

「宿主炎症応答を利用した病原菌の生体内増殖機構の解明と 薬剤耐性菌治療への応用」

国立大学法人旭川医科大学医学部感染症学講座微生物学分野 教授
原 英樹

要旨

人流が増した現代社会では感染症に罹患しやすい環境にある。とくに薬剤耐性菌のサイレント・パンデミックは長い年月をかけて深刻化しており¹、既存の抗菌薬に変わる治療法の開発が求められている。抗生物質などの菌体を標的とする薬剤は新たな耐性菌の出現を誘発することから、革新的治療方針の転換が喫緊の課題となっている。そこで本研究では、感染重症患者の多くで報告されている炎症応答に着目した。

様々な病原体感染において、重症患者ではインフラマソーム応答依存的に炎症性サイトカインである IL-18 が上昇することが報告されている。われわれは細菌が産生するサイトリジンがインフラマソーム応答を亢進することを突き止めた。また、リステリアや黄色ブドウ球菌がインフラマソーム応答を亢進させるリン酸化経路を見出した。そこで本リン酸化シグナルを阻害することでインフラマソーム応答を抑制したところ、薬剤耐性黄色ブドウ球菌に感染したマウスの生存率が改善した。今回の研究成果をもとに、今後インフラマソーム応答を効果的に制御できる薬剤を開発することで、治療困難な薬剤耐性菌に対する新たな対策を確立できる可能性を秘めている。

背景・目的

病原体は多様な pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)を発現しており、ヒトに感染すると宿主細胞は細胞内および細胞外受容体を介して微生物成分を認識し炎症応答を惹起する。細胞表面に発現する toll-like receptor (TLR)などは病原性に関わらずすべての微生物を認識することで炎症応答に関わるタンパク質の発現を上昇させる。一方で nod-like receptor (NLR)に代表される細胞内受容体は、apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)およびシステインプロテアーゼであるカスパーゼ 1 前駆体をリクルートすることでインフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体を細胞内に形成する。これによりカスパーゼ 1 前駆体が活性型に変換され、基質である炎症性サイトカイン interleukin-16 (IL-16)前駆体および IL-18 前駆体を切断することで生物活性を有する活性体を細胞外へ分泌させる。また、カスパーゼ 1 は孔形成タンパク質ガスダーミン D も活性型へと変換させることで膜傷害を伴うプログラム細胞死パイロトーシスを誘導する。

これまでの研究から、われわれは *Listeria monocytogenes* (リステリア)をはじめとするグラム陽性菌感染において IL-18 が多量に産生されると臓器内菌数が増加することを突き止めた²。また近年パンデミ

ックを引き起こした新型コロナウイルスも感染病態の重症度と IL-18 濃度に相関性があることが報告されている³。IL-18 の産生にはインフラマソームの活性化が必須であることから、細菌感染がどのようにして細胞内に発現しているインフラマソーム受容体を活性化しているのか解明することで、微生物と免疫応答の相互作用を明らかにすることが重要となる。インフラマソームを形成する細胞内受容体としてこれまでに 7 種類の分子が同定されており⁴、ほとんどの病原体は複数のインフラマソーム受容体を活性化する。これは細胞質にアクセスするウイルスや細胞内寄生菌だけでなく、細胞内寄生性を示さない一般細菌でも同様であることから、われわれはインフラマソーム応答を抑制することで感染症の悪化を防ぐことができるのではないかと考えた。そこで本研究では、病原細菌がインフラマソームを活性化する分子機序、およびインフラマソームを介して感染症が重症化するメカニズムを解明することで感染症治療に応用することを試みた。

方法

細胞の調整：本研究には初代マクロファージを使用した。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分化誘導培地で 5 日間培養し接着細胞を回収した。マクロファージは 24 well プレートに 0.5×10^6 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。

細胞感染実験：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 MOI=10、黄色ブドウ球菌 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 11~17 時間培養を行った。

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)：培養上清中のサイトカイン濃度を測定するために、回収した上清を遠心し死細胞などの混在物を取り除いた。その上澄みを回収し、市販の ELISA キットを用いて各サイトカイン濃度を定量した。

ウェスタンブロット：培養した細胞から培地を取り除き、残った細胞を SDS sample buffer で溶解し加熱変性させ細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を SDS-PAGE ゲルにアプライし、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜にトランスブロットし、Blocking One でブロッキングを行った。その後、検出するタンパク質を特異的に認識する 1 次抗体で PVDF 膜を処理し洗浄後、Horseradish peroxidase (HRP)標識した 2 次抗体で処理した。洗浄した PVDF 膜に化学発光基質を作用させることで目的とするタンパク質の検出を行った。

実験動物：本研究では野生型 C57BL/6 マウスおよびその遺伝子改変マウスを用いて in vivo 感染実験を行った。

in vivo 感染実験： $10^4 \sim 10^6$ colony forming unit (CFU) のリステリアを経静脈投与し、2~4 日後に採血し血清中のサイトカイン濃度を ELISA キットで測定した。回収した臓器はホモジナイズし、寒天培地にプレーティングしたのち生菌数をカウントすることで臓器内菌数を算出した。薬剤や合成サイトカインの投与は腹腔内注射で実施した。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。

統計解析：統計処理は GraphPad Prism 8 を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

微生物は多岐にわたるリガンドを発現しており、細胞内寄生菌であるリステリアは AIM2、NLRP3、NLRP6 といった複数の細胞内受容体を介してインフラマソームを活性化することをわれわれは明らかにしている²。また、インフラマソーム応答がリステリアの感染病態に影響することを見出したことから、菌が産生する病原因子とインフラマソーム応答の相関性を検討した。まず、リステリアの主要病原因子である listeriolysin O (LLO) を欠損した変異株を作製しマクロファージに感染させたところ、インフラマソーム依存的な IL-18 産生がまったく誘導されなかった (図 1a,b)。このことから、病原因子の発現がインフラマソーム応答を誘導していることが判明した。そこで、LLO によるインフラマソーム応答の亢進機序を調べたところ、

LLO は細胞膜のラフト領域と相互作用することで、非受容体型チロシンキナーゼである Lyn および Syk を活性化していることがわかった。また、Lyn-Syk リン酸化シグナルはインフラマソーム形成に必須となる ASC のリン酸化を制御していることが明らかとなった。さらに、4 つのドメインから構成されている LLO のなかで、ドメイン 3 に位置する 223 番目スレオニンアラニンに置換したリステリア組換え株 (LLO T223A 変異株) では野生型 LLO と比較してインフラマソーム依存的な IL-18 産生が激減することを突き止めた (図 1c)。そこで、感染個体における菌の病原性を検証したところ、LLO T223A 変異株を感染したマウスでは LLO 産生株と比較してインフラマソーム依存的な IL-18 産生が低下することで臓器内菌数が減少していた (図 2)。

これらの結果から、LLO を介したインフラマソーム応答の亢進はリステリアの病原性に寄与しており、これまで知られていた膜傷害活性に加えて新たな LLO の病原活性を同定することができた。これら

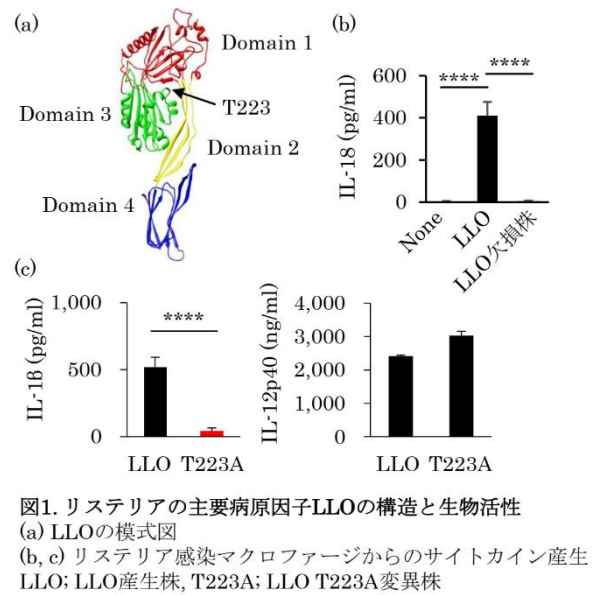


図1. リステリアの主要病原因子LLOの構造と生物活性
(a) LLOの模式図
(b, c) リステリア感染マクロファージからのサイトカイン産生
LLO; LLO産生株, T223A; LLO T223A変異株

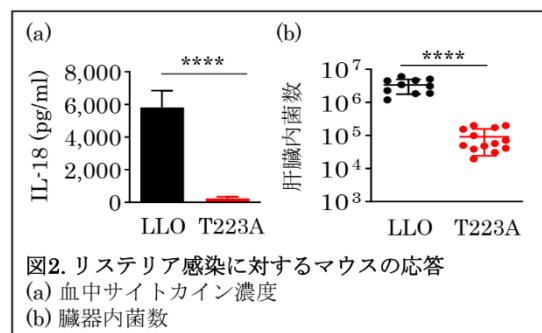


図2. リステリア感染に対するマウスの応答
(a) 血中サイトカイン濃度
(b) 臓器内菌数

の研究成果は論文として報告した（発表論文 1, 2）。

以上の結果を踏まえて、次に国内で最も多くの薬剤耐性菌が検出されている黄色ブドウ球菌がどの細胞内受容体で認識されているのか検討した。その結果、インフラマソーム依存的な IL-18 産生が AIM2 欠損マクロファージで低下しており、一方でインフラマソーム非依存的な IL-12 産生には大きな影響は認められなかった（図 3）。この結果は、これまでに報告のあった NLRP3 や NLRP6 に加えて、黄色ブドウ球菌が AIM2 を活性化することでインフラマソーム応答を誘導していることを示している。

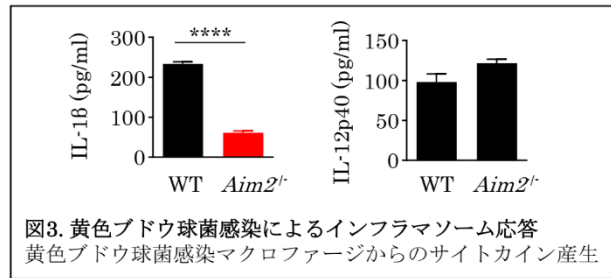


図3. 黄色ブドウ球菌感染によるインフラマソーム応答
黄色ブドウ球菌感染マクロファージからのサイトカイン産生

AIM2 は細胞内で二本鎖 DNA を認識する DNA センサーとして機能しており、これまでウイルス感染や細胞内寄生菌感染で活性化することが知られていた⁵。本結果は、黄色ブドウ球菌のような細胞内寄生性を示さない病原菌でも感染マクロファージにおいて菌由来の核酸を細胞質内に曝露していることを示している。そこで、AIM2 インフラマソーム応答が黄色ブドウ球菌感染に与える影響を調べた。その結果、AIM2 欠損マウスの臓器内菌数は野生型マウス

と比べて減少しマウスの生存率も改善した。また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染に対する AIM2 インフラマソーム応答の影響も検討したところ、薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染に対しても AIM2 インフラマソームが活性化することで感染病態が悪化していることが明らかとなった（図 4）。これらの結果は、黄色ブドウ球菌感染に対してインフラマソーム応答は有害に働いており、薬剤耐性菌であってもインフラマソーム応答を阻害することで感染病態を改善できることを示している。

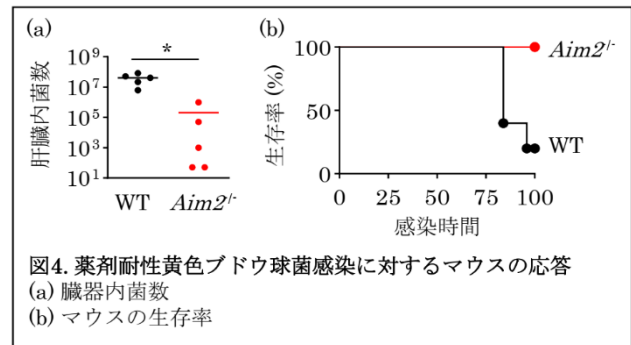


図4. 薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染に対するマウスの応答
(a) 臓器内菌数
(b) マウスの生存率

ここまでの研究から、黄色ブドウ球菌は少なくとも AIM2、NLRP3、NLRP6 を介してインフラマソームを活性化することが判明していることから、各細胞内受容体を阻害するよりもインフラマソームに共通した下流のシグナル経路を阻害する方が効果的であると考えられた。これらの細胞内受容体はいずれもインフラマソームの活性化に ASC を必要とすることから、黄色ブドウ球菌感染における ASC のリン酸化修飾を制御するキナーゼの同定を試みた。その結果、JNK を阻害すると黄色ブドウ球菌感染による IL-18 産生が抑制されることを突き止めた。さらにその下流を調べたところ、JNK がキナーゼ A を活性化しており、キナーゼ A が ASC を直接リン酸化していることを見出した。次に、インフラマソーム応答を阻害

する目的でキナーゼ A を阻害する薬剤を薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染マウスに投与した。薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染マウスに抗生物質であるピペラシリンを投与しても治療効果が認められないのに対して、阻害剤投与群ではインフラマソーム炎症が抑制されることで臓器内菌数が低下し、マウスの生存率が劇的に改善した（図 5）。これらの結果は、抗生物質が効かない薬剤耐性菌に対してもインフラマソーム

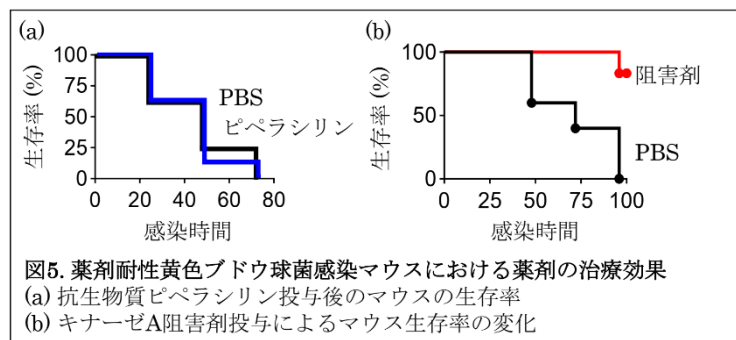


図5. 薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染マウスにおける薬剤の治療効果
(a) 抗生物質ピペラシリン投与後のマウスの生存率
(b) キナーゼA阻害剤投与によるマウス生存率の変化

ム応答を制御することで菌体を標的とせずに感染治療できる可能性を示唆している。これらの研究成果は論文としてまとめ国際学術誌に投稿中である。

考察

今回のリステリア感染実験から、多くの感染炎症に関する知見を得ることができた。まず、インフラマソーム応答がグラム陽性菌の感染病態を悪化させており、菌は病原因子を産生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。リステリアの主要病原因子である LLO は **cholesterol-dependent cytolysin (CDC)** に属しており、リステリア以外のグラム陽性病原菌はそれぞれ特有の CDC を産生している⁶。黄色ブドウ球菌は CDC を発現していないが **alpha toxin** や **leukocidin** など多数の毒素を産生することからこれらが CDC と類似した機能を果たしていると考えられる。CDC の特性として、脂質膜に結合することでオリゴマーを形成し、膜上に孔を形成することが古くから知られていた。本研究では、この膜傷害機能に加えて、LLO が膜ラフトに集積することで膜直下にリクルートしてくる **Lyn** や **Syk** といった非受容体型チロシンキナーゼを活性化し、インフラマソームのアダプター分子 **ASC** をリン酸化していることを突き止めた。ASC はリン酸化することで **ASC speck** とよばれる凝集体を形成し **カスパーゼ 1** を効率的に活性化することで炎症応答を拡大させることから⁷、われわれは新たな LLO の病原機能を同定するに至った。このようにグラム陽性菌は毒素を産生することでインフラマソーム応答を亢進させ、感染病態を増悪化させていることが明らかとなった。今後、LLO の **223** 番号スレオニンがどのような分子機序で非受容体型チロシンキナーゼを活性化しているのか明らかにすることで、新たな感染治療法の開発につながることを期待される。

インフラマソームを活性化する細胞内受容体として **7** 種類の分子が同定されており⁴、これまでに細胞内寄生性を示す細菌やウイルスなどは複数の細胞内受容体を活性化することが知られていた。今回、細胞内寄生性を示さない黄色ブドウ球菌で検証を行ったところ、**NLRP3**、**NLRP6**、**AIM2** といった複数の細胞内受容体を介してインフラマソームを活性化することが明らかとなった。最近の研究から、黄色ブドウ球菌や菌体成分が細胞質内で検出される事例が報告されていることから、マクロファージが細菌を貪食することで菌の細胞内寄生性などに関係なく、細胞内受容体を介してインフラマソームが活性化しうることを示している。黄色ブドウ球菌がどのようなメカニズムで細胞質内に菌体リガンドを送達しているのか特定するためにはさらに詳細な検討を要する。

細菌感染において、薬剤耐性化の進行が国際的に問題視されている。そこで本研究の社会への還元を実現すべく、インフラマソーム阻害による感染治療を検証した。国内の臨床検出株のうち **80%** 以上がすでに薬剤耐性化していると報告されている黄色ブドウ球菌に注目し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (**MRSA**) をマウスに感染させた。**B-ラクタム** 抗生物質であるピペラシリンを投与しても治療効果は認められなかったが、一方でインフラマソーム応答を減弱させるキナーゼ阻害薬を投与したところ、感染マウスの生存率が劇的に改善した。以上の結果から、インフラマソームの活性化は病原菌の生体内増殖を亢進させるが、インフラマソーム応答を阻害することで感染症をコントロールできることが示された。さらに、この免疫療法は菌の薬剤耐性に左右されないことから、**MRSA** などの有効な治療法が確立されていない感染症にも有用である大きな利点がある。ペニシリンが発見されて約一世紀が経つが、抗

生物質に代わる感染治療法はいまだ確立されていないことから、今後、実用化に向けてヒトに使用できる薬剤の開発やトランスレーショナル・リサーチなども展開していきたい。

研究室の立ち上げ時期に本研究助成でサポートしていただき、本研究を円滑に開始することができました。以上のような研究の進展に大いなる援助をいただいた一般財団法人 化学及血清療法研究所に心より感謝申し上げます。

共同研究者

旭川医科大学医学部、松田 泰幸
山口大学医学部、坂本 啓
ミシガン大学医学部、Gabriel Nunez

引用論文

- [1] Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, Alqumber MAA. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel)*. 2023, 11, 1946.
- [2] [Hara H](#), Seregin SS, Yang D, Fukase K, Chamailard M, Alnemri ES, Inohara N, Chen GY, Núñez G. The NLRP6 inflammasome recognizes lipoteichoic acid and regulates Gram-positive pathogen infection. *Cell* 2018, 175, 1651-1664.
- [3] Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J. Exp. Med.* 2021, 218, e20201707.
- [4] Xue Y, Enosi Tuipulotu D, Tan WH, Kay C, Man SM. Emerging Activators and Regulators of Inflammasomes and Pyroptosis. *Trends Immunol.* 2019, 40, 1035-1052.
- [5] Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009, 458, 514-8.
- [6] Tweten RK, Hotze EM, Wade KR. The Unique Molecular Choreography of Giant Pore Formation by the Cholesterol-Dependent Cytolysins of Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015, 69,

323-340.

[7] Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mitsuyama M. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature Immunology*, 2013, 14, 1247-1255.

助成研究に関連した発表論文

1. 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 Reports* 2022, 38, 110414.

2. Matsuda Y, Yamauchi H, Hara H. Activation of inflammasomes and mechanisms for intracellular recognition of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology and Immunology* 2023, 67, 429-437.