

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590522

研究課題名(和文) 結核菌分泌因子によるマクロファージ機能制御の分子基盤の確立

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of the macrophage function by mycobacterial secretory components

研究代表者

河村 伊久雄 (Kawamura, Ikuo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20214695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌ゲノム上のRD1領域は、マクロファージの細胞内カルシウム濃度の上昇を介してカルパインを活性化し、IL-1 の成熟化と分泌に関与する。また、結核菌に対する感染防御の誘導に関わるASCは、144番目のチロシン残基がプロテインキナーゼであるJnkおよびSykによりリン酸化を受けると、スペックと呼ばれる凝集塊を形成する。ASCスペックはcaspase-1を活性化し、成熟型IL-1 やIL-18産生が誘導されることが示された。さらに、PD-1シグナル経路はエフェクターT細胞の機能制御に強い効果を発揮するが、メモリーからエフェクターT細胞への分化制御には、Tim3経路が重要な役割を果たしている。

研究成果の概要(英文)：I have studied the molecular mechanism by which Mycobacterium tuberculosis (MTB) stimulates or regulates the host immune response. In the series of experiments I found that the region of difference 1 (RD1), a genomic locus in the MTB genome that has been shown to participate in the virulence of the bacterium, contributes to the maturation and secretion of IL-1 by enhancing the level of intracellular Ca<sup>2+</sup> followed by calpain activation. Furthermore, it has been shown that the inflammasome adaptor ASC is phosphorylated at a 144-tyrosine residue during inflammasome activation in a Syk- and Jnk-dependent manner. Phosphorylated ASC forms speck-like aggregate and contributes to caspase-1 activation. In addition, it was found that PD-1 inhibitory signal severely affects the function of Th1 cells and Tim3-dependent signal is critical to regulation of the differentiation of memory T cell into effector T cells.

研究分野：感染免疫学

キーワード：結核菌 BCG RD1 カルパイン マクロファージ ASC PD-1 Tim-3

### 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における結核の発症率は、他の先進諸国と比べると比較的高い状態にあるといえる。また、抗結核剤の無秩序な使用や高齢化社会の到来と社会のグローバル化が、今後治療困難な超多剤耐性結核菌の流行の引き金を引く可能性が考えられている。結核の問題点は、その原因となる菌の強い抵抗性にある。結核菌は宿主に感染後、主にマクロファージに取り込まれるが、常在性マクロファージはこれを殺菌処理することができない。一方、結核菌感染後3-4週間目には防御免疫が発現し、抗原特異的T細胞から大量のIFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ が産生されてマクロファージの殺菌活性が著しく亢進する。しかし、この場合でも体内から菌を排除するのは容易ではない。これらの事から、結核に対する新たな治療や予防戦略を構築するためには、宿主感染防御応答と菌が有する抵抗性機序を分子レベルで明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

(1) 結核菌ゲノム上のRD1領域はESX1分泌装置を構成する遺伝子をコードしており、菌の病原性、組織障害、感染細胞の細胞死や炎症性サイトカインの産生誘導に関与する重要な領域である。しかし、その機能は十分に解明されていない。そこで本研究では、重要な炎症性サイトカインの一つであるIL-1 $\alpha$ 産生に及ぼすESX1の影響について明らかにする。

(2) ASC欠損マウスを用いたこれまでの解析から、ASCがインフラマソーム形成に依存しない形で宿主免疫応答に関与することが示された。これまでもCard9やMyD88などのアダプター分子の欠損で結核に対する感受性が上げることが報告されており、ASCも結核に対する防御免疫発現に必要な何らかのシグナル制御に関与するものと考えられる。そこで、ASC活性化の詳細なメカニズムについて解析する。

(3) PD-1は、活性化したT細胞やB細胞、および機能不全に陥ったCD4<sup>+</sup>T細胞に発現し、2種類の特異的リガンド(PD-L1とPD-L2)と結合する。また、PD-1とPD-1特異的リガンドの会合は、活性化T細胞に抑制性シグナルを伝達することが示されている。この抑制性シグナルは、末梢組織において免疫寛容の維持や、結核菌感染初期の感染防御応答の制御には重要であるが、BCGワクチンの効果を減弱させることが示されている。そこで、抗PD-1抗体を用いてPD-1シグナル経路を阻害した場合のBCGに対するT細胞応答について解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 結核菌感染マクロファージからのサイトカイン産生応答におけるRD1遺伝子領域の

