

筑波大学

博士（医学）学位論文

**SQSTM1/p62/A170 regulates pulmonary inflammation induced by  
legionella infection by modulating inflammasome activity**

(SQSTM1/p62/A170 はインフラマソーム活性を調節することにより  
レジオネラ感染による肺炎症を制御する)

2 0 1 3

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

大塚 茂男

# 目 次

## 学位論文

1. 背景・目的	4
2. 方法	6
3. 結果	10
4. 考察	16
5. 参考文献	17
6. 図	20
7. 謝辞	31

## 参考論文

1. SQSTM1/p62/A170 regulates the severity of *Legionella pneumophila* pneumonia by modulating inflammasome activity
2. Transcription Factors GATA-3 and ROR  $\gamma$  t Are Important for Determining the Phenotype of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma

## 背景・目的

呼吸器感染症は感染症の中で主要な疾患群であり、世界中で未だ高い罹患率、死亡率を有している。その中で細菌性肺炎はごくありふれた疾患であるが、しばしば重症化を経験する。興味深い点は、重症肺炎の起炎菌は特殊な菌ではないことが多く、軽症肺炎患者から検出される菌と同じであったり、常在菌であることさえある。この重症化のメカニズムとして、病原体に対する宿主応答の違いが関与していると考えられている。

*Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) はグラム陰性桿菌に分類される細菌で、しばしば重症化を経験するレジオネラ肺炎の起炎菌である (Vergis et al., 2000)。レジオネラ属は鞭毛を伴う細胞内寄生菌であり、細胞表面に発現する Toll-like receptors (TLRs) や細胞内に存在する NOD-like receptors (NLRs) といったセンサーの役割をする多数のタンパクと相互作用を起こす (Delbridge and O’Riordan, 2007; Miao et al., 2007; Palusinska-Szyszk and Janczarek 2010)。レジオネラ感染はしばしばこれらのタンパクを介したシグナル伝達系の過剰な活性化とそれに続く過剰な炎症性サイトカインの分泌を引き起こし、気管支や肺胞上皮、血管内皮を傷害する。レジオネラ自体の毒性に加えて、菌・宿主間の相互作用が *L. pneumophila* による肺炎をより重症化させうる。

肺に感染した *L. pneumophila* は主に肺胞マクロファージ内で増殖する。マクロファージはサイトカインネットワークを介した炎症や宿主防御の中心的役割を担っている細胞である (Gordon and Martinez, 2010)。従って、*L. pneumophila* 肺炎において、マクロファージのレジオネラに対する反応が重症度を決定する主要な因子であることが推測される。

Sequestosome1/A170/p62 (SQSTM1) は p56lck の SH2 ドメインに対するリガンドとして同定された細胞内タンパクである (Joung et al., 1996)。マウスの SQSTM1 である A170 はマクロファージでストレス応答により発現する細胞内タンパクとして最初に同定された (Ishii et al., 1999)。SQSTM1 は現在では多機能タンパクとして知られ、細胞の生死や環境応答に関わる様々なシグナルを調節するハブのような役割を担っていると考えられている (Komatsu et al., 2012)。

遺伝子改変マウスを用いた研究から、SQSTM1 は骨のリモデリングや肥満、癌化などを含む様々な細胞活動において重要な役割を担っていることが明らかにされている (Duran et al., 2004; Rodriguez et al., 2006; Duran et al., 2008)。しかしながら、病原体に対する宿主応答における役割は分かっていない。今回我々は、SQSTM1 欠損マウス (SQSTM1<sup>-/-</sup>) およびそのマクロファージを用いて *L. pneumophila* 感染モデルを作成することを通して、病原体

に対する宿主応答における SQSTM1 の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

# 方法

## 細菌

*L. pneumophila* (ATCC#33152) は American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、一度培養した物を分注して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。実験用の細菌液は凍結ストックからエーゼで BCYE  $\alpha$  液体培地へ接種後 3 日間前培養をした後、500ul を 50ml の BYE  $\alpha$  液体培地へ接種し 2 日間本培養を行った物を使用した。菌濃度は、 $\text{OD}_{600}$  の吸光度を用いて推定し、段階希釈した菌液を BCYE  $\alpha$  寒天培地に接種して形成されたコロニー数 (CFU) をカウントして確定する方法を用い、菌液調製のたびに測定した。マウスおよびマクロファージへの投与液として、生食を用いて最終濃度  $2 \times 10^9/\text{ml}$  として使用した。熱処理による不活化は菌液を  $80^{\circ}\text{C}$  で 20 分加熱することで調製し、不活化を BCYE  $\alpha$  寒天培地を用いて確認した。

## マウス

C57BL/6 WT マウスは日本チャールス・リバーより購入した。SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスは前述の通り作成した (Okada et al., 2009)。実験には 7-9 週齢のマウスを使用した。マウスは筑波大学動物資源センター内の SPF 環境で飼育した。すべての動物実験は筑波大学のガイドラインに則って実施した。

## *L. pneumophila* または LPS、Silica への暴露

マウスはイソフルランを用いた全身麻酔の後、ヒト医療用の耳鏡を用いて 22 ゲージ静脈留置針の外筒をマウスの気管内に留置し、 $1 \times 10^7/\text{body}$  の *L. pneumophila* もしくは 100ug/body の LPS, 250ug/body の Silica を合計 50ul の生食に懸濁させて気管内に投与した。コントロール用のマウスには 50ul の生食を同様に投与した。病理検体は 10% のホルマリンで  $4^{\circ}\text{C}$ 、一晚以上固定した後、パラフィンで包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。全肺中の菌量を測定するために、肺を滅菌済み生食中でホモジネートし、段階希釈したものを BCYE  $\alpha$  寒天培地に接種して CFU をカウントした。

## BAL

安楽死させたマウスの気管へ 20 ゲージ静脈留置針を留置し、接続した延長チューブを通して 20cm の高さから肺が完全に広がるまで約 1ml の生食を注入後、すべての洗浄液を回収した。この作業を 1 匹あたり合計 5 回繰り返した。初回の回収液の上清を ELISA に

使用し、すべての回収液から得られた細胞数を血球計算板で計数した後、Diff-Quick 染色をして血球分画を計数した。

### マクロファージ

腹腔内に 4% チオグリコレートを 2ml 注入し、3-4 日後に 10%FBS と抗生剤 (100U/ml penicillin G, 100ug/ml streptomycin) 入りの RPMI1640 培地 5ml で 2 回洗浄して回収液を得た後、 $1 \times 10^6$  cells/ml に調製したものを培養プレート上に接種し、2 時間後に接着した細胞をマクロファージとして実験に使用した。細胞は培養開始から実験まで一晩おいてから使用した。*L. pneumophila* 感染実験には 10%FBS 入り RPMI1640 培地に *L. pneumophila* を MOI 10 となるように調製し、投与後 500g で 5 分間遠心を行い、1 時間培養して感染を成立させた後、滅菌 PBS(-) で 3 回洗浄して非感染の菌を除去し、規定の時刻にサンプリングを行った。感染細胞数は細胞を破壊した溶液を段階希釈したものを BCYE  $\alpha$  寒天培地に接種し、3 日後に CFU をカウントして決定した。マクロファージ生存率については CytoTox96 Non-Reactive Cytotoxicity Assay (G1780, Promega) を用いて測定した。熱処理により不活化した菌は MOI 10 または 100 で用い、フラジェリン (tlrl-pstfla, InvivoGen) は 100 ng/ml で、3-MA (M9281, Sigma) は 5 mM の濃度でそれぞれ用いた。NLRP3 インフラマソーム刺激実験では、マクロファージを 100ng/ml の LPS で 4-16 時間刺激してプライミングを行った後、PBS(-) で洗浄後に 1mM の ATP (A2383, Sigma)、4uM の nigericin (N7143, Sigma)、200ug/ul の Silica (S5505, Sigma) のいずれかを加えて 4-6 時間刺激し、上清と細胞を回収して実験に使用した。

### トランスフェクション

WT マウスマクロファージから得た NLRP3 もしくは IPAF の cDNA をテンプレートにして PCR で増幅した ORF を pFLAG-CMV2 expression vector (E7398, Sigma) のそれぞれ HindIII/ClaI もしくは ClaI/SalI サイトへサブクローニングした。同様に、SQSTM1 についても pAcGFP1-C1 expression vector (632470, Clontech) の EcoRI/SalI サイトへサブクローニングした。塩基配列は ABI3130 を用いてシークエンスの確認を行った。FuGENE HD (E2311, Promega) を用いてサブクローニングした pFLAG-NLRP3 ベクターもしくは pFLAG-IPAF ベクターを AcGFP1-SQSTM1 ベクターと共に 293T 細胞にトランスフェクションさせ、24 時間後に細胞を回収して実験に使用した。

## 定量的 RT-PCR

マクロファージ内の RNA を RNeasy Mini Kit (74104, QIAGEN) を用いて回収し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301, TOYOBO) を用いて逆転写して cDNA を得た。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (QPS-201, TOYOBO) を用いてリアルタイム PCR 用のサンプルを調製し、ABI7500 Fast (Applied Biosystems) を用いて検出した。プライマー配列は Massachusetts General Hospital Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) から得た。用いたプライマー配列の Primer Bank ID は次の通りである：IL-1 $\beta$ , #118130747c1; TNF- $\alpha$ , #133892368c3; I $\kappa$ B $\alpha$ , #6754840a1; NQO-1, #161621259c1; HO-1, #6754212a1.

