

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03488

研究課題名(和文) 低活性を示すToll様受容体アゴニストの情報伝達経路の解明

研究課題名(英文) Cell signaling pathway of Toll-like receptor agonists with low activity

研究代表者

横田 伸一 (Yokota, Shin-ichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10325863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Atypicalな自然免疫賦活因子としてグラム陽性菌のリポテイコ酸、特に有用細菌として機能性食品に利用されている乳酸菌に着目して、その化学構造と生物活性の検討から脂肪酸組成の多様性と、炎症性サイトカインやIgAの産生誘導能との関連性を明らかにした。クラリスロマイシンがミトコンドリアタンパク質であるNIPSNAP-1, 2に結合することでミトコンドリアの機能を阻害することがToll様受容体を介したサイトカイン産生の抑制をもたらすことを示した。キノロン系抗菌薬の多くにRSウイルスの複製抑制活性のあることを見出し、RNA依存性RNAポリメラーゼの阻害作用によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫反応は感染症における宿主の初期応答として位置づけられる。本研究によって、乳酸菌群などの有用細菌の表層成分であるリポテイコ酸が免疫応答にかかわっており、その責任構造が主として脂肪酸部分にあることを示した。また、リポテイコ酸に新規の構成成分を見出すことができた。さらに、これまで抗菌薬として用いられた薬に免疫調整機能や抗ウイルス活性を見出し、その分子機構を明らかにした。これらの知見は、従来の薬剤の新規機能の利用(drug repositioning)や新しい免疫調節剤、感染症予防治療薬開発に活用できる。

研究成果の概要(英文)：Relationship between chemical structure and biological activity of Gram-positive bacterial lipoteichoic acids as an atypical immunostimulant were determined. The diversity of fatty acid composition was found, and its related biological activity, such as induction of IL-6 in human macrophage cell lines and IgA in mouse Peyer's patch. We also found several new constituents in the lipoteichoic acids in lactic acid bacteria. Clarithromycin suppressed innate immune response by inhibition of mitochondrial function via binding to mitochondrial proteins NIPSNAP-1, 2. Many quinolone antibiotics shared not only immunomodulatory activity, but also suppression of RS virus replication via inhibition of RNA-dependent RNA polymerase.

研究分野：微生物学

キーワード：自然免疫 細菌 リポテイコ酸 Toll様受容体 ミトコンドリア クラリスロマイシン キノロン系抗菌薬 RSウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体には自然免疫機構のひとつとして、微生物の生体高分子を漠然と認識するパターン認識受容体 (PRRs) が存在している。PRRs の代表例が Toll 様受容体 (TLR) である。例えば TLR4 はグラム陰性菌のリポ多糖を、TLR2 は細菌のリポタンパク質を、TLR5 は鞭毛を認識し、病原体排除に関わる炎症性サイトカインや抗菌タンパク質などが発現誘導される。一方で、宿主に対して慢性感染を成立させることのできる病原体や常在細菌叢を形成する微生物では TLR による認識で惹起されるレスポンスが弱いことが想定される。ピロリ菌やクラミジアなどのリポ多糖は、リポド A 部位の脂質の化学構造や本数が大腸菌に代表される病原性の強い菌とは異なることがすでに知られており、炎症反応惹起能が弱いことに関してはコンセンサスが得られているところである。しかしながら、これら低毒性リポ多糖の認識が TLR4 によるとする報告と、TLR2 によるものとする相反する報告が 15 年ほど前からあるものの、未だ結論を見るに至っていない。さらには、低毒性リポド A が TLR4 アンタゴニストとして働くとの報告もある。

