

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591152

研究課題名(和文) 呼吸器感染症生体応答機構、特に転写応答機構の解明とその治療への応用

研究課題名(英文) Identification of host factors which protect against the development of pulmonary inflammation induced by intracellular pathogens

研究代表者

石井 幸雄 (Ishii, Yukio)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80272194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器感染症の重症化を防御する因子について研究した。Nrf2は感染時の酸化ストレスや炎症性タンパク産生を抑制する転写因子で、Nrf2を欠く個体ではインフルエンザの肺炎が増悪することを明らかにした。

p62は酸化ストレスで誘導される多機能タンパクである。レジオネラ感染時のマクロファージでp62はインフラマゾームの活性化、それに引き続く炎症性タンパク産生を抑制し、肺炎増幅を防御することを明らかにした。

非結核性抗酸菌症の重症化にはリンパ球亜集団(Th1/Th17)のバランスが重要であることを示した。転写因子T-betの欠損はTh17偏移を導き、菌増殖、肺炎亢進をもたらすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, the protective roles of Nrf2, p62, and T-bet in the development of lung inflammation induced by intracellular pathogens are investigated. Nrf2 is a transcription factor involved in cellular protection against oxidative stimuli. The antioxidant pathway controlled by Nrf2 is found to be pivotal in protection against the development of influenza virus-induced pulmonary inflammation and injury under oxidative conditions.

P62, a scaffold multifunctional protein involved in several cellular events, is found to be a negative regulator of acute pulmonary inflammation during Legionnaires' disease, possibly by regulating inflammasome activity and subsequent proinflammatory cytokine production.

T-bet, the master regulator for Th1 development, is found to be a critical regulator for susceptibility and inflammatory responses to *M. avium*. T-bet-deficient mice are highly susceptible to *M. avium* infection with diminishment of Th1 responses and development of Th17 responses.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：転写因子 インフルエンザ レジオネラ肺炎 非結核性抗酸菌症 マクロファージ T細胞 酸化ストレス 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

平成 23 年の本邦死亡統計では肺炎は死亡順位の第 3 位であり、呼吸器感染症の克服は重要課題である。同様の病原微生物に曝露されても呼吸器感染症の発症や重症化には個人差があることより、呼吸器感染症の発症増悪の感受性は宿主側因子が重要な役割を果たしていると思われる。病原微生物を含めた環境因子からの情報は、細胞内情報伝達機構を通じて転写因子に伝達され、情報に応じた遺伝子の誘導的発現を行うことで生体応答がなされている。従って転写応答は呼吸器感染症の最も重要な宿主応答と考えられ、その異常は様々な呼吸器感染症の発症増悪に関与するものと思われる。Nrf2 はマクロファージや上皮細胞に高発現し、多彩な生体防御遺伝子の転写誘導を介し細胞レベルの生体防御の基幹をなす転写因子である。NF- $\kappa$ B や IRF3 などの Toll 様受容体 (TLRs) 下流分子活性化を Nrf2 が抑制することから、TLRs を介する病原微生物宿主応答の制御因子として重要であることが示唆される。また Nrf2 の標的遺伝子である SQSTM1/A170/p62(p62) はオートファジー関連因子 LC3 のアダプター分子であることより、食細胞内菌処理過程を含めた自然免疫反応にこれらの分子が関与することが推測される。一方、病原微生物感染に対するヘルパー T (Th) 細胞応答は獲得免疫反応の重要なプロセスである。転写因子 T-bet, GATA3, および ROR $\gamma$ t は、それぞれ Th1, Th2, および Th17 細胞分化のマスターレギュレーターであり、様々な病原微生物感染に対する Th 応答の制御を行う。従って、これらの自然免疫、獲得免疫系に関わる転写因子の異常は多くの呼吸器感染症の発症進展感受性に影響すると思われる。

## 2. 研究の目的

今回の研究では宿主応答が特に重要と思われる細胞内寄生性病原微生物のうち、頻度が高く対策の急務である非結核性抗酸菌、レジオネラ菌、インフルエンザウィルス感染の宿主応答機構を転写制御の観点から明らかにする。更にその異常と発症感受性との関係を明らかにし、治療応用への礎とすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) インフルエンザ感染と Nrf2

