

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460539

研究課題名(和文) Fasシグナルを介した新たな細菌感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Fas-mediated inflammatory response against bacterial infection in vivo

研究代表者

内山 良介 (Uchiyama, Ryosuke)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20456891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のアポトーシス誘導に重要であるFasシグナル経路が、細菌感染でマクロファージの炎症性サイトカインIL-1 β 産生を誘導することが知られている。しかし、この炎症が実際の宿主免疫応答でどのような役割を担っているのかが不明であった。本研究課題では、病原細菌リステリア感染で、Fas依存的に産生されたIL-1 β がT細胞を活性化し、感染防御に有効なサイトカインIFN- γ とIL-17を同時に産生するヘルパーT細胞(Th17/Th1細胞)を誘導するメカニズムを明らかにした。本研究成果は、細菌感染における新たなヘルパーT細胞の誘導機序とその感染防御メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fas signaling pathway is known to play a pivotal role in apoptosis induction. In addition, we have revealed that macrophages produced IL-1 β by Fas-mediated inflammation in bacterial infection. However, the precise role of Fas-mediated cytokine production in actual pathogen infection was unclear. In this study, we found that Fas-mediated IL-1 β contributes to the induction of novel helper T cells which produce IFN- γ /IL-17 (called Th17/Th1 cells). This study provides a deeper understanding of the molecular mechanisms of Th17/Th1 induction during pathogenic microbe infection in vivo.

研究分野：細菌学・感染免疫学

キーワード：Fasシグナル 炎症性サイトカイン 細菌感染

1. 研究開始当初の背景

生体は病原体の侵入を感知すると、適切な炎症応答を惹起（炎症性サイトカインを産生）して病原体の排除を試みる。さらに、その炎症によって獲得免疫を誘導することで、特異的かつ効果的な防御応答を起動し生体を防御する。

従来、病原体を感知し炎症性サイトカインを産生する機序としては、マクロファージなどの食食系細胞の細胞膜に発現する Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) や、細胞質内に侵入した病原体を感知する NOD 様受容体 (NOD-like receptor, NLR) が知られていた。TLR は細胞外に存在する病原体や食食した異物等を認識し、TNF- α 、IL-6 や IL-12 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する。これに対して NLR は、細胞質内で危険を感知すると、システインプロテアーゼの一種である caspase-1 活性化を誘導するタンパク質複合体インフラマソームを形成する。活性化した caspase-1 は、炎症性サイトカイン IL-1 β や IL-18 の前駆体タンパク質を切断して活性型とし細胞外へ放出し、炎症を惹起する。

一方、我々の研究グループは、従来アポトーシス誘導に重要な役割を果たすことが知られる Fas シグナル経路が病原細菌感染でマクロファージの caspase-8 を活性化し、これが前駆体 IL-1 β /IL-18 を切断して活性型とし、炎症を惹起することを見出した (図 1)。これは、従来知られている炎症性サイトカイン産生機序に加えて新たな炎症惹起メカニズムが生体に存在し感染防御において役割を担っている可能性を示唆するものである。

しかし、従来から知られるインフラマソーム依存的な IL-1 β /IL-18 産生に加えて、Fas シグナル経路を介した炎症応答メカニズムが実際の病原体感染においてどのような役割を担っているのか、その詳細は不明であった。

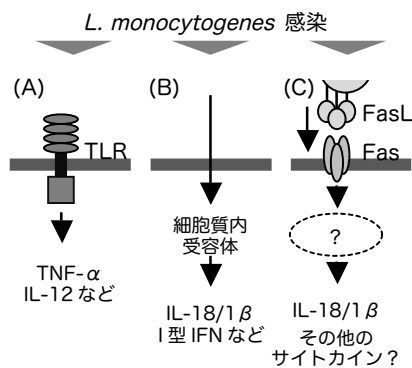


図 1 マクロファージ・樹状細胞によるリステリア認識と炎症応答経路

2. 研究の目的

上述のように、病原体感染において起動する Fas 依存的な炎症応答 (炎症性サイトカイン IL-1 β /IL-18 産生) が、実際の生体における免疫誘導や感染防御でどのような役割を担っているのか、その詳細は不明であった。そこで本研究では、この点を明らかにする目的で、以下の項目に焦点を絞って研究を遂行した。

