

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22808

研究課題名(和文) 感染防御応答を促進する栄養素感知機構の解明

研究課題名(英文) Identification of nutrient-sensing system that promotes host defense responses

研究代表者

齊藤 達哉 (Saitoh, Tatsuya)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60456936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：栄養不足により病原体に易感染性となることは、古くからよく知られている。風邪を引いた際に、しっかりと栄養を摂取することにより体調が回復した経験は、皆に共通のものだろう。しかしながら、適量の栄養摂取が防御応答の誘導に不可欠である理由については、不明な点が多く残されている。本研究では、病原体に対する防御応答において重要な役割を果たす自然免疫機構およびサイトカインに着目し、栄養不足により防御応答不全に陥る機序の解明を目指して研究を行った。解析の結果、自然免疫機構を介した炎症性サイトカインIL-1betaの放出に特定の栄養素が必要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「なぜ栄養を十分に取らないと感染に弱くなるのか？」という古くから知られている、しかし回答することが難しい、栄養学および健康科学研究分野における根源的な謎に対する答えを導き出すための分子基盤を整えるものである。本研究によりアミノ酸がTLRを介したIL-1betaの発現を増強する機序が明らかになれば、感染症を予防するために栄養素の摂取が必須である理由の一端を説明することが出来るようになる。

研究成果の概要(英文)：It has been well known for a long time that lack of nutrition makes us susceptible to pathogens. We have all had the common experience of recovering from a cold by consuming adequate nutrition. However, there are still many unanswered questions as to why adequate nutritional intake is essential for the induction of defense responses. In this study, we focused on the innate immune system and cytokines, which play important roles in the defense response against pathogens, and aimed to elucidate the mechanism of defense response failure caused by nutritional deficiency. As a result of our analysis, we found that specific nutrients are required for the release of the pro-inflammatory cytokine IL-1beta through the innate immune system.

研究分野：免疫学・薬学

キーワード：免疫 感染症 栄養

## 1. 研究開始当初の背景

栄養不足に陥ると、ウイルスや細菌などの病原体に易感染性となることは、古くからよく知られている。風邪を引いた際にしっかりと栄養を摂取することにより体調が回復した経験は、多くの人々に共通するものと思われる。しかしながら、適量の栄養摂取が防御応答の誘導に不可欠である理由については、不明な点が多く残されている。

研究代表者は、自然免疫機構により誘導される感染防御応答の研究に一貫して取り組んでおり、病原体を感知してサイトカインやインターフェロンなどを介した防御応答を誘導する自然免疫機構の研究を推進している。特に、自然免疫機構である Toll-like receptor (TLR)や NLRP3 (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3)インフラマソームの制御機序、当該機構を標的とする治療薬の作用機序などに関する研究を行ってきた (Saitoh et al. *Nature* 2008, 456, 264-268; Saitoh et al. *Immunity* 2011, 34, 352-363; Misawa et al. *Nat Immunol* 2013, 14, 454-460; Misawa et al. *Int Immunol* 2015, 27, 425-434; Saitoh and Akira. *J Allergy Clin Immunol* 2016, 138, 28-36.など)。一連の研究の過程で、TLR および NLRP3 インフラマソームを介した炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-1beta の放出をアミノ酸不足が減弱させることを見出したことが、本研究のきっかけとなった。IL-1beta は、インフルエンザウイルス、ライノウイルスや B 群連鎖球菌などの病原体に対する感染防御を担う重要な炎症性サイトカインである (Nat Immunol 2013, 14, 246-253; J Immunol 2012, 188, 1953-60 など)。これまでの予備研究により、特定のアミノ酸が欠乏しただけで IL-1beta の放出が大きく減弱すること、これは TLR を介した IL-1beta の転写活性化が正常に行われないことに原因があることを突き止めている。当該アミノ酸は、現在の知識では説明出来ない新たな機序を介して IL-1beta 転写活性化を促進し、感染防御応答を誘導すると考えられた。そこで、IL-1beta を介した防御応答に関わる新たな栄養素感知機構の解明を目指す本研究を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究は、「なぜ栄養を十分に取らないと感染に弱くなるのか？」という古くから知られている、しかし回答することが難しい、栄養学および健康科学研究分野における根源的な謎に対する答えを導き出すための分子基盤を整えるものである。本研究によりアミノ酸が TLR を介した IL-1beta の発現を増強する機序が明らかになれば、感染症を予防するために栄養素の摂取が必須である理由を明確に説明することが出来るようになる。もう一つの意義は、既知の mTOR とは異なるアミノ酸感知機構を同定することにある。アミノ酸感知機構の研究は精力的に行われているが、そのほとんどが mTOR に関するものである。mTOR は様々な細胞応答・生体応答において極めて重要な役割を果たしているが、本研究で研究対象とする IL-1beta の発現を増強するアミノ酸は mTOR の活性とは関わりがない。mTOR とは独立した、感染防御に深く関わる新たなアミノ酸感知機構に関する本研究は、高い学術性を有する挑戦的なものと考えている。