動物は C57BL6 野生型マウス、および同系の Nrf2 ノックアウト (KO) マウスを用いた。COPD 肺炎モデル作成のため、各マウスを 1 日 10 本のタバコに 4 日間曝露した。最終曝露より 4 時間後にインフルエンザウィルス (PR8 株) を経鼻投与し感染モデルを作成した。一部マウスには Nrf2 活性化を導く目的でカルボシステイン (CS) を連日経口投与した。感染後の各時点で肺組織を採取し、病理像を確認するとともに、同組織中の Nrf2 活性化や酸化ストレスの程度を免疫組織化学的に検討した。

肺組織における NF $\kappa$ B, IRF, および Nrf2 の活性化の程度はウェスタンブロット、免疫組織化学にて解析し、Nrf2 下流遺伝子の発現レベルは定量 PCR にて解析した。粘液産生の程度は PAS 染色にて形態的に観察するとともに、ムチン分子の発現量を定量し各群で比較した。

### (2) レジオネラ感染と p62

動物は C57BL6 野生型マウス、および同系の p62-KO マウスを用いた。マウスにレジオネラ菌 (*L. pneumophila*, ACTT #33152) を経気管支的に投与し、感染モデルを作成した。各マウスよりマクロファージを採取し、レジオネラ曝露後のカスパーゼ 1 活性、インターロイキン (IL)-18, IL-1 産生量を調べ、インフラマゾーム活性の指標とした。P62 と結合するインフラマゾーム分子を免疫沈降法にて同定した。感染後の各時点で肺組織を採取し、病理像を観察するとともに、気管支肺胞洗浄を行い、炎症細胞数を測定、各群で比較した。

### (3) 非結核性抗酸菌感染と T 細胞転写因子

動物は Balb/c 野生型マウス、同系の T-bet-KO マウス、および同系の T-bet 過剰発現 (tg) マウスを用いた。各マウスに非結核性抗酸菌臨床分離株である *M. avium* subsp. *Hominissuis* (MAC) を経気道的に投与することで MAC 感染モデルを作成した。感染後 10 ヶ月までの生存率を測定した。感染後 2 ヶ月で肺、肝臓、脾臓を採取し、各臓器の菌量を測定、各群で比較した。感染 2 か月後の肺病理像を観察するとともに、気管支肺洗浄液中の炎症細胞数、分画を測定した。肺組織中の Th1, Th2, および Th17 サイトカインの発現は定量 PCR で解析した。CD4 陽性 T 細胞中の T-bet, GATA3, および ROR $\gamma$ t 陽性細胞の割合、インターフェロン (IFN) $\gamma$  陽性細胞、および IL-17 陽性細胞の割合はそれぞれ FACS にて解析した。一部のマウスには IFN- $\gamma$  の補充、抗体投与による IL-17 の中和を行い、肺炎症、MAC 増殖に及ぼす影響について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) インフルエンザ感染と Nrf2

Nrf2-KO マウスでは野生型マウスに比べ、喫煙曝露インフルエンザ感染後の肺炎症が顕著に亢進していた。野生型マウスマクロファージではウィルス刺激後に抗酸化ストレス酵素群、グルタチオン関連酵素群の発現が誘導されたのに対し、Nrf2-KO マウスのマクロファージではこれらの誘導が見られなかった。また同マクロファージでは NF $\kappa$ B, IRF 活性化が亢進し、TNF- $\alpha$  などの向炎症性サイトカインの発現が亢進していた。CS を投与した野生型マウスでは肺マクロファージにおける Nrf2 活性化とともに、肺組織における酸化ストレスの軽減、炎症細胞浸潤の減弱、粘液過分泌の抑制が見られた。Nrf2 は喫煙ストレス化のインフルエンザ感染、すなわち COPD 等の感染増悪等の状況に際し防御的に