役割を明らかにするため、結核菌H37Rv株、RD1領域欠損株およびRD1相補株をC57BL/6マウスマクロファージに感染させ、その後の細胞内生菌数、サイトカイン(IL-1 $\alpha$ 、IL-12/23p40)産生、カルパイン活性化および細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。また、感染細胞からのLDH遊離量を測定し、感染後の細胞死の程度を算出した。

(2) ASC活性化メカニズムを明らかにするため、C57BL/6マウス、Casp1<sup>-/-</sup>、Pycard<sup>-/-</sup>、Card9<sup>-/-</sup>あるいはNlrp3<sup>-/-</sup>マウスより回収したマクロファージを結核菌、リステリアあるいはLPS + Nigericinで刺激し、IL-1 $\beta$ およびIL-18産生量を測定した。刺激後のIL-1 $\beta$ 産生における各種キナーゼの関与を調べるため、特異的阻害剤存在下でのサイトカイン産生量を調べた。また、各種キナーゼの活性化はリン酸化の程度により判定した。

(3) C57BL/6マウスにBCG (10<sup>4</sup> cfu)を皮下接種し、8週後に脾臓を回収した。赤血球を破壊した後、脾細胞懸濁液(5x10<sup>6</sup> cells/ml)を調製し、24穴培養プレートに加えた(1ml/well)。IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1R1、PD-1、C3、Tim-3、CTLA-4、またはIFN- $\alpha/\beta$ に対する中和抗体存在下にPPDで2日間刺激し、培養上清を回収した。培養上清中のIFN- $\gamma$ 産生量はELISAで測定した。さらに別の実験では、BCG接種8週後のマウスより回収した脾細胞を各種抗体存在下にPPDで7日間刺激した。生細胞を回収し、正常マウス脾細胞から得た抗原提示細胞を新たに添加した後、PPDでさらに2日間刺激した。培養上清を回収してIFN- $\gamma$ 産生量を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 結核菌H37RvおよびRD1欠損株をマウスマクロファージに感染させ、その後のサイトカイン産生応答を調べた。その結果、IL-12/23p40産生には明らかな違いは認められなかったが、IL-1 $\alpha$ 産生では野生株感染に比べてRD1欠損株感染で誘導されるサイトカイン産生量が有意に低いことが示された。一方、これらサイトカインmRNAの発現レベルに違いは認められなかったことから、RD1はこれらサイトカイン転写後のプロセスに影響することが示された。これまでの報告から、IL- $\alpha$ は前駆体として産生され、その後カルパインによるプロセッシングを受けて成熟型になることがわかっている。そこで、野生株およびRD1欠損株感染後のカルパイン活性化の程度を調べた。その結果、野生株感染後に見られたカルパインの活性化は、RD1欠損株感染では認められなかった。また、カルパイン活性化に必要な細胞内カルシウム濃度の上昇が、RD1欠損株感染では認められないことが示された。以上の結果より、RD1は結核菌感染マクロファージの細胞内カルシウム濃度の上昇に関与し、その結果としてカスバ

ーゼが活性化され、成熟型 IL-1 $\alpha$ 産生が誘導されることが明らかになった。

(2) これまでの研究成果から、結核菌に対する感染防御の誘導には Apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (ASC) が関与することが示されている。また、カスパーゼ1や NLRP3 欠損マウスでは感染後に誘導される感染防御応答に低下が見られないことから、ASC はインフラマソーム形成やカスパーゼ1の活性化を介さずに感染防御の誘導に関与することが示唆される。そこで、インフラマソーム形成を介さない場合に ASC の活性化がどのような機序で誘導されるのかについて解析した。その結果、ASC は特定のチロシン残基がリン酸化されると凝集し、ASC スペックを形成することが明らかになった。さらにこの機序について詳細に解析したところ、ASC のリン酸化にはプロテインキナーゼである c-jun N-terminal kinase (JNK) および Spleen tyrosine kinase (Syk) が関与し、これらキナーゼにより ASC の 144 番目のチロシン残基がリン酸化されることが明らかとなった。また、144 番目のチロシン残基の変異体を用いた解析から、同アミノ酸のリン酸化が ASC スペック形成に重要であることが示された。さらに、尿酸投与により実験的に誘導される炎症反応が Syk および JNK 非存在下では有意に抑制されることから、これらプロテインキナーゼは *in vivo* においても ASC スペック形成に関与することが示唆された。ASC スペックはカスパーゼ1を呼び寄せ、その活性化を誘導する場として働くことが示されている。今のところ、カスパーゼ1以外に ASC スペックと会合する分子を特定することはできていないが、防御免疫の成立に関わるシグナル経路を担う分子の活性化に ASC スペックが関与する可能性は大きいものと考えられる。

