhibitors blocked IL-1 β secretion. In addition, IL-1 β secretion was decreased in NLRP3 KD cells, suggesting that phagocytosis of carbon nanotubes enhances pro-IL-1 β cleavage through NLRP3 inflammasome activation. Thus, the results imply that carbon nanoparticles may have a significant impact in exacerbations of C. pneumoniae infection.

研究分野：微生物学

キーワード：肺炎クラミジア カーボンナノ粒子 IL-1

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は日本全国で約 800 万人が罹患していると考えられる国民病の 1 つである。一般に気管支喘息などのアレルギー炎症反応では、Th2 サイトカイン (IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13) が協同的に働くことにより引き起こされる (*Nat Med*, 18:673-83, 2012)。近年、これらの気管支喘息の病態形成に重要な Th2 サイトカイン産生が、IL-1 ファミリー (IL-1 β 、IL-18) によって制御されていることが明らかとなった (*Allergol Int*, 59:125-35, 2010)。

IL-1 ファミリーのうち、IL-1 β や IL-18 はその前駆体である pro IL-1 β や pro IL-18 が産生され、カスパーゼ 1 によって切断されることで、成熟型サイトカインへ変換される (*Cell*, 140:821-32, 2010)。この成熟型への変換に関与するカスパーゼ 1 はインフラマソームと呼ばれる複合体を形成することで活性化する。したがって、IL-1 β や IL-18 の分泌制御を担うインフラマソーム複合体の形成過程は、気管支喘息などの炎症反応を制御する上で極めて重要なステップである。

偏性細胞内寄生細菌である肺炎クラミジアは呼吸器感染症の原因となるだけでなく、動脈硬化や気管支喘息などの慢性炎症性疾患に関与することが示唆されている (*JAMA*, 266:225-230, 1991)。健康成人における本菌の抗体保有率は約 60-70% と極めて高く、誰もが生涯に数度は感染する (*Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 8:191-202, 1989)。またカーボンブラックやカーボンナノチューブなどのカーボンナノ粒子は、タイヤやプリンターなど広く生活環境に使用されている。大きさは数 nm 程度と極めて小さいため、アスベストと同様に容易に肺胞へと到達する。そのため、肺炎クラミジアやカーボンナノ粒子は気管支喘息の引き金となる重要なアレルゲンである。

最近、肺炎クラミジアが TLR2/MyD88 および NLRP3/ASC インフラマソームを介して、IL-1 β の分泌を誘導していることが報告された (*J Immunol*, 184:5743-54, 2010; *PLoS ONE*, 6:e21477, 2011)。またカーボンナノ粒子が、LPS 刺激マクロファージに対して、IL-1 β の分泌を誘導していることが明らかとなった (*J Biol Chem*, 286:21844-52, 2011; *ACS Nano*, 5:6861-70, 2011)。このように、肺炎クラミジアやカーボンナノ粒子による IL-1 ファミリー分泌誘導が、気管支喘息の病態形成を促していると考えられる。そこで、クラミジア感染とカーボンナノチューブ暴露との相乗作用によるマクロファージからのカスパーゼ 1 を介する IL-1 産生の促進が、気管支喘息の増悪化に関与すると考え、その促進機序を細胞・分子レベルにて明らかにする。

2. 研究の目的

偏性細胞内寄生細菌である肺炎クラミジアは呼吸器感染症の原因となるだけでなく、動脈硬化や気管支喘息などの慢性炎症性疾患に関与することが示唆されている。炎症性サイトカインの 1 つ IL-1 β は、肺炎クラミジア刺激によりマクロファージから NLRP3 インフラマソームの活性化を介して分泌されることが知られている (*J Immunol*, 184:5743-54, 2010; *PLoS ONE*, 6:e21477, 2011)。一方、大気中微小粒子の一つであるカーボンナノ粒子が、NLRP3 インフラマソームを介して LPS 刺激マクロファージより IL-1 β の分泌を誘導することが報告されている (*J Biol Chem*, 286:21844-52, 2011; *ACS Nano*, 5:6861-70, 2011)。このように、肺炎クラミジア感染やカーボンナノ粒子による刺激が、IL-1 β 分泌誘導を介して気管支喘息などの慢性的な病態形成を促進している可能性が考えられる。そこで本研究では、肺炎クラミジアおよびカーボンナノ粒子の共刺激による IL-1 β の相乗的分泌促進機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

肺炎クラミジアと細胞株: 肺炎クラミジア TW-183 株は、ヒト上皮細胞株 HEp-2 で 3 日間増殖させ、凍結融解後に遠心法にて精製したものをを用いた。マクロファージは、50 nM PMA (Sigma, St. Louis, MO) で 3 日間刺激した THP-1 細胞を用いた。

細胞刺激: 肺炎クラミジアを MOI 5 で PMA 刺激 THP-1 細胞に添加後、カーボンナノ粒子であるカーボンナノチューブをさらに添加し、24 時間培養した。

IL-1 β の検出: 成熟型 IL-1 β は、培養上清中より抗 IL-1 β 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を用いたウェスタンブロット法にて検出した。いくつかの実験に際しては、アクチン重合阻害剤 サイトカラシン D, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) やカスパーゼ阻害剤 (z-VAD-fmk, ペプチド研究所; z-WHED-fmk, Enzo Life Sciences) を用いた。

qRT-PCR: RNA を抽出後、cDNA 合成を行い、IL-1 β 、IL-8、TNF を検出するプライマーを用いて、炎症性サイトカイン遺伝子の発現を定量した (*Infect Immun*, 79:4947-56, 2011)。