働く因子であることが示唆された。

### (2) レジオネラ感染と p62

p62-KO マクロファージでは野生型マクロファージに比べ、レジオネラ曝露後の IL-1 産生は有意に亢進しておいた。同曝露後のカスペーゼ 1 活性、IL-18 産生も p62-KO マクロファージで顕著に亢進しており、p62 の欠失はレジオネラ感染時のマクロファージにおけるインフラマゾーム活性を高めるものと思われた。免疫沈降による解析から、p62 はインフラマゾーム分子である NLRC4 (IPAF)、および NLRP3 に直接結合し、それぞれの分子の二量体形成を妨げることが明らかになった。p62-KO マウスでは野生型マウスに比べ、レジオネラ感染後の肺炎症が高度であり、肺組織中の IL-1 発現が亢進していた。以上より、p62 はインフラマゾームの活性とそれに引き続く向炎症サイトカイン産生を調節することにより、レジオネラ感染時の肺炎症を負に調節する因子であるものと考えられた。

### (3) 非結核性抗酸菌感染と T 細胞転写因子

野生型マウスに比べ、MAC 感染後の生存率は T-bet-KO マウスでは有意に低下していた。感染 2 ヶ月の時点において、肺、肝臓、脾臓共に MAC の菌量が T-bet-KO マウスでは有意に増加していた。MAC 感染後の野生型マウスでは気管支周辺に好中球やリンパ球等の炎症細胞浸潤が見られた。T-bet-KO マウスでは炎症細胞浸潤の程度が顕著であり、肺胞領域にはフォーミーマクロファージが多数集簇していた。逆に T-bet-tg マウスでは炎症細胞浸潤は極めて軽微であった。T-bet-KO マウスの肺組織では IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの Th1 サイトカインや、誘導型一酸化合成酵素 (NOS2) の発現が野生型マウスに比べ有意に低下し、逆に Th17 サイトカインである IL-17 は有意に増加していた。Th2 サイトカインである IL-4 の発現は各マウスで差が見られなかった。MAC 感染後に、野生型マウス、T-bet-tg マウスでは T-bet 陽性 T 細胞が増加したのに対し、T-bet-KO マウスでは ROR- $\gamma$  陽性リンパ球が顕著に増加していた。T-bet-KO マウスに IFN- $\gamma$  を外因性に補充すると、未補充マウスと比べ臓器菌量が減少したが、肺炎症に差は見られなかった。一方、T-bet-KO マウスに抗 IL-17 抗体を投与すると肺組織の炎症細胞数は有意に減少したものの、臓器菌量に差は認めなかった。以上より、T-bet を欠失する個体では臓器における MAC 増殖が亢進し、肺炎症が高度であることが示された。T-bet-KO マウスでは Th17 偏移が認められたことから、MAC 感染の感受性は従来言われていた Th1/Th2 バランスではなく、Th1/Th17 バランスが重要であり、T-bet は同バランスを決定する重要な宿主因子であることが示唆された。T-bet 欠失による IFN- $\gamma$  低下は個体の菌増殖をもたらし、一方で、T-bet 欠失による IL-17 過剰は肺炎症、特に好中球性炎症亢進をもたらすことが

明らかとなった。

### 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 7件)

Yoh K, Morito N, Ojima M, Shibuya K, Yamashita Y, Morishima Y, Ishii Y, Kusakabe M, Nishikii H, Fujita A, Matsunaga E, Okamura M, Hamada M, Suto A, Nakajima H, Shibuya A, Yamagata K, Takahashi S. Overexpression of ROR $\gamma$ t under control of the CD2 promoter induces polyclonal plasmacytosis and autoantibody production in transgenic mice. *European Journal of Immunology*, 42: 1999-2009, 2012 (査読有) doi: 10.1002/eji.201142250

Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Yoh K, Yageta Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Takahashi S, Hizawa N. Transcription factors GATA-3 and ROR $\gamma$ t are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Journal of Immunology*, 190: 1056-1065, 2013 (査読有) doi: 10.4049/jimmunol.1202386.

Morishima Y, Ano S, Ishii Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Hizawa N. Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013: 609395, 2013 (査読有) doi: 10.1155/2013/609395.

Matsuyama M, Ishii Y, Yageta Y, Ohtsuka S, Ano S, Matsuno Y, Morishima Y, Yoh K, Takahashi S, Ogawa K, Hogaboam CM, Hizawa N. Role of Th1/Th17 balance regulated by T-bet in a mouse model of Mycobacterium avium complex disease. *Journal of Immunology*, 192: 1707-1717, 2014 (査読有) doi:10.4049/jimmunol.1302258.