## 共免疫沈降・イムノブロッティング

全細胞抽出液は Laemmli バッファーにて調製した。細胞質分画は 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1x Complete protease inhibitor cocktail (Roche) を混合したバッファーで細胞を溶解し 10 分間氷冷した後、14000g で 3 分間遠心した上清を用いた。核分画の調製は、この遠心後の沈殿に 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 0.4 KIU aprotinin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を混合したバッファーを加えて超音波処理を施し 30 分間氷冷した後、14000g で 15 分間遠心した上清して得た。培養上清中のタンパク質は 10%v/v TCA を加えて 30 分間氷冷し、15000g で 15 分間遠心して沈殿させ、氷冷した 100% アセトンで 2 回洗浄を行った後、乾燥させて調製した。共免疫沈降は Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (143.21D, Invitrogen) と次の抗体を用いて実施した：Anti-FLAG M2 (F1804, Sigma), Anti-GFP (632592, Clontech), Anti-SQSTM1 (PM066, MBL)。各サンプルは Laemmli バッファーを加えて 5 分間沸騰水中で煮沸し、15% もしくは 5-20% の SDS ポリアクリルゲルを用いて電気泳動し、PVDF 膜に転写した後、次の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った：Anti-NLRP3 (MAB7578), Anti-IPAF (06-1125), Anti-FLAG M5 (F4042, Sigma), Anti-GFP (632592, Clontech), Anti-ACTB (BMR00270, Bio Matrix Research), Anti-LC3B (2775, CST), Anti-ASC/TMS1 (4628, CST), Anti-IL-1 $\beta$  (8689, CST), Anti-NF $\kappa$ B p65 (sc-372, Santa Cruz), Anti-Nrf2 (sc-13032, Santa Cruz), and Anti-LaminB (sc-6217, Santa Cruz)。

## ELISA

培養上清中もしくは BALF 中における IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の濃度測定には Quantikine Mouse Immunoassay Kit (IL-1 $\beta$ , MLB00c; TNF- $\alpha$ , MTA00B, R&D) を用いた。同様に IL-18



については Mouse IL-18 ELISA Kit (7625, MBL) を用いた。

### **Caspase-1 活性の測定**

*L. pneumophila* 感染マクロファージ培養上清中の caspase-1 活性の測定には Caspase-1 Fluorometric Assay (BF12100, R&D) を用いた。

### **統計処理**

データは平均 ± 標準誤差で表した。データの解析にはスチューデントの t 検定を用いた。生存曲線の検定には Kaplan-Meire 法と log-rank 検定を用いた。有意水準には  $p < 0.05$  を用いた。

## 結果

### *L. pneumophila* 感染 SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ培養上清中の炎症性サイトカイン

*L. pneumophila* は主にマクロファージに感染するため、まず、WT と SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスより採取したマクロファージを用いて *L. pneumophila* に対する反応を検討した。C57BL/6 系統のマウスは *L. pneumophila* に対して自然耐性を持っていると報告されているが (Saito et al., 2001)、*L. pneumophila* が WT および SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージへ感染し、緩やかに増殖することを確認した。*L. pneumophila* 感染後のマクロファージの生存率と菌の増殖については WT と SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ間で差を認めなかった (図 1 A-B)。

*L. pneumophila* に感染したマクロファージ内では、主にインフラマソーム活性化を介した IL-1 $\beta$  産生の亢進や pyroptosis を介した細胞死、NF $\kappa$ B の活性化を介した TNF- $\alpha$  を中心とする炎症性サイトカイン産生の亢進が起こり感染防御につながっていくことが分かっている (Massis et al., 2011)。そこで、IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  について、WT と SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ培養上清中の濃度を検討した。その結果、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  のいずれも両群で *L. pneumophila* 感染に伴って培養上清中への分泌が亢進していた。しかし、IL-1 $\beta$  は SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージで WT と比較して有意に分泌が亢進していたのに対し、TNF- $\alpha$  は両群間で差を認めなかった (図 2 A-B)。

### *L. pneumophila* 感染 SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ中の NF- $\kappa$ B 活性

SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ培養上清中で *L. pneumophila* 感染後に IL-1 $\beta$  の分泌が有意に亢進していた結果を受けて、SQSTM1 と IL-1 $\beta$  産生の関連性について検討した。IL-1 $\beta$  は前駆体である proIL-1 $\beta$  として合成され、細胞内でプロセッシングを受けた後に成熟体である IL-1 $\beta$  として細胞外に分泌される。その前駆体である proIL-1 $\beta$  の合成は転写レベルで NF- $\kappa$ B によって調節されている (Cogswell et al. 1994)。SQSTM1 が K63 E3 ユビキチンリガーゼである TRAF6 を介して NF- $\kappa$ B を活性化させるという報告がある。そこで、SQSTM1 が *L. pneumophila* 感染後にマクロファージ内の NF- $\kappa$ B 活性化に関与するかどうかを検討した。NF- $\kappa$ B p65 の核内移行、NF- $\kappa$ B の活性化に伴い発現が亢進するインヒビターである I $\kappa$ B の発現レベル、NF- $\kappa$ B の主要なターゲット遺伝子である TNF- $\alpha$  の発現レベルを検討したが、いずれにおいても WT と SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ間で差は見られなかった (図 3 A-C)。

*L. pneumophila* 感染後のマクロファージにおいて、ProIL-1 $\beta$  は細胞外からの TLRs、特に

TLR2 と TLR5 の刺激に伴う NF- $\kappa$ B 活性化により産生が亢進するとされるため、TLR を介した IL-1  $\beta$  産生についても検討した。熱により不活化した *L. pneumophila* は TLR2 経路を刺激し (Girard et al., 2003)、鞭毛の構成成分であるフラジェリンは TLR5 経路を刺激する (Miao et al., 2007; Steiner 2007) ため、これらを用いてマクロファージを刺激した。熱処理後の *L. pneumophila* による刺激では、刺激後にマクロファージ培養上清中の IL-1  $\beta$  レベルはわずかに増加するものの、WT と SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ間で差は見られなかった (図 4 A)。フラジェリンによる刺激では、マクロファージ培養上清中への IL-1  $\beta$  分泌さえ見られなかった (図 4 A)。

以上の結果から、我々の実験系においては、SQSTM1 は *L. pneumophila* 感染に伴う NF- $\kappa$ B 活性化と proIL-1  $\beta$  合成に影響を与えていないと考えられた。

### ***L. pneumophila* 感染 SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージにおけるインフラマソーム活性化**

前駆体である proIL-1  $\beta$  は caspase-1 によるプロセッシングを受けて IL-1  $\beta$  へと成熟する。その caspase-1 は前駆体である pro-caspase-1 として合成されるがそのままでは活性を持たず、NLRs と apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain(ASC) と共にインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を形成し、インフラマソーム内で活性化され機能を発揮する。従って、インフラマソーム複合体形成すなわち活性化が IL-1  $\beta$ , IL-18 を含む IL-1  $\beta$  ファミリータンパクの成熟化に直結している (Schroder and Tschopp, 2010)。SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージでは、*L. pneumophila* 感染後に WT マクロファージと比較して培養上清中の IL-1  $\beta$  が有意に増加していたが、IL-18 においても同様に有意な増加が見られており (図 5 A)、このことは SQSTM1 とインフラマソームとの関連性を疑わせる結果であった。また、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージでは、WT マクロファージと比較して、培養上清中の活性型 caspase-1 である caspase-1 p20 の増加と、細胞内における caspase-1 活性の有意な上昇が認められ (図 5 B, C)、これらの結果から、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージにおける IL-1  $\beta$  分泌増加は、インフラマソームの活性化に伴うものであることが示唆された。よって、SQSTM1 は *L. pneumophila* 感染に伴うインフラマソーム活性化を抑制していると考えられた。

### **SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージにおける NLRP3 インフラマソーム活性化**

インフラマソームはその構成タンパクである NLR の違いにより複数あることが分かっている。代表的なものとしては、NLRP1 インフラマソーム、NLRP3/NALP3 (NLRP3) イ

ンフラマソーム、NLRC4/IPAF (IPAF) インフラマソーム、AIM2 インフラマソームが挙げられる (Schroder and Tschopp, 2010)。これらの中で *L. pneumophila* 感染時には IPAF インフラマソームが活性化されることが知られており、そのメカニズムとしては NLR である IPAF がフラジェリンを認識することによる (Zhao et al., 2010) ことが分かっている。他方で、NLRP3 インフラマソームの刺激因子は多岐にわたり、ペプチドグリカン、細菌の核酸などの PAMPs、ATP やシリカといった化合物などが知られている (Schroder and Tschopp, 2010)。これまでの結果から、*L. pneumophila* 感染に伴い SQSTM1 がインフラマソーム、特にこの場合 IPAF インフラマソームの活性化の抑制を示唆するデータが得られたが、複数あるインフラマソームは互いに共通する部分が多いことから、SQSTM1 は他のインフラマソームについても同様の機能を持っている可能性が考えられた。そこで NLRP3 インフラマソームについて、活性化因子である ATP とシリカでマクロファージを刺激し、その活性化について検証を行った。インフラマソーム活性化に伴う IL-1  $\beta$  分泌は、前提として前駆体である proIL-1  $\beta$  の産生亢進と蓄積が必要でありこれをプライミングと呼ぶが、ATP やシリカはプライミングを起こすことができず、逆にプライミング単独では IL-1  $\beta$  の分泌は起こらない。プライミングは低濃度の LPS 刺激で起こすことができ、TLR4 - NF- $\kappa$ B 経路の活性化を通して達成される。今回我々はプライミングに LPS を使用したが、LPS 単独では IL-1  $\beta$  の転写亢進は見られたが、IL-1  $\beta$  の分泌はなされないことを確認した (図 6A)。ちなみに *L. pneumophila* はプライミングと IPAF インフラマソームの活性化を同時に起こすことができる。LPS 刺激によるプライミングに引き続いて、NLRP3 インフラマソーム活性化因子である ATP にて刺激を行ったところ、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ培養上清中の IL-1  $\beta$  濃度は WT マクロファージと比較して有意に高値を示した (図 6A)。一方、IL-1  $\beta$  の mRNA レベルは両群で差を認めず (図 6B)、IL-1  $\beta$  の成熟過程に差があることが示唆された。NLRP3 インフラマソーム活性化因子であるが、ATP とは異なる経路で活性化を起こすことが知られている Silica についても同様の検討を行ったところ、やはり SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ培養上清中の IL-1  $\beta$  濃度及び Caspase-1 活性は WT マクロファージと比較して有意に高値を示していた (図 6C-D)。

以上の結果から、SQSTM1 は IPAF インフラマソームのみならず NLRP3 インフラマソーム活性化に対しても抑制的に働いていると考えられた。

### SQSTM1 とインフラマソーム構成タンパクの相互作用

SQSTM1 がインフラマソーム活性化に抑制的に作用していることが明らかになった

め、次にそのメカニズムに迫るべく実験を行った。SQSTM1がインフラマソーム構成タンパクと直接結合することで作用を発揮している可能性について、共免疫沈降を用いて解析を行った。始めに293T細胞を用いた強制発現系により実験を行った。FLAGタグを付加したNLRP3またはIPAFを、GFPタグを付加したSQSTM1と共に293T細胞内で強制発現させた上で、それぞれ抗FLAG抗体もしくは抗GFP抗体を用いて共免疫沈降したところ、NLRP3及びIPAF共にSQSTM1と共免疫沈降された(図7A, B)。次に、WTマクロファージを用いて内因性タンパクにおいても同様に実験を行った結果、インフラマソーム刺激後のWTマクロファージにおいてもNLRP3はSQSTM1により共免疫沈降された(図7C)。一方、他のインフラマソーム構成タンパクであるASC, caspase-1について、WTマクロファージを用いた共免疫沈降実験を行ったが、両者共にSQSTM1とは共免疫沈降されなかった(図7C)。これらの結果はSQSTM1がNLRP3, IPAFと直接結合し機能を発揮しうることを示唆すると考えられた。SQSTM1が同じくNLRであるNOD2のNACHTドメインに結合するという研究報告が最近なされ(Park et al., 2013)、これは我々の仮説を支持していると考えられた。

活性化刺激によりIPAFインフラマソームはNACHTドメインを介して重合し、caspase-1を活性化させることが分かっている(Davies et al., 2011)。我々の結果でも、*L. pneumophila*感染後のSQSTM1<sup>-/-</sup>マクロファージにおいて、WTマクロファージと比較して単量体のIPAFが減少し、二量体のIPAFが増加しており(図7D)、共免疫沈降の結果と合わせると、SQSTM1はNLRP3, IPAFといったNLRの恐らくNACHTドメインに直接結合し、重合を阻害することでインフラマソームの活性化を抑制していると考えられた。

### ***L. pneumophila* 感染 SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスにおける肺炎症**

これまでの実験でマクロファージレベルでの*L. pneumophila*感染もしくはATP、Silica刺激に対するSQSTM1の反応を明らかにした。そこで、マウスレベルでのSQSTM1の役割を明らかにするために、WTおよびSQSTM1<sup>-/-</sup>マウスに*L. pneumophila*を気管内に投与し肺炎モデルを作成した。

感染後の生存率および全肺中の菌量については、両群で明らかな差は見られなかった(図8A, B)。肺病理像では、両群共に肺胞隔壁の浮腫性肥厚と肺胞内への滲出、および両部位への炎症細胞浸潤という急性肺障害に合致する所見が得られたが、その程度がSQSTM1<sup>-/-</sup>マウスでWTマウスと比較してより顕著であった(図9A)。また、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好中球数がSQSTM1<sup>-/-</sup>マウスでWTマウスと比較して有意に増加して

おり (図 9 B)、IL-1  $\beta$ 濃度も同様に SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスで有意な増加が見られた (図 9 C)。

### NLRP3 インフラマソーム活性化刺激による SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスの肺炎症

*L. pneumophila* 肺炎において、SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスレベルでも SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージで見られた反応と同様の傾向であったことから、SQSTM1 のインフラマソーム活性化抑制が個体レベルにも影響を与えている可能性が考えられた。そこで、マウス個体の NLRP3 インフラマソームを活性化するとされる、LPS もしくは Silica を気管内に投与してその影響について検討した。その結果、LPS 及び Silica のいずれにおいても肺病理像で急性肺障害に合致する所見が得られ、その程度は SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスで WT より顕著であった (図 10 A, C)。また、BALF 中の好中球数も SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスで WT と比較して有意に増加が見られた (図 10 B, D)。

以上の結果から、SQSTM1 がインフラマソームの活性化を抑え、急性肺障害に対しても抑制的に作用している可能性が示唆された。

### *L. pneumophila* 感染 SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージとオートファジー

*L. pneumophila* はマクロファージ中でオートファゴソームに似た空胞内で増殖する (Dubuisson and Swanson, 2006; Isberg et al., 2009)。また、SQSTM1 はオートファゴソーム形成に必須であるタンパクの LC3/Atg8 と相互作用をする (Komatsu et al., 2007; Komatsu et al., 2009)。そこで *L. pneumophila* 感染後のマクロファージ内で SQSTM1 がオートファジーに与える影響について検討した。オートファゴソーム形成のマーカールとされる LC3-II/LC3-I 比を *L. pneumophila* を感染させた WT および SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージで見たとところ、感染前後で変化は認められず、また、両群間での差も見られなかった (図 11 A)。この結果から、我々の実験系においてはオートファジーの *L. pneumophila* に対する影響は小さいと考えられた。

### *L. pneumophila* 感染 SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ中の Nrf2 活性

Nrf2 は酸化ストレス防御に重要な役割を担う転写因子で、SQSTM1 は Nrf2 を抑制している Keap1 と競合することで Nrf2 の活性化を起こすことが明らかになっている (Komatsu et al., 2010)。そこで *L. pneumophila* 感染後のマクロファージ内で SQSTM1 が Nrf2 の活性化に与える影響について検討した。Nrf2 の核内移行、Nrf2 のターゲットである NQO-1 と HO-1 の転写活性について、*L. pneumophila* を感染させた WT および SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロ

ファージで検討した。Nrf2 の核内移行は *L. pneumophila* 感染前後でほとんど変化せず、また、両群間でも差は見られなかった (図 12 A)。また、NQO-1 および HO-1 の転写活性についても両群間で明らかな差は見られなかった (図 12 B-C)。これらの結果から、Nrf2 は *L. pneumophila* 感染後のマクロファージにおいてはほとんど活性化されず、また、SQSTM1 も影響しないことが示唆された。

## 考察

今回の実験で我々は、SQSTM1 の欠損がマクロファージからの IL-1  $\beta$ 分泌を有意に促進させることを明らかにした。SQSTM1 の欠損はマクロファージからの IL-18 分泌および caspase-1 の活性化についても有意に促進させることを示し、これらのことから、SQSTM1 の欠損がインフラマソームを活性化させることを明らかにした。SQSTM1 はインフラマソーム構成因子である NLRs、ASC、caspase-1 の中で、NLRs と直接結合することを SQSTM1 と IPAF および NLRP3 との共免疫沈降実験によって証明した。そして、SQSTM1 のインフラマソーム活性化抑制は、SQSTM1 が NLRs と直接結合することにより NLRs の重合化を阻害し、インフラマソーム複合体形成を抑制することで起こしている可能性を示した。また、SQSTM1 を欠損したマウスでは、*L. pneumophila* や LPS、Silica により重篤な肺障害が引き起こされることを示した。

以上の結果から SQSTM1 は、インフラマソーム活性化にネガティブフィードバックをかけることにより肺の過剰な炎症を抑制し、病原体や異物に対する炎症反応全体をコントロールする一翼を担っていると考えられた。本来宿主防御に働くべき炎症が過剰になり、バランスの破綻から重篤化を招く SIRS や ARDS といった病態においては、炎症のコントロールが非常に重要である。本研究において SQSTM1 の持つインフラマソーム活性化抑制機能を明らかにしたことは、炎症コントロールが必要な病態に対する新たな治療戦略を提供する意味で意義深いと考えられる。



## 参考文献

- Bar, I., P.J. Guns, J. Metallo, D. Cammarata, F. Wilkin, J.M. Boeynants, H. Bult, and B. Robaye. 2008. Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 74: 777-784.
- Cogswell, J.P., M.M. Godlevski, G.B. Wisely, W.C. Clay, L.M. Leesnitzer, J.P. Ways, and J.G. Gray. 1994. NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J. Immunol.* 153: 712-723.
- Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting. 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 707-735.
- Delbridge, L.M., and M.X. O'Riordan. 2007. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 10-16.
- Dubuisson, J.F., and M.S. Swanson. 2006. Mouse infection by *Legionella*, a model to analyze autophagy. *Autophagy* 2: 179-182.
- Duran, A., M. Serrano, M. Leitges, J.M. Flores, S. Picard, J.P. Brown, J. Moscat, and M.T. Diaz-Meco. 2004. The atypical PKCinteracting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev. Cell* 6: 303-309.
- Duran, A., J.F. Linares, A.S. Galvez, K. Wikenheiser, J.M. Flores, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2008. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13: 343-354.
- Girard, R., T. Pedron, S. Uematsu, V. Balloy, M. Chignard, S. Akira, and R. Chaby. 2003. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell Sci.* 116(Pt 2): 293-302.
- Gordon, S., and F.O. Martinez. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
- Isberg, R.R., T. O'Connor, and M. Heidtman. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cozy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 13-24.
- Ishii, T., K. Itoh, H. Sato, and S. Bannai. 1999. Oxidative stress-inducible proteins in macrophages. *Free Radic. Res.* 31:351-355.
- Joung, I., J.L. Strominger, and J. Shin. 1996. Molecular cloning of a phosphotyrosine- independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5991-5995.
- Komatsu, M. S. Waguri, M. Koike, Y. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, and K. Tanaka. 2007. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163.
- Komatsu, M., H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y.S. Sou, I. Ueno,

- A. Sakamoto, K.I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka, and M. Yamamoto. 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12: 213-223.
- Komatsu, M., S. Kageyama, and Y. Ichimura. 2012. p62/SQSTM1/A170: Physiology and pathology. *Pharmacol. Res.* 66: 457-462.
- Liliana M. Massis and Dario S. Zamboni. 2011. Innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Front Microbiol.* 2:109.
- Miao, E.A., E. Andersen-Nissen, S.E. Warren, and A. Aderem. 2007. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 29: 275-288.
- Moscat, J., M.T. Diaz-Meco, A. Albert, and S. Campuzano. 2006. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol. Cell* 23:631-640.
- Okada, K., T. Yanagawa, E. Warabi, K. Yamastu, J. Uwayama, K. Takeda, H. Utsunomiya, H. Yoshida, J. Shoda, and T. Ishii. 2009. The alpha-glucosidase inhibitor acarbose prevents obesity and simple steatosis in sequestosome 1/A170/p62 deficient mice. *Hepatol. Res.* 39: 490-500.
- Palusinska-Szys, M., and M. Janczarek. 2010. Innate immunity to Legionella and toll-like receptors - review. *Folia. Microbiol.* 55:508-514.
- Park, S., S.D. Ha, M. Coleman, S. Meshkibaf, and S.O. Kim. 2013. p62/SQSTM1 enhances NOD2-mediated signaling and cytokine production through stabilizing NOD2 oligomerization. *PLoS ONE* 8: e57138.
- Rodriguez, A., A. Durán, M. Selloum, M.F. Champy, F.J. Diez-Guerra, J.M. Flores, M. Serran, J. Auwerx, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2006. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 3: 211-222.
- Saito, M., H. Kajiwara, H. Miyamoto, and S. Yoshida. 2001. Fate of *Legionella pneumophila* in macrophages of C57BL/6 chronic granulomatous disease mice. *Microbiol. Immunol.* 45: 539-541.
- Sanz, L., M.T. Diaz-Meco, H. Nakano, and J. Moscat. 2000. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* 19: 1576-1586.
- Schroder, K., and J. Tschopp. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
- Seibenhener, M.L., J.R. Babu, T. Geetha, H.C. Wong, N.R. Krishna, and M.W. Wooten. 2004. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell Biol.* 24: 8055-8068.
- Shi, C.S., K. Shenderov, N.N. Huang, J. Kabat, M. Abu-Asab, K.A. Fitzgerald, A. Sher, and J.H. Kehrl. 2012. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1  $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 13: 255-263.
- Steiner, T.S. 2007. How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infect.*

Immun. 75: 545-552.

Vergis, E.N., E.A. Akbas, and V.L. Yu. 2000. Legionella as a cause of severe pneumonia. *Sem. Resp. Crit. Care Med.* 21: 295-304.

Zhao, Y., J. Yang, J. Shi, Y.N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu, and F. Shao. 2010. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477: 596–600.

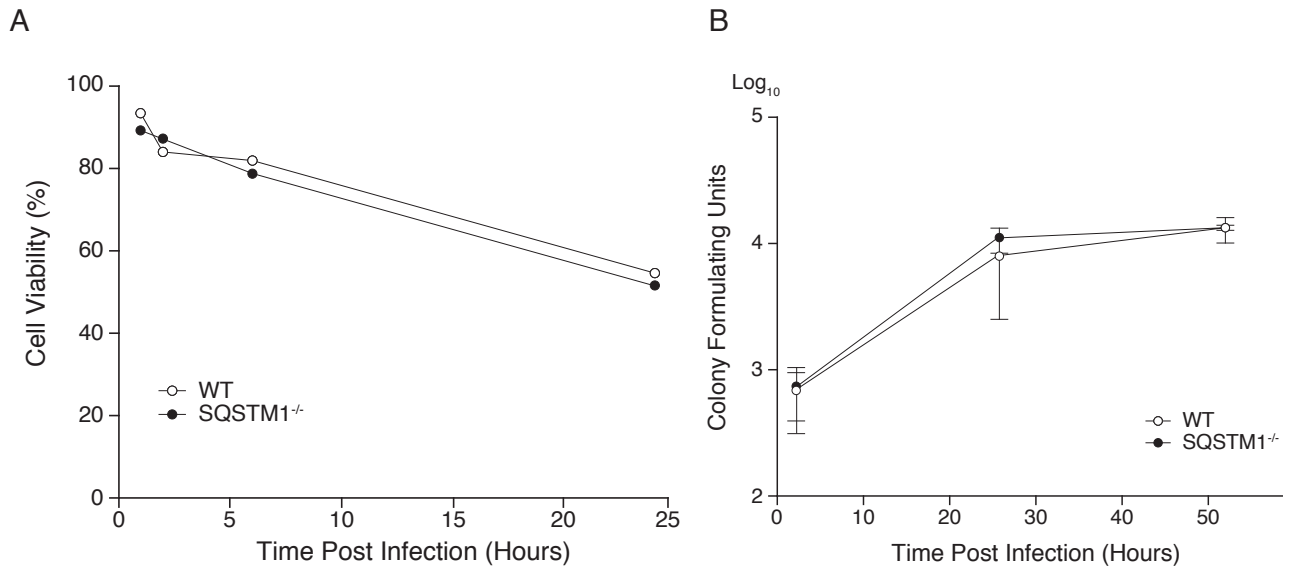


図 1. WT と SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージにおいて *L. pneumophila* 感染後の生存率と菌の増殖のいずれにも差を認めない：WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) における *L. pneumophila* 感染後の (A) マクロファージ生存率と (B) マクロファージ内菌量の変化

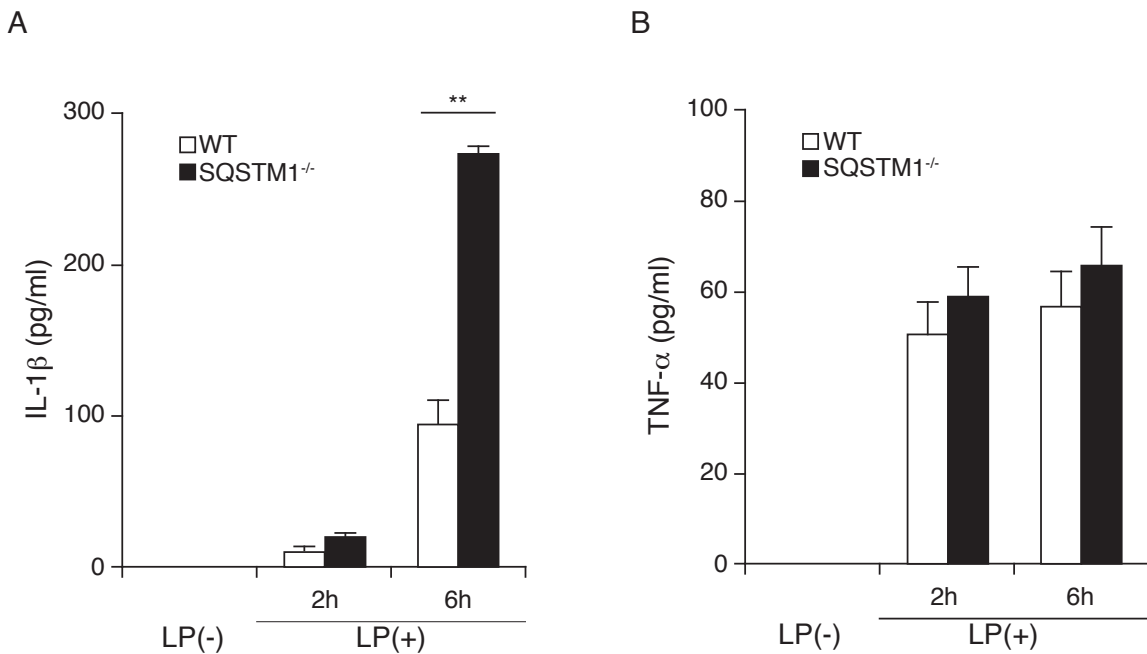
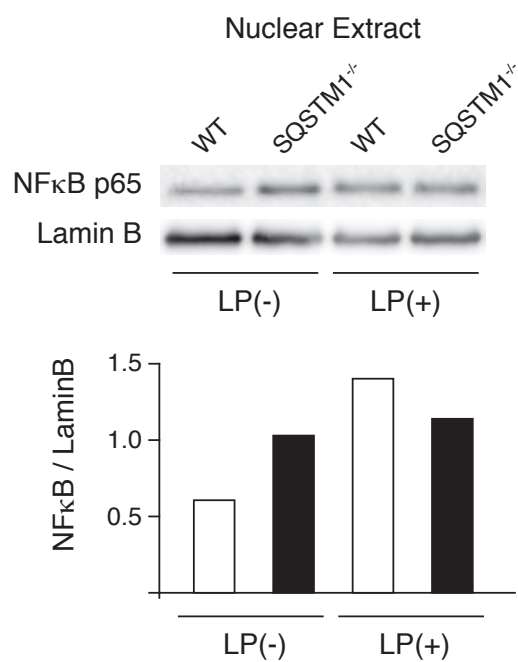
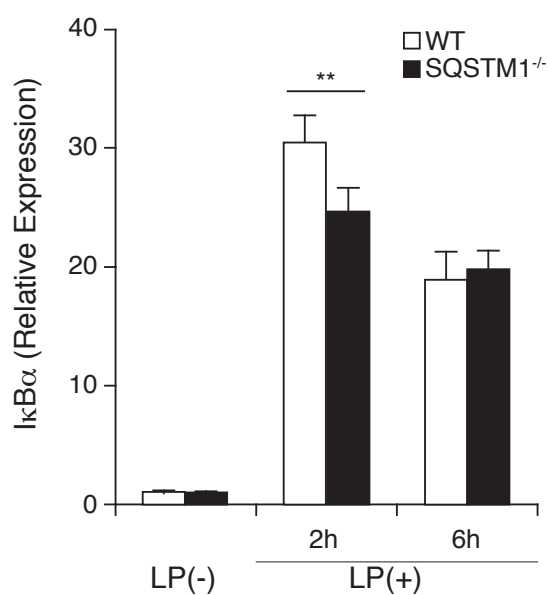


図 2. *L. pneumophila* 感染後マクロファージの IL-1  $\beta$  分泌は SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージで WT マクロファージと比較し亢進しているのに対し、TNF-  $\alpha$  分泌は両群で差を認めない： *L. pneumophila* 感染後の WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) における、培養上清中の (A)IL-1  $\beta$  濃度、(B)TNF-  $\alpha$  濃度

A



B



C

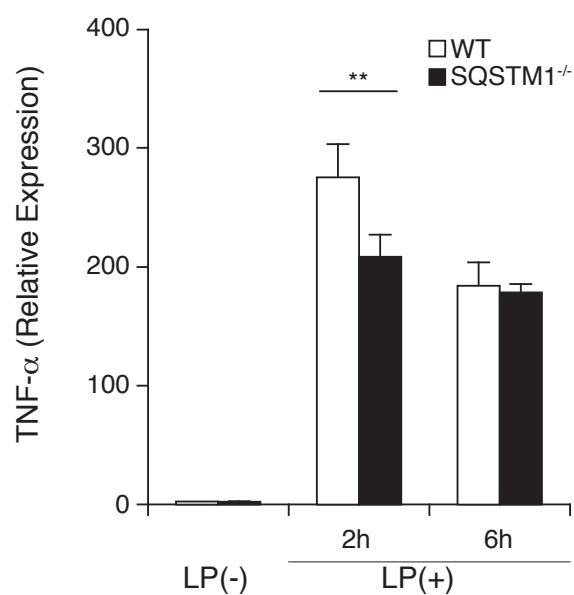


図 3. *L. pneumophila* 感染後の NF- $\kappa$ B 活性は WT マクロファージと SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ間で差を認めない: *L. pneumophila* 感染後の WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) における、(A) 核抽出物内 NF- $\kappa$ B p65 発現と内部標準としての Lamin B 発現に対する比率、細胞内 (B) I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA、(C) TNF- $\alpha$  mRNA の LP(-) WT マクロファージに対する相対発現量

A

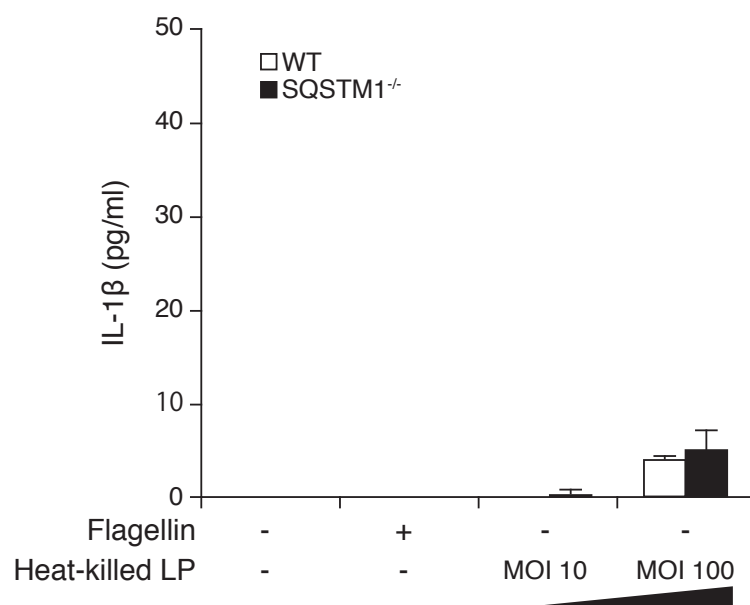


図 4. *L. pneumophila* による TLR 刺激は IL-1  $\beta$  の分泌をほとんど起こさない : (A) TLR2 または TLR5 刺激による WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) 培養上清中の IL-1  $\beta$  濃度

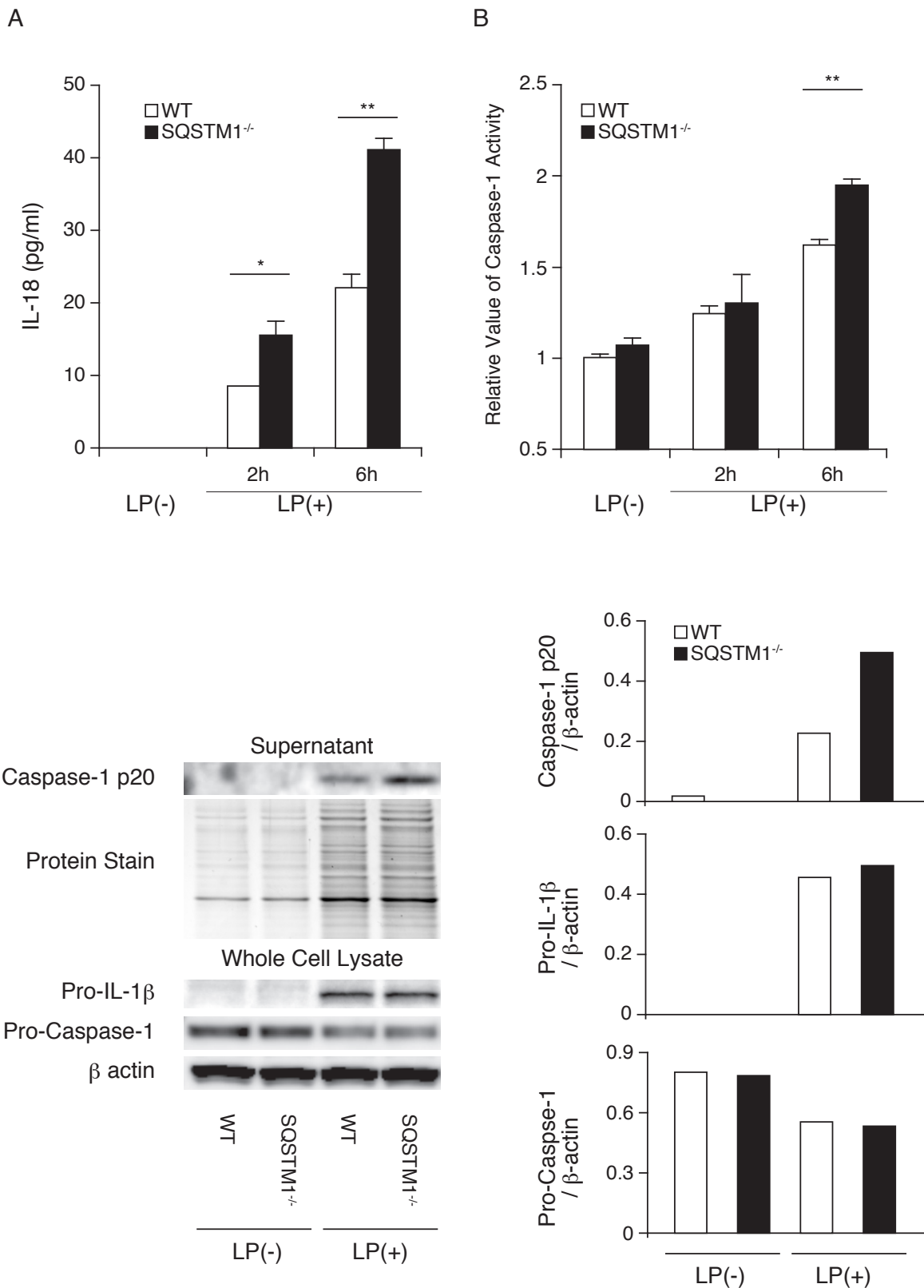


図 5. SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージでは *L. pneumophila* 感染後の caspase-1 活性が亢進している : *L. pneumophila* 感染後の WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) における、(A) 培養上清中の IL-18 濃度、(B)caspase-1 活性、(C) 培養上清中の caspase-1 p20 発現、細胞内の proIL-1β, pro-caspase-1 発現の内部標準としてのβ-actin 発現に対する比率

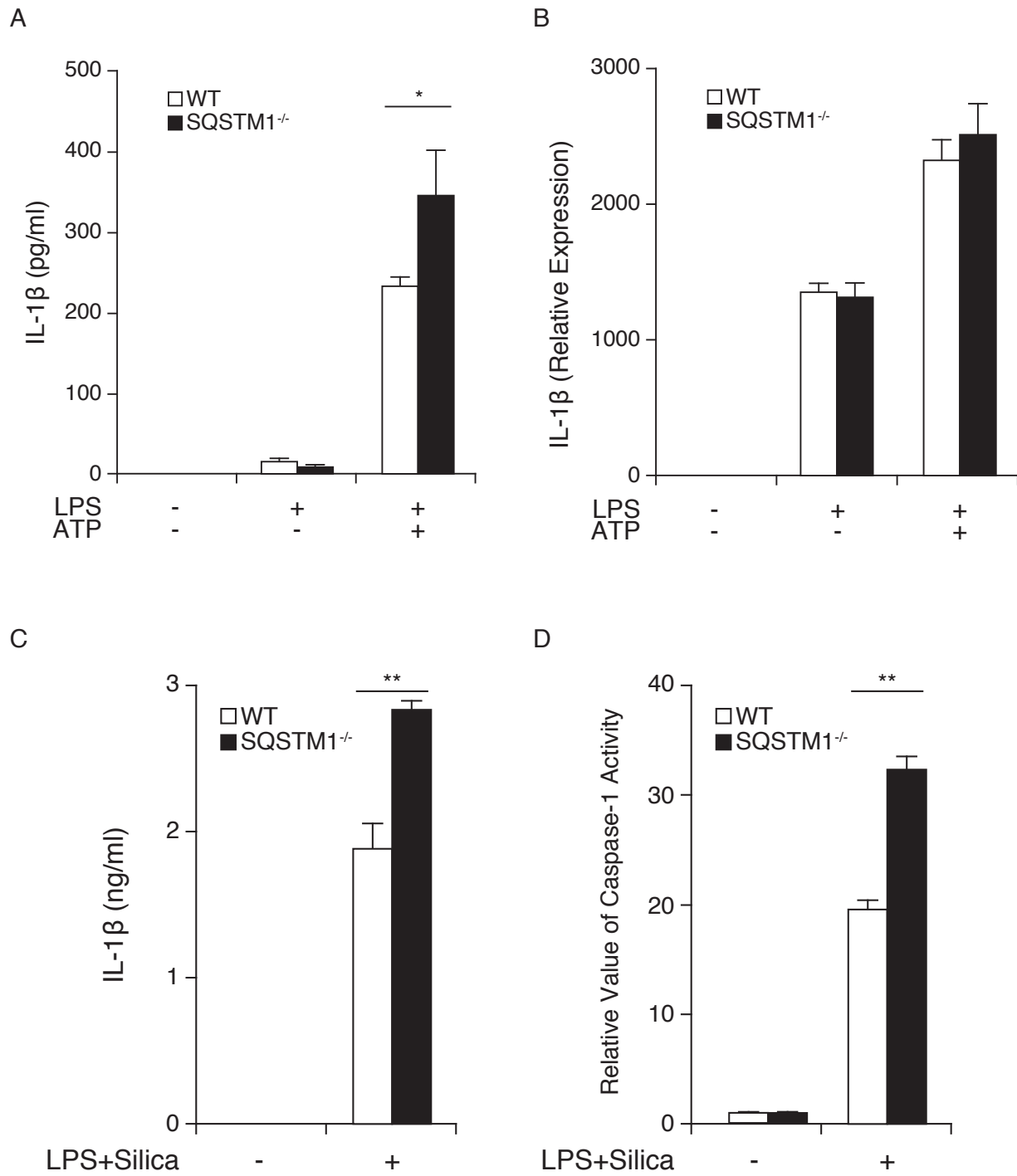


図6. SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージでは NLRP3 インフラマソーム刺激による IL-1 β 分泌が亢進している:(A-B) WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) における LPS±ATP 刺激による (A) 培養上清中の IL-1 β 濃度、(B)IL-1 β mRNA の非刺激 WT マクロファージに対する相対発現量。(C-D) Silica 刺激による WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) 培養中の (C)IL-1 β 濃度及び (D)Caspase-1 活性。



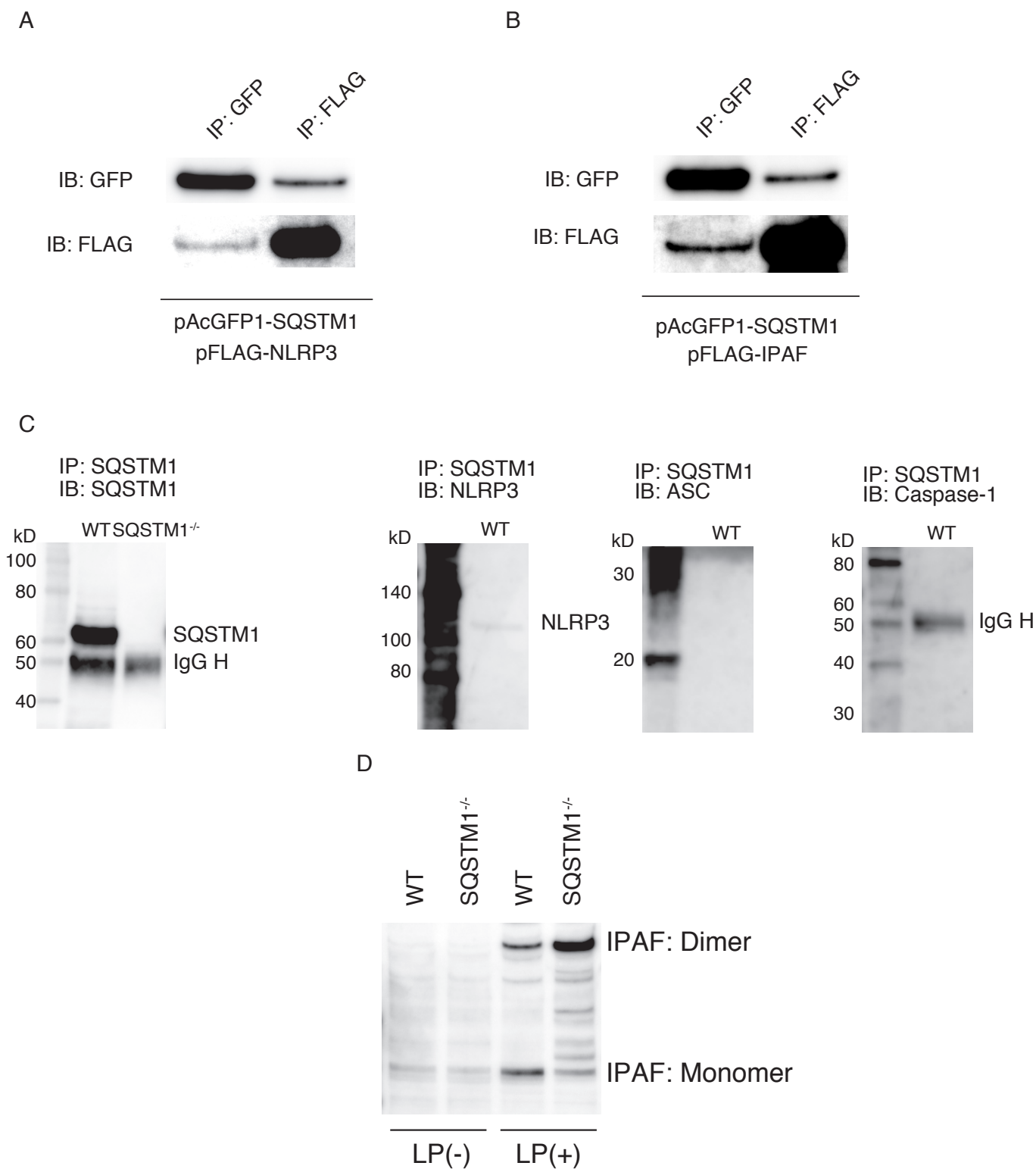


図 7. SQSTM1 は NLRP3、IPAF と直接結合して重合化を阻害し、インフラマソームの活性化を抑制する：(A-B)293T 細胞に過剰発現させた (A)FLAG-NLRP3 または (B)FLAG-IPAF と GFP-SQSTM1 とをお互いに共免疫沈降し、それぞれをイムノプロットした結果。(C)WT マクロファージを LPS+Nigericin により刺激後に SQSTM1 にて共免疫沈降を施行し SQSTM1、NLRP3、ASC、caspase-1 に対してイムノプロットした結果。(D)*L. pneumophila* 感染マクロファージにおいて IPAF に対してイムノプロットした結果。

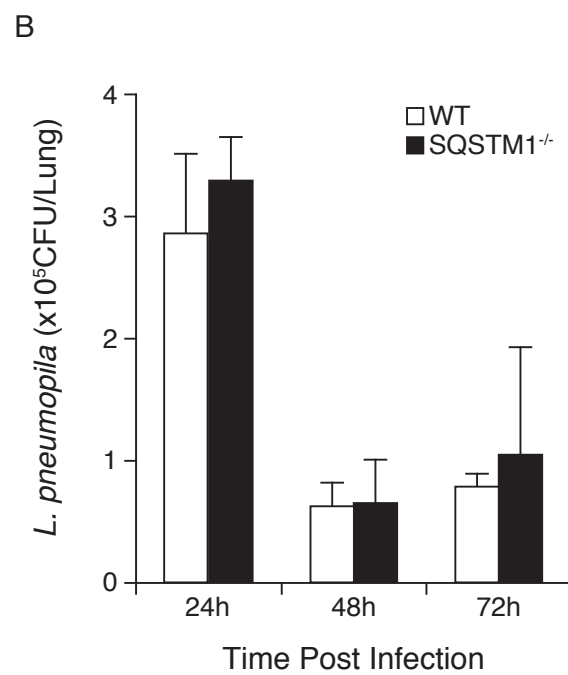
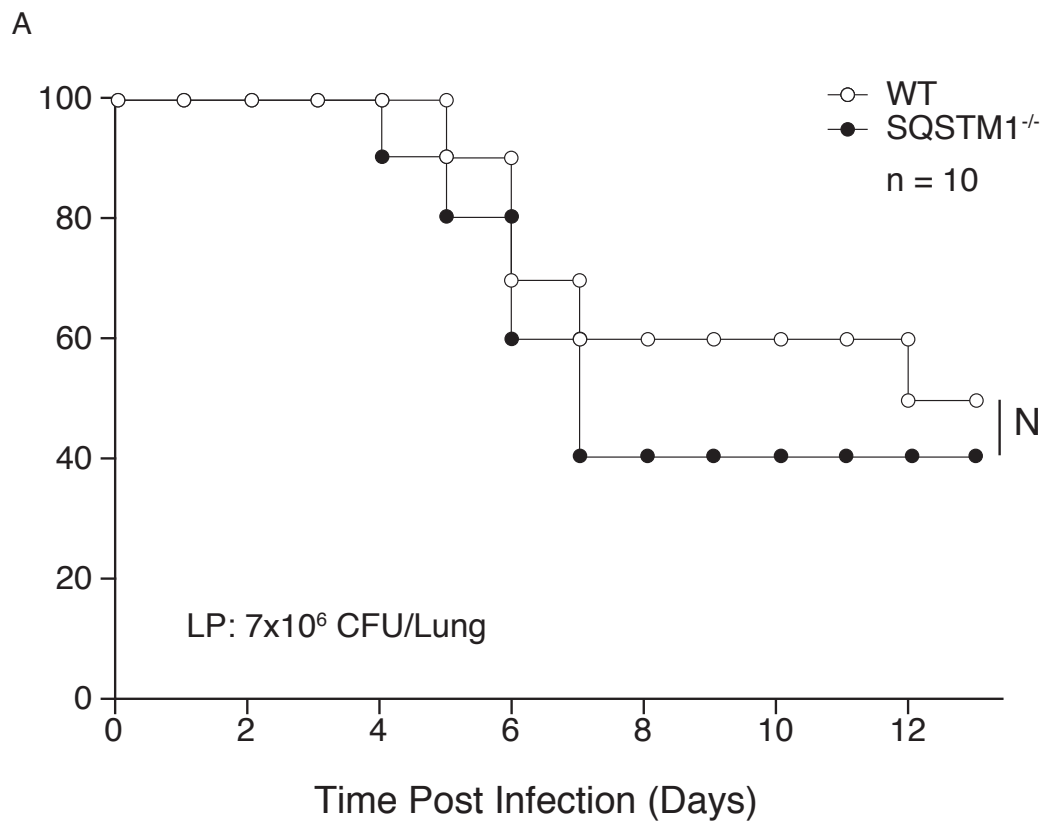
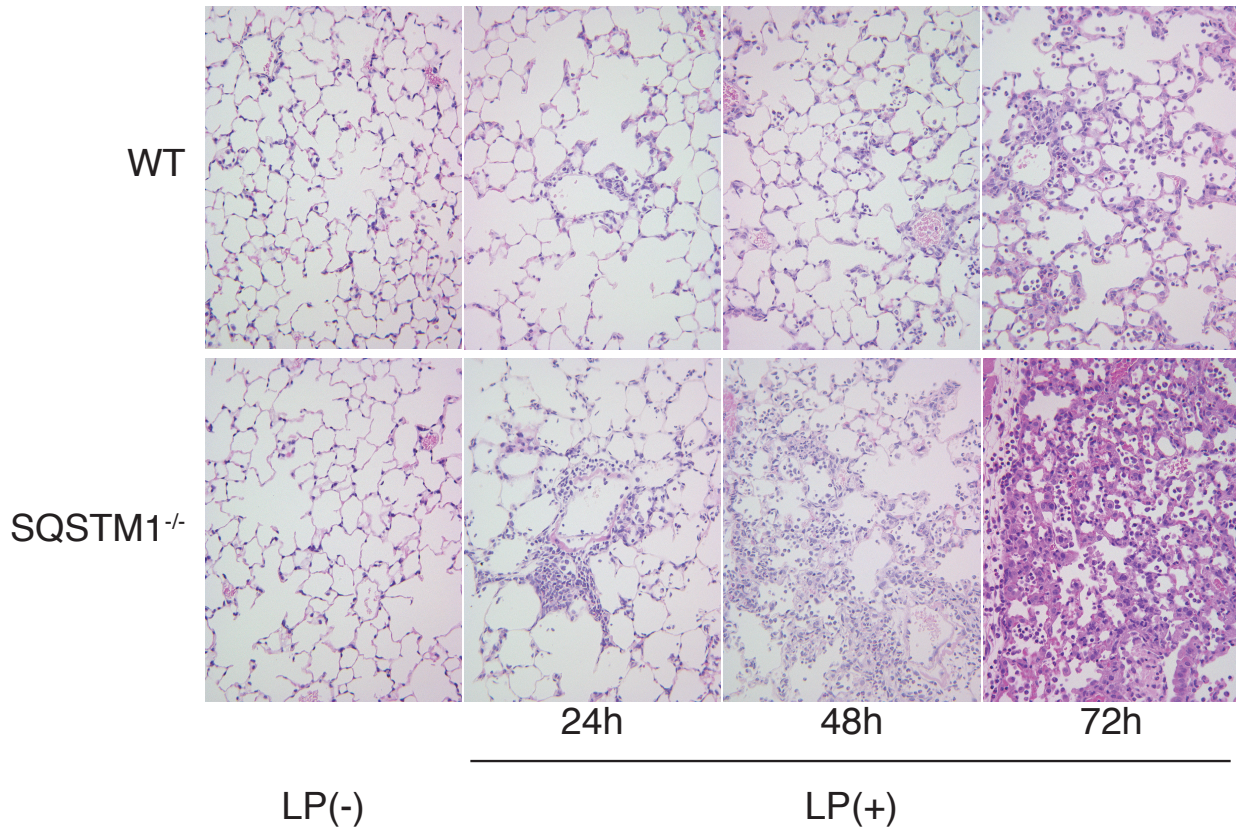
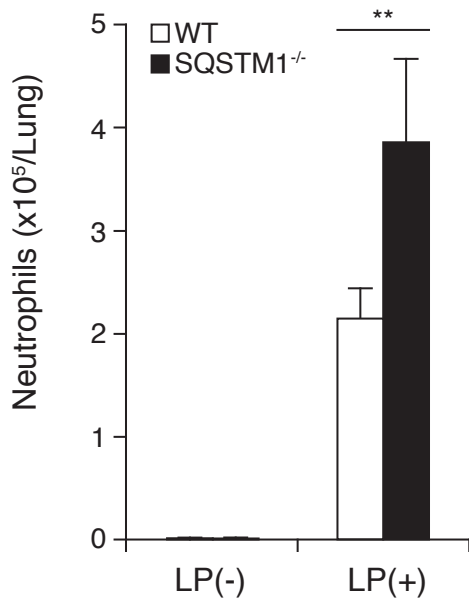


図 8. WT マウスと SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスでは *L. pneumophila* 肺炎後の生存と増殖菌量に差を認めない: *L. pneumophila* 感染後の (A)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス生存率、(B)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス全肺菌量

A



B



C

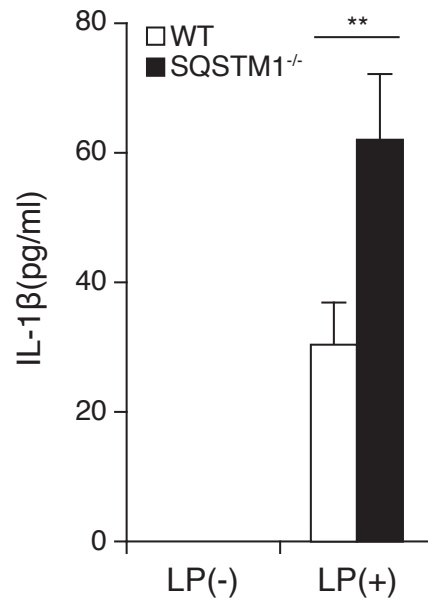


図9. SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスでは *L. pneumophila* 肺炎による好中球性肺炎症の亢進を認める : *L. pneumophila* 感染後の (A)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス肺病理像、(B-C)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の (B) 好中球数、(C)IL-1 β濃度

