

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24年 6月 4日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790407

研究課題名（和文） マクロファージの殺菌メカニズムにおけるアポトーシスの意義とその分子機構

研究課題名（英文） Studies on apoptotic signaling in macrophages following mycobacterial infection

研究代表者

多田納 豊（TATANO YUTAKA）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70432614

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Mycobacterium smegmatis* を供試して、抗酸菌感染マクロファージ（M \cdot ）のアポトーシスに連動した抗菌活性増強作用について、特にどのようなシグナルによって誘導されたアポトーシスがM Φ 殺菌能の亢進を引き起こすのかについての検討を行った。その結果、(1) ATP または 1-(3,4-Dichlorobenzyl)-1H-indole-2,3-dione（Apoptosis activator II：AAII）により誘導される宿主 M \cdot のアポトーシスの進行と細胞内 *M. smegmatis* に対する殺菌効果の増強作用との連動性が観察され、(2) AAII により誘導されるアポトーシスに連動した殺菌増強作用には、caspase-3 の活性化以降の段階のシグナルが部分的に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the correlation between apoptotic signaling pathways and macrophage activities against *Mycobacterium smegmatis* (SM) infection. Treatment with 5 mM ATP or 50 μ M 1-(3,4-Dichlorobenzyl)-1H-indole-2,3-dione: Apoptosis activator II (AAII) induced the apoptosis of macrophages and decreased intramacrophage survival of SM. AAII-induced but not ATP-induced apoptosis recovers in macrophages treated with caspase 3 inhibitor. These results suggest that apoptosis induced by AAII may be concomitant with the up-regulation of macrophage anti-mycobacterial activities, and this affects a signal transduction involved in caspase 3-mediated apoptosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
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：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：マクロファージ、アポトーシス、細菌、シグナル伝達、殺菌エフェクター

1. 研究開始当初の背景

結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) などの抗酸菌や *Coxiella* などでは、感染 M \cdot の TNF- α 、ATP、ピコリン酸などのシ

グナルにより誘導されるアポトーシスに連動して、細胞内局在菌の殺菌が起こることが知られている（富岡：[総説] 臨床免疫，2003）。しかしながら、アポトーシスがM Φ 内殺菌にどのように関係しているのかについては、未

だコンセンサスは得られておらず、アポトーシスに連動して M・内殺菌能の亢進が起こるような系では、実際にどのようなメカニズムが働いているのかについても全く未解明のままである。

当研究室でのこれまでの検討により、purinoceptor を介した ATP シグナルによって誘起される M・アポトーシスは、確かに M・殺菌能の亢進に連動しているが、この場合の M・殺菌能には細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂; cPLA₂) の活性化とファゴソームへの移行が重要であることが明らかになっている (富岡: J Immunol, 2005)。同様に別のグループの研究でも、TNF- α シグナルにより誘導される M・アポトーシスに連動した M・殺菌能には、cPLA₂ の関与が認められており、当教室でこれまでに明らかにして来ている新しいタイプの M・内殺菌メカニズム、すなわち、「cPLA₂ の酵素活性により産生されるアラキドン酸に依存した殺菌機構」が MΦ アポトーシスに連動して、動員されている可能性が強いものと考えられる (富岡: [総説] 臨床免疫, 2003a, 2003b)。他方、ATP シグナルで誘導される M・アポトーシスに連動した M・殺菌能の亢進については、M・殺菌能の主要なメディエーターである活性酸素分子種 (ROI) や活性酸化窒素分子種 (RNI) などのラジカルが関与している可能性は低いとされており、M・アポトーシスに連動した M・殺菌能にはかなり特殊なタイプの殺菌メカニズムが関係しているらしい。

