

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790416

研究課題名 (和文) リステリア感染モデルを用いた細胞内微生物認識分子群の機能解析

研究課題名 (英文) Roles for intracellular innate immune receptors in host responses to *Listeria monocytogenes* infection

研究代表者

土屋 晃介 (TSUCHIYA KOHSUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437216

研究成果の概要 (和文) : *Listeria monocytogenes* (リステリア) はクロファージの細胞質への侵入および細胞内での増殖が可能な細胞内寄生細菌である。本菌をマクロファージに感染させるとカスパーゼ 1 の活性化が誘導される。しかし、細胞質に侵入できないリステリア変異株はこの応答を誘導しない。そのため、細胞質内に放出されたリステリアの構成成分または本菌の細胞内挙動が何らかの細胞内受容体に認識されることでカスパーゼ 1 活性化が誘導されることが考えられる。今回、そのような細胞内受容体の同定を試みたところ、細胞質内の DNA を認識する受容体である AIM2 (absent in melanoma 2) がアダプター ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-activating and recruitment domain) を介してリステリアの認識およびカスパーゼ 1 活性化の誘導に重要な役割を果たすことを見いだした。

研究成果の概要 (英文) : *Listeria monocytogenes* invades the cytoplasm of macrophages and induces the activation of caspase-1 and the subsequent maturation of IL-1 β and IL-18. Although apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-activating and recruitment domain (ASC), an adaptor protein of Nod-like receptors, has been shown to play an essential role in inducing this cellular response to *L. monocytogenes*, the mechanism has not been fully elucidated. In this study, we demonstrated that absent in melanoma 2 (AIM2), a cytosolic DNA receptor, plays an important role in the activation of caspase-1 during *L. monocytogenes* infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：インフラマソーム、AIM2、NLRP3、ASC、リステリア、細胞内寄生菌

1. 研究開始当初の背景

微生物由来成分を認識して自然免疫系を活性化させる分子群として Toll-like receptor (TLR) が発見され大きなトピックとなった

が、近年、細胞質内にも微生物由来成分を認識する分子群が存在することが知られるようになり盛んに機能解析が行われている。細胞質内の微生物認識分子群の多くは、総称し

て **Nod-like receptor (NLR)** と呼ばれ、一部は自然免疫系の活性化や抑制、細胞死の誘導などに関わることが知られているが、残りの多くは機能が不明である。一部の **NLR** の役割にインフラマソーム形成の誘導がある。インフラマソームは **NLR** やその他の分子を含むタンパク複合体であり、システインプロテアーゼであるカスパーゼ 1 を成熟化させる。成熟化したカスパーゼ 1 は、前駆型インターロイキン (IL) -1 β および前駆型 IL-18 を活性型に変換し、これらのサイトカインを介して炎症を惹起する。

リステリアは自然界に広く分布するグラム陽性短桿菌で、人畜共通感染症の病原体である。本菌は上皮細胞や肝細胞、繊維芽細胞など宿主の広範な細胞に侵入して細胞内で増殖する典型的な細胞内寄生細菌である。また、マクロファージに食食されても食胞膜を傷害することで食胞を脱出して食食による殺菌を回避する。リステリアをマクロファージに感染させるとカスパーゼ 1 の成熟化が誘導されて IL-1 β および IL-18 が産生される。また、この応答は細胞質に侵入できないリステリア変異株は誘導しないため、細胞質内に放出されたリステリアの構成成分または本菌の細胞内挙動が何らかの細胞内受容体に認識されることでカスパーゼ 1 活性化が誘導されると考えられる。しかし、その誘導機序は不明である。

2. 研究の目的

リステリアを感染させたマクロファージで観察されるカスパーゼ 1 成熟化の誘導は、特定の **NLR (NLRP3, NLRC4 など)** のアダプター分子である **ASC** に依存しているが、**NLRP3** や **NLRC4** には依存しておらず(図 1, 2)、カスパーゼ 1 成熟化の誘導に関わる **NLR** 分子が他に存在すると考えられる。今回、そのような **NLR** 分子を同定することを目的とする。成熟化したカスパーゼ 1 は、前駆型 IL-1 β および前駆型 IL-18 を活性型に変換し、これらのサイトカインを介して炎症を惹起するなど、宿主の免疫系に作用する。特に IL-18 は、細胞内寄生細菌の感染に対する防御の中心的役割を担うインターフェロン γ (IFN- γ) の分泌を促進する。また、カスパーゼ 1 成熟化に伴う宿主細胞の細胞死は、細胞内寄生細菌にとって寄生場所 (宿主) の消失を意味する。そのため、**NLR** を起点とするカスパーゼ 1 依存的な細胞応答は細胞内寄生細菌の感染に対する宿主の抵抗性に重要であると考えられ、その機序を解析することは感染防御機構の理解を深めると考えられる。

3. 研究の方法

実験動物 : ASC 欠損マウス、**NLRP3** 欠損マウス、**NLRC4** 欠損マウスは兵庫医大 筒

井ひろ子教授より分与された。野生型マウスは日本クレアより購入した。何れも **SPF** 環境下で飼育し、実験に用いる際は文部科学省通達の研究機関等における実験動物等の実施に関する基本指針に基づいて使用した。