本研究は、感染症に対する予防法・診断法の開発への将来的な展開が見込まれるため、臨床的意義も有している。本研究から得られる成果は、老化に伴う食欲減退や過度の食事制限による栄養不足に起因する防御応答不全のリスクを判断する基準、食事により摂取すべき最低限の栄養水準の策定などに将来的に貢献するものと考えられる。また、今後、アミノ酸を感知するセンサーやアミノ酸に応答する転写因子などを同定することが出来れば、TLR および NLRP3 インフラマソームを介した防御応答を適切なタイミングで増強する新たな感染症予防薬 (ワクチンアジュバントなど) の開発につながる。さらに、栄養不足による防御応答不全を模倣するモデルマウスを作製することが出来れば、インフルエンザや風邪といった日常に潜む感染症の発症機序の解明や新たな治療薬スクリーニング系の開発につながる。

## 3. 研究の方法

【マウスおよび細胞】

本研究では、野生型マウスとして C57BL/6 マウスを用いて実験を行った。当該マウスの腹腔にチオグリコレートを投与し、腹腔内に遊走してきた細胞をマウス腹腔マクロファージとして実験に用いた。

#### 【試薬】

IL-1beta ELISA kit は Biolegend 社より購入した。抗 IL-1beta 抗体は R&D Systems 社より購入した。各種 TLR リガンドやアルミニウムアジュバントは Invivogen 社より購入した。

#### 【ELISA】

マウス腹腔マクロファージを Pam3CSK4 およびアルミニウムアジュバントなどで刺激し、培養上清を回収した。IL-1beta に対する ELISA を行い、培養上清中の IL-1beta の濃度を測定した。

#### 【ウエスタンブロットおよび定量 PCR】

マウス腹腔マクロファージを Pam3CSK4 などの TLR リガンドで刺激し、全タンパク質と全 RNA を回収した。ウエスタンブロットおよび定量 PCR は定法に従った。

#### 【プロテオミクス】

マウス腹腔マクロファージを特定のアミノ酸の存在下・非存在下において TLR2 リガンドである Pam3CSK4 で刺激し、培養上清および細胞溶解液を回収した。質量分析により培養上清中に放出されたタンパク質を網羅的に同定し、セクレトームの変動を解析した。また、質量分析により細胞内のリン酸化ペプチドを網羅的に同定し、リン酸化プロテオームの変動を解析した。

## 4. 研究成果

(1) リン酸化プロテオミクスに基づく、アミノ酸が TLR を介した IL-1beta 発現を促進する機序に関する解析

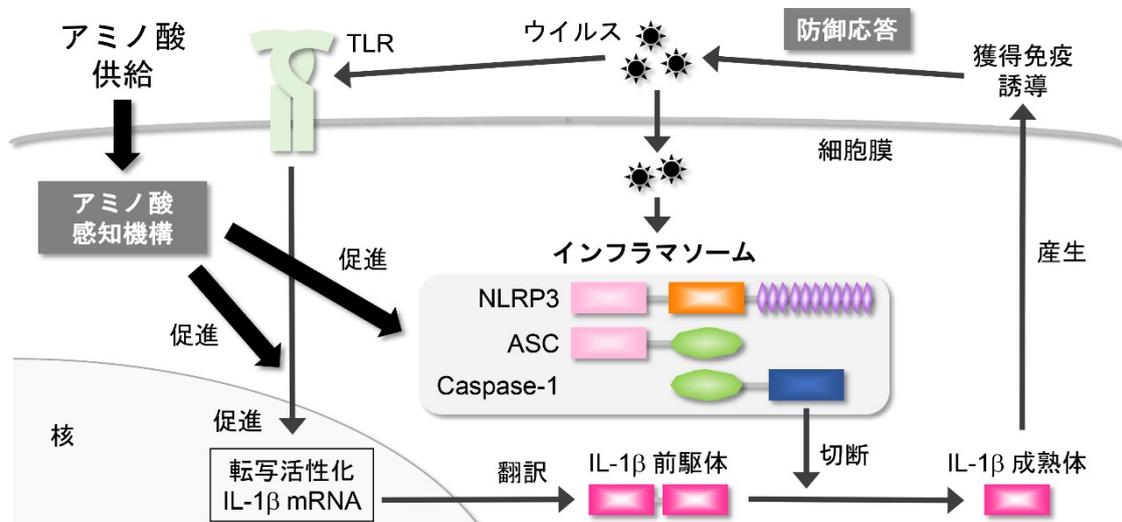
バリン、ロイシン、アルギニンなどのアミノ酸は、様々な細胞応答を制御するセリン・スレオニンキナーゼである mTOR の活性を制御する。本研究で研究対象とするアミノ酸は mTOR の活性に影響を与えないことを予備研究において確認している。一方で、当該アミノ酸もタンパク質のリン酸化状態を変化させることにより自然免疫応答を制御する可能性が考えられた。そこで、マウス腹腔マクロファージを当該アミノ酸の存在下・非存在下において培養し、TLR 刺激によって生じる細胞内タンパク質のリン酸化状態の変動をプロテオミクスにより解析した。解析の結果、Prpf4b をはじめとした多くの分子のリン酸化状態が当該アミノ酸の有無によって影響を受けることが明らかになった。また、mTOR の制御を受ける S6K や 4E-BP のリン酸化状態は当該アミノ酸の除去によって低下しなかったことから、当該アミノ酸の除去が mTOR の活性を低下させているわけではないことが裏付けられた。本解析から、当該アミノ酸は mTOR に依存しない新たな経路を介して自然免疫応答を制御していることが明らかになった (図 1)。