このことに関連して近年、研究代表者らが行った検討では、ピコリン酸による M・の細胞内 MAC 菌に対する抗菌活性の増強作用 (富岡: J Antimicrob Chemother, 2006) の場合にも、ROI や RNI などのラジカルさらには遊離脂肪酸や β -ディフェンシンなどが関与している可能性は低いといった成績が得られている (富岡, 多田納ら: Int J Antimicrob Agents, 2007)。さらに興味深いことに、ピコリン酸処理により、MAC 感染 M・には、早期アポトーシスに特徴的な細胞表面へのホスファチジルセリンの移行が誘導されるが、M・染色体 DNA の分解・ヌクレオソームへの断片化という中・後期アポトーシスのプロセスまでは惹起されないことが明らかになってきた (多田納ら: 日本化学療法学会雑誌, 2007)。このような成績を加味して考えた場合、種々のシグナルを受けた M・での抗酸菌殺菌活性の増強という現象は、M・アポトーシスは部分的な関与にとどまるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、様々なシグナルにより M・に

アポトーシスを誘導した場合に、M・の殺菌能への影響について、(1) どのようなシグナルによって誘導されたアポトーシスが、M・殺菌能の亢進を引き起こすのか? (2) アポトーシスに連動した M・殺菌能の亢進には、どのようなタイプの殺菌機構が関わっているのか? (3) M・のアポトーシス誘導にかかわる細胞内シグナル伝達系と M・殺菌能の亢進に係るシグナル伝達系とは、どのような形でクロストークしているのか? とした課題を中心に系統的な検討を行う。

3. 研究の方法

1. 供試菌株および供試細胞

供試菌は、*Mycobacterium smegmatis* SM14 株を用いた。供試細胞は、Zymosan A にて誘導した BALB/c マウス由来腹腔マクロファージ (PEC), J774.1 細胞株 (J774.1 M・), または RAW264.7 細胞株 (RAW264.7 M・) を用いた。

2. アポトーシス誘導剤

M・に対するアポトーシス誘導剤としては etoposide, ATP, TNF- \cdot , Fas ligand, \cdot -(Trichloromethyl)-4-pyridineethanol (PETCM), Forskolin, Staurosporine, および 1-(3,4-Dichlorobenzyl)-1H-indole-2,3-dione (Apoptosis Activator II: AA II) を用いた。

3. DNA ladder 法による細胞のアポトーシスの評価

PEC (1×10^6 細胞/ウェル) を ATP 添加あるいは非添加の条件下で 24 時間に亘って培養し、常法により DNA を抽出し、これをアガロース電気泳動にかけ、MΦ 細胞のアポトーシスに起因する DNA 断片化の有無とその程度を観察した。

4. MTT 法による細胞死の評価

caspase-3 inhibitor 処理、あるいは非処理のマクロファージ細胞 (2×10^4 細胞/ウェル) をアポトーシス誘導剤添加あるいは非添加の条件下で 24 時間に亘って培養した。一定時間培養後、MTT 試薬を添加し、37°C, 3 時間追加培養し、培養上清を除去した後、DMSO を添加して 550nm の吸光度を測定した。

5. MΦ 細胞内 *M. smegmatis* の生残菌数の測定

上記マクロファージ細胞 (2×10^4 細胞/ウェル) に MOI=10 で供試菌株を 2 時間感染させた。2% FBS 加 HBSS で洗浄して非感染菌を除き、10% FBS 加 RPMI 培地中、2 \cdot g/ml Amikacin 存在下、各種アポトーシス誘導剤添加あるいは非添加条件下で 37°C, 一定時間培養した。所定時間に 0.23% SDS で細胞を溶解し、BSA を加えて SDS を中和させ、次いで

蒸留水での 2 回の遠心・洗浄を行った後に、7H11 寒天平板上でコロニーのカウントを行い、細胞内菌数を計測した。

4. 研究成果

1. Etoposide による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用との連動性

Etoposide による J774.1 MΦ に対するアポトーシス誘導の経時的変化を明らかにするため、J774.1 MΦ を etoposide 存在下で 48 時間にわたり培養し、MTT アッセイにより MΦ 細胞の生存率を求めた。その結果、etoposide 500 μM 存在下では、18 時間の培養で、J774.1 MΦ の生存率がおよそ 50% 程度まで減少することが分かった (図 1A)。そこで次に、*M. smegmatis* 感染 MΦ を etoposide で 18 時間処理した際の宿主 MΦ 内の *M. smegmatis* の生残菌数を求めた。その結果、etoposide により宿主 MΦ 細胞のアポトーシスに連動した形で *M. smegmatis* 殺菌作用が認められた (図 1B)。