(3) BCG 接種後に誘導される T 細胞機能制御のメカニズムを解析するため、マウスに BCG を接種した。制御機序が発現する 8 週後に脾 T 細胞を回収し、*in vitro* で PPD 刺激した。その際、各種免疫抑制経路の阻害抗体を添加して、T 細胞機能制御にどのような機序が関与しているのかを、抗原特異的 T 細胞からの IFN- $\gamma$ 産生量を指標に解析した。脾 T 細胞を PPD で 2 日間刺激することにより発現する BCG 特異的 Th1 細胞の機能を調べたところ、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  や IL-1R1 に対する抗体は T 細胞機能に影響しないことが示された。また、抑制性シグナル分子として知られる CTLA-4 や Tim-3 に対する抗体処理でも IFN- $\gamma$ 産生に有意な変化は認められなかった。一方、抗 PD-1 抗体を添加した場合には、著明な IFN- $\gamma$ 産生の増強が認められた。従って、PD-1 シグナル経路はエフェクター T 細胞の機能を抑制することで BCG 感染後期の免疫制御に関与す

ることが示された。さらに、セントラルメモリーからエフェクター T 細胞への分化に対する影響を調べるため、BCG 感作マウスの脾 T 細胞を各種抗体存在下に PPD で 7 日間刺激した。その後、得られた T 細胞の Th1 細胞としての能力を PPD 刺激に対する IFN- $\gamma$ 産生量で解析したところ、抗 PD-1 抗体はこの T 細胞分化には影響を及ぼさなかったが、抗 Tim-3 抗体処理により IFN- $\gamma$ 産生が有意に増強することが示された。従って、メモリー T 細胞から Th1 型エフェクター T 細胞への分化制御には Tim3 の関与が大きいものと考えられた。さらに、C3 および I 型 IFN に対する抗体で処理した場合に IFN- $\gamma$ 産生が抑制されたことから、これらが関与するシグナル経路が BCG 感染後期の T 細胞分化に関与することも示された。

## 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 10 件)

Yang, R., C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fung, M. Mitsuyama, I. Kawamura. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 $\alpha$  from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. *Pathog., Dis.* 査読有, 70: 51-60, 2014. DOI: 10.1111/2049-632X.12075

Fang, R., H. Hara, S. Sakai, E. Hernandez-Cuellar, M. Mitsuyama, I. Kawamura, K. Tsuchiya. Type I interferon signaling regulates activation of the absent in Melanoma2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 査読有, 82: 2310-2317, 2014. DOI: 10.1128/IAI01572-14

河村伊久雄, 抗酸菌に対する祝応答とサイトカインネットワーク、呼吸器内科、査読無、26: 42-48, 2014. URL: [www.kahyo.com/](http://www.kahyo.com/)

Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, Y. Shen, J. Mtzuchichi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, M. Mitsuyama. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat. Immunol.* 査読有, 14: 1247-1255, 2013. DOI: 10.1038/ni.2749

Yokobori, N., B. Lopez, L. Geffner, C. Sabio y Garcia, P. Schierloh, L. Barrera, S. de la Barrera, S. Sakai,

I. Kawamura, M. Mitsuyama, V. Ritacco, C. Sastain Mdel. Two genetically-related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. *Infect. Genet. Evol.* 査読有, 16: 151-156, 2013. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.01.007  
河村伊久雄, 結核菌による宿主感染防御の発現制御, 結核, 査読無, 88: 315-321, 2013. URL: www.kekkaku.gr.jp/  
河村伊久雄, 結核菌に対する免疫応答調節機構, 医学のあゆみ, 査読無, 246: 489-494, 2013. URL: https://www.ishiyaku.co.jp/  
Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, S. Akira, M. Mitsuyama. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* 査読有, 189: 5113-5117, 2012. DOI: 10.4049/jimmunol.1202479  
Endo, Y., M. Takahashi, D. Iwaki, Y. Ishida, N. Nakazawa, T. Kodama, T. Matsuzaka, K. Kanno, Y. Liu, K. Tsuchiya, I. Kawamura, M. Ikawa, S. Waguri, I. Wada, M. Matsuchita, W. J. Schwaeble, T. Fujita. Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Immunol.* 査読有, 189: 5860-5866, 2012. DOI: 10.4049/jimmunol.1200836  
Yamamoto, T., H. Hara, K. Tsuchiya, S. Sakai, R. Fang, M. Matsuura, T. Nomura, F. Sato, M. Mitsuyama, I. Kawamura. *Listeria monocytogenes* strain-specific impairment of the TetR regulator underlies the drastic increase in cyclic di-AMP secretion and beta interferon-inducing ability. *Infect. Immun.* 査読有, 80: 2323-2332, 2012. DOI: 10.1128/IAI.06162-11