(2) アミノ酸がインフラマソーム活性化に与える影響に関する解析

IL-1beta の発現レベルは通常は低く保たれているが、パターン認識受容体である TLR が病原体を感知すると IL-1beta の転写が強く誘導される。一方で、NLRP3 インフラマソームは NLRP3 (パターン認識受容体)、ASC (アダプター)、Caspase-1 (プロテアーゼ) からなる複合体であり、IL-1beta の成熟と放出を誘導する。すなわち、TLR による発現誘導、それに続く NLRP3 インフラマソームによる成熟・放出を経て、IL-1beta は機能を発揮する。研究代表者は、予備研究において当該アミノ酸が TLR を介した IL-1beta の転写を制御していることを確認していたが、インフラマソームに対する効果については未確認であった。そこで、マウス腹腔マクロファージを TLR 刺激の段階までは通常の培地で培養し、当該アミノ酸の存在下・非存在下でアルミニウムアジュバントによる NLRP3 インフラマソームの刺激を行い、効果を検証した。解析の結果、当該アミノ酸の非存在下では IL-1beta の産生が低下したことから、当該アミノ酸は NLRP3 インフラマソームの活性化にも影響を与えることが明らかになった。本解析から、当該アミノ酸は TLR を介

した IL-1beta の転写に加えて、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1beta の成熟・産生を促進することが明らかになった (図1)。

図1. アミノ酸によるIL-1β産生の促進



(3) セクレトーム解析に基づく、アミノ酸レベルに応じて産生が変動する分子の同定  
 研究代表者は、予備研究において当該アミノ酸が TLR を介した IL-1beta の産生を制御していることを確認していたが、IL-1beta 以外の分子の放出については不明な点が残されていた。そこで、マウス腹腔マクロファージを当該アミノ酸の存在下・非存在下において培養し、TLR 刺激、それに続くアルミニウムアジュバント刺激を行い、細胞外に放出されるタンパク質を質量分析により同定することによりセクレトームの変動を解析した。解析の結果、当該アミノ酸は IL-1beta に加えて、IL-1alpha の産生を促進することが明らかになった。一方で、当該アミノ酸は Tumor necrosis factor (TNF), IL-6 などの他の炎症性サイトカインの産生を促進しないことも明らかになった。IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, TNF の発現はいずれも転写因子 NF-kappaB の活性化により誘導されることから、当該アミノ酸の効果に NF-kappaB が関与する可能性は低いものと考えられる。また、IL-1beta の転写には転写因子 Nrf2 や転写因子 HIF-1alpha が関わることから、これらの転写因子に対する当該アミノ酸の効果を検証した。解析の結果、当該アミノ酸は Nrf2 を介した Sqstm1 の発現や HIF-1alpha を介した Pkm2 などの発現に影響を与えないことが明らかになった。本解析から、当該アミノ酸は NF-kappaB、Nrf2、HIF-1alpha などの転写因子を介さない新たな機構を介して IL-1alpha や IL-1beta の発現を促進すると考えられる。