Ohtsuka S, Ishii Y, Matsuyama M, Ano S, Morishima Y, Yanagawa T, Warabi E, Hizawa N. SQSTM1/p62/A170 regulates the severity of Legionella pneumophila pneumonia by modulating inflammasome activity. *European Journal of Immunology*, 44: 1084-1092, 2014 (査読有) doi: 10.1002/eji.201344091.

Yageta Y, Ishii Y, Morishima Y, Ano S, Ohtsuka S, Matsuyama M, Takeuchi K, Itoh K, Yamamoto M, Hizawa N. Carbocysteine reduces viral-induced pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 50: 963-973, 2014 (査読有) doi: 10.1165/rcmb.2012-0292 OC.

Iriguchi S, Kikuchi N, Kaneko S, Noguchi E, Morishima Y, Matsuyama M, Yoh K, Takahashi S, Nakauchi H, Ishii Y. T cell-restricted T-bet overexpression induces aberrant hematopoiesis of myeloid cells and functional conversion of regional macrophages in the lung. *Blood* 125: 370-382, 2015(査読有)doi: 10.1182/blood-2014-05-575225.

〔学会発表〕(計 10 件)

Yageta Y, Masuko H, Ano S, Yamadori T, Morishima Y, Ishii Y, Takeuchi K, Hizawa N. Carbocysteine reduced influenza virus-induced pulmonary inflammation via activation of Nrf2 in cigarette smoke-exposed mice. International Conference of American Thoracic Society, San Francisco, 2012

石井幸雄：呼吸器疾患における環境応答異常機構の解明と創薬への応用．第 52 回日本呼吸器学会学術講演会（神戸）2012

松山政史、石井幸雄、檜澤伸之、小川賢二：遺伝子改変マウスを用いた肺 MAC 症病態生理の解明．第 87 回日本結核病学会総会，広島，2012

Matsuyama M, Ishii Y, Otsuka S, Ano S, Matsuno Y, Morishima Y, Hizawa N. Role of T-bet in the development of pulmonary MAC disease. International Conference of American Thoracic Society, Philadelphia, 2013

Otsuka S, Matsuyama M, Ishii Y, Ano S, Matsuno Y, Morishima Y, Hizawa N. The role of A170/SQSTM1/p62 in Legionella Pneumophila pneumonia. International Conference of American Thoracic Society, Philadelphia, 2013

石井幸雄、森島祐子：Th1/Th2 細胞バランスによって制御される気道炎症 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会（東京）2013

Matsuyama M, Ishii Y, Otsuka S, Ano S, Matsuno Y, Morishima Y, Hizawa N. Role of ROR- $\gamma$ t in the development of pulmonary MAC infection in mice. International Conference of American Thoracic Society, San Diego 2014

松山 政史、石井 幸雄、檜澤 伸之．動物実験モデルから考える肺 MAC 症の難治化病態．第 89 回日本結核病学会総会（岐阜）2014

松山 政史、石井 幸雄、大塚 茂男、阿野 哲士、松野 洋輔、森島 祐子、檜澤 伸之．肺 MAC 感染における T-bet の役割．第 54 回日本呼吸器学会学術講演会（大阪）2014

石井 幸雄、松山 政史．動物モデルを用いた非結核性抗酸菌感染症宿主因子の検討．第 90 回日本結核病学会総会（長崎）2015

〔図書〕(計 3 件)

松山政史、石井幸雄、檜澤伸之：免疫 -

肺 MAC 症と免疫 - 呼吸 32: 238-243, 2013  
松山政史、石井幸雄：「肺 MAC 症における Th1 細胞の役割」、倉島篤行、小川賢二編集、肺 MAC 症診療 Up to Date .pp130-131、南江堂、2013 年

松山政史、石井幸雄：転写因子 T-bet による Th1/Th17 バランス制御と MAC 感染症 医学のあゆみ 252(12) 1240-1241, 2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 幸雄 (ISHII YUKIO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80272194