

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460523

研究課題名(和文) インフラマソーム構成タンパクを介した新たな感染防御機構の発見およびその機序の解明

研究課題名(英文) Caspase-1-independent roles for inflammasome-forming proteins in bacterial infections

研究代表者

土屋 晃介 (Tsuchiya, Kohsuke)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：50437216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、病原性細菌と宿主間の相互作用による病態形成機序の解明を目的とし、リステリア感染および肺炎球菌感染における自然機構インフラマソームの役割を検討した。インフラマソームを構成するASCが致死性リステリア感染モデルにおいてIL-18依存的に感染を増悪化させることを発見し、その機序を明らかにした。また、肺炎球菌肺炎において、ASCがインフラマソーム非依存的にSTAT6活性化を持続させることで粘膜防御因子の発現低下を抑制し、宿主防御に寄与することを見出した。さらに、肺炎球菌がpneumolysinを産生することで肺炎増悪化因子IL-1 の産生をインフラマソーム非依存的に誘導することを報告した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the roles for inflammasomes in infection with *L. monocytogenes* and *S. pneumoniae*, for the purpose of understanding pathological mechanism mediated by host-pathogen interactions. We found that the inflammasome adaptor ASC exacerbates lethal listeriosis by mediating IL-18 production, which leads to NK cell-dependent production of the immunosuppressive cytokine IL-10. It was also found that during pneumococcal pneumoniae, ASC sustains STAT6 activation in airway epithelial cells in an inflammasome-independent manner, thereby inhibiting the down-regulation of mucosal defense genes contributing to host defense against the pathogen. In addition, we reported that pneumolysin, a virulence factor of *S. pneumoniae*, plays a critical role in the production of IL-1, which has been demonstrated as a mediator of lung inflammation, in response to this bacterium. The IL-1 production was dependent on calcium ions influx and calpain, but not the inflammasome.

研究分野：免疫学・細菌学

キーワード：肺炎球菌 リステリア インフラマソーム NLRP3 ASC STAT6 IL-18 IL-10

1. 研究開始当初の背景

インフラマソームは一種の自然免疫様であり、特定の細胞質内パターン認識受容体、カスパーゼ-1、アダプター分子 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain) から構成されるタンパク複合体である。インフラマソームは病原微生物を含む多様な炎症誘導刺激に応じて形成され、カスパーゼ-1 活性化の場として働く。活性化型カスパーゼ-1 はシステインプロテアーゼ活性を有しており、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -1 β および IL-18 をタンパク分解性に成熟化させる。また、ネクローシス様プログラム細胞死であるピロトーシスを誘導することでこれらのサイトカインや damage-associated molecular patterns を放出させる。このように、インフラマソームはカスパーゼ-1 の活性化および下流のエフェクター機序 (IL-1 β 、IL-18、ピロトーシス) を介して病原微生物などに対する炎症応答を担う。インフラマソームを構成するパターン認識受容体として NLRP3 や AIM2 が知られている。これらの受容体はそれぞれ細胞内 K⁺ イオン濃度の低下および二重鎖 DNA を認識してインフラマソームを形成する。また、NLRP3 と AIM2 はアダプター分子である ASC を介してカスパーゼ-1 と介合し、ASC はこれらの受容体がインフラマソームを形成するのに必須の役割を果たす。

インフラマソームは病原微生物に対する宿主防御や腸管の恒常性維持などに関与することが報告されている。肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) はグラム陽性の双球菌であり、肺炎や中耳炎といった局所感染から髄膜炎、敗血症などの全身性感染を引き起こす。肺炎球菌感染症は幼児や高齢者の死亡原因として世界的な問題であり、我が国でも高齢者市中肺炎の半数が肺炎球菌によるものといわれている。近年では薬剤耐性肺炎球菌の増加が問題となっており、分離株の 50% 近くがペニシリン耐性を示すといわれる。肺炎球菌による病態形成の機序を明らかにすることは、新規治療法の開発のためにも重要である。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、肺炎球菌が自身の膜傷害毒素 pneumolysin (PLY) に依存して宿主マクロファージのカスパーゼ-1 活性化を誘導することを報告している (*Infect. Immun.* 2008. 76:1547-1557)。また、このカスパーゼ-1 活性化応答には AIM2 インフラマソームと NLRP3 インフラマソームが関わり、アダプター分子 ASC が必須であることも報告した (*J. Immunol.* 2011. 187:4890-4899)。さらに、ASC または NLRP3 を欠損するマウスが野生型マウスと比べて肺炎球菌の肺感染 (経鼻感染) に対して高い感受性を示すことから、インフラマソームが本菌に対する宿主防御に