(1) Fas 依存的な炎症応答によって誘導される細菌感染免疫応答を明らかにする。

(2) インフラマソーム依存的な炎症応答の関与について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、病原細菌感染における Fas 依存的な炎症応答の役割を解明するため、病原細菌リステリア (*Listeria monocytogenes*) のマウス感染実験をモデルとして使用した。

(1) Fas 依存的な炎症応答によって誘導される細菌感染免疫応答を明らかにする。

Fas 依存的な炎症応答が、細菌感染においてどのような免疫応答の誘導に寄与するか検討するため、野生型および Fas 遺伝子欠損 (*Fas*^{-/-}) マウスの尾静脈よりリステリアを接種感染し、6 日後の脾臓を回収した。リンパ球を分離したのち MACS (Miltenyi Biotec 社) で CD4⁺ T 細胞を単離した。In vitro で CD3 ϵ /CD28 再刺激を行った後、培養上清を回収してサイトカインの解析を行った。解析は Cytometric Bead Array 法および ELISA 法を用いた。

また、リステリアの感染防御で重要な役割を果たすインターフェロン- γ (IFN- γ) および IL-17 産生細胞を同定するため、細胞質内サイトカイン染色法 (Intracellular cytokine staining 法) を用いた。上記と同様に、マウスにリステリアを尾静脈より接種感染し、脾臓 CD4⁺ T 細胞を CD3 ϵ /CD28 刺激し、細胞固定後、細胞膜透過性処理を行った。IFN- γ および IL-17 抗体で染色した後、フローサイトメーターで IFN- γ および IL-17 産生細胞の同定を行った。

さらに、T 細胞活性化に対する IL-1 β の効果を明らかにするため、T 細胞上で IL-1 受容体を欠損したマウスを骨髄移入実験により作製し検討を行った。同様に、T 細胞に発現する Fas の関与について検討するため、骨髄移入により T 細胞上の Fas を欠損するマウスを作製し、検討を行った。

(2) インフラマソーム依存的な炎症応答の関与について明らかにする。

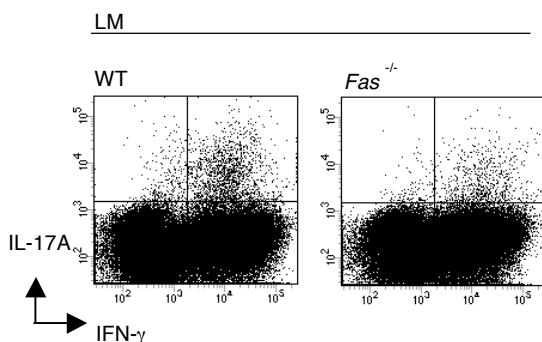
病原体感染による IL-1 β 産生は、従来知られているインフラマソーム依存的な産生メカニズムによるものが主であると考えられている。Fas 依存的な炎症応答で誘導される免疫応答について、従来のインフラマソーム誘導性炎症応答がどのように関与しているのか検討するため、インフラマソーム活性化に必須の因子であるアダプター分子 ASC の遺伝子欠損マウス (*Asc*^{-/-} 遺伝子欠損 (*Asc*^{-/-}) マウス) を用いて、上記 (1) と同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) Fas 依存的な炎症応答によって誘導される細菌感染免疫応答を明らかにする。