菌株 : *Listeria monocytogenes* EGD 株およびその *hly* 欠損株を用いた。

細胞 : 各マウスにチオグリコレート培地を投与し、3 日後腹腔マクロファージを回収した。リステリアを感染させ、感染 24 時間後の培養上清および細胞溶解液を回収した。

アッセイ : 培養上清中および細胞溶解液中の活性型 IL-18 を **ELISA** で測定した。成熟型カスパーゼ 1 はウエスタンブロットで検出した。**HEK293** 細胞にインフラマソーム系を再構築し、リステリアの認識に働く細胞内受容体のスクリーニングを行った。このスクリーニングで関与が疑われた受容体がマクロファージにおいて同様の機能を示すか **siRNA** を用いたノックダウンで解析した。

4. 研究成果

(1) **カスパーゼ 1 活性化における ASC の重要性** リステリアに対する活性型 IL-1 β の産生応答は **NLRP3** または **NLRC4** を欠損するマクロファージでも野生型マクロファージとほぼ同程度に認められたが、**ASC** 欠損マクロファージでは全く認められなかった (図 1)。カスパーゼ 1 成熟化の誘導も同様の結果であった (図 2)。このことから、**NLRP3** および **NLRC4** 以外の **ASC** 依存的な受容体がこの応答に関わると考えられた。

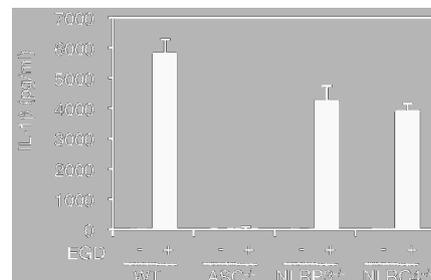


図 1 IL-1 β 産生応答における各インフラマソーム構成因子の重要性

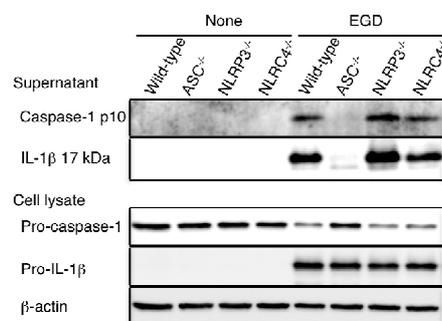


図 2 カスパーゼ 1 活性化応答における各インフラマソーム構成因子の重要性

(2) ASC 依存性の NLR のスクリーニング

(1) の結果から、リステリアに対するカスパーゼ 1 活性化応答は ASC に依存するが、代表的な NLR である NLRP3 や NLRC4 に依存しないことがわかった。そこで、他の NLR についてリステリアの標的器官である脾臓における発現を RT-PCR で解析したところ、NLRP6、NLRP10、NLRP12、AIM2 が脾臓において強く発現していることがわかった (図 3)。しかしながら、NLRP10 はエフェクタードメインである pyrin ドメインを欠いておりインフラマソームの形成には抑制的に働くことが知られている。一方、脾臓で発現がみられなかった NLRP2 はマクロファージ細胞株で LPS などの刺激によって発現が誘導され、ある種の細菌に対するケモカイン応答に関与することが知られている。そこで、NLRP2、NLRP6、NLRP12 および AIM2 の 4 つの受容体を候補としてインフラマソーム再構築系を用いて解析した。このスクリーニングでは、各受容体候補、ASC、前駆型カスパーゼ 1 および前駆型 IL-1 β を HEK293 細胞に強制発現させ、リステリアを感染させた後、培養上清中の IL-1 β を測定した。その結果、AIM2 を発現させた細胞がリステリアに対して強く応答することがわかった (図 4)。



図 3 脾臓および卵巣における各受容体分子の発現

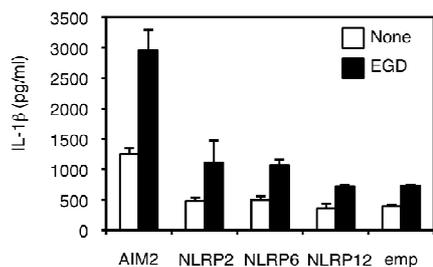


図 4 脾臓および卵巣における各受容体分子の発現

(3) マクロファージのカスパーゼ 1 応答における AIM2 の役割

(2) の結果から、AIM2 がリステリアの認識に関与している可能性が示唆された。そこで、AIM2 をノックダウンしたマクロファージでリステリアに対するカスパーゼ 1 活性化応答を解析し、AIM2 の関与を調べた。AIM2 ノ