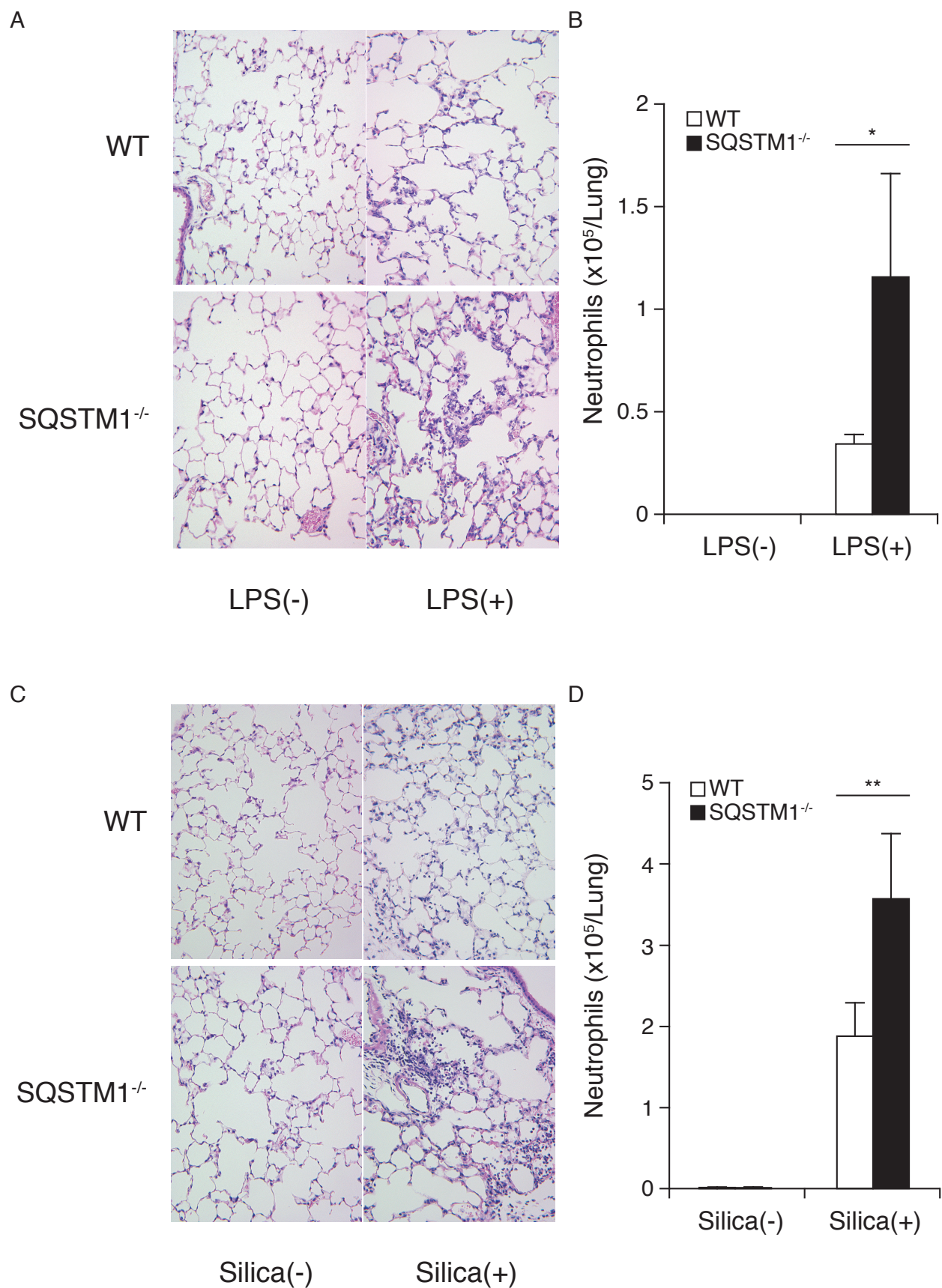


図 10. SQSTM1<sup>-/-</sup> マウスでは LPS または Silica による好中球性肺炎症の亢進を認める：LPS 気管内投与後の (A)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス肺病理像、(B)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球数、Silica 気管内投与後の (C)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス肺病理像、(D)WT マウスおよび SQSTM1<sup>-/-</sup> マウス気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球数

A

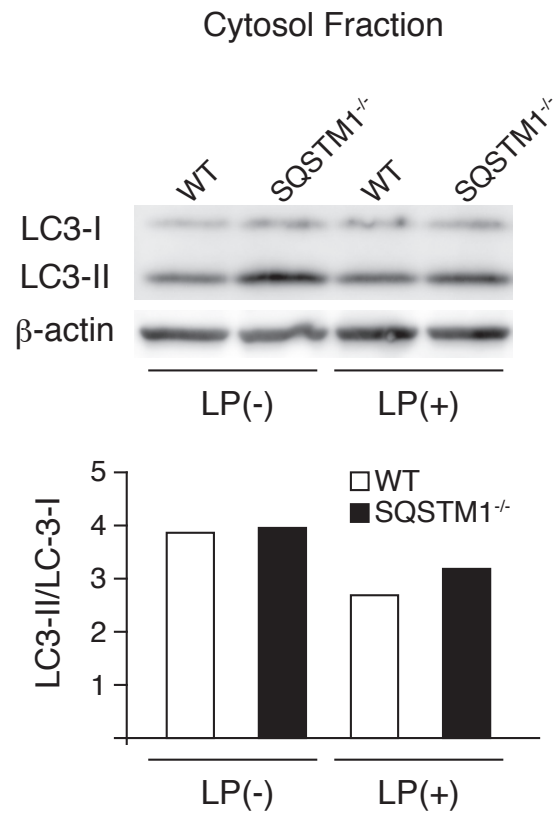


図 11. *L. pneumophila* 感染によるマクロファージ内のオートファジー充進は認めない : (A) *L. pneumophila* 感染あり (LP(+)) なし (LP(-)) における WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) 内の LC3-I 及び LC3-II 発現とその発現量比

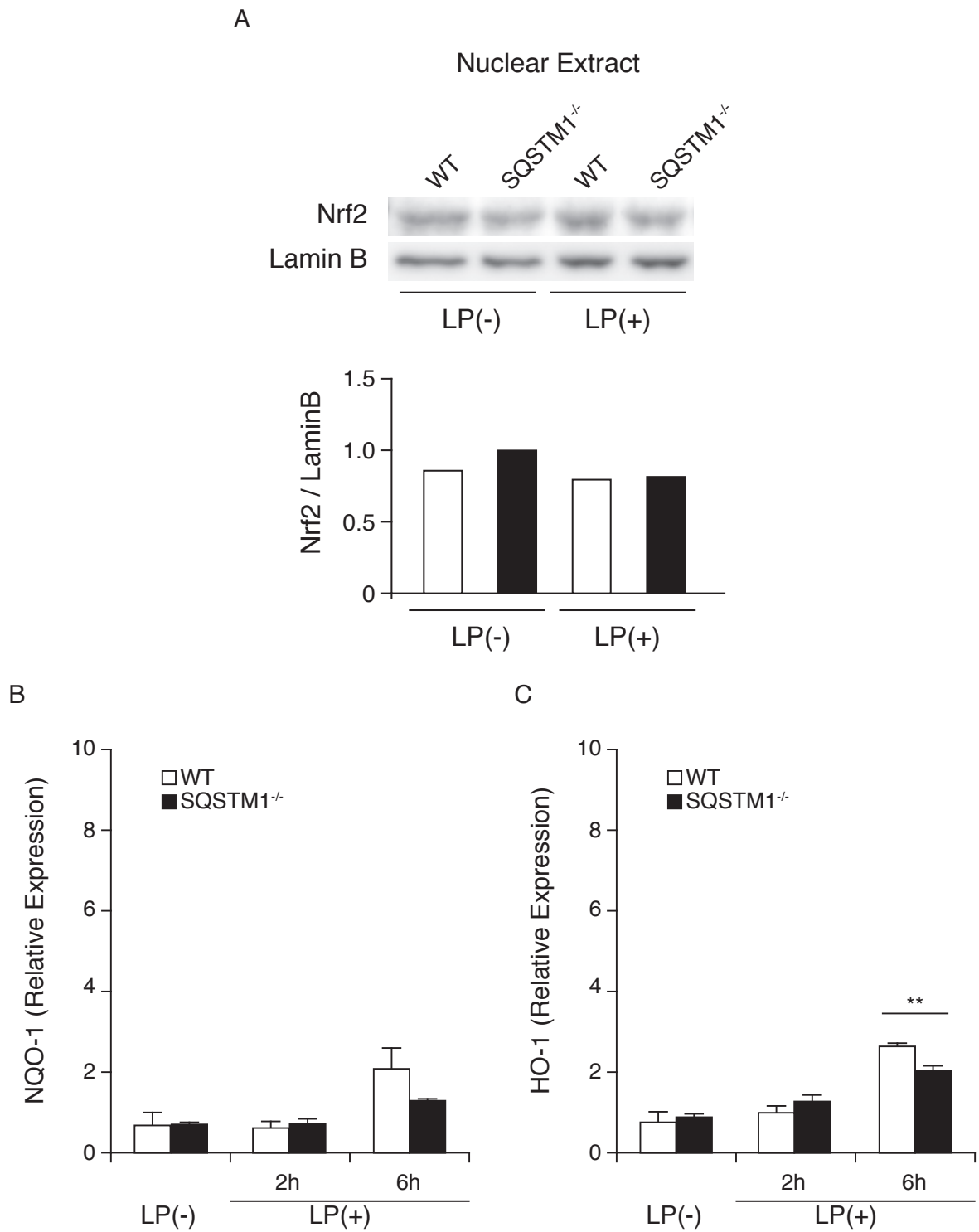


図 12. *L. pneumophila* 感染後の Nrf2 活性は WT マクロファージと SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ間で差を認めない: *L. pneumophila* 感染後の WT マクロファージ (白)、SQSTM1<sup>-/-</sup> マクロファージ (黒) における、(A) 核抽出物の Nrf2 発現及び内部標準としての Lamin B 発現に対する比率、細胞内 (B)NQO-1 mRNA、(C)HO-1 mRNA の LP(-) WT マクロファージに対する相対発現量

## 謝辞

本研究に当たり終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸器内科 檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切な御指導と御示唆を頂きました筑波大学大学院医療医学系石井幸雄教授に深く感謝致します。

研究その他多方面にわたり御指導頂きました筑波大学大学院呼吸器内科大塚盛男教授、筑波大学大学院呼吸器内科坂本透准教授、水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授、ひたちなか社会連携教育センター寺本信嗣教授に深く感謝致します。

また、日々の研究において御援助、御協力を頂きました、森島祐子講師、栗島浩一講師、川口未央講師、本間晋介講師、松野洋輔講師、山本良子講師、斎藤武文医学博士、二宮浩樹医学博士、遠藤健夫医学博士、石川博一医学博士、飯島弘晃医学博士、野村明広医学博士、菊池教大医学博士、原口典博医学博士、山鳥忠宏医学博士、際本拓未医学博士、金子美子医学博士、谷下田雄一医学博士、増子裕典医学博士、阿野哲士医学博士、藤田純一医学博士、大原元医学士、近藤享子医学士、太田恭子医学士、中澤健介医学士、松山政史医学士、谷田貝洋平医学士、塩澤利博医学士、田村智宏医学士に深謝致します。

さらに、実験手技について御指導、御協力を頂いた須藤郁女史、中村貴子女史に心より感謝致します。

最後に、日々の研究、診療を続けていく上で、常に心の支えとなり、温かく励まし続けてくれた家族に感謝したいと思います。