TEM: 肺炎クラミジアおよびカーボンナノチューブで刺激した PMA 刺激 THP-1 細胞は、TEM による観察を行った。

IL-18 の検出: IL-18 は培養上清より市販の IL-18 ELISA キット (MBL, Nagoya, Japan) を用いて検出した。

siRNA: 過去の報告に従いデザインした nlrp3 遺伝子をノックダウンする siRNA を RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて細胞に遺伝子導入した (*J Immunol*, 184:922-30, 2010)。

4. 研究成果

PMA 刺激 THP-1 細胞に肺炎クラミジアを添加したところ、培養上清より成熟型 IL-1 β が検出された一方、カーボンナノチューブの単独刺激では、成熟型 IL-1 β はほとんど検出されなかった。次に、PMA 刺激 THP-1 細胞を肺炎クラミジアとカーボンナノチューブの両方で刺激したところ、成熟型 IL-1 β の明らかな増加が認められた。一方、カーボンナノチューブの単独刺激では IL-1 β 、IL-8、TNF α mRNA の増加は認められなかった。またカーボンナノチューブは、肺炎クラミジアの数に影響を与えなかった。

次に、TEM 観察により、同一マクロファージ細胞内に肺炎クラミジアとカーボンナノチューブの両方が存在している像を観察した。さらにカーボンナノチューブによる IL-1 β 分泌促進機構を明らかにするために、アクチン重合阻害剤を用いたところ、アクチン重合阻害剤添加により培養上清中の成熟型 IL-1 β の分泌を抑制された。またパンカスペーゼ阻害剤やカスペーゼ 1 阻害剤を用いて実験を行ったところ、カスペーゼ 1 阻害剤の濃度依存的に成熟型 IL-1 β の分泌が抑制された。

さらにカーボンナノチューブによるカスペーゼ 1 活性化を明らかにするために、IL-1 β と同様にカスペーゼ 1 によって活性化される IL-18 の分泌を培養上清より ELISA で検出した。その結果、肺炎クラミジアとカーボンナノチューブの共刺激により、IL-18 の分泌促進が認められた。またカーボンナノチューブによる IL-18 の分泌促進はカスペーゼ 1 阻害剤で濃度依存的に抑制された。

そこで、IL-1 β の成熟化に NLRP3 インフラマソームが関与することを明らかにするために、siRNA による nlrp3 遺伝子ノックダウン細胞を用いて同様の実験を行った。まず nlrp3 遺伝子の抑制を RT-PCR にて確認した。次に、nlrp3 遺伝子ノックダウン細胞に肺炎クラミジアとカーボンナノチューブで共刺激を行ったところ、成熟型 IL-1 β の分泌が明らかから抑制された。

これらの結果から、マクロファージによるカーボンナノチューブの貪食が NLRP3 インフラマソームの活性化を介して、肺炎クラミジア刺激により誘導される成熟型 IL-1 β の分泌を促進していることが示唆された。このように、カーボンナノ粒子は肺炎クラミジア感染の病態に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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 1 件)

Matsuo J., Nakamura S., Takeda S., Ishida K., Yamazaki T., Yoshida M., Chiba H., Hui S.P., Yamaguchi H. Synergistic costimulatory effect of *Chlamydia*

pneumoniae with carbon nanoparticles on NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion in macrophages. *Infection and Immunity*. 査読有 (in press)
DOI: 10.1128/IAI.02968-14.

[学会発表](計 6 件)

(下線は研究代表者を示す)

松尾淳司, 中村真二, 山口博之: Synergistic effect of chlamydiae with carbon nanoparticles on IL-1 β secretion via NLRP3 inflammasome. 第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場(岐阜). (2015 年 3 月 26-28 日)

松尾淳司, 中村真二, 惠淑萍, 武田晴治, 千葉仁志, 山口博之: 肺炎クラミジアとカーボンナノ粒子の共刺激によるマクロファージからの IL-1 β の相乗的分泌促進作用について. 第 32 回日本クラミジア研究会学術集会, ぼるる京都(京都). (2014 年 9 月 27 日)

松尾淳司, 中村真二, 山口博之: 肺炎クラミジアおよびカーボンナノ粒子の共刺激によるマクロファージからの IL-1 β 分泌促進機構. 第 81 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌医科大学(札幌). (2014 年 8 月 29-30 日)

Matsuo J., Takeda S., Nakamura S., Hui S.P., Yamaguchi H.: *Chlamydia pneumoniae* stimulation with carbon nanoparticles synergistically enhances IL-1 β secretion from macrophages. 114th General Meeting in American Society for Microbiology, Boston Convention and Exhibition Center (Boston, USA). (May 17-20, 2014)

松尾淳司, 中村真二, 山口博之: カーボンナノ粒子を伴う肺炎クラミジア刺激はマクロファージからの IL-1 β の分泌を相乗的に促進する. 第 87 回日本細菌学会総会, タワーホール船堀(東京)(2014 年 3 月 26-28 日)

Matsuo J., Nakamura S., Yamaguchi H.: Carbon nanoparticles synergize with *Chlamydia pneumoniae* to enhance IL-1 β secretion from macrophages. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology, Tower Hall Funabori (Tokyo, Japan). (Mar 25, 2014)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松尾 淳司 (MATSUO, junji)
北海道大学・大学院保健科学研究院・講師
研究者番号：5 0 3 5 9 4 8 6

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし