

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03489

研究課題名（和文）グラム陽性病原菌の宿主炎症応答を利用した生体内増殖機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the in vivo proliferation mechanism of Gram-positive pathogens through host inflammatory responses

研究代表者

原 英樹（Hara, Hideki）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30456892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：リステリアや黄色ブドウ球菌などのグラム陽性病原菌がインフラマソームを活性化し感染宿主内での増殖を亢進していることをわれわれは見出している。本研究では、リステリアが産生する病原因子LL0がシグナル伝達の場合として機能する膜ラフトに集積することで、LynやSykを介してインフラマソーム応答を亢進することを突き止めた。同活性にはLL0223番目のスレオニンが重要であり、同アミノ酸を置換するとリステリアの病原性が消失することを見出した。以上の結果から、インフラマソーム応答がリステリアなどの感染病態形成に重要な役割を担っており、LL0内の1アミノ酸により制御されていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフラマソーム応答は病原菌感染で活性化されるが、非病原菌はインフラマソーム受容体に対するリガンドは発現しているにも関わらず活性化できない。インフラマソームによるこの病原菌と非病原菌の識別機構は不明であったが、本研究ではリステリアが産生する病原因子に着目することで、インフラマソームの活性化には細胞内受容体に対するリガンドだけでなく、ASCの翻訳後修飾を可能とする病原因子の存在が必須であることを突き止めた。この知見はASCの翻訳後修飾を阻害することで感染病態を改善できることを意味しており、今後、特異的な阻害剤を開発することで薬剤耐性菌の治療などに応用できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：We have reported that Gram-positive pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* activate the inflammasome to promote their proliferation within the host during infection. In this study, we found that the virulence factor LL0 produced by *Listeria* accumulates in membrane rafts that function as signal transduction sites, promoting inflammasome response through Lyn and Syk. We identified the 223rd threonine in LL0 is crucial for this activity, and replacing this amino acid results in the loss of *Listerial* pathogenicity. From these results, it is revealed that the inflammasome plays an important role in the pathogenesis of infections such as *Listeria monocytogenes*, and that it is regulated by a single amino acid within LL0.

研究分野：微生物学

キーワード：感染症 炎症 インフラマソーム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

病原菌が感染するとわれわれの体は微生物成分を非自己として認識することで様々な炎症応答を惹起する。その1つとして、リステリアや黄色ブドウ球菌などのグラム陽性病原菌が感染すると細胞内受容体が特異的リガンドを感知しインフラマソーム応答を活性化する。これまでの研究から、インフラマソーム応答が活性化するとこれらの感染病態が悪化することをわれわれは見出している。合成リガンドによる刺激とは異なり、病原体は多くの微生物リガンドを発現していることからインフラマソームの活性化に至るシグナル経路は複雑であり未解明な点が多い。なかでも、非病原菌感染ではインフラマソームが活性化しない、もしくは応答が低いことを示す報告が複数あることから、特定の病原因子の発現がインフラマソーム応答を活性化させるカギとなっている可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

インフラマソームが活性化するとリステリアや黄色ブドウ球菌などの感染症が重症化することから、本研究ではグラム陽性病原菌がインフラマソーム応答を活性化する分子機序を解明することを目的とする。特に、病原菌が産生する病原因子が特異的に活性化するシグナル経路を突き止めることで、非病原菌感染との違いを明らかにする。これらの分子機序を明確にすることは感染症における新たな治療標的分子の発見につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

#### ・マクロファージの調整

初代マクロファージを回収するために、チオグリコレート培地をマウス腹腔に投与し、4日後に腹腔内を洗浄し腹腔マクロファージを回収した。骨髄由来マクロファージはマウスの骨髄細胞をL929細胞培養上清を用いて5日間分化誘導させ回収した。マクロファージは24 wellプレートに $0.5 \times 10^6$  cells/wellで培養し付着させ、非付着性細胞は培地交換することで取り除いた。

#### ・細胞感染

細胞培養プレートに付着させたマクロファージに菌液を添加して感染させた。菌数と細胞数の比率(MOI)は、リステリアの場合はMOI=10、黄色ブドウ球菌の場合はMOI=50として1時間感染させたのち、ゲンタマイシン含有培地を添加することで細胞外での菌の増殖を阻止し、さらに18時間培養を行った。培養上清および細胞懸濁液は、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) およびウエスタンブロット解析に用いた。

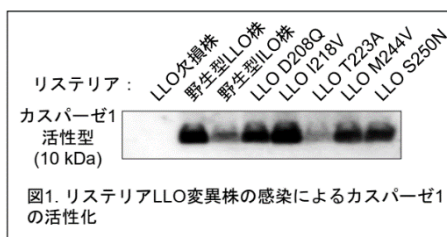


図1. リステリアLLO変異株の感染によるカスパーゼ1の活性化

#### ・リガンド刺激

NLRP3インフラマソームを活性化するために、LPSでマクロファージを4時間プライミングしたのちに、nigericinで30~60分刺激を行った。AIM2インフラマソームの活性化にはLPSで同様にマクロファージをプライミングしたのちに、poly(dA:dT)をLipofectamine LTXでトランスフェクトし1~2時間培養した。

#### ・マウス感染

$10^4 \sim 10^6$  colony forming unit (CFU) のリステリアを経静脈投与し、4日後に採血しサイトカイン濃度を測定した。回収した臓器はホモジナイズ後、寒天培地にプレーティングして生菌数をカウントした。黄色ブドウ球菌の場合は、 $10^8$  CFUを経静脈投与し、2日後に同様の操作で実験を行った。

### 4. 研究成果

(1) インフラマソーム応答を亢進させるリステリア病原因子の責任領域の特定

これまでの研究から、細胞内寄生菌リステリアが産生する主要病原因子 listeriolysin O (LLO) がインフラマソームの活性化に関与することを突き止めている。LLOは4つのドメインから構成されており本活性に関わるLLOの責任領域を絞り込んだところ、ドメイン3がインフラマソーム応答の亢進に重要であることが判明した。さらにドメイン3内のアミノ酸について点変異株を作製したところ、223番目スレオニン

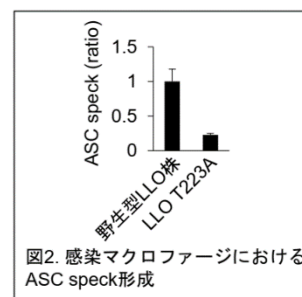


図2. 感染マクロファージにおけるASC speck形成

に置換した組換え体 (LLO T223A株) ではマクロファージに感染した際のインフラマソーム依存的なカスパーゼ1の活性化が野生型LLOを発現する株 (野生型LLO株)と比較して減弱することを見出した (図1)。また、インフラマソームが活性化する際に形成されるASC speckがLLO

T223A 株感染では減少していた (図 2)。これらの結果から、LL0 のドメイン 3 に位置する 223 番目スレオニンが ASC speck 形成よりも上流に作用することでインフラマソーム応答を亢進させていることが判明した。

### (2) リステリア病原因子によるインフラマソーム応答亢進機序の解明

インフラマソームの活性化には Syk などのチロシンキナーゼが関与することをわれわれは見出している。そこで LL0 がチロシンキナーゼの活性化に関与する可能性を検討した。その結果、野生型 LL0 株感染では Lyn および Syk が活性化していることを突き止めた。一方で、LL0 T223A 株感染では Lyn および Syk のリン酸化が減少していることが判明した (図 3)。また、リン酸化標的分子としてインフラマソーム構成因子の翻訳後修飾を調べたところ、ASC の 144 番目チロシンがリン酸化しており、同修飾が LL0 T223A 株感染では低下することを見出した (図 4)。このチロシンをフェニルアラニンに置換すると ASC speck の形成が著しく低下することから、リステリアの病原因子 LL0 は Lyn および Syk を活性化することで ASC のリン酸化を促し、インフラマソーム応答を亢進していることが明らかとなった。これらの研究成果は責任著者として *Cell Reports* 誌に投稿し受理された (引用文献)。

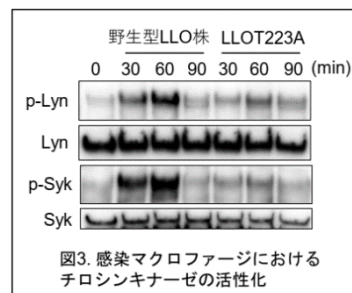


図3. 感染マクロファージにおけるチロシンキナーゼの活性化

### (3) インフラマソームが病原菌の生体内増殖を亢進する分子機序の解明

ASC などのインフラマソーム構成因子を欠損したマウスにリステリアを感染させると野生型マウスと比較して臓器内菌数が低下する。このメカニズムを解明するために、カスパーゼ 1 の基質となる IL-1 $\beta$  および IL-18 の関与を検討した。その結果、IL-1 $\beta$  欠損マウスでは野生型マウスと同程度の臓器内菌数が検出されたのに対して、IL-18 を欠損させるとインフラマソーム構成因子欠損マウスと同様に臓器内菌数の減少が観察された。さらに黄色ブドウ球菌感染でも検討を行ったところ、リステリア感染で得られた結果とは異なり、IL-1 $\beta$  欠損マウスと IL-18 欠損マウスの両方で臓器内菌数の低下が観察された (図 5: 未発表データ)。以上のことから、インフラマソームの活性化は病原菌の生体内増殖を加速させるが、どのサイトカインが関与するのかは病原体で異なることが判明した。この観点からも、サイトカインの中和や拮抗阻害は一定の効果は認められるが病原体によっては単一のサイトカインを標的としても効果が薄いことが示唆された。

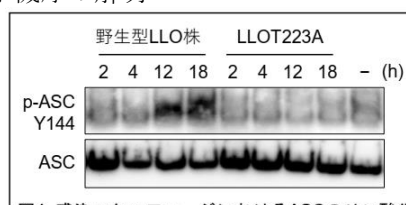


図4. 感染マクロファージにおけるASCのリン酸化

### (4) 薬剤耐性菌感染に対するインフラマソーム阻害効果の検証

薬剤感受性株であるリステリアや黄色ブドウ球菌をマウスに感染した場合、インフラマソームの活性化を阻害することで病原菌の生体内増殖が亢進されず、マウスの生存率が改善する。そこで、このインフラマソーム応答を介した病原菌の生体内増殖が薬剤耐性菌でも起こっているのか検証を行った。ストレプトマイシン耐性リステリアを NLRP6 や ASC を欠損したマウスに感染させたところ、興味深いことに、野生型マウスと比較して臓器内菌数が有意に減少した。さらに臨床分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌でも検討を行ったところ、ASC 欠損マウスでは野生型マウスと比較して臓器内菌数が減少した (図 6: 未発表データ)。これらの結果から、インフラマソーム阻害による病原菌の増殖抑制効果は薬剤感受性菌だけでなく、薬剤耐性菌の感染病態も改善できることが示された。

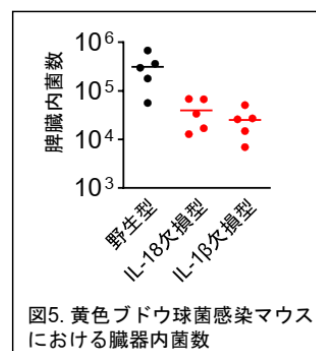


図5. 黄色ブドウ球菌感染マウスにおける臓器内菌数

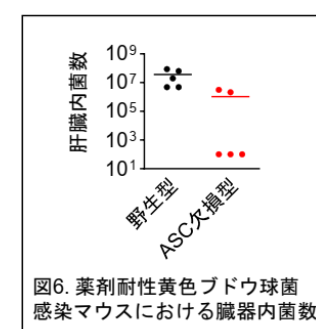


図6. 薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染マウスにおける臓器内菌数

### <引用文献>

Tanishita Y, Sekiya H, Inohara N, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Núñez G, Hara H. *Listeria Toxin Promotes Phosphorylation of the Inflammasome Adaptor ASC through Lyn and Syk to Exacerbate Pathogen Expansion.* *Cell Rep.* 38, 110414, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuchiya K, Hosojima S, Hara H, Kushiya H, Mahib M. R., Kinoshita T, Suda T	4. 巻 34
2. 論文標題 Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 downstream of inflammasomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108887	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 Tanishita Y, Sekiya H, Inohara N, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Nunez G, Hara H	4. 巻 38
2. 論文標題 Listeria Toxin Promotes Phosphorylation of the Inflammasome Adaptor ASC through Lyn and Syk to Exacerbate Pathogen Expansion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110414	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

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hideki Hara, Gabriel Nunez, Akihiko Yoshimura
2. 発表標題 Analysis of the mechanism by which Gram-positive bacteria activates NLRP6 inflammasome
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hara H, Nunez G, Yoshimura A
2. 発表標題 Recognition of Gram-positive bacteria infection in macrophages through NLRP6 inflammasome
3. 学会等名 The 27th international symposium on molecular cell biology of macrophages（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hara H, Tanishita Y, Sekiya H, Nunez G, Yoshimura A
2. 発表標題 Molecular mechanism of inflammasome activation induced by Gram-positive bacteria infection
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hara H, Nunez G, Yoshimura A
2. 発表標題 Lyn kinase signaling promotes inflammasome activation in macrophages infected with <i>Listeria monocytogenes</i>
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hara H, Tanishita Y, Sekiya H, Nunez G, Yoshimura A
2. 発表標題 LLO promotes phosphorylation of the inflammasome adaptor ASC through Lyn to exacerbate infection
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara H, Yoshimura A, Nunez G
2. 発表標題 Activation of inflammasomes exacerbates Gram-positive bacteria infection through IL-18 production
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 英樹、吉村 昭彦、Nunez Gabriel
2. 発表標題 インフラマソーム応答を介した感染重症化機構
3. 学会等名 第34回微生物シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara H
2. 発表標題 Inflammasome-mediated exacerbation of infectious diseases and its application
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara H
2. 発表標題 Advances in research of innate immune sensors and diseases
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 原 英樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 120
3. 書名 尿酸結晶とインフラマソーム	

1. 著者名 原 英樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 110
3. 書名 新型コロナウイルスの感染とインフラマソーム	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	ニュネッツ ガブリエル  (Nunez Gabriel)		
研究協力者	坂本 啓  (Sakamoto Kei)		

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			
米国	ミシガン大学			