[学会発表](計 15 件)

河村伊久雄, 抗結核感染防御における ASC の重要性について, 第 84 回実験結核研究会, 2014 年 5 月 8 日, 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)  
Kawamura, I. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- $\gamma$  production by antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Acute Respiratory Infectious, Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting. February 9-13, 2014, Dhaka,

Bangladesh

Kawamura, I., S. Sakai, M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- $\gamma$  production by antigen-specific Th1 type CD4<sup>+</sup> T cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 2013 年 8 月 17-18 日, 北海道大学獣医学部(北海道札幌市)  
河村伊久雄, 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御, 第 86 回日本ハンセン病学会総会, 2013 年 5 月 30-31 日, ソニックシティ (埼玉県さいたま市)  
河村伊久雄, PD-1 シグナル経路による抗結核防御免疫の制御, 第 82 回実験結核研究会, 2012 年 5 月 9 日, 広島国際会議場 (広島県広島市)  
河村伊久雄, 結核菌による宿主感染防御の発現制御, 第 87 回日本結核業学会, 2012 年 5 月 10 日, 広島国際会議場 (広島県広島市)  
原英樹, 河村伊久雄, 土屋晃介, 光山正雄, リステリア感染における主要病原因子 listeriolysin O 依存的なインフラマソーム応答の役割, 第 23 回日本生体防御学会総会, 2012 年 7 月 11 日, 品川区総合区民会館 (東京都品川区)  
Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, M. Mitsuyama. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会, 2012 年 11 月 17 日, 臨床研究情報センター (兵庫県神戸市)  
Qu, H., H. Hara, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, K. Tsuchiya, Y. Xu, M. Mitsuyama. Critical role of listeriolysin O in calpain activation, which is triggered after evasion of *Listeria monocytogenes* from the phagosome into the cytoplasm of infected macrophages. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会, 2012 年 11 月 17 日, 臨床研究情報センター (兵庫県神戸市)  
Tsuchiya, K., H. Hara, S. Sakai, E. Hernandez-Cuellar, I. Kawamura, M. Mitsuyama. The inflammasome adaptor ASC plays a host-detrimental role in lethal infection with *Listeria monocytogenes*. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)  
Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, M. Mitsuyama. Involvement of the domain 3 of listeriolysin O in inflammasome activation induced by *Listeria monocytogenes* infection. 第 41 回日本

免疫学会学術集会、2012年12月5-7日、  
神戸国際会議場（兵庫県神戸市）  
Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H.  
Hara, S. Sakai, I. Kawamura, M.  
Mitsuyama. Nitric oxide-dependent  
suppression of the NLRP3 inflammasome  
activation. 第41回日本免疫学会学術  
集会、2012年12月5-7日、神戸国際会  
議場（兵庫県神戸市）  
原英樹、土屋晃介、河村伊久雄、光山正  
雄、The Thr223 in listeriolysin O is  
essential for the ability to induce  
the inflammasome activation. 2013年  
3月18-20日、第86回日本細菌学会総  
会、幕張メッセ（千葉県千葉市）  
Qu, H.、原英樹、河村伊久雄、土屋晃介、  
光山正雄、リステリア感染で誘導される  
カルパイン活性化におけるリステリオ  
リシン0の重要性、2013年3月18-20  
日、第86回日本細菌学会総会、幕張メ  
ッセ（千葉県千葉市）  
土屋晃介、酒井俊祐、原英樹、河村伊久  
雄、光山正雄、肺炎球菌におけるNLRP3  
とASCの防御的役割の解析、2013年3  
月18-20日、第86回日本細菌学会総会、  
幕張メッセ（千葉県千葉市）

〔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

<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河村 伊久雄 (KAWAMURA, Ikuo)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20214695