

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591108

研究課題名（和文）レジオネラ感染に対するヒトの自然抵抗性を支配する遺伝子 NAIP1 に関する研究

研究課題名（英文） Relationship of human apoptosis inhibitor NAIP1 between natural resistance against *Legionella* infection

研究代表者

宮本 比呂志 (MIYAMOTO HIROSHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40229894

研究成果の概要（和文）： C57BL/6 などほとんどの系統のマウスのマクロファージではレジオネラの細胞内増殖が抑制されるが、これには細胞死（pyroptosis）が深く関わっている。Pyroptosis にはカスパーゼ-1 の活性化が必須であるが、この過程に *Naip5* 遺伝子産物が関与していることが知られている。RAW264 細胞では、レジオネラ感染時の、菌の細胞内増殖の抑制、カスパーゼ-1 の活性化、および細胞死がほとんど観察されなかったが、C57BL/6 *Naip5* の強制発現のみならず、*Naip5* のヒトホモログである *NAIP* を強制発現によってもこれらが回復した。さらに、*Naip5* の機能欠損が原因でレジオネラ感染感受性の *A/J* 系統で、ヒト *NAIP* をマクロファージ特異的に発現させると、レジオネラ感染に耐性になる傾向を示した。*Naip5* の機能欠損をヒト *NAIP* が回復させたことから、マウス同様ヒトにおいても pyroptosis によるレジオネラの感染防御機構が存在し、そこに *NAIP* が関与している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）： Macrophages from C57BL/6 mice restrict growth of *Legionella pneumophila*. Restriction of bacterial growth is dependent on cell death which requires caspase-1 and *Naip5*. On the other hand, *A/J* mouse strain carries a defective *Naip5* allele, whose macrophages result in permissiveness to *L. pneumophila* replication. We found murine RAW264 macrophage cells exceptionally supported bacterial growth and failed to induce caspase-1-mediated cell death. C57BL/6 *Naip5* restored susceptibility to *L. pneumophila* and impaired induction of cell death, indicating RAW264 harbors a defect in endogenous *Naip5* function. Human *NAIP*, structural homolog of *Naip5*, also restored *Naip5*-deficiency in RAW264 cells. *A/J* mice expressing human *NAIP* in macrophages exhibited improved bacterial clearance and decreased mortality when challenged with *L. pneumophila* at lung. These results suggest that human *NAIP* is a functional homolog of murine *Naip5* and contributes host's defense against *L. pneumophila* by inducing caspase-1-dependent cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学、自然免疫、レジオネラ

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ属菌はグラム陰性桿菌で、ヒトの肺炎（レジオネラ肺炎，在郷軍人病）やインフルエンザ様の熱性疾患（ポンティアック熱）の原因菌である。本菌の最も重要な病原因子は、食細胞の殺菌に抵抗し、増殖する細胞内寄生性で、マウスでは、*Naip5* 遺伝子の機能の有無によって「レジオネラ感染に抵抗性か、感受性か（食細胞内で殺菌されるか、されないで増殖するか）」が決定されることがわかっている。ヒト *NAIP* は *Naip5* に類似した唯一の遺伝子で、ヒトのレジオネラ感染に関連していることが示唆され、レジオネラ感染への感受性の差を決める因子の一つであると予想されるが、その機能はよくわかっていない。

2. 研究の目的

ヒトの肺炎（レジオネラ肺炎，在郷軍人病）やインフルエンザ様の熱性疾患（ポンティアック熱）の原因菌であるレジオネラ属菌の病原性は、食細胞での増殖性と密接に関連している。マウスにおいては、マクロファージ細胞内でのレジオネラ増殖の制御に、*Naip5* 遺伝子産物が関与していることが明らかにされている。*Naip5* の構造的なホモログとしてヒトには *NAIP* が存在するが、レジオネラ感染時における生体内でのヒト *NAIP* の役割に

ついては、現在のところまったく明らかになっていない。ヒト *NAIP* の、レジオネラ感染における生体内での役割を解明することは、レジオネラ症の予防・治療の面からも重要であると考えられる。そこで本研究では、ヒトのレジオネラ感染抵抗性遺伝子であると想定される *NAIP* が、実際に生体内でのレジオネラの感染防御にどのように関与しているのか、について明らかにする。

3. 研究の方法

(細胞)

ヒト *NAIP* または C57BL/6 *Naip5* の cDNA を、GFP との融合遺伝子となるように連結し、サイトメガロウイルスプロモーターで発現するようなベクターを構築した。これを RAW264 細胞に導入し、導入した遺伝子を安定に高レベルで発現するクローンを選抜して安定発現株として使用した。細胞は RPMI1640 培地に増殖補助成分を適宜添加して培養した。