本研究の学術的な問いは、「低毒性 TLR アゴニストの情報伝達系は、高毒性のそれとは本質的に異なるのではないか。これを明らかにすることにより、細菌が宿主に定着するのに必要な宿主への働きかけを理解できるのでは。」である。さらに、申請者は乳酸菌、特に腸内乳酸菌で機能性食品としても使用されているガセリ菌の菌体表層糖脂質であるリポテイコ酸に存在するユニークな構造を見出している [Appl Environ Microbiol (2013)]。具体的には、膜にアンカーしている糖脂質部分に通常のグラム陽性菌では二糖であるところが現在までこの菌種でしか認められていない四糖を有していることである。予備的な検討では、病原性細菌の代表である黄色ブドウ球菌のリポテイコ酸と比較すると、腸管上皮細胞のサイトカイン誘導をガセリ菌リポテイコ酸が全く起こさないというデータを得ている。一方、大腸菌リポ多糖による炎症性サイトカインの誘導を抑制する効果、すなわちアンタゴニスト効果をガセリ菌リポテイコ酸に見出している。一方、マクロライド系抗菌薬であるクラリスロマイシンやアジスロマイシンが抗炎症作用をもつことが知られており、慢性閉塞性肺疾患や滲出性中耳炎などの慢性的な気道炎症を伴う疾患において、その症状を軽減させるために少量長期投与で使用されている。しかしながら、その分子機構はサイトカイン産生などの炎症に関与する物質産生の抑制を検討するととどまり、未だ不明である。申請者らは、マクロライド系抗菌薬の免疫調節活性の作用機序を明らかにするために、クラリスロマイシン結合タンパク質のスクリーニングを実施し、いくつかの候補タンパク質を得て、それらが炎症性サイトカイン産生誘導に関わることを証明してきた [Biochem Biophys Res Commun (2017) に 2 報連報で発表]。これらの候補タンパク質はこれまで免疫反応へのかかわりが報告されておらず、新規の細胞内情報伝達調節機構であると考えている。その過程で、これらタンパク質が関わる情報伝達経路を低活性 TLR アゴニストが強く活性化すると推測させる結果を予備的な検討から見出している。

2. 研究の目的

慢性感染、定着を成立させることのできる細菌の多くで、自然免疫応答の最前線に位置する TLR を介した細胞伝達の低下が認められている。本研究では、これら細菌の TLR 低活性アゴニストもしくはアンタゴニストとして働いている分子の詳細な化学構造の決定を行い、自然免疫反応惹起能との構造活性相関を明らかにする。低活性 TLR アゴニストとしては有用細菌である乳酸菌、特にその菌体表層成分であるリポテイコ酸を中心にそれらの化学構造と情報伝達経路を明らかにする。一方、私たちがすでに見出しているマクロライド系抗菌薬やキノロン系抗菌薬が持つ免疫応答調節活性の作用機序を明らかにすることで、低活性 TLR アゴニストの情報伝達との関連性を明らかにする。これらの背景から、低活性 TLR アゴニストを持つ細菌の宿主への定着や慢性感染を成立させる要因を明らかにしていく。さらには、既存の抗菌薬の新たな免疫調節活性の機序などの新しい活性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 高い免疫賦活活性を有する乳酸菌のリポテイコ酸の化学構造

菌株ごとの多様性が高い乳酸菌リポテイコ酸について複数の菌種について化学構造を検討した。リポテイコ酸を酸やアルカリ等で多糖を部分分解して得られた断片について、¹H-NMR、¹³C-NMR、MALDI-TOF 質量分析等のスペクトル解析と、断片の構成成分のガスクロマトグラフィー/質量分析を行う。

複数種の乳酸菌 (*Lactobacillus gasseri*, *Lactiplantibacillus plantarum* や *Lactococcus* 属など) リポテイコ酸について黄色ブドウ球菌、腸球菌のリポテイコ酸を比較対照として、細胞を刺激したときの免疫応答について検討する。用いる細胞株としては、TLR4 高発現株 T24 (尿路上皮細胞株)、TLR4 低発現株 MKN28 (胃がん細胞株)、CaCo2 (結腸がん細胞株) や、各種 TLR を発現させた HEK293 細胞株を用いる。IL-8 やインターフェロン- λ 等のサイトカイン産生の検討に加えて、MAP キナーゼ系、NF- κ B 系、IRF3 系などの細胞内情報伝達系を各因子のリン酸化、レポーター遺伝子アッセイにより検討する。