当該アミノ酸による IL-1beta 産生の促進効果は、初代培養マウス腹腔マクロファージや初代培養マウス骨髄由来マクロファージで確認されたが、マウスマクロファージ細胞株である J774 細胞や RAW 細胞などでは確認されなかった。初代培養細胞と比べて、がん化した細胞や不死化した細胞ではアミノ酸の感受性・要求性が異なることが知られており、今回見出した自然免疫応答に関わるアミノ酸感知機構も細胞のがん化や不死化により感受性・要求性が変化するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 DeVorkin Lindsay, Pavey Nils, Carleton Gillian, Comber Alexandra, Ho Cally, Lim Junghyun, McNamara Erin, Huang Haochu, Kim Paul, Zacharias Lauren G., Mizushima Noboru, Saitoh Tatsuya, Akira Shizuo, Beckham Wayne, Lorzadeh Alireza, Moksa Michelle, Cao Qi, Murthy Aditya, Hirst Martin, DeBerardinis Ralph J., Lum Julian J.	4. 巻 27
2. 論文標題 Autophagy Regulation of Metabolism Is Required for CD8+ T Cell Anti-tumor Immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 502 ~ 513.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.03.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawamura Y,....., Saitoh T,....., Matsuo H. (齊藤達哉は49名中37番目)	4. 巻 78
2. 論文標題 Genome-wide association study revealed novel loci which aggravate asymptomatic hyperuricaemia into gout	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1430 ~ 1437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2019-215521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama A, Nakatochi M, Kawamura Y, ....., Japan Gout Genomics Consortium (Japan Gout).	4. 巻 79(5)
2. 論文標題 Subtype-specific gout susceptibility loci and enrichment of selection pressure on ABCG2 and ALDH2 identified by subtype genome-wide meta-analyses of clinically defined gout patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 657-665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2019-216644.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 武村直紀, 齊藤達哉	4. 巻 28
2. 論文標題 痛風発症におけるNLRP3 インフラマソームの役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 高尿酸血症と痛風 (2020)	6. 最初と最後の頁 6-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omori S, Tsugita M, Hoshikawa Y, Morita M, Ito F, Yamaguchi SI, Xie Q, Noyori O, Yamaguchi T, Takada A, Saitoh T, Toyokuni S, Akiba H, Nagata S, Kinoshita K, Nakayama M.	4. 巻 34(6)
2. 論文標題 Tim4 recognizes carbon nanotubes and mediates phagocytosis leading to granuloma formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108734.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 自然免疫から読み解く食と病気との関係
3. 学会等名 第6回クリオイル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武村直紀, 松井裕大, 齊藤達哉
2. 発表標題 Nanaomycin AはNLRP3インフラマソームの活性化を阻害する
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 生体防御応答に関わるオルガネラ・ゾーンの理解と制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井祐大, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 Nanaomycin AはATP誘導性の炎症を抑える
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木稜介, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 15d-Prostaglandin J2はインフラマソームが誘導する炎症を抑制する
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子によるIL-1 およびIL-1 の放出を阻害する化合物の探索
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武村直紀, 松井裕大, 齊藤達哉
2. 発表標題 Nanaomycin AはATP誘導性の炎症を抑える
3. 学会等名 日本薬学会第 140 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 微粒子が誘導するパイロトーシスの機序解明と制御法開発
3. 学会等名 日本薬学会第 140 年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による炎症応答を抑制する生薬由来化合物の解析
3. 学会等名 日本薬学会第 140 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤達哉
2. 発表標題 オルガネラ膜損傷により誘導される炎症応答の理解と制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 シンポジウム招待講演 オンライン開催 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木稜介, 武村直紀, 齊藤達哉
2. 発表標題 インフラマソーム活性化を抑制するプロスタグランジン類の同定と効果検証
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 ポスター発表 オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 小迫英尊, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による炎症応答を抑制する生薬由来化合物の解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 ポスター発表 オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Manabu Taura, Ryosuke Sasaki, Naoki Takemura, Tatsuya Saitoh
2. 発表標題 15d-Prostaglandin J2 inhibits noncanonical inflammasome response to ameliorate endotoxin shock
3. 学会等名 第94回薬理学会年会 一般口頭発表 オンライン開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武村直紀, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 シリカナノ粒子による炎症応答ならびに間質性肺炎の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 一般学術発表(口頭) オンライン開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生駒健太, 武村直紀, 田浦学, 小迫英尊, 齊藤達哉
2. 発表標題 刺激性微粒子による炎症応答を阻害する生薬由来化合物の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 一般学術発表(口頭) オンライン開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井祐大, 武村直紀, 田浦学, 齊藤達哉
2. 発表標題 Nanaomycin AはNLRP3インフラマソームの活性化を阻害する
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 一般学術発表(ポスター) オンライン開催
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科生体応答制御学分野ホームページ  
<https://saihtatsuya.wixsite.com/saihtohlab>

6. 研究組織			
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	University of Victoria			
中国	上海交通大学			