まず初めに、Fas 依存的な炎症応答が病原細菌の感染による免疫誘導にどのような役割を担っているのか検討するため、野生型および *Fas*^{-/-} マウスにリステリアを感染させ、6 日後の脾臓から CD4⁺ T 細胞を回収し、*in vitro* 再刺激後のサイトカイン産生を Cytometric Bead Array を用いて解析した。その結果、IFN- γ 、TNF- α 産生については両者で大きな差が認められなかった。一方、IL-17 産生については野生型マウスに比べ *Fas*^{-/-} マウス由来 CD4⁺ T 細胞で低いことがわかった。IL-17 を産生するヘルパー T 細胞 (Th17 細胞) の誘導に IL-1 β が関与することが既に知られているため、上記の結果より、リステリア感染の際に Fas 依存的に産生誘導された IL-1 β が Th17 細胞を誘導しているのではないかと考え、細胞質内サイトカイン染色法で IL-17 産生細胞の同定を行った (図 2)。その結果、IL-17 産生性 CD4⁺ T 細胞は IFN- γ を同時に産生していることが明らかになった。この IFN- γ /IL-17 両産生性 T 細胞 (Th17/Th1 細胞) は野生型マウスでは誘導されているものの、*Fas*^{-/-} マウスでは誘導されないことがわかった (図 2)。

図 2, リステリア感染による Th17/Th1 細胞の誘導



Fas^{-/-} マウスでは IFN- γ のみを産生する Th1 細胞

の誘導は認められた。以上の結果より、*Fas*^{-/-} マウスではリステリア感染による Th17/Th1 細胞が誘導されないため、IL-17 産生が低い可能性が示唆された。

次に、リステリア感染により産生された IL-1 β が T 細胞を刺激し Th17/Th1 細胞を誘導するのか検討するため、IL-1 β 受容体である IL-1R1 を T 細胞上で欠損させたマウスを骨髄移入により作製し、リステリア感染による Th17/Th1 細胞の誘導について調べた。その結果、IL-1R1 欠損 T 細胞では Th17/Th1 細胞の誘導が低下した。これより、リステリア感染による Th17/Th1 細胞の誘導には、産生された IL-1 β が T 細胞上の IL-1R1 を介して T 細胞活性化を誘導することが重要であることがわかった。

(2) インフラマソーム依存的な炎症応答の関与について明らかにする。

従来、IL-1 β は細胞質内タンパク質複合体インフラマソームにより活性化された caspase-1 によって切断され活性型となってサイトカインとして機能することが知られている。我々が今回見出した Fas 依存的な IL-1 β 産生による Th17/Th1 細胞の誘導に対して、インフラマソームがどのように関与しているのか、検討を行った。

インフラマソーム活性化にはアダプター分子 ASC が必要であることが知られている。ここでは、*Asc*^{-/-} マウスにリステリア感染し、Th17/Th1 細胞の誘導について検討を行った。その結果、野生型に比べて *Asc*^{-/-} マウスでは Th17/Th1 細胞が誘導されないことがわかった。

リステリア感染による IL-1 β 産生には、感染初期にインフラマソーム活性化が誘導され、この後に Fas 依存的なメカニズムで IL-1 β 産生が誘導される事がわかっている。今回の研究結果より、Fas 依存的な IL-1 β 産生メカニズムは、インフラマソーム依存的な炎症に加えて、IL-1 β の増幅メカニズムであると考えられる。この炎症性サイトカインの増幅があった場合、Th17/Th1 細胞が誘導され、感染防御に寄与するのではないかと考えられる。

今回得られた知見は、従来、リステリア感染防御に主要な役割を果たすと考えられていた Th1 細胞に加え、新たに Th17/Th1 細胞がヘルパー T 細胞として出現することを示したものである。これが Fas 依存的な炎症メカニズムで誘導されることを明らかにした。今回の成果は、今後、Th17/Th1 細胞を利用した新たな感染防御方法の開発やワクチン開発に貢献するものであると考えている。

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 1 件)

内山良介、兵医大医会誌、査読無し、第40巻1号、細菌感染における Fas 依存的な炎症応答

[学会発表] (計 1 件)

Uchiyama R, Ishido S. Inflammasome- and Fas-mediated IL-1 β contributes to Th17/Th1 cell induction in pathogenic bacterial infection *in vivo*. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル (宜野湾市)、平成28年12月7日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 良介 (UCHIYAMA Ryosuke)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20456891

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

筒井 ひろ子 (TSUTSUI Hiroko)

兵庫医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：40236914

米原 伸 (YONEHARA Shin)
京都大学大学院・生命科学研究科・教授
研究者番号：00124503

(4) 研究協力者

()