ックダウンマクロファージではリステリア感染で誘導される活性型 IL-1 β 、IL-18 の産生応答およびカスパーゼ 1 成熟化が有意に減弱していた (図 5、6)。このことから、AIM2 がリステリアの認識に働き、インフラマソームを活性化させる細胞内受容体であることが明らかとなった。AIM2 は細胞質内の DNA を認識することが知られている。そこで、リステリアから DNA を抽出してマクロファージの細胞内に導入したところ AIM2 依存的に活性型 IL-18 が分泌された (図省略)。では、細胞内の菌からどのように DNA が放出されるのか。本研究では、マクロファージにリステリアを感染させると感染 12 時間以降に IL-1 β 産生やカスパーゼ 1 活性化がみられた (図省略)。この応答の開始時期はリステリアの細胞内増殖がピークを向かって減少に転じる時間と一致していたため、菌が細胞質内で大量に増殖し、その一部が生存環境の悪化に伴って死菌となり、DNA を放出する可能性が考えられた。

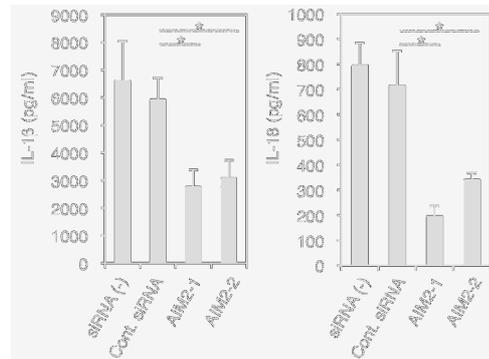


図 5 脾臓および卵巣における各受容体分子の発現

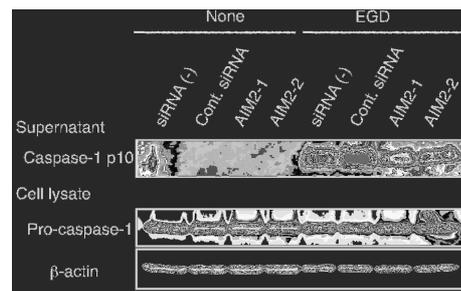


図 6 脾臓および卵巣における各受容体分子の発現

以上、本研究で DNA を認識する AIM2 がリステリアに対するカスパーゼ 1 活性化応答に重要な役割を果たすことが明らかになった。AIM2 インフラマソームは比較的最近になって発見されたインフラマソームであり、その感染防御応答における役割を実際の病原菌で確認できたことは非常に興味深い。また、

リステリアは強く免疫応答を誘導するため、弱毒株によるワクチンキャリアーとしての利用も研究されている。今回の結果は、そのような研究の発展にも寄与すると期待できる。

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. Sylvia Daim、河村伊久雄、土屋晃介 (他 8 名、3 番目)、Expression of the Mycobacterium tuberculosis PPE37 protein in Mycobacterium smegmatis induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages、Journal of Medical Microbiology、査読有、60 巻、2010、pp. 5182-5191
2. 酒井俊祐、河村伊久雄、岡崎拓、土屋晃介 (他 2 名、4 番目)、PD-1-PDL-1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin、International Immunology、査読有、22 巻、2010、pp. 912-925
3. 土屋晃介、原英樹、河村伊久雄 (他 7 名、1 番目)、Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with Listeria monocytogenes、The Journal of Immunology、査読有、185 巻、2010、pp. 1186-1195
4. Yanna Shen、河村伊久雄、野村卓正、土屋晃介 (他 7 名、4 番目)、Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of Listeria monocytogenes by murine macrophages、Infection and Immunity、査読有、78 巻、2010、pp. 2857-2867
5. Sita R. Dewamitta、野村卓正、河村伊久雄、原英樹、土屋晃介 (他 8 名、5 番目)、Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 alpha secretion in macrophages infected with Listeria monocytogenes、Infection and Immunity、査読有、78 巻、2010、pp. 1884-1894
6. 暮沼武士、河村伊久雄、原英樹、内山良介、Daim S.、Dewamitta S.R.、酒井俊祐、土屋晃介 (他 2 名、8 番目)、The RD1 locus in the Mycobacterium tuberculosis genome contributes to activation of

caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages、Infection and Immunity、査読有、77 巻、2009、pp. 3992-4001

[学会発表] (計 5 件)

1. 土屋晃介 (筆頭演者)、Mechanism of inflammasome activation upon infection with Listeria monocytogenes、14th International Congress of Immunology、2010 年 8 月 25 日、兵庫県神戸市
2. 土屋晃介 (筆頭演者)、Involvement of absent in melanoma 2 (AIM2) in inflammasome activation in macrophages infected with Listeria monocytogenes、The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity、2010 年 9 月 8 日、兵庫県・淡路市
3. 土屋晃介 (筆頭演者)、Mechanism of inflammasome activation upon infection with Listeria monocytogenes、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 27 日、神奈川県・横浜市
4. 土屋晃介 (筆頭演者)、Mechanism of the inflammasome activation upon infection with Listeria monocytogenes、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪府・大阪市
5. 土屋晃介 (筆頭演者)、Mechanism of the inflammasome activation upon infection with Listeria monocytogenes、The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity、2009 年 9 月 10 日、兵庫県・淡路市

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1204/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 晃介 (TSUCHIYA KOHSUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50437216