(2) マクロライド系抗菌薬の免疫調節活性機構の解明

クラリスロマイシン結合タンパクとして申請者らが同定したミトコンドリアタンパク質 (NIPSNAP-1, 2) と NIP-SNAP 結合タンパク質として同定した HSP60 と p62/SQSTM-1 や微生物によるサイトカイン産生誘導の情報伝達にかかわる MAVS との関連、すなわちタンパク質間の結合及び相互作用、発現量に対する影響を検討する。過剰発現もしくは発現抑制した際の刺激物質に対する情報伝達の変化について検討する。これらのタンパク質はすべてミトコンドリアに局在しており、ミトコンドリア自体が自然免疫応答情報伝達にかかわっているという作業仮説を立て、それを検証する。クラリスロマイシンを細胞株に作用させた時のミトコンドリアの機能変化、自食作用 (マイトファジー) への影響を共焦点レーザー顕微鏡、もしくは電子顕微鏡で観察する。あるいは膜電位の変化などミトコンドリアの機能、代謝の変化を中心に検討する。

(3) キノロン系抗菌薬の免疫調節作用と抗ウイルス作用の機序解明

キノロン系抗菌薬にグラム陰性菌リポ多糖による炎症性サイトカインの産生誘導の抑制と RS ウイルス感染によるインターフェロン- λ , β の産生誘導を抑制する活性を見出ししている。これらの作用機構に関して、TLR 系の細胞内情報伝達系に着目して、(1) で用いた実験系を使って検討する。キノロン系抗菌薬の RS ウイルスの増殖、複製に対する影響を検討する。キノロン系抗菌薬として、人、動物に使用されている 14 種のキノロン系抗菌薬を供試することで構造活性相関を検討する。RS ウイルスの相互作用するタンパク質を探索し、ドッキングシミュレーションで相互作用するアミノ酸を抽出する。それらの変異組換えタンパク質を作製し、ウイルス RNA の転写活性が失われる変異を探索する。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌のリポテイコ酸の化学構造と生物活性

4 菌種の菌から LTA を抽出精製して構造解析を行った。すべてグリセロールリン酸ポリマーを親水性主鎖として持ち、D-alanine が部分的に置換していた。一方で、アンカー糖脂質部分に構造の多様性が認められた。*L. gasseri* は 4 糖とジモしくはトリアシルグリセロール、*L. plantarum* は 3 糖とジモしくはトリアシルグリセロール、*Lactococcus lactis* と *Staphylococcus aureus* は 2 糖とジアシルグリセロールを有していた。脂肪酸の組成は、*S. aureus* では C18:0 と分岐脂肪酸である anteiso-C17:0、anteiso-C15:0 から構成され、3 菌種の乳酸菌では不飽和脂肪酸 C18:1(n-9) と C16:0、さらに *L. gasseri* 以外の 2 菌種ではシクロプロパン環を有する C19:cy が含まれていた。以上の結果から、乳酸菌群と黄色ブドウ球菌の LTA においては、脂肪酸の組成が異なっていることが示された。ヒト結腸癌由来細胞である Caco-2 細胞は、TLR4 アゴニストのリポ多糖 (LPS)、TLR2/TLR1 アゴニストの Pam₃CSK や 3 種の乳酸菌 LTA にはほとんど応答しないのに対して、黄色ブドウ菌 LTA と TLR2/TLR6 アゴニストの Pam₂CSK でのみ IL-8 産生が認められるという特異なサイトカイン応答を示した。検討した 3 種の乳酸菌 LTA と黄色ブドウ球菌 LTA の親水性領域は D-アラニン置換のあるグリセロールリン酸ポリマーで共通している。一方、アンカー糖脂質の脂質成分として、黄色ブドウ球菌では C18:0 と分岐脂肪酸である anteiso-C17:0、anteiso-C15:0 から構成され、乳酸菌では不飽和脂肪酸 C18:1(n-9) と C16:0、さらにガセリ菌以外ではシクロプロパン環を有する C19:cy が含まれていた。脂質の組成の違いが LTA の Caco-2 細胞による LTA の認識の違いを与えていることが示唆された。