重要な役割を果たす可能性を示してきた (上記文献)。他のグループからは IL-1 β および IL-18 が肺炎球菌感染で防御的に働くことが報告されていたため、NLRP3 と ASC はカスパーゼ-1 依存的に感染抵抗性に寄与すると考えられた。しかし、予想に反してカスパーゼ-1 欠損マウスは野生型マウスと同程度の抵抗性を示した。また、前述の通り NLRP3 欠損マウスでは肺炎球菌に対する感受性が亢進していたが、肺炎球菌感染肺における IL-1 β および IL-18 の産生応答は NLRP3 に非依存的であったことから、NLRP3 の感染抵抗性への寄与は本質的にはカスパーゼ-1 活性化および下流のサイトカイン成熟化を介したのではない可能性が示唆された。つまり、これらのインフラマソーム構成因子 (NLRP3 および ASC) はカスパーゼ-1 活性化以外の未知経路を介して宿主防御を担う可能性が考えられたが、その機序は不明であるため解明を試みた。

3. 研究の方法

研究方法の概要

肺炎球菌感染への感染抵抗性の評価や各種サイトカイン産生、感染局所への炎症性細胞の浸潤などの解析を行い、NLRP3 と ASC がカスパーゼ-1 活性化以外の未知経路を介して肺炎球菌感染の制御に働くことを明確に示した。そこで、この経路依存的に誘導される宿主防御因子の探索を DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析で行った。得られた候補遺伝子について詳細な発現解析を行い、NLRP3 と ASC に依存的かつカスパーゼ-1 非依存的に発現することを確認した。さらに、それらの遺伝子の発現ベクターを作製して機能解析を行うことで肺炎球菌感染に対して防御的に働く遺伝子を同定した。NLRP3 と ASC が防御的因子の発現を正に制御する機序を明らかにするために各シグナル伝達分子の活性化をウエスタンブロット、免疫組織染色、プロモーターアッセイで解析した。

肺炎球菌の肺炎モデルの作製 肺炎球菌の肺炎モデル作製は申請者らの以前の報告に従って経鼻感染で行った。マウスに麻酔をかけた後、肺炎球菌液 (D39 株) を鼻から吸引させることで感染させた。

各インフラマソーム構成分子の感染抵抗性への関与 各系統のマウス (野生型マウス、カスパーゼ-1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス、ASC 欠損マウス) に肺炎球菌を経鼻感染させ、生死を観察して生存曲線を得た。また、肺などの臓器を回収し、CFU カウント法で臓器内菌数を測定した。

各インフラマソーム構成分子の肺病理への関与 感染マウスから肺を回収して組織切片を作製し、HE 染色で組織像を観察した (組織切片作製および染色は京都大学・総合解剖

センターに委託)。

カスパーゼ1 依存のおよび非依存のサイトカインの検出 感染マウスの肺ホモジェネートを検体として用い、IL-1 β 、IL-18、IL-10、IL-17、IFN- γ をELISA法で測定した。

好中球 (およびマクロファージ) 浸潤の解析 肺胞洗浄液を回収し、遠心して肺胞腔内の細胞を集めた。肺胞細胞を蛍光標識抗 Gr-1 抗体および F4/80 抗体で二重染色し、フローサイトメーターで解析した。F4/80 陽性細胞をマクロファージ、F4/80 陰性 Gr-1 陽性細胞を好中球として各細胞の浸潤を評価した。

遺伝子発現の解析 各系統のマウス (野生型マウス、カスパーゼ-1 欠損マウス、NLRP3 欠損マウス、ASC 欠損マウス) に肺炎球菌を経鼻感染させ、肺を回収して全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。NLRP3 依存、ASC 依存、かつカスパーゼ-1 非依存的に発現している粘膜防御因子を候補とし、さらに real time RT-PCR 法でこれら遺伝子の発現を解析した。(n = 8-10)。

骨髄移植キメラを用いた解析 NLRP3 と ASC はマクロファージなどの免疫細胞だけでなく気道上皮細胞にも発現することが報告されているため、これらのタンパクが骨髄由来細胞 (免疫細胞など) および非骨髄由来細胞 (上皮細胞など) のどちらかで防御に関わるかを骨髄移植キメラマウスで検討した。放射線照射した野生型に野生型または遺伝子欠損マウス由来の骨髄を移植して免疫系を再構築した後に肺炎球菌を感染させて感染抵抗性を調べた。

リコンビナントタンパクを用いた解析 複数の抗菌タンパクや菌体結合タンパク (Reg3 γ 、BPIFA1/SPLUNC1、BPIFB1/LPLUNC1、Intelectin-1 など) が NLRP3-ASC 依存的に発現する候補として同定されたことから、これらのリコンビナントタンパクを作製し、肺炎球菌に対する結合能を解析した。また、発現ベクターを経鼻的にトランスフェクションして感染抵抗性への影響を調べた。

STAT3 および STAT6 の関与の検討 STAT3 および STAT6 が Reg3 γ 、BPIFA1、BPIFB1、Muc5B の発現に重要であること、また、ASC が STAT3 の活性化に関与することが報告されている (BMC Genomics. 2007. 8:455、J. Immunol. 2009. 182:7655-7662)。そのため、STAT3/6 が NLRP3-ASC の下流で防御因子の発現に働く可能性が疑われ、感染肺における STAT3/6 活性化を抗リン酸化 STAT3/6 抗体を用いた免疫組織染色およびウエスタンブロット法で検討した。

レポーターアッセイ Reg3g 遺伝子および Tff2 遺伝子のプロモーター部位をルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクトして NLRP3 および ASC にプロモーター活性が上昇するか検討した。

4. 研究成果

(1) 気道上皮における NLRP3 と ASC のインフラマソーム非依存的な新規防御的役割の発見と機序解明

野生型マウスおよび ASC または NLRP3 を欠損するマウスに肺炎球菌を経鼻感染させて感染抵抗性を検討したところ、野生型マウスと比べて ASC 欠損マウスおよび NLRP3 欠損マウスで肺内菌数が有意に高く、生存率も低かった (図 1)。

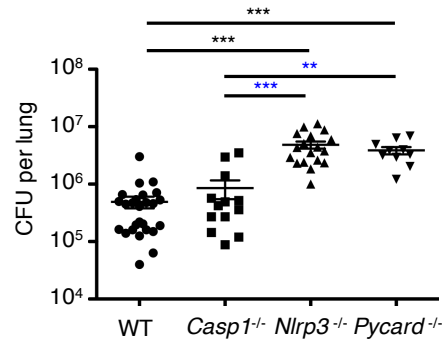


図1. NLRP3とASCは肺炎球菌感染でインフラマソーム非依存的に宿主防御に寄与する

さらに、ASC 欠損マウスおよび NLRP3 欠損マウスでは肺組織が顕著に傷害されていた。一方、カスパーゼ-1 を欠損するマウス (Casp1 欠損マウス) の肺炎球菌への感受性は野生型マウスのもと同様であったことから、ASC と NLRP3 がインフラマソーム依存的に感染防御に貢献する可能性が示された。

各系統のマウスに肺炎球菌を経鼻感染させてサイトカイン産生応答を検討したところ、IL-1 β および IL-18 の産生応答は NLRP3 に非依存的であったことから、NLRP3 の感染抵抗性への寄与はこれらのサイトカインを介したものではないことがわかった。その他のサイトカインの産生も NLRP3 または ASC の欠損によって大きな影響を受けなかった。さらに、肺胞内への好中球の浸潤および好中球由来エラスターゼ活性の上昇も NLRP3 と ASC に非依存的であった。これらの結果から、NLRP3 と ASC が未知のシグナル伝達経路を介して防御に貢献する可能性が想定された。

そこで、肺炎球菌感染時に肺内で NLRP3 および ASC 依存的にかつカスパーゼ-1 非依的に発現する遺伝子を網羅的発現プロファイリングで同定した。その中に粘膜防御因子として知られるタンパクをコードする遺伝子 (Reg3g, Tff2, Bpifa1, Itln1 など) が含まれていたことから、以降はこれらの遺伝子に着目した。これらの遺伝子の発現が NLRP3 および ASC 依存的であることを定量的 RT-PCR 法で確認した。次に、TFF2, BPIFA1, Intelectin-1 のリコンビナントタンパクを作製し、肺炎球菌への結合能を調べた。その結果、Intelectin-1 が菌体に弱く結合することがわかった。また、TFF2 は組織修復因子で

もあるため、TFF2 発現ベクターを ASC 欠損マウスに経鼻的にトランスフェクションしてから肺炎球菌を感染させて肺内菌数を調べたところ、対照群よりも TFF2 強制発現群で菌数が低下したことからこのタンパクが防衛的に働くことがわかった。

ASC と NLRP3 がどのような機序で粘膜防御因子の発現を正に制御するのか不明であるため、その機序の解明を試みた。これらの遺伝子発現に関与するとされるシグナル伝達因子を解析したところ、ERK, JNK, STAT3, NKX2-1 の活性化または発現量は ASC と NLRP3 の欠損の影響を受けなかったが、STAT6 の活性化および転写因子 SPDEF の発現が ASC と NLRP3 に依存して活性化または発現維持されていた。SPDEF の発現は STAT6 によって正に制御されることが知られており、SPDEF の強制発現により *Reg3g* 遺伝子および *Tff2* 遺伝子のプロモーター活性が上昇したことから、ASC と NLRP3 は肺炎球菌感染下で STAT6 の活性化を促進することで SPDEF の発現を維持し、結果的に粘膜防御因子の発現を維持・上昇させて宿主防御に働くことが示唆された。さらに、ASC と NLRP3 がどのような形式で STAT6 活性化に働くか検討したところ、HEK293 細胞において 2 型サイトカイン刺激で誘導される STAT6 のリン酸化が ASC と NLRP3 の強制発現により持続することを見出した。この結果から、2 型サイトカインによる STAT6 リン酸化の誘導を負のフィードバック制御によって抑制する何らかの機序が ASC と NLRP3 によって阻害される可能性が想定される。

これらの研究は、ASC と NLRP3 がインフラマソーム非依存的な新規シグナル機構を介して感染防御に寄与するという、予想外の大きな発見につながった。これまでにこれらの結果成果を論文にまとめて投稿しているが残念ながら発表には至っておらず、今後も権威ある雑誌への掲載を目指す (図 2)。

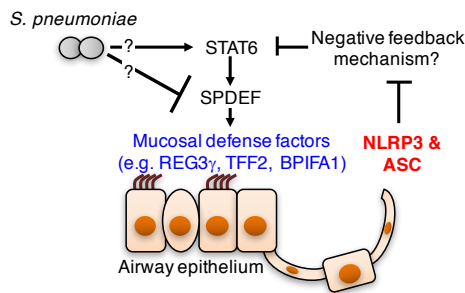


図2. 肺炎球菌感染におけるNLRP3とASCの役割

(2) ASC による IL-18 産生応答を介した致死性リステリア症の増悪化メカニズムの解明

致死性全身リステリア感染において ASC が感染の増悪に働くことを見出した。その分子機序を検討したところ、感染後、ASC 依存的に血中 IL-18 レベルが上昇することがわかり、IL-18 が ASC の下流で増悪化を担っていることが明らかになった。

ASC がインフラマソーム依存的経路および非依存的経路の両方を介して血中 IL-18 レベルを上昇させることがわかった。さらに、インフラマソーム非依存的経路には ASC 依存的に血中に放出されるエラスターゼが関与することを突き止めた。

リステリア感染において IL-18 が NK 細胞依存的に IL-10 の産生を誘導することがわかった。IL-10 はリステリアに対する感染抵抗性を低下させる免疫抑制性サイトカインであり、IL-18 が IL-10 産生を誘導することで致死性全身リステリア感染の増悪に働くことが示唆された。IL-18 による IL-10 産生誘導には NK 細胞が重要な役割を果たすが、IL-18 の直接的な刺激によって NK 細胞が IL-10 を産生するという証拠は得られなかったことから、何らかの生体内特異的な間接的機序が関わりと予想される。

本研究により、ASC が致死性全身リステリア感染を増悪化させることを見出し、その機序が明らかになった。このような研究成果により、IL-18 や NK 細胞が重症感染の治療における新たな標的となりうることが示唆された。本研究は論文として *European Journal of Immunology* 誌に掲載された。

(3) 肺炎球菌による PLY 依存的な IL-1 α 産生誘導機序の解明

PLY は肺炎球菌の病原性発揮に重要な病原因子であり、グラム陽性菌に幅広く保存されるコレステロール依存的膜傷害毒素ファミリーに属する。PLY は他のファミリーと同様にコレステロール含有脂質膜に孔を形成するが、この活性に依存して宿主マクロファージの IL-1 α 産生を誘導することを発見した。その機序として、この応答にインフラマソームは不必要であること、およびカルパインに依存することを示した。さらに、PLY が細胞膜に孔を形成することで細胞内への Ca²⁺ イオン流入を誘導してカルパインを活性化させることを明らかにした。

IL-1 α は肺炎球菌肺炎において宿主防御に必須ではなく、むしろ炎症病態を促進する可能性が示されている。したがって、PLY による IL-1 α 産生の誘導は肺炎の病態形成に寄与する可能性があり、本研究により PLY の新たな病原性機序が示唆された。この研究結果は論文として *Infection and Immunity* 誌に掲載された。

その他の研究成果は主な発表論文等の欄を参照のこと。

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) Nakajima S, Imamura R, Yoshino M, Sakurai M, Tsuchiya K, Sugihara K, Asano M, and Suda T. Characterization of innate and adaptive immune responses in PYNOD-deficient mice. *ImmunoHorizons*. (査読有) **2**(4) 129-141. 2018.
doi:https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700074
- 2) Fang R, Wu R, Du H, Jin M, Liu Y, Lei G, Jiang B, Lei Z, Peng Y, Nie K, Tsuchiya K. Pneumolysin-Dependent Calpain Activation and Interleukin-1 α Secretion in Macrophages Infected with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. (査読有) **85**(9): pii: e00201-17. 2017.
doi: 10.1128/IAI.00201-17.
- 3) Zhang P, Tsuchiya K, Kinoshita T, Kushiya H, Suidasari S, Hatakeyama M, Imura H, Kato N, Suda T. Vitamin B6 Prevents IL-1 β Protein Production by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. (査読有) **291**(47):24517-24527. 2016.
doi: 10.1074/jbc.M116.743815
- 4) Kochi Y, Miyashita A, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Sekimizu K, Kaito C. A human pathogenic bacterial infection model using the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *FEMS Microbiol Lett*. (査読有) **363**(15): pii: fnw163. 2016.
doi: 10.1093/femsle/fnw163.
- 5) Hashino M, Tachibana M, Nishida T, Hara H, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M. Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death. *Front Microbiol*. (査読有) **6**:1145. 2015.
doi: 10.3389/fmicb.2015.01145.
- 6) Tsuchiya K, Hara H, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Sakai S, Daim S, Chen X, Dewamitta SR, Qu H, Mitsuyama M, Kawamura I. The adaptor ASC exacerbates lethal *Listeria monocytogenes* infection by mediating IL-18 production in an inflammasome-dependent and -independent manner. *Eur J Immunol*. (査読有) **44**(12):3696-3707. 2014.
doi: 10.1002/eji.201444673.

- 7) Fang R, Hara H, Sakai S, Hernandez-Cuellar E, Mitsuyama M, Kawamura I, Tsuchiya K. Type I interferon signaling regulates activation of the absent in melanoma 2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. (査読有) **82**(6):2310-7. 2014.
doi: 10.1128/IAI.01572-14.

〔学会発表〕 (計 10 件)

- 1) 土屋晃介 (筆頭演者) Caspase-1 serves as an apoptosis-initiating caspase in the absence of Gasdermin D (GSDMD). **第 46 回日本免疫学会学術集会**, 2017 年 12 月 12 日, 宮城県仙台市
- 2) 土屋晃介 (筆頭演者) “シンポジウム「がん・免疫 - 研究と臨床の最前線 -」 Caspase-1 依存的細胞死の分子機序と生理的役割 “ **日本薬学会・北陸支部第 129 回例会**, 2017 年 11 月 26 日, 石川県金沢市 <招待 >
- 3) Kohsuke Tsuchiya (筆頭演者) Caspase-1 serves as an apoptosis-initiating caspase in the absence of Gasdermin D (GSDMD). **5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017)**, October 30, 2017, Kanazawa, Japan <国際学会 >
- 4) 土屋晃介 (筆頭演者) Pyroptosis はアンピシリンによるリステリア感染治療を促進する. **第 26 回日本 Cell Death 学会学術集会**, 2017 年 7 月 24 日, 東京都大田区
- 5) 土屋晃介 (筆頭演者) A role for the redox master regulator Nrf2 in host defense against *Listeria monocytogenes* infection. **第 45 回日本免疫学会学術集会**, 2016 年 12 月 7 日, 沖縄県宜野湾市
- 6) 土屋晃介 (筆頭演者) Involvement of the redox master regulator Nrf2 in host defense against *Listeria monocytogenes* infection. **中国免疫学会第十一届全国免疫学学術大会**, 2016 年 11 月 7 日, 中華人民共和国安徽省 <国外 >
- 7) 土屋晃介 (筆頭演者) ” ワークショップ「PAMPs 受容体研究の最前線」細菌感染におけるインフラマソーム構成蛋白の新たな防衛的役割” **第 88 回日本細菌学会総会**, 2015 年 3 月 28 日, 岐阜県岐阜市 <招待 >
- 8) 土屋晃介 (筆頭演者) NLRP3 and ASC contribute to host defense against pneumococcal pneumonia in an inflammasome-independent manner. **第 43 回**

日本免疫学会学術集会, 2014年12月12日,
京都府京都市 <ベストプレゼンテーション
賞受賞 >

9) 土屋晃介 (筆頭演者) インフラマソーム
構成タンパクによる気道自然免疫の恒常性
維持と肺炎球菌への宿主防御機序 **第67回**
日本細菌学会関西支部学術集会, 2014年11
月22日, 兵庫県西宮市

10) 土屋晃介 (筆頭演者) ” シンポジウム「生
体防御を眺める視点」自然免疫機構による細
胞内の監視と細胞内寄生菌の感染戦略”
第25回日本生体防御学会学術総会, 2014年
7月10日, 宮城県仙台市<招待 >

[図書] (計 2件)

1) 土屋晃介. パイロトーシスの分子機構
と意義. 実験医学:羊土社. 第34巻7号
1037 - 1144頁 (2016年)

2) 土屋晃介. インフラマソーム/ASC スペ
ック-最新の知見. 医学のあゆみ:医歯薬出
版株式会社. 第251巻12号1148 - 1150
頁 (2014年)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 晃介 (Tsuchiya, Kohsuke)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 50437216