しかしながら、etoposide は細胞内への透過性が高く、細胞内寄生菌に対して直接毒性を有するものと考えられた。また、topoisomerase II に加え DNA gyrase に対する阻害作用も有するため、CFU を指標とした殺菌活性測定に影響を及ぼしていると考えられた。そこで、etoposide の *M. smegmatis* に対する *in vitro* での殺菌作用について検

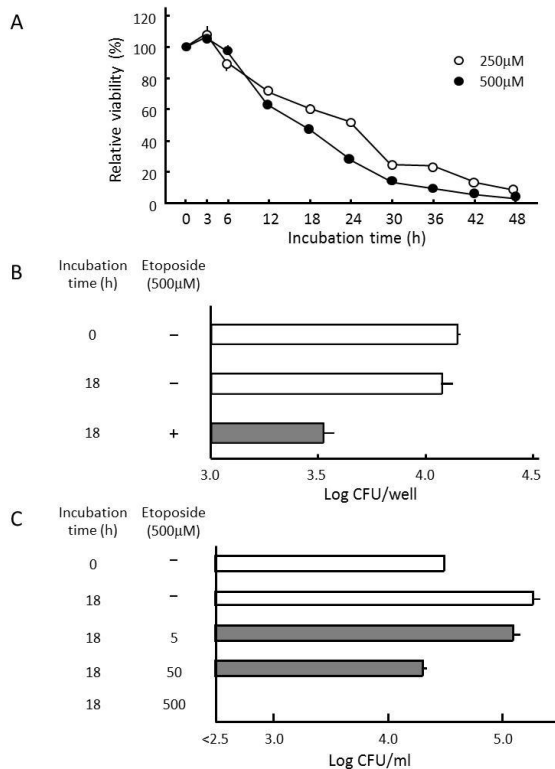


図 1

討を行ったところ、etoposide は *M. smegmatis* そのものに対して直接的な殺菌作用を示した (図 1C)。したがって、この成績が MΦ のアポトーシスに連動した殺菌能というよりも、etoposide の毒性を強く反映している可能性が考えられた。

2. ATP による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用との連動性

PEC は ATP 刺激下で一定時間培養すると、時間経過とともにアポトーシスが誘導される (図 2A)。これまでに行った MAC 菌を供試した実験では、ATP による宿主 MΦ のアポトーシスの誘導と MΦ 内感染 MAC 菌に対する殺菌能の増強作用との連動性を検証することが非常に困難であったが、今回、*M. smegmatis* を供試した場合には、ATP による宿主 MΦ のアポトーシスの進行に連動して MΦ の殺菌能が増強する現象が観察された (図 2B)。