さらに、マウスパイエル板による IgA の産生誘導やヒト単球 (マクロファージ) 系細胞株による抗体産生誘導の指標となる IL-6 の産生誘導で、高い活性を持つことが明らかとなっている乳酸菌 2 菌種についてグラム陽性菌リポテイコ酸 (LTA) を精製し、化学構造を検討した。乳酸菌 A (知的財産権のために非公表) では、これまで LTA の成分としてはどの菌からも報告されていない稀有なアミノ酸の存在を同定した。乳酸菌 B では、Octyl-Sepharose クロマトグラフィーで二成分に分画され、うち一成分にのみサイトカイン誘導活性を見出した。構造解析の結果、活性のある画分から 3 残基のアシル基をもつ LTA が含まれており、アシル基 2 残基には活性が認められず、3 残基のアシル基の活性への関与を明らかにした。

(2) マクロライド系抗菌薬の免疫調節活性機構の解明

低活性 TLR アゴニストの情報伝達とマクロライド系抗菌薬が持つ免疫調節活性の情報伝達系の関連性に関して、クラリスロマイシン結合タンパク質として同定していた NIP-SNAP-1, 2 の Crispr-Cas9 によるノックアウト (KO) 細胞株と siRNA によるノックダウン (KD) 細胞株を作製した。グラム陰性菌リポ多糖 (LPS) 誘導性サイトカイン (IL-8) 産生を指標に NIPSNAP-1, 2 のクラリスロマイシン誘導性抗炎症作用への関与を検討した。NIPSNAP-1, 2 の double KD 細胞において LPS による IL-8 の産生誘導の抑制とミトコンドリアの酸素消費速度や ATP 産生の低下が認められた。ミトコンドリアの機能阻害剤である deferiprone, m-chlorophenylhydrazine 処理によって NIPSNAP-1, 2 の発現量低下と IL-8 産生誘導抑制が認められた。クラリスロマイシン処理では NIPSNAP-1, 2 の発現量に変化なく、IL-8 産生誘導能とミトコンドリア機能の低下が認められた。以上の結果から、クラリスロマイシンは NIPSNAP-1, 2 に結合することでミトコンドリアの機能と恒常性を低下させる作用があり、それが TLR を介した免疫応答である IL-8 の産生誘導の抑制に関わっていることが示唆された。

一方で、NIPSNAP-1, 2 の double KO 細胞ではクラリスロマイシンによる IL-8 産生誘導に変化が認められなかった。NIPSNAP-1, 2 の KD による一過性の機能不全ではクラリスロマイシンの抗炎症作用は発揮されるが、長期にわたる完全な機能不全をもたらす KO ではミトコンドリアの機能を補完するサルベージ機構が働いているものと推定した。