(マウス)

マクロファージ特異的なヒト SR-A エンハンサー/プロモーターの下流にヒト *NAIP* cDNA を連結したベクターを構築し、日本エスエルシーに委託してヒト *NAIP* を発現するトランスジェニック A/J マウスを作出した。

(*in vitro* 感染実験)

24 ウェルプレートに播種した 10^6 の細胞に対して、 $800 \times g$ で 10 分間遠心することにより *Legionella pneumophila* フィラデルフィア 1 株を感染させた。細胞を溶解し、適宜希釈したのち BCYEa プレートにまき、出現したコロニーを計測することにより、培養ウェル中に含まれる全菌数を測定した。細胞死の判定には、培養上清中に放出される乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) を用いて測定した。カスパーゼ 1 の活性化は、培養上清を SDS-PAGE で分離後、抗カスパーゼ-1 抗体を用いたウェスタンブロットリングをおこない、p10 のバンドの出現で判定した。

(*in vivo* 感染実験)

ケタミンおよびキシラジン麻酔下、 $40 \mu l$ の PBS に懸濁したレジオネラを鼻腔内に接種した。肺内の菌数の算定には、肺のホモジナイズを適宜希釈して BCYEa プレートにまき、出現したコロニーを計測した。致死量の菌を接種したマウスの経過観察においては、マウスが浅速呼吸、呼吸困難に陥った場合に人道的エンドポイントとして安楽死させた。すべての動物実験は佐賀大学動物実験委員会の承認を得た上でおこなった。

4. 研究成果

(1) マウス RAW264 細胞における、内在性 *Naip5* の機能不全。

RAW264 細胞ではレジオネラの細胞内増殖が抑制されないが (Fig. 1a), レジオネラ感染時の、カスパーゼ-1 の活性化および細胞死がほとんど観察されなかった (Fig. 1b)。C57BL/6 の *Naip5* を過剰に発現する RAW264 のクローンでは、レジオネラの細胞内増殖が顕著に抑制されるが (Fig. 1a), このときカスパーゼ-1 の活性化と細胞死が起きていた (Fig. 1b)。RAW264 内在性

の *Naip5* cDNA を単離し、塩基配列を確認したところ、突然変異等は観察されなかった (data not shown)。RAW264 では内在性 *Naip5* 遺伝子の発現量が低レベルであることと併せて、RAW264 細胞では、内在性 *Naip5* の発現不全により、レジオネラ感染細胞の pyroptosis が誘導されないためにレジオネラの細胞内増殖が抑制されないと考えられた。

(2) ヒト NAIP による、レジオネラの細胞内増殖の抑制。

RAW264 でヒト *NAIP* を発現させた場合でも、レジオネラの細胞内増殖が顕著に抑制されるが (Fig. 1a), このときもカスパーゼ-1 の活性化と細胞死を伴っていた (Fig. 1b)。これらのことから、ヒト *NAIP* もマウス *Naip5* と同様にレジオネラ感染細胞の pyroptosis の誘導に関与し、レジオネラの細胞内増殖を抑制する機能を有していることが示唆された。

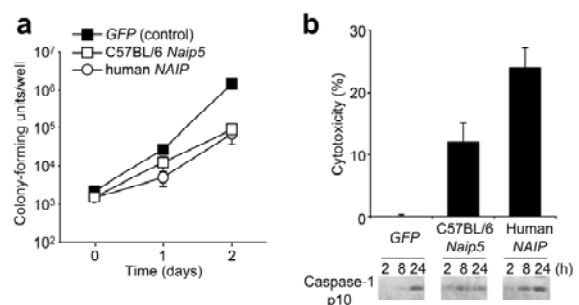


Fig. 1. ヒト *NAIP* は *L. pneumophila* 感染細胞に pyroptosis を誘導する. (a) *GFP*, C57BL/6 由来 *Naip5*, ヒト *NAIP* をそれぞれ発現する RAW264 における *L. pneumophila* の増殖. (b) *L. pneumophila* 感染後の細胞死, およびカスパーゼ-1 の活性化を示す p10 のウェスタンブロット.

(3) ヒト *NAIP* の、個体レベルでのレジオネラの感染防御への寄与。

非致死量のレジオネラを経鼻感染させたところ、ヒト *NAIP* を発現する *A/J* マウスでは、野生型 *A/J* マウスに比べて、感染 2

日後に肺内に残存する菌が少ない傾向がみられた (Fig. 2a). また, 致死量のレジオネラを経鼻感染させたとき, ヒト *NAIP* を発現する A/J マウスでは, 生存日数の延長傾向と生存率の上昇傾向が観察された (Fig. 2b). 以上の結果から, ヒト *NAIP* はレジオネラ感染細胞の pyroptosis の誘導に関与することを通じて, ヒトのレジオネラの感染防御に寄与していることが示唆された.