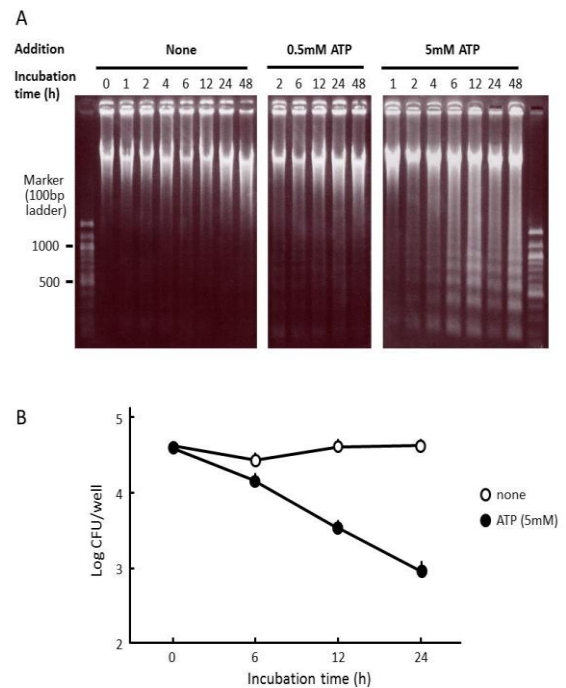


図 2

3. ATP による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用との連動性における caspase-3 シグナルの関与

ATP は、P2X7 受容体からのシグナル伝達を介して、p38 の活性化を経て、caspase-3 を活性化し、アポトーシスが誘導されることが報告されている。そこで、上記の検討で示された ATP による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシスと連動した殺菌能増強作用において、caspase-3 シグナルの関与について明らかにするため、caspase-3 阻害剤、

Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK, を処理した際の ATP の *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導および殺菌能について検討を行った。その結果, 図 3A で示す通り, caspase-3 阻害剤で処理した場合においても, ATP による PEC の細胞死の誘導を解除出来なかった。さらに, その際の M・内の感染 *M. smegmatis* の生残菌数について測定を行ったが, ATP による細胞死の誘導に伴う殺菌能増強作用は caspase-3 阻害剤添加による変化は見られなかった (図 3B)。

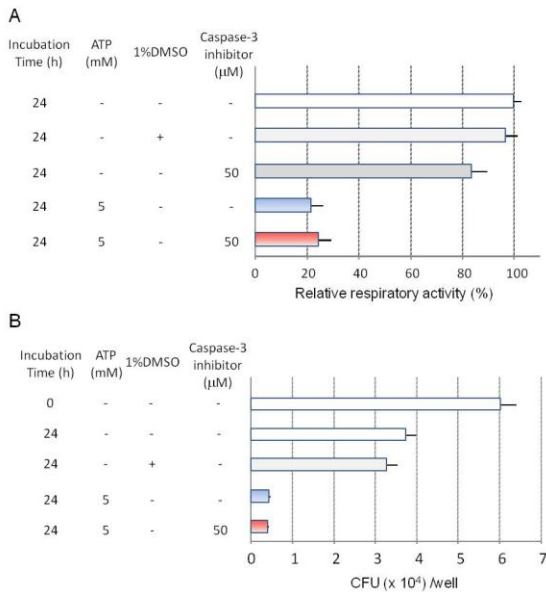


図 3

4. ATP による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用との連動性における caspase-1 シグナルの関与

ATP は, caspase-1 を活性化し, ピロトーシスと言われる細胞死を誘導することも報告されている。また, 上述の如く, PEC における ATP による細胞死の誘導においては, caspase-3 (アポトーシス) 非依存的なメカニズムを介している可能性が示唆された (図 3A)。そこで次に, ATP による PEC の細胞死の誘導がピロトーシスによるものであるかどうか明らかにするため, caspase-1 阻害剤, Ac-YVAD-AOM, を処理した際の ATP の PEC の細胞死誘導能について検討した。その結果, caspase-1 阻害剤で処理した場合においても, ATP による PEC の細胞死の誘導を抑制することは出来なかった (図 4A)。また, その際の M・内の感染 *M. smegmatis* に対する殺菌能増強作用について検討も行ったが, PEC の殺菌能は, caspase-1 阻害剤の添加によっても解除されなかった。(図 4B)。