(3) キノロン系抗菌薬の免疫調節作用と抗ウイルス作用の機序解明

本研究で、ほぼすべてのキノロン系抗菌薬にグラム陰性菌 LPS による炎症性サイトカインの産生誘導と RS ウイルスによるインターフェロン- λ , β の産生誘導を抑制する活性、および RS ウイルスの感染細胞内での増殖抑制を見出した。その中で、スパルフロキサシンが他のキノロン系抗菌薬と比較して、抗炎症作用、抗 RS ウイルス活性両方ともに著明に高い活性を有することを見出した。今回の研究で、広くキノロン系抗菌薬に RS ウイルス増殖自体も抑制することが見出され、RS ウイルスゲノムの複製、転写の活性を抑制することを明らかにした。RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性本体であるウイルスの L タンパク質に対するキノロン系抗菌薬の直接の相互作用が示唆され、ドッキングシミュレーションによって結合に関与すると考えられるアミノ酸残基を抽出した。それらの変異組換えタンパク質を作製し、転写活性が失われる変異を複数見出した。14 種のキノロン系抗菌薬の構造と活性の関連を検討した。スパルフロキサシンとはキノロン骨格の 5 位の置換基のみが異なるオルビフロキサシンには抗炎症活性がほとんど認められないことから、5 位のアミノ基が抗炎症活性発揮に重要であることが示唆された。一方、抗 RS ウイルス活性の構造活性相関は抗炎症活性のそれとは異なり、5 位のアミノ基の関与は低いと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Shiraishi T, Maeno S, Kishi S, Fujii T, Tanno H, Hirano K, Tochio T, Tanizawa Y, Arita M, Yokota S, Endo A. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Oligosaccharide metabolism and lipoteichoic acid production in <i>Lactobacillus gasseri</i> and <i>Lactobacillus paragasseri</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Microorganisms | 6. 最初と最後の頁 1590 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9081590 | 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 Katsuki R, Shiraishi T, Sakata S, Hirota T, Nakamura Y, Yokota S. | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Inhibitory effect of the glycerophosphate moiety of lipoteichoic acid from lactic acid bacteria on dexamethasone-induced atrogin-1 expression in C2C12 myotubes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology | 6. 最初と最後の頁 351-357 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.67.351 | 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 Takumi-Tanimukai Y, Yamamoto S, Ogasawara N, Nakabayashi S, Mizuta K, Yamamoto K, Miyata R, Kakuki T, Jitsukawa S, Sato T, Tsutsumi H, Kojima T, Takano K, Yokota S. | 4. 巻 304 |
| 2. 論文標題 A hydroxypropyl methylcellulose plaque assay for human respiratory syncytial virus | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Virological Methods | 6. 最初と最後の頁 114528 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2022.114528 | 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 - |
| 1. 著者名 Yamamoto Soh, Sudo-Yokoyama Yuka, Ogasawara Noriko, Yokota Shin-ichi | 4. 巻 316 |
| 2. 論文標題 Rapid, simple, and cost-effective plaque assay for murine norovirus using microcrystalline cellulose | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Virological Methods | 6. 最初と最後の頁 114715 ~ 114715 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jviromet.2023.114715 | 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 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Kojima Naoya, Kojima Shohei, Hosokawa Shin, Oda Yoshiki, Zenke Daisuke, Toura Yuta, Onohara Emi, Yokota Shin-ichi, Nagaoka Masato, Kuroda Yasuhiro | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Wall teichoic acid-dependent phagocytosis of intact cell walls of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> elicits IL-12 secretion from macrophages | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology | 6. 最初と最後の頁 986396 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.986396 | 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 Matsuzaki Chiaki, Shiraishi Tsukasa, Chiou Tai-Ying, Nakashima Yukari, Higashimura Yasuki, Yokota Shin-ichi, Yamamoto Kenji, Takahashi Tomoya | 4. 巻 88 |
| 2. 論文標題 Role of lipoteichoic acid from the genus <i>Apilactobacillus</i> in inducing a strong IgA response | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology | 6. 最初と最後の頁 e0019022 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.00190-22 | 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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷向由佳、小笠原徳子、山本圭佑、高野賢一 |
| 2. 発表標題 Drug-repositioningによる抗RSV治療薬開発のための基礎研究 |
| 3. 学会等名 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 横田伸一、小島直也、小島匠平、細川伸、小田慶喜、長岡正人、黒田泰弘 |
| 2. 発表標題 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 細胞壁の壁テイコ酸依存性のマクロファージによる貪食依存的なIL-12の産生誘導 |
| 3. 学会等名 第27回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷向由佳、小笠原徳子、山本圭佑、横田伸一、高野賢一 |
| 2. 発表標題 スパルフロキサシンによるRespiratory syncytial virus複製抑制機構の解明 |
| 3. 学会等名 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>札幌医科大学医学部微生物学講座 https://www.microbe-sapmed.com/</p> |
|---|

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 |
|-------|--|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 小笠原 徳子 (Ogasawara Noriko) (00438061) | 札幌医科大学・医学部・准教授 (20101) | |
| 研究分担者 | 山本 聡 (Yamamoto Soh) (10588479) | 札幌医科大学・医学部・助教 (20101) | |
| 研究分担者 | 白石 宗 (Shiraishi Tsukasa) (70725168) | 札幌医科大学・医学部・助教 (20101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 永島 裕之 (Nagashima Hiroyuki) (90592840) | 札幌医科大学・医学部・研究員 (20101) | |
| 研究分担者 | 佐藤 豊孝 (Sato Toyotaka) (30756474) | 札幌医科大学・医学部・講師 (20101) | |

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 |
|---------|---------|
| | |