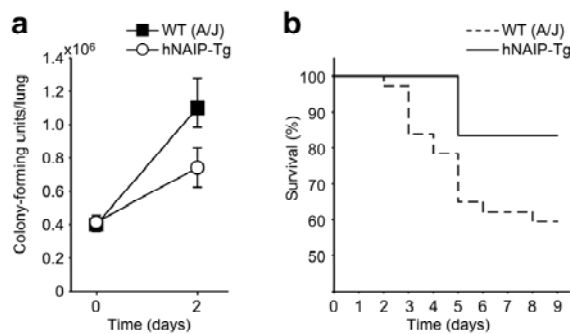


Fig. 2. ヒト *NAIP* は *L. pneumophila* の感染防御に寄与する. (a) 野生型 A/J マウス (WT) またはヒト *NAIP* を発現する A/J マウス (hNAIP-Tg) に非致死量 (10^6) の *L. pneumophila* を鼻腔より肺感染させたときの, 肺内の菌数. (b) 致死量 (10^8) の *L. pneumophila* を鼻腔より肺感染させたときの経過を示す Kaplan-Meier 曲線.

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)

1. Nanako Katagiri, Takeo Shobuike, Bin Chang, Akiko Kukita, Hiroshi Miyamoto
The human apoptosis inhibitor *NAIP* induces pyroptosis in macrophages infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* 14(13) 1123-1132, 2012, 査読有
2. Katunori Furuhashi, Akiko Edagawa, Hiroshi Miyamoto, Yo Morimoto, Masafumi Fukuyama
Identification of *Legionella rubrilucens*

isolated from a hot spring for foot-soaking in Niigata, Japan

Biocontrol Science VOL.17, NO.2, 101-105, 2012, 査読有

3. Chan Geun Park, Byoung Jun Kim, Hee-Youn Kim, Yeo-Jun Yun, Kwan Soo Ko, Hiroshi Miyamoto, Bum-Joon Kim, Yoon-Hoh Kook
Analysis of Population Structure among Korean and Japanese *Legionella pneumophila* Isolates Using hsp60 Sequences. *Microbiol Immunol* VOL.56, 572-578, 2012, 査読有

4. Furuhashi K., Edagawa A., Miyamoto H., Goto K., Yoshida S.,
The first case of *Legionella nagasakiensis* isolation from hot spring water ; *Biocontrol. Sci.* VOL.16, NO.4, 171-176, 2011, 査読有

5. Furuhashi K, Ogihara K, Ishizaki N, Oonaka K, Yoshida Y, Goto K, Hara M, Miyamoto H., Yoshida S-I, Fukuyama M.
Identification of *Legionella londiniensis* isolated from hot spring water samples in Shizuoka, Japan, and cytotoxicity of isolates. *J Infect Chemother* VOL.16, NO.5, 367-371, 2010, 査読有

6. Komura T, Yasui C, Miyamoto H., Nishikawa Y.
Caenorhabditis elegans as an alternative model host for *Legionella pneumophila* and protective effects of *Bifidobacterium infantis*. *Appl Environ Microbiol* VOL.76, NO.12, 4105-4108, 2010, 査読有

7. 菫蒲池健夫、宮本比呂志
レジオネラー IV 型分泌機構—急性肺傷害 呼吸器内科 19(1), 22-29、2011、査読無

[学会発表] (計 3 件)

1. 古畑勝則, 枝川亜希子, 宮本比呂志, 福

山正文 新種 *Legionella thermalis* 日本防
菌防黴学会第 39 回年次大会 日本防菌防黴
学会第 38 回年次大会 p.193 2012.9.11~12
きゅりあん (品川区立総合区民会館)

2. Katagiri N, Shobuike T, Miyamoto H Human
NAIP restreicts *Legionella pneumophila*
replication accompanied by host cell death
13th International Union of
Microbiological Sciences Congress, IUMS
2011 Sapporo, p183 2011.9.6~10

3. 枝川亜希子, 木村明生, 古畑勝則, 田中
榮次, 足立伸一, 宮本比呂志 EMA-LAMP 法
を用いた生菌レジオネラ検出方法の検討
日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 日本防
菌防黴学会第 38 回年次大会 p.207
2011.8.30~31 千里ライフサイエンスセン
ター (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 比呂志 (MIYAMOTO HIROSHI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 40229894

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号:

(3) 連携研究者

菖蒲池 健夫 (SHOBUIKE TAKEO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号: 70336113