以上の結果から, ATP による PEC の細胞死誘導には, caspase-3 および caspase-1 非依存

的な細胞死シグナルが関与している可能性が示唆された。

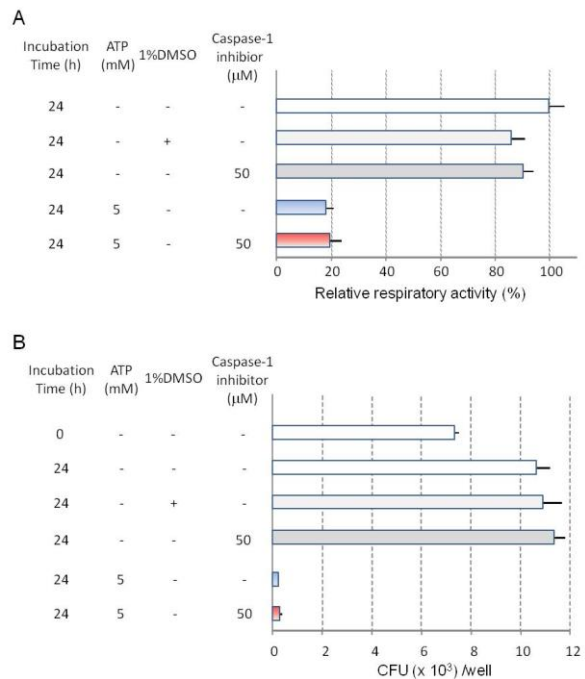


図 4

5. Apoptosis Activator II (AA II) による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用との連動性

RAW264.7 MΦ は AA II 存在下で一定時間培養すると, 時間経過とともにアポトーシスが誘導されるが (図 5A), *M. smegmatis* を感染させた MΦ では, AA II による宿主 MΦ のアポトーシスの進行に連動して MΦ 内殺菌能が増強する現象が観察された (図 5B)。

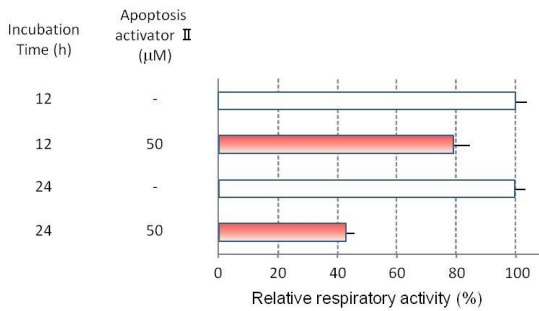
6. Apoptosis Activator II (AA II) による *M. smegmatis* 感染 MΦ のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用に対する caspase-3 阻害剤の阻害効果

AA II による *M. smegmatis* 感染 RAW264.7 M・のアポトーシスに連動した殺菌能増強作用において, caspase-3 シグナルがどのように関わっているのか明らかにするため, caspase-3 阻害剤, Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK を処理した際の AA II の *M. smegmatis* 感染 M・のアポトーシス誘導および殺菌能について検討を行った。その結果, 図 6A で示す通り, caspase-3 阻害剤で処理した場合において, AA II による RAW264.7 M・の細胞死の誘導が部分的に解除された。さらに, その際の M・内の感染 *M. smegmatis* の生残菌数について測定を行った結果, AA II で誘導された RAW264.7 M・のアポトーシスに連動した抗

M. smegmatis 殺菌能増強作用が部分的に解除された (図 6B)。

以上の結果から、AA II によるマクロファージのアポトーシス誘導は、これに連動して殺菌能の増強メカニズムが働くことが明らかとなった。さらに、その殺菌能の増強作用は、caspase-3 の活性化の下流のシグナルが部分的に関与している可能性が示唆された。

A



B

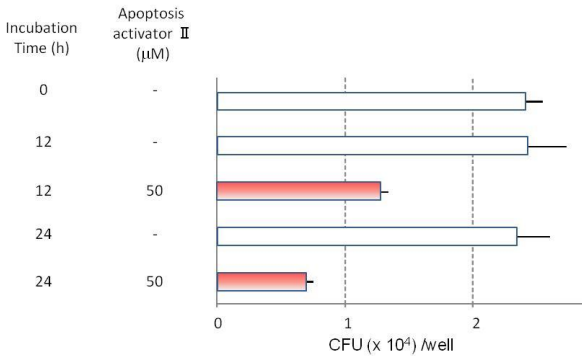
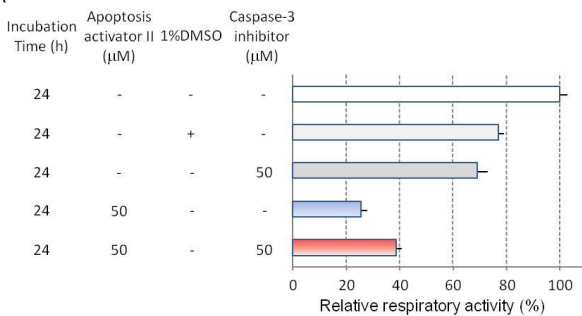


図 5

A



B

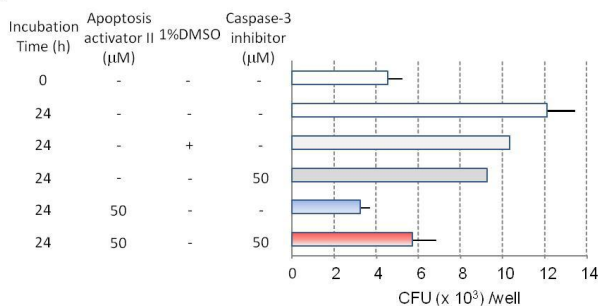


図 6

7. 他のアポトーシス誘導剤による *M. smegmatis* 感染 M・のアポトーシス誘導と殺菌能増強作用との連動性についての検討

TNF- α , Fas ligand, Staurosporine, さらに caspase-3 活性の増強を惹起してアポトーシスを誘導することが知られている PETCM, 細胞内 cAMP の増加を介してアポトーシスを誘導することが知られている Forskolin を用いて M・のアポトーシス誘導を試みたが、いずれもアポトーシスおよびそれに連動する M・殺菌能増強作用は惹起されなかった (成績省略)。

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 8 件)

1) Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T: [Review] Characteristics of Suppressor Macrophages Induced by Mycobacterial and Protozoal Infections in Relation to Alternatively Activated M2 Macrophages. Clin Dev Immunol 2012, ID 635451, 19 pages (online journal) doi:10.1155/2012/635451

2) Tatano Y, Sano C, Yasumoto K, Shimizu T, Sato K, Nishimori K, Matsumoto T, Yano S, Takeyama H, Tomioka H: Correlation between variable-number tandem-repeat-based genotypes and drug susceptibility in *Mycobacterium avium* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31: 445-454, 2012 査読有, DOI 10.1007/s10096-011-1326-7

3) Tomioka H, Tatano Y, Sano C, Shimizu T: [Review] Development of new antituberculous drugs based on bacterial virulence factors interfering with host cytokine networks. J Infect Chemother, 3: 302-317, 2011, DOI: 10.1007/s10156-010-0177-y

4) Tatano Y, Yasumoto K, Shimizu T, Sano C, Sato K, Yano S, Takeyama H, Tomioka H: Comparative study for the virulence of *Mycobacterium avium* isolates from patients with nodular-bronchiectasis- and cavitarytype diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29:801-806, 2010 査読有, DOI 10.1007/s10096-010-0930-2

〔学会発表〕(計 38 件)

1) Yutaka Tatano, Chiaki Sano, Toshiaki Shimizu, Haruaki Tomioka: Association between variable-number tandem-repeat-based genotypes and drug susceptibility in *Mycobacterium avium* isolates. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), 2011 年 9 月 10 日, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan. (会期: 9/6-10, Fusao Tomita and Daniel O Sordelli)

2) Yutaka Tatano, Chiaki Sano, Toshiaki Shimizu, Haruaki Tomioka: Correlation between variable-number tandem-repeat-based genotypes and drug susceptibility in *Mycobacterium avium* isolates. The 8th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance (ISAAR 2011), 2011 年 4 月 7 日, COEX, Seoul, Korea. (会期: 4/6-8, Jae-Hoon Song and Walter Wilson)

3) Yutaka Tatano, Chiaki Sano, Toshiaki Shimizu, and Haruaki Tomioka: Properties of immunosuppressive macrophages generated by *Mycobacterium avium* complex infection induced in bcgs and bcgr genotype mice. Society for general microbiology (SGM) Autumn Conference - University of Nottingham, 6-9 September 2010, 2010 年 9 月 6-7 日, Nottingham, UK. (会期: 9/6-9)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田納 豊 (TATANO YUTAKA)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 70432614

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: