

## 「新規炎症応答を利用した感染症制御を目的とした基礎研究」

武庫川女子大学 薬学部

内山 良介

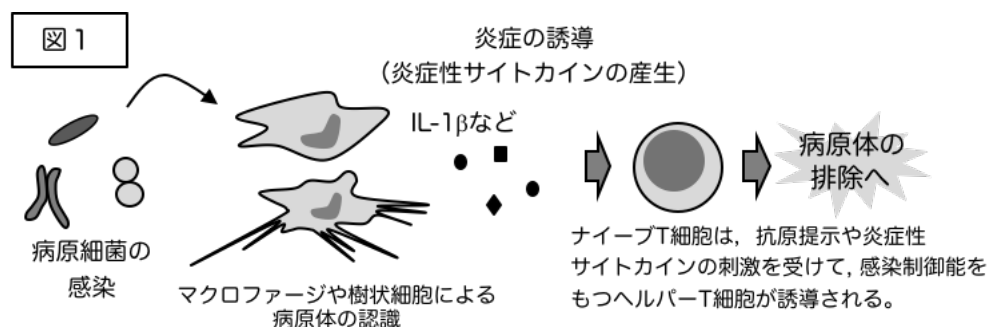
### 1 研究の背景と目的

私たち人類は、感染症との絶え間ない戦いを続けている。抗菌薬の研究開発が目覚ましい発展を遂げる一方で、広範囲の抗菌薬に耐性を示す薬剤耐性菌が出現し、治療の難化・長期化を引き起こしている。さらに、当該研究計画が採択された後、世界的な SARS-CoV-2 (新型コロナウイルス) 感染拡大により、医療、社会、経済などに甚大な影響が生じている。このように、日々変化する病原微生物に対し、我々は不断の対策が重要であることを改めて認識させられる事態が生じている。

一方、私たちの生体は、あらゆる病原微生物に対応することができる基本的なシステムである「免疫系」を有している。しかし、感染症を引き起こす個々の病原微生物に対して免疫系を適切に作動させ対処するには、侵入した病原微生物に応じた炎症応答を惹起する(炎症性サイトカインを産生する)ことが必要である。さらに、この炎症に応じて適切なヘルパーT細胞の分化が誘導されることが重要である(図1)。病原体の侵入を感知したマクロファージや樹状細胞は、取り込んだ病原体の一部を抗原としてT細胞に提示するとともに、種々の炎症性サイトカインを産生する。この際に産生されたサイトカインの種類や組み合わせに応じて、病原体に応じた適切なヘルパーT細胞の分化が誘導される。しかし、この炎症性サイトカイン産生の詳細なメカニズムには不明の点が多く、適切かつ効果的なワクチンの開発の障壁の一部となっている。

これまでの世界的な研究により、病原体に由来する分子を認識して炎症性サイトカインを産生する、宿主側の自然免疫受容体(Toll様受容体TLRやNod様受容体NLRなど)の存在が明らかにされた。実際、結核菌やリステリアなどの細胞内寄生性細菌に対する感染防御では、これらの自然免疫受容体による炎症を契機に、1型ヘルパーT細胞(Th1細胞)が誘導されることが知られている(*Adv Immunol*, 113: 135-156, 2012)。これに加えて、近年の研究により、実際の細菌感染で生体防御効果をもつヘルパーT細胞は、従来知られている古典的なTh1細胞(classical Th1細胞)とは異なる、新たな細胞集団(非典型Th1細胞; non-classical Th1細胞)である可能性が示唆された(*Science*, 349: 606-613, 2015)。これは、真に感染制御に効果的なヘルパーT細胞が、従来考えられていた細胞集団とは異なる新しいものである可能性を示唆している。さらに、このような細胞を人為的に制御することで、治療困難な感染症を制御できる可能性がある。しかし、現在、この新規ヘルパーT細胞がどのようなメカニズムで誘導され、実際の細菌感染でどのような役割を担うのか、その全容は不明である。

申請者はこれまでの研究で、細胞のアポトーシスを誘導するFasシグナル経路が、細菌感染で炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ /IL-18を産生することを見出した(*J Immunol*,



190(8): 4245-4254, 2013.)。さらにこの IL-1 $\beta$ が、病原細菌リステリア感染に対して、IFN- $\gamma$ および IL-17 を同時に産生する新規ヘルパーT 細胞 (Th17/Th1 細胞) を誘導することを見出した (*J Immunol*, 199(3): 1122-1130, 2017.)。近年の研究で、この Th17/Th1 細胞は、後に IL-17 産性能を失い IFN- $\gamma$ 産性能のみを維持した、上述の非典型 Th1 細胞 (non-classical Th1 細胞) へと分化する可能性が示されている (*J Immunol*, 194: 3116-3126, 2015)。以上より、Fas シグナルを介して産生された炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ によって新規ヘルパーT 細胞 (Th17/Th1 および非典型 Th1 細胞) が誘導され、細菌感染防御で重要な役割を担う可能性がある。

そこで本研究では、細胞の Fas シグナル経路が、アポトーシス誘導とは異なり、細菌感染で炎症応答を惹起する (炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ を産生する) 詳細なメカニズムを解明する。さらに、この炎症応答を介して、従来の古典的な Th1 細胞とは異なり、非典型 Th1 細胞が誘導され、細菌感染防御に作用するメカニズムを解明する。

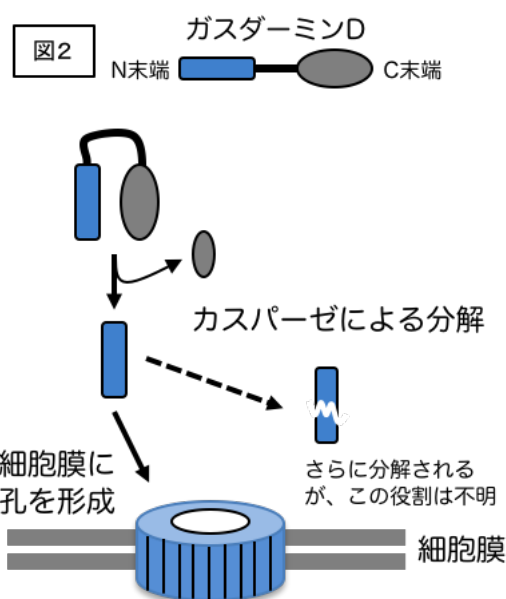
## 2 研究方法・研究内容

上述の目的を達成するため、本研究計画では以下の内容について実験を行った。

### (1) Fas 依存的な IL-1 $\beta$ 産生における GasderminD の関与

マクロファージや樹状細胞が産生する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ は、細胞質内で合成された後、細胞外へ分泌されサイトカインとして機能する。一般的に分泌タンパク質には細胞外へ分泌されるために必要なシグナルペプチドが付与されているが、IL-1 $\beta$ にはそのシグナルペプチドが存在せず、細胞外へ分泌されるメカニズムは不明であった。一方、これまでの

研究で、細胞質内に存在する GasderminD というタンパク質が、病原体感染などに応じて活性化したタンパク質分解酵素の一種 caspase-1 により分解され、その一部がマクロファージなどの細胞膜に孔を形成し、その孔を経由して IL-1 $\beta$ が分泌されることが明らかにされた (図2)。しかし、Fas 依存的な IL-1 $\beta$ 産生における GasderminD の関与は不明である。そこで、マウス由来マクロファージ系細胞株の RAW264 細胞を用いて、Fas 依存的な IL-1 $\beta$ 産生における GasderminD の関与を検討した。



### (2) Fas 依存的な caspase-8, -3 活性化と Gasdermin D 活性化および IL-1 $\beta$ 産生への関与

炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ は、活性をもたない前駆体タンパク質として合成された後、種々の刺激によって活性化した caspase-1 によって切断の過程を受けて活性型となり生体で機能する。これまでの研究で、Fas 依存的な IL-1 $\beta$ 産生では、Fas シグナル経路の下流で活性化した caspase-8 が IL-1 $\beta$ 活性化に関与することが示されている。これに加えて、Fas シグナル経路の下流では、一般に caspase-3 が活性化することが知られている (*J Immunol*, 189(12): 5508-12, 2012)。そこで、Fas 依存的に活性化する caspase-8, -3 の、Gasdermin D 活性化における役割を検討した。

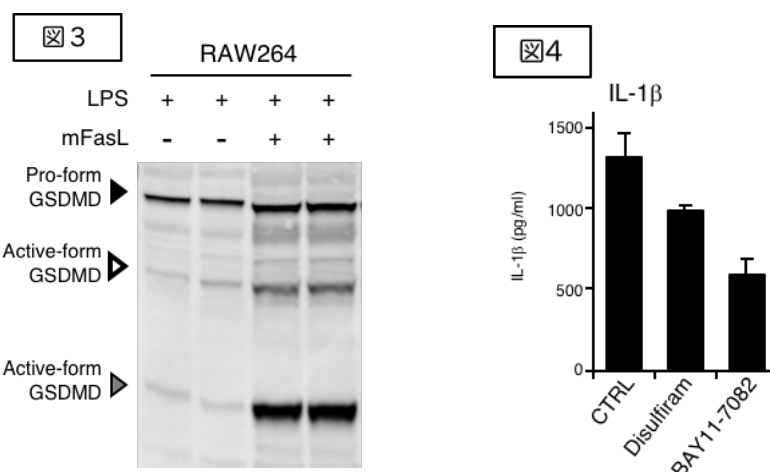
### (3) 非典型 Th1 細胞の分化誘導における IL-1 $\beta$ の役割

これまでのヒト材料を用いた研究から、非典型 Th1 細胞の誘導に IL-1 $\beta$ が重要であることが示されている。そこで、マウス由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いて、*in vitro* 実験系におけるヘルパーT 細胞の分化誘導条件での IL-1 $\beta$ 存在の役割について検討を行った。

## 3 研究成果

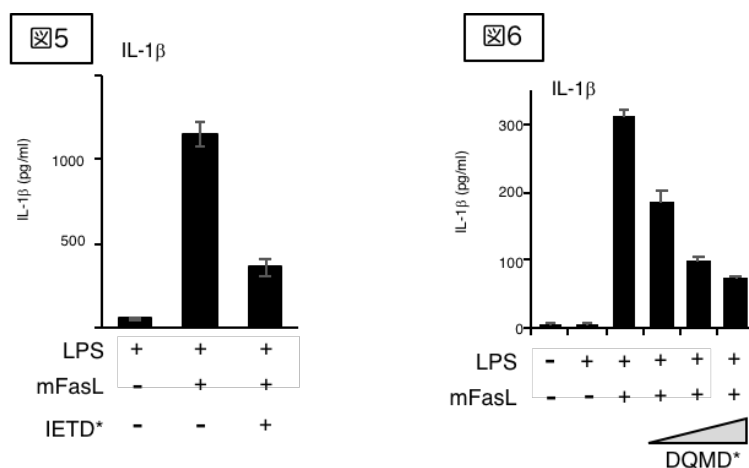
### (1) Fas 依存的な IL-1 $\beta$ 産生における Gasdermin D の関与

RAW264 細胞は定常状態では Fas (受容体) を発現しておらず、Fas リガンド (FasL) 刺激に対して耐性を示す。一方、TLR4 リガンドであるグラム陰性細菌由来のリポ多糖 (LPS) で刺激をすると、細胞膜上に Fas を発現し FasL 感受性となる。そこで、RAW264 細胞に LPS および FasL 刺激を加え、Gasdermin D の活性化をウェスタンブロット法で検討した。その結果、Fas シグナル活性化に伴って活性型およびさらに切断を受けた Gasdermin D が検出された (図3)。そこで、Gasdermin D による孔形成を阻害することが知られる disulfiram や BAY11-7082 で細胞を処理したところ (*Nat Immunol*, 21; 736-745, 2020), Fas 依存的な IL-1 $\beta$ 産生が部分的に阻害された。以上の結果より、Fas 依存的に活性化・切断を受けた Gasdermin D は部分的に IL-1 $\beta$ 産生に関与する可能性が示唆された。



### (2) Fas 依存的な caspase-8,-3 活性化と Gasdermin D 活性化および IL-1 $\beta$ 産生への関与

これまでの研究で、NLR などの刺激によって活性化した caspase-1 が Gasdermin D を切断・活性化することが知られている。一方、Fas 依存的に活性化した caspase-8 や caspase-3 が Gasdermin D の活性化に関与しているのか、検討を行った。Caspase-8 または caspase-3 阻害剤存在下で LPS および FasL 刺激による Gasdermin D 活性化についてウェスタンブロット法で確認を行ったところ、Fas シグナルによって活性化される Gasdermin D が、caspase-8 または caspase-3 阻害剤によって有意に阻害された。そこで、RAW264 細胞からの IL-1 $\beta$ 産生における阻害剤の影響を確認したところ、Fas 依存的に産生される IL-1 $\beta$ が、caspase-8 または caspase-3 阻害剤によって有意に阻害された (図5, 6. \*IETD および DQMD は caspase-8 および-3 阻害剤を示す)。以上の結果より、Fas シグナル依存的に活性化された caspase-8 または caspase-3 が、Gasdermin D 活性化を介して IL-1 $\beta$ 産生に関与している可能性が示唆された。



### (3) 非典型 Th1 細胞の分化誘導における IL-1β の役割

*In vitro* 実験系における非典型 Th1 細胞の誘導条件と、その際の IL-1β の影響を検討するため、まず、MACS (Magnetic-activated cell sorting) を用いて、マウス脾臓から CD4<sup>+</sup> T 細胞の分離を試みた。分離前の全脾臓細胞中の CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合が 19.2%であったのに対し、分離後の CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合は 97.5%であったことから、MACS により CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離精製することができた。次に、分離した CD4<sup>+</sup> T 細胞に対して、IL-1β 存在の有無による異なる刺激条件によって分化誘導されるヘルパー T 細胞の種類を、産生されるサイトカインの種類を指標にして調べた。ここでは、ヘルパー T 細胞を誘導する条件として、抗 CD3ε 抗体および抗 CD28 抗体のみ、またはこれらの刺激に加えて、レコンビナントサイトカイン IL-1β, IL-6, IL-23, 抗 IFN-γ 中和抗体, 抗 IL-4 中和抗体存在下で検討した。CD4<sup>+</sup> T 細胞に対して IL-1β 非存在下で分化誘導を行った場合、IFN-γ のみを産生するヘルパー T 細胞の誘導が認められた。一方、IL-1β 存在下で分化誘導を行った場合、IFN-γ, IL-17 共に産生するヘルパー T 細胞の誘導が認められた。この結果から、IL-1β 存在下では IFN-γ と IL-17 を産生する非典型 Th1 細胞の分化が誘導された可能性が考えられた。

今後は、Intracellular cytokine staining 法を用いて、分化誘導された個々のヘルパー T 細胞の性質について、詳細な検討を行っていきたいと考えている。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

抗菌薬による治療とワクチンによる予防は、感染症制御を推進する上で欠くことのない車の両輪であると考えられる。免疫記憶を利用したワクチンによる感染症予防は、その防御効果が長期間継続することから、感染症自体への罹患を予防できる点で社会的にも有益である。しかし、感染症の原因となる個々の病原体に応じた適切な抗原や炎症応答に関する情報は不足し、新規ワクチン開発には多くの困難がある。今回の申請者の研究結果は、独自に見出した新規炎症応答を基軸に、真に感染防御能を有する免疫細胞の誘導機序を明らかにするものである。本研究によって、これまで制御が困難であった感染症への対処方法において新規かつ重要な知見を与えることができ、感染制御分野の研究を大きく発展させる成果が